

**ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ФЕЦЮХ АНАСТАСІЯ БОГДАНІВНА

УДК 504:581.1:543.9:662.6

**ФІЗІОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ СТІЙКОСТІ
РОСЛИН *SALIX VIMINALIS* L.
В УМОВАХ ТЕХНОГЕННОГО ЗАБРУДНЕННЯ**

091 – біологія

09 – біологія

подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ А.Б. Фецюх

Науковий керівник: **Терек Ольга Іштванівна** доктор біологічних наук, професор

Львів – 2022

АНОТАЦІЯ

Фецюх А.Б. Фізіологічні аспекти стійкості рослин *Salix viminalis* L. в умовах техногенного забруднення. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» галузі знань 09 «Біологія». Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2022.

В даний час проблема забруднення навколишнього середовища є надзвичайно актуальною. Особливо це стосується техногенно забруднених територій. Прикладом такої території є Стебницьке хвостосховище, яке містить 22 млн тонн соляно-глинистих відходів флотаційного збагачення, утворених внаслідок збагачення мінеральної сировини.

Вивчення захисних механізмів рослин за впливу абіотичних стресорів має велике значення в сучасних умовах розвитку сільського господарства та змін клімату. Стійкість рослин до техногенного забруднення є складною ознакою, яка включає фізіологічні механізми в організмі рослин.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню впливу абіотичного стресу, а саме засолення та важких металів (ВМ) в умовах техногенно забрудненого хвостосховища м. Стебника на морфометричні параметри, антиоксидантну та білок-синтезувальну системи рослин верби прутувидної (*Salix viminalis* L.) та їх фіторемедіаційний потенціал, а також угруповання ендofітних бактерій (ЕБ) коренів *S. viminalis* за впливу ризосферних бактерій *Salicornia europaeae* L. та забруднення хвостосховища м. Стебник.

Метою дисертаційної роботи було оцінити вплив техногенного забруднення на морфометричні та фізіологічні показники *S. viminalis*, а також вивчення складу угруповань ендofітних бактерій коренів рослин в умовах Стебницького хвостосховища.

Основні завдання роботи:

- виявити вплив техногенного забруднення на морфометричні показники та вміст води у органах *S. viminalis* в умовах Стебницького хвостосховища;
- визначити вміст ВМ у рослинному матеріалі та субстраті хвостосховища за умов росту рослин, а також оцінити відповідність вмісту ВМ екологічним нормам;
- визначити склад угруповань ЕБ коренів *S. viminalis* за сумісного впливу техногенного забруднення Стебницького хвостосховища та інокулювання ризосферою *Salicornia europaea* L.;
- дослідити вплив умов хвостосховища на накопичення білків у органах *S. viminalis*;
- встановити інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у тканинах *S. viminalis* за утворенням малонового діальдегіду (МДА);
- дослідити вплив умов хвостосховища на стан окремих компонентів антиоксидантної системи (АОС) рослин – активність каталази (КАТ) (КФ 1.11.1.6) та пероксидази (ПОД) (КФ 1.11.1.7), вміст аскорбінової (АК), дегідроаскорбінової (ДГАК) та дикетогулонової кислот (ДКГК), фенольних сполук, проліну та розчинних цукрів у органах *S. viminalis*.

Для проведення досліджень використовували листки, стебла та корені 30-ти добових *S. viminalis*, вирощених у лабораторних умовах на субстраті із ділянок хвостосховища м.Стебник та 120-ти добових *S. viminalis*, вирощених на території Стебницького хвостосховища у польових умовах. Варіантами досліджень слугували рослини вирощені на субстраті Стебницького хвостосховища із ділянок відновленого біогеоценозу (контроль) та із ділянок, де поширені піонерні глікогалофіти (дослід). Для дослідження ЕБ коренів *S. viminalis*, окрім вище перелічених варіантів, використовували субстрат із найбільш забруднених ділянок Стебницького хвостосховища та ризосферні бактерії *Salicornia europaea* L., рослин, які ростуть на найбільш засолених ділянках даного хвостосховища.

Визначення морфометричних показників проводили на 30 добу росту у лабораторних умовах та на 120-ту – в польових.

На 30-ту добу росту *S. viminalis* досліджено активність АОС та процесів ПОЛ, проаналізовано вміст загальних та стресових білків у органах рослин, виявлено властивість рослин верби прутovidної накопичувати ВМ.

Відбір зразків коренів *S. viminalis* для скринінгу ЕБ було проведено після 90 діб росту рослин у лабораторних умовах.

Аналіз ферментної та неферментної АОС проведено на 120-ту добу росту *S. viminalis* в польових умовах.

У результаті проведених досліджень встановлено, що *S. viminalis* зазнавали стресу в умовах росту на техногенному субстраті Стебницького хвостосховища та проявляли адаптивні реакції. Зокрема виявлено незначне пригнічення ростових параметрів *S. viminalis* за росту на техногенному субстраті Стебницького хвостосховища як у лабораторних, так і у польових умовах вирощування. Визначення інтегрального показника стабільності росту *S. viminalis* показало, що на ділянках відновленого біогеоценозу є умови переходу до стресових умов (від норми до забруднення). Виявлено накопичення води у коренях 30-ти добових рослин у лабораторних умовах та у листках 120-ти добових *S. viminalis* у польових умовах.

Виявлено вплив фіторемедіації рослинами *S. viminalis* на вміст деяких ВМ у субстраті хвостосховища. Виявлено значне зменшення вмісту цинку в дослідному субстраті, порівняно з початковим вмістом, тобто перед вирощуванням рослин. Екологічну інформативність вмісту ВМ оцінювали за еколого-геохімічними коефіцієнтами. Найвищий коефіцієнт концентрації був у кадмію, який значно перевищував середній вміст елемента в орних землях України, та молібдену. Поліелементне забруднення субстрату зі хвостосховища, згідно з індексом забруднення ґрунту (ІЗГ), було однаковим до росту рослин, а після – показник зменшився у досліді. Дослідження біогеохімічної активності рослин підтвердили, що рослини верби мають високу здатність накопичувати ВМ із субстрату хвостосховища м.Стебник. Слід відмітити, що вміст ВМ у субстраті хвостосховища досить значний, однак рослини *S. viminalis* проявили фіторемедіаційні властивості

та стійкість до комплексного стресу засолення та ВМ в умовах Стебницького хвостосховища.

Виконано скринінг ЕБ коренів *S. viminalis* за умов впливу ризосферних бактерій *Salicornia europaea* L. та техногенно забрудненого субстрату хвостосховища м. Стебник. Результати досліджень показали, що різноманітність бактерій у досліджуваних зразках *S. viminalis* з та без додавання ризосфери *S. europaea* відрізнялись не значно. Однак, слід відмітити позитивний ефект ризосферних бактерій *S. europaea* на збільшення відносної кількості бактерій у зразках. У всіх досліджуваних зразках коренів *S. viminalis* на рівні роду найбільше були представлені бактерії *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Rhizobacteriaceae* та *Flavobacterium*. Виявлено роди *Marinobacterium*, *Idiomarina*, *Marinamicrobium* та *Halomonas*, які були представлені у більшій кількості у зразках *S. viminalis*, які росли на субстраті із найбільш забруднених ділянок Стебницького хвостосховища. Виявлено наявність бактерій-поглиначів попередника «стресового» етилену АСС (1-аміноциклопропан-1-карбонової кислоти). За умов додавання ризобактерій *S. europaea*, зміни концентрації АСС були більш виразнішими.

Виявлено накопичення білків у стеблах та коренях 30-ти добових *S. viminalis* за росту на засоленому субстраті із хвостосховища в лабораторних умовах вирощування. В електрофореграмах проаналізованих органів *S. viminalis* виявлено низькомолекулярні поліпептиди із Mr 30, 23, 22, 20, 17, 15, 12, 10 та 8 кДа, вміст яких істотно варіював в залежності від органа рослин. Помічено якісні та кількісні відмінності спектрів низькомолекулярних білків у контрольному та дослідному варіантах, зокрема у органах дослідних *S. viminalis* зміни білків були виразнішими. У коренях *S. viminalis* виявлено низькомолекулярні білки із Mr 19—21 кДа у контрольному та дослідному варіантах, однак за впливу техногенного забруднення їх кількість збільшувалась. Виявлено більший вміст білків із Mr 22 кДа у стеблах дослідних рослин у порівнянні з контрольним варіантом. За стресових умов, у стеблах *S. viminalis* утворювались білки із Mr 17 кДа. У листках дослідних рослин був менший вміст білків із Mr 20—23 кДа у порівнянні із контролем, однак більше білків Mr 10 кДа. Отже, за дії техногенного забруднення в органах рослин *S.*

viminalis накопичувались низькомолекулярні стресові білки, що може бути пов'язано з певними особливостями пристосування рослин.

Встановлено вплив техногенного забруднення на АОС 30-ти добових *S. viminalis*. Виявлено зниження вмісту фенольних сполук за дії стресу, внаслідок адаптації рослин до нових умов та токсичної дії засолення. Отримані дані можна пояснити дефіцитом вологи, який виникає при засоленні. Виявлено зростання вмісту АК, ДАК та ДКГК у листках та коренях *S. viminalis* у порівнянні із контрольними рослинами. У стеблах *S. viminalis* встановлено інтенсивне використання АК та зростання вмісту ДАК та ДКГК відносно контролю. Отримані результати можуть свідчити про пристосування рослин *S. viminalis* до впливу техногенного забруднення. Ферментативна активність 30-ти добових *S. viminalis* була найвищою у листках дослідних рослин, порівняно із контрольними. Відомо, що за росту на забрудненому субстраті спостерігається підвищення загальної пероксидазної активності, що підтверджується отриманими даними. У результаті лабораторних досліджень встановлено накопичення проліну в стеблах і коренях 30-ти добових *S. viminalis* дослідного варіанту, порівняно із контролем. Результати дослідження можна пояснити фізіологічною посухою, яка виникає як наслідок засолення субстрату хвостосховища.

За умов росту в польових умовах Стебницького хвостосховища, 120-ти добові *S. viminalis* були використані для дослідження системи антиоксидантного захисту рослин в умовах техногенного засолення. У стеблах *S. viminalis* виявлено активність пероксидази та накопичення проліну за умов техногенного забруднення. Однак у коренях спостерігалось підвищення активності каталази. Адаптаційні механізми *S. viminalis* проявлялись у збільшенні кількості спирто- та водорозчинних цукрів у листках та коренях рослин. Отже, збільшення кількості та зміни активності ферментів показали участь АОС в адаптації *S. viminalis* до техногенного забруднення в умовах Стебницького хвостосховища.

Отримані результати дисертаційної роботи засвідчують адаптивні реакції *S. viminalis* в умовах росту на субстраті хвостосховища м. Стебник, які проявлялись у активності антиоксидантних ферментів та збільшення вмісту неферментативних

антиоксидантів. Також виявлено чітке накопичення низькомолекулярних стресових білків порівняно із контрольними рослинами. Важливо відмітити, що *S.viminalis* проявляли фітореMediaційні властивості. Отримані дані стануть відправною точкою для розуміння механізмів адаптації *S.viminalis* до комплексного впливу засолення та ВМ в умовах Стебницького хвостосховища. Вважаємо, що отримані результати у майбутньому дадуть змогу використовувати *S. viminalis* у природоорієнтованих рішеннях та еко-інженерних проектах на техногенно забруднених територіях.

Ключові слова: *Salix viminalis*, хвостосховище, засолення, мінеральні елементи, важкі метали, фітореMediaція, антиоксидантна система, каталаза, пероксидаза, розчинні цукри, фенольні сполуки, аскорбінова кислота, пролін, стресові білки, ендofітні бактерії.

SUMMARY

Fetsiukh A. Physiological Aspects of *Salix viminalis* L. Tolerance to Technogenic Pollution Conditions. – Qualifying scientific work with manuscript rights.

Ph.D. thesis, field of knowledge 09 "Biology", speciality 091 "Biology". Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, 2022.

Currently, the problem of environmental pollution is extremely significant. This especially applies to technogenically polluted areas. An example of such an area is the Stebnyk tailing, which contains 22 million tons of salt-clay waste from flotation enrichment, formed as a result of enrichment of mineral raw materials.

The study of the protective mechanisms of plants under the influence of abiotic stressors is of great importance in the modern conditions of agricultural development and climate change. Plant tolerance to technogenic pollution is a complex trait that involves physiological mechanisms in the plant organism.

This thesis is devoted to the study of the effect of abiotic stress, namely salinity and heavy metals (HM), in the conditions of the technogenically polluted tailing in Stebnyk on the morphometric parameters, antioxidants and protein profile of willow plants (*Salix viminalis* L.), and their phytoremediation potential as well as the community of endophytic bacteria (EB) in *S. viminalis* roots under the influence of rhizospheric bacteria of *Salicornia europaeae* L. and pollution of Stebnyk tailing.

The aim of the investigation was to evaluate the nature of the impact of technogenic pollution on the morphometric and physiological parameters of *S. viminalis*, as well as to examine the composition of endophytic bacteria of plant roots under the Stebnyk tailing conditions.

The main tasks of the thesis:

- to reveal the influence of technogenic pollution on the morphometric parameters and water content in organs of *S. viminalis* under Stebnyk tailing conditions;
- to determine the content of HM in *S. viminalis* organs and substrate of the tailing after plant growth, as well as to assess the compliance of HM to ecological norms;

- to determine the community composition of endophytic bacteria of *S. viminalis* roots under the combined influence of technogenic pollution of the Stebnyk tailing and rhizosphere bacteria of *Salicornia europaea* L.;

- to investigate the influence of tailing conditions on the accumulation of proteins in *S. viminalis* organs;

- to establish the intensity of lipid peroxidation in *S. viminalis* tissues based on the formation of malondialdehyde (MDA);

- to investigate the influence of tailing conditions on some components of the antioxidative system (AOS) of plants – the activity of catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) and peroxidase (POD) (EC 1.11.1.7), the content of ascorbic (AsA), dehydroascorbic (DHA), and diketogulonic acids (DKG), phenolic compounds, proline, and soluble sugars in *S. viminalis* organs.

Leaves, stems, and roots of *S. viminalis* after 30 and 120 days of growth in a greenhouse on substrate from the Stebnyk tailing, and in the field conditions of the Stebnyk tailing respectively were used for the research. For our research, we used plants grown on Stebnyk tailing substrate from areas of restored biogeocenosis (control) and where pioneer glycohalophytes are common (experiment). To study the EB of *S. viminalis* roots, in addition to the variants listed above, we used substrate from the most polluted areas of the Stebnyk tailing and rhizospheric bacteria of *Salicornia europaea* L., plants that grow on the most saline areas of the Stebnyk tailing.

Determination of morphometric parameters was carried out after 30 days of growth in a greenhouse and after 120 days of growth under field conditions.

The activity of the antioxidative system and lipid peroxidation processes in organs of *S. viminalis* after 30 days of growth was investigated; the content of common and stress proteins in plant organs was analyzed; the ability of basket willow to accumulate heavy metals was revealed.

Selection of *S. viminalis* root samples for screening of EB was carried out after 90 days of plant growth in a greenhouse.

Analysis of the enzymatic and non-enzymatic antioxidants was carried out after 120 days of growth of *S. viminalis* under field conditions.

It was established that *S. viminalis* was stressed under growth conditions on the technogenically polluted substrate of the Stebnyk tailing and showed adaptive reactions. In particular, a slight suppression of the growth parameters of *S. viminalis* during growth on the Stebnyk tailing was found both under laboratory and field conditions. The determination of the integral indicator of developmental stability of *S. viminalis* showed that conditions of transition to stressful (from normal to pollution) exist on the area of restored biogeocenosis. Water accumulation was detected in the roots of 30 day-old plants in greenhouse conditions and the leaves of 120-day old *S. viminalis* under field conditions.

A positive effect of *S. viminalis* growth on the content of some HM in the substrate of the tailing was found. A significant decrease in the content of zinc in the experimental substrate was revealed, compared to the initial content before plant growth. The ecological informativeness of the HM content was assessed by ecological-geochemical coefficients. The highest coefficient of the concentration was for cadmium, which significantly exceeded the average content of the element in arable lands of Ukraine, and molybdenum. Polyelement pollution of the tailing substrate according to the soil pollution index (SPI), was the same before the growth of plants, but after plant growth, the indicator was decreased in the experiment. Studies of the biogeochemical activity of plants have confirmed that willow plants have a high ability to accumulate HM from the substrate of the Stebnyk tailing. It should be noted that the content of HM in the substrate of the tailing is significant, however, *S. viminalis* showed phytoremediation properties and resistance to the complex stress of salinity and HM under the Stebnyk tailing conditions.

Screening of the EB of *S. viminalis* roots was performed under the conditions of exposure to the technogenically polluted substrate of the Stebnyk and rhizosphere bacteria of *Salicornia europaea* L. The research results showed that the diversity of endophytic bacteria in *S. viminalis* samples with and without the supplementation of *S. europaea* rhizosphere did not have a significant difference. However, a positive effect of rhizosphere bacteria of *S. europaea* on EB amount was established. In root samples of *S. viminalis*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Rhizobacteriaceae*, and *Flavobacterium* were the most represented at the genus level. It should be noted that such genera as *Marinobacterium*, *Idiomarina*, *Marinamicrobium*, and *Halomonas* were represented in

greater numbers in the roots samples of *S. viminalis*, which grew on the substrate from the most polluted areas of the Stebnyk tailing. ACC-utilizing bacteria were found. Changes in ACC concentration were more distinct in samples that were supplemented with rhizosphere bacteria of *S. europeae*.

Accumulation of proteins in the stems and roots of 30-days old *S. viminalis* during growth on technogenic saline substrate from Stebnyk tailings under greenhouse conditions was revealed. Low molecular weight polypeptides with Mr 30, 23, 22, 20, 17, 15, 12, 10, and 8 kDa were found in the electrophoregrams of the analyzed proteins in organs of *S. viminalis*. The content of proteins varied significantly depending on the plant organ. Qualitative and quantitative differences in the spectra of low molecular weight proteins were observed between the control and experimental variants, in particular, in the organs of the experimental *S. viminalis*, protein changes were more significant. Proteins with Mr 19-21 kDa were detected in the control and experimental variants in *S. viminalis* roots, but their number increased under stress conditions. Higher content of proteins with Mr 22 kDa was found in the stems of the experimental plants compared to the control variant. Proteins with Mr 17 kDa were found in the stems of *S. viminalis* under stress conditions. Lower content of proteins with Mr 20-23 kDa and more proteins with Mr 10 kDa was found in the leaves of plants under stress conditions, compared to the control. Therefore, low molecular weight stress proteins accumulated in the organs of *S. viminalis* under technogenic pollution, which may be related to certain features of plant adaptation.

The influence of technogenic pollution on the antioxidative system of 30-day old *S. viminalis* was determined. The content of phenolic compounds was decreased as a result of plant adaptation to new conditions and the toxic effect of the tailing's substrate salinity. The obtained data can be explained by the moisture deficit that occurs under salinity. An increase in the content of AsA, DHA, and DKG in the leaves and roots of *S. viminalis* compared to the control plants was revealed. In the stems of *S. viminalis*, intensive use of AK was established. The content of DHA and DKG was increased relative to the control. The obtained results may indicate the adaptation of *S. viminalis* plants to technogenic pollution. Enzymatic activity of 30-days old *S. viminalis* was the

highest in the leaves of the experimental plants, compared to the control. It is known that growing on polluted substrate showing an increase in total peroxidase activity, which is confirmed by the data we obtained. As a result of laboratory studies, the accumulation of proline in the stems and roots of the 30-days old *S. viminalis* experimental variant was established, compared to the control. The results of the study can be explained by physiological drought, which occurs as a result of substrate salinity.

One hundred and twenty days old *S. viminalis* were used to study the plant antioxidative defense system under Stebnyk tailing field conditions. Peroxidase activity and proline accumulation were detected in the stems of *S. viminalis* under technogenic pollution. However, an increase in catalase activity and the content of soluble sugars was observed in the roots. Therefore, the amount increase and changes in the activity of enzymes showed the participation of the antioxidative system in the adaptation of *S. viminalis* to technogenic pollution under the conditions of the Stebnyk tailing.

The obtained results of the dissertation prove the adaptive reactions of *S. viminalis* under the conditions of the Stebnyk tailing, which were shown in the activity of antioxidative enzymes and an increase in the amount of non-enzymatic antioxidants. A clear accumulation of low molecular weight stress proteins was also detected compared to control plants. Importantly, *S. viminalis* demonstrate phytoremediation properties. The obtained data will be a starting point for understanding the mechanisms of *S. viminalis* adaptation to complex impact of salinity and heavy metals under the conditions of the Stebnyk tailing. We believe that the obtained results will make it possible to use *S. viminalis* in nature-based solutions and eco-engineering projects on technogenically polluted areas in the future.

Key words: *Salix viminalis*, tailing, salinity, mineral elements, heavy metals, phytoremediation, antioxidant system, catalase, peroxidase, soluble sugars, phenolic compounds, ascorbic acid, proline, stress proteins, endophytic bacteria.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Статті, в яких висвітлені основні наукові результати дисертації:

1. **Fetsiukh, A.,** Bunio, L., Patsula, O., Timmusk, S., & Terek, O. (2022). Content of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in *Salix viminalis* L. grown on the Stebnyk tailing. *Acta Agrobotanica*, 75, 1-13. <https://doi.org/10.5586/aa.752> (Scopus).
2. **Фецюх, А. Б.,** Буньо, Л. В., Пацула, О. І., & Терек, О. І. (2020). Вплив засолення на склад білків і вміст проліну в органах рослин *Salix viminalis* L. *Фізіологія рослин і генетика*, 52(5), 412—421. <https://doi.org/10.15407/frg2020.05.412>
3. **Фецюх, А.,** Буньо, Л., Пацула, О., & Терек, О. (2019). Накопичення важких металів рослинами *S. viminalis* за росту на субстраті з Стебницького хвостосховища. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (81), 96-110. <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2019.81.11>
4. **Фецюх, А.,** Буньо, Л., Пацула, О., & Терек, О. (2018). Екологічні проблеми, спричинені розробкою Прикарпатського родовища полімінеральних калійних руд у м. Стебник. *Біологічні студії*, (12, № 2), 157-166. <http://dx.doi.org/10.30970/sbi.1202.537>
5. Пацула, О., **Фецюх, А.,** & Буньо, Л. (2018). Використання *Salix viminalis* L. для фітореMediaції ґрунтів, забруднених важкими металами. *Екологічні науки*, 1(20), 101-106.
6. Буньо, Л. В., **Фецюх, Н.,** Пацула, О. І., & Терек, О. І. (2017). Якість рослинної сировини одержаної з *Salix viminalis* L. вирощеної на засоленому субстраті хвостосховища м. Стебника. *Біологічні студії*, (11, № 3-4), 96-97.

Праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

7. **Фецюх, А.,** & Пацула, О. (2016). Вплив важких металів на морфофізіологічні показники рослин верби прутувидної (*Salix viminalis* L.). *Молодь і поступ біології. Тези доповідей XII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів (Львів, 19-21 квітня 2016 р.)* (С.343-344). Львів: ЛНУ.

8. **Фецюх, А. Б.,** Буньо, Л. В., & Пацула, О. І. (2016). Міцність зв'язку хлорофілу з білково-ліпідним комплексом рослин *Salix viminalis L.* за росту на засоленому субстраті з хвостосховища м. Стебник. *Фізіологія рослин у системі сучасних біологічних знань та наук. Тези доповідей II-го науково-методичного інтернет-семінару (Харків, Україна, 14 грудня 2016 р.)* (С. 32-33). Харків: ХНУ.
9. **Фецюх, А. Б.,** Буньо, Л. В., & Пацула, О.І. (2016). Вміст важких металів у рослин *Salix viminalis L.* за росту на засоленому субстраті з хвостосховища м. Стебник. *Біологія: від молекули до біосфери. Тези доповідей XI Міжнародної наукової конференції (Харків, Україна, 29 листопада – 2 грудня 2016)* (С. 106-107). Харків: ХНУ.
10. **Фецюх, А.,** Библів, Х., Гузар, О., Буньо, Л., & Пацула, О. (2017). Антиоксидантна система рослин *Salix viminalis L.* за росту на засоленому субстраті хвостосховища м. Стебник. *Молодь і поступ біології. Тези доповідей XIII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів (Львів, Україна, 25-27 квітня 2017 р.)* (С. 293-294). Львів: ЛНУ.
11. **Фецюх, А.,** Библів, Х., Гузар, О., Пацула, О., & Буньо, Л. (2017). Водоутримуюча здатність листків рослин *Salix viminalis L.* за росту на засоленому субстраті хвостосховища м. Стебник. *Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/BioScience Advances. Тези доповідей XV Міжнародної наукової конференції молодих вчених (Київ, Україна, 18-21 квітня 2017)* (С. 124-125). Київ: ПАЛИВОДА А.В.
12. **Фецюх, А. Б.,** Буньо, Л. В., & Пацула, О. І. (2017). Вплив сольового забруднення на вміст фенольних сполук в органах *Salix viminalis L.*, вирощених на субстраті з хвостосховища м. Стебник. *Біологія: від молекули до біосфери. Тези доповідей XII Міжнародної конференції молодих науковців (29 листопада – 1 грудня 2017)* (С. 110-111). Харків: ФОП Шаповалова Т. М.
13. **Фецюх, А. Б.,** Буньо, Л. В., & Пацула, О. І. (2017). Прооксидантно-антиоксидантна система у рослин *Salix viminalis L.* за дії сольового забруднення. *International research and practice conference: Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences (Lublin, Poland, December*

27-28, 2017) (pp. 288-291). Lublin: Izdawniciba «Baltija Publishing».

14. **Фецюх, А.,** Буньо, Л., Пацула, О., & Терек, О. (2018). Вплив засолення на вміст аскорбінової кислоти у органах рослин *Salix viminalis* L. *Молодь і поступ біології. Тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів (Львів, 10 – 12 квітня 2018)* (С. 309-310).

15. **Фецюх, А.,** Пацула, О., Буньо, Л., & Терек, О. (2019). Біогеохімічна активність рослин *Salix viminalis* L. за росту на відвалах переробки полімінеральних калійних руд м. Стебник. *Молодь і поступ біології. Тези доповідей XV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів (Львів, 9 – 11 квітня 2019)* (С. 180-181). Львів: ЛНУ.

16. **Фецюх, А.,** Пацула, О., Буньо, Л., & Терек, О. (2020). Роль ризосферних бактерій *Salix* sp. у мобілізації та фітоекстракції мікроелементів на забруднених ґрунтах. *Молодь і поступ біології. Тези доповідей XVI Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів (Львів, 27 – 29 квітня 2020)* (С. 210-211). Львів: ЛНУ.

17. **Фецюх, А.,** & Буньо, Л. (2020). Флуктуаційна асиметрія листків *Salix viminalis* L. в інтактній зоні і зоні техногенного забруднення. *Стан природних ресурсів: перспективи їх збереження та відновлення у контексті сталого розвитку. Тези доповідей IV Міжнародної науково-практичної конференції (Дрогобич, 27–28 жовтня 2020 р.)* (С. 81-83). Дрогобич: ДДПУ.

18. **Фецюх, А.,** Буньо, Л., & Терек, О. (2021). Кінетика росту *Salix viminalis* L. за умов техногенного навантаження. *Актуальні проблеми фізіології рослин і генетики. Тези доповідей Міжнародної наукової конференції (Київ, 17 червня 2021 р.)* (С. 200-202). Київ: Інтерсервіс.

19. **Fetsiukh, A.,** & Timmusk, S. (2021). Phytostabilization of Mine Tailing at Northeastern Outskirts of Stebnyk Region: The Role of Plant-Soil-Microbe Interactions and Extremophilic Microbial Ability to Decontaminate Pollution. Ph.D. students' days Faculty of Food Engineering, Tourism and Environmental Protection (Arad, Romania, November 26, 2021) (P. 12). Arad: Ministry of Education "Aurel Vlaicu" University.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АОС – антиоксидантна система

АК – аскорбінова кислота

АФК – активні форми кисню

БТШ – білки теплового шоку

БХА – показник біогеохімічної активності

ВМ – важкі метали

ГДК – гранично допустима концентрація

ДАК – дегідроаскорбінова кислота

ДКГК – дикетогулонова кислота

ЕБ – ендofітні бактерії

Кс – коефіцієнт концентрації

КАТ – каталаза

Кб – коефіцієнт безпеки

КБН – коефіцієнт біологічного накопичення

КК – кларк концентрації

Н.д. – немає даних

НмБТШ – низькомолекулярні білки теплового шоку

ПОД – пероксидаза

ФА – флуктуаційна асиметрія

ФТ – фактор транслокації

АСС – 1-аміноциклопропан-1-карбонова кислота

АССD – деаміназа 1-аміноциклопропан-1-карбонової кислоти

Mr – молекулярна маса

NMDS – неметричне багатовимірне шкалювання

ОТО – операційна таксономічна одиниця

PGPB – ріст-стимулюючі бактерії

Zc – сумарний показник забруднення

ЗМІСТ

ВСТУП	20
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	28
1.1. Техногенно забруднені території та шляхи їх відновлення.....	28
1.2. Верба прутувидна (<i>Salix viminalis</i> L.) як вид енергетичних рослин та їх фіторе mediaційний потенціал.....	32
1.3. Механізми адаптації рослин до абіотичного стресу.....	34
1.4. Роль мікробіому в адаптації рослин до стресових умов.....	40
РОЗДІЛ 2. УМОВИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	46
2.1. Характеристика досліджуваних рослин <i>S. viminalis</i>	46
2.2. Відбір субстрату та закладання польового дослідження на території хвостосховища м. Стебника.....	46
2.3. Визначення кислотності у субстраті Стебницького хвостосховища.....	48
2.4. Визначення водорозчинних іонів у субстраті Стебницького хвостосховища.....	48
2.5. Визначення ВМ у субстраті та рослинному матеріалі.....	50
2.6. Вирощування <i>S. viminalis</i> у лабораторних умовах.....	51
2.7. Визначення морфометричних показників.....	53
2.8. Визначення флуктуаційної асиметрії листових пластинок.....	53
2.9. Визначення вмісту білка за Лоурі.....	55
2.10. Хроматографічне розділення низькомолекулярних білків.....	55
2.11. Оцінка ефективності поглинання ВМ рослинами.....	56
2.12. Екологічна оцінка навантаження субстрату важкими металами.....	57
2.13. Визначення вмісту проліну.....	58
2.14. Визначення вмісту аскорбінової, дегідроаскорбінової та дикетогулонової кислот.....	59
2.15. Визначення вмісту малонового диальдегіду як показника активності процесів ПОЛ.....	60
2.16. Визначення активності каталази (КФ 1.11.1.6).....	61
2.17. Визначення активності пероксидази (КФ 1.11.1.7).....	62

2.18. Визначення вмісту фенольних сполук.....	62
2.19. Визначення вмісту спирто- та водорозчинних цукрів спектрофотометричним методом.....	63
2.20. Екстракція ДНК та секвенування Illumina MiSeq.....	64
2.21. Виділення бактерій та якісна оцінка активності АСС-дезамінази.....	66
2.22. Нінгідринний метод скринінгу бактерій-поглиначів АСС за допомогою 96-лункового ПЛР-планшету.....	66
2.23. Статистично-математичне опрацювання результатів досліджень.....	67
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ	69
3.1. Морфометричні показники рослин <i>S. viminalis</i> за росту на субстраті хвостосховища м. Стебник.....	69
3.2. Вміст водорозчинних іонів у субстраті Стебницького хвостосховища....	77
3.3. Вміст ВМ у субстраті Стебницького хвостосховища та їх акумуляція в органах <i>S. viminalis</i>	78
3.4. Екологічна оцінка вмісту ВМ у субстраті та в органах <i>S. viminalis</i> за росту на субстраті Стебницького хвостосховища.....	88
3.5. Скринінг ендofітних бактерій <i>S. viminalis</i> в умовах Стебницького хвостосховища.....	94
3.6. Визначення АСС-поглинаючих ендofітних бактерій коренів <i>S. viminalis</i> за умов вирощування на техногенному субстраті хвостосховища.....	103
3.7. Накопичення білків у органах <i>S. viminalis</i> за росту на субстраті Стебницького хвостосховища.....	106
3.8. Активація процесів ПОЛ у рослинних тканинах <i>S. viminalis</i> за утворенням МДА.....	111
3.9. Вміст фенольних сполук в органах <i>S. viminalis</i> за росту на субстраті хвостосховища.....	113

3.10. Вміст аскорбінової, дегідроаскорбінової та дикетогулонової кислот у органах <i>S. viminalis</i> за умов росту на субстраті Стебницького хвостосховища.....	116
3.11. Активність каталази та пероксидази в органах <i>S. viminalis</i> за росту на субстраті Стебницького хвостосховища.....	120
3.12. Вміст водо- та спирторозчинних цукрів у органах <i>S. viminalis</i> за росту на субстраті хвостосховища м. Стебник.....	125
3.13. Вміст проліну в органах рослин <i>S. viminalis</i> за росту на субстраті хвостосховища м. Стебник.....	127
РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	131
ВИСНОВКИ.....	141
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	144
Додаток.....	180

ВСТУП

Актуальність теми. Однією з найважливіших і найактуальніших серед проблем забруднення навколишнього середовища є техногенне забруднення значних територій. Прикладом такої території є Стебницьке хвостосховище, яке містить 22 млн тонн твердої фази соляно-глинистих відходів флотаційного збагачення, утворених внаслідок збагачення мінеральної сировини (Снітинський та ін., 2013). У контексті цієї проблеми важливим є вивчення впливу абіотичного стресу на фізіологічні аспекти стійкості рослин та перерозподіл ВМ між ґрунтом і рослинами для з'ясування фіторемедіаційних властивостей останніх.

Відомо, що *Salix* spp. є перспективними рослинами з високим приростом біомаси та здатністю накопичувати метали, поряд із цим рослини характеризуються адаптацією до стресових факторів навколишнього середовища, подальшого пом'якшення несприятливих факторів зміни клімату та забруднення ґрунту (Сао et al., 2022). На сьогоднішній день, *Salix viminalis* L. вважається безумовним лідером в біоенергетиці. Рослини використовуються як сировина для виробництва твердого палива. Тому дуже часто в літературі зустрічається ще одна назва – верба енергетична (Борщук, 2022).

В умовах розвитку сільського господарства, кліматичних змін планети та продуктової кризи, вивчення механізмів сольового стресу рослин набуває все більшого значення. Реакція рослин на дію високих концентрацій солей складна та комплексна, вона включає велику кількість чітко скоординованих процесів. Вплив на рослини надмірних концентрацій солей призводить до осмотичного стресу та створює іонний дисбаланс внаслідок накопичення токсичних іонів Cl^- та особливо Na^+ . Сольовий стрес також негативно впливає на мінеральний гомеостаз ряду поживних макроелементів, а саме Ca^{2+} та K^+ (Ісаєнков, 2012).

Рослини, вирощені на забруднених ґрунтах, знаходяться під впливом кількох стресів одночасно, а саме ВМ, засолення, нестача поживних речовин, фізіологічна посуха та іонна токсичність. Ці фактори негативно впливають на ріст, продуктивність та перебіг фізіолого-біохімічних процесів у тканинах рослин (Shankar, Evelin, 2019; Zahra et al., 2021; Fetsiukh et al., 2022). Реакція рослин на

вище перелічені стреси залежить від виду, генотипу, стану розвитку та метаболізму рослини, а також тривалості дії стресу (Vabeanu et al., 2017). Встановлено, що у відповідь на дані стресові фактори у клітинах рослин спостерігається надмірне накопичення активних форм кисню (АФК) (Yang et al., 2021; Fetsiukh et al., 2022), яке може викликати перекисне окислення ліпідів (ПОЛ), окислення білка, інактивацію ферментів, пошкодження ДНК та/або взаємодія з іншими життєво важливими складовими клітини рослин, а також викликає пошкодження клітин, що призводить до запрограмованої загибелі клітин (Koуро et al., 2012; Parihar et al., 2014; Hasanuzzaman et al., 2020; Кавулич, 2020). Нейтралізація АФК у організмі рослин за умов окисного стресу ефективно забезпечується функціонуванням багатоступеневої системи захисту, яка складається з високомолекулярних сполук – антиоксидантних ферментів (каталаза, пероксидаза) та низькомолекулярних антиоксидантів (фенольні сполуки, вітаміни, амінокислоти та цукри) (Mushtaq et al., 2020; Chiappero et al., 2021; Eljebbawi et. in., 2021). Для контролю окислювально-відновного гомеостазу в клітинах рослин важливим є баланс між продукцією АФК та біосинтезом антиоксидантів. Вважається, що антиоксидантна ферментна система є основним механізмом стійкості рослин за впливу стресових факторів (Das, Roychoudhury, 2014; Foyer, Noctor, 2005; Amist et al., 2019; Dumanović et al., 2019; Ghasemi-Omran et al., 2021; Xie et al., 2022).

Клітини рослин відповідають на стрес змінами процесу біосинтезу білків. Збереження структури білкових молекул і запобігання їх агрегації важливі для існування в стресових умовах (Wang et al., 2004; Kosová et al., 2013). Білки теплового шоку (БТШ), які утворюються у відповідь на зміну таких чинників як засолення, відповідають за складання білків, транслокацію та деградацію в багатьох клітинних процесах, стабілізують білки й мембрани (Халін, Пиріжок, 2020). Протеомною пластичністю рослини адаптуються до змін навколишнього середовища. Розкриття механізму формування відповіді рослини на стрес і з'ясування ролі білків у забезпеченні їх стійкості мають велике практичне й теоретичне значення (Wang et al., 2004).

Рослини в основному є первинними акумуляторами ВМ, тому вивчення впливу ВМ на рослинні організми і механізми їх стійкості становлять великий фундаментальний і прикладний інтерес (Халін, Пиріжок, 2020). Деревя таких родів як *Salix*, *Betula*, *Populus*, *Alnus* та *Acer* досить часто використовуються для дослідження впливу ВМ на рослинний організм. Проте з метою фітомеліорації більшу увагу приділяють швидкоростучим видам, наприклад, таким як *Salix* sp. (Фецюх та ін., 2019). Ряд досліджень підтвердили високу ефективність верб (*Salix* spp.) у використанні для очищення забруднених земель ВМ (Arsenov et al., 2020; Gautam et al., 2021; Sameena, Puthur, 2021).

Важливе значення відіграють зв'язки рослина-мікробіом. Оцінка впливу мікробіому на ознаки, що лежать в основі економічно важливих культур є дуже важливими (Cappelli et al., 2022). Корисні мікроорганізми вже давно виділяють за допомогою традиційних підходів, які надають корисну інформацію для оцінки мікробного різноманіття (Gupta et al., 2021). Однак не усі лабоарторні підходи дієві, оскільки поживні середовища, специфічні для групи бактерій, можуть обмежувати виявлення домінуючих мікробних угруповань, пов'язаних з рослинами. Взаємозалежність між бактеріями може зменшити їх ріст на поживному середовищі. Тому виникає потреба у методах ізоляції видів специфічних бактерій, зберігаючи потенційні взаємодії бактерія-бактерія, які втрачаються, коли колекції культур створюються на основі чистих культур. Дослідження використання мікробного консорціуму за допомогою підходу збору культур на основі мікробних угруповань як альтернативного використання корисних інокулянтів мікробіому є актуальним питанням (Aamir et al., 2021). Інокуляція рослин бактеріальними консорціумами може принести користь рослині більшою мірою, ніж інокуляція лише одним бактеріальним штамом. Інноваційна стратегія для ідентифікації консорціумів корисних мікроорганізмів рослин здійснюється на основі активності мікробного катаболізму гормонів (Lebrun et al., 2021; Santoyo et al., 2021).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було оцінити вплив техногенного забруднення на морфометричні та фізіологічні показники *S. viminalis*,

а також вивчення складу угруповань ендofітних бактерій коренів рослин в умовах Стебницького хвостосховища.

Основні завдання роботи:

- виявити вплив техногенного забруднення на морфометричні показники та вміст води в органах *S. viminalis* в умовах Стебницького хвостосховища;
- визначити вміст ВМ у рослинному матеріалі та субстраті хвостосховища за умов росту рослин, а також оцінити відповідність вмісту ВМ екологічним нормам;
- визначити склад ЕБ коренів *S. viminalis* за сумісного впливу техногенного забруднення Стебницького хвостосховища та ризосфери *Salicornia europaeae* L.;
- дослідити вплив умов хвостосховища на накопичення білків у органах *S. viminalis*;
- встановити інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у тканинах *S. viminalis* за утворенням малонового діальдегіду (МДА);
- дослідити вплив умов хвостосховища на стан окремих компонентів антиоксидантної системи (АОС) рослин – активність каталази (КАТ) та пероксидази (ПОД), вміст аскорбінової (АК), дегідроаскорбінової (ДГАК) та дикетогулонової кислот (ДКГК), фенольних сполук, проліну та розчинних цукрів у органах *S. viminalis*.

Об'єкт дослідження – фізіологічні адаптивні реакції *S. viminalis* в умовах росту на техногенному субстраті хвостосховища м.Стебник.

Предмет дослідження – вплив техногенного забруднення Стебницького хвостосховища на ростові та фізіологічні показники рослин *S. viminalis*, зокрема на стан антиоксидантної системи та вміст білків у органах рослин, а також фітореMediaційні властивості *S. viminalis* та взаємодії рослина-мікробіом.

Методи дослідження – біометричні (ростові параметри), фізико-хімічні (кислотність субстрату), біохімічні (вміст білка, накопичення низькомолекулярних білків, МДА, проліну, пероксидази, каталази, фенольних сполук, АК, ДАК та ДКГК), комплексометричний (вміст водорозчинних іонів), спектрофотометричні (вміст ВМ у рослинному матеріалі та субстраті; визначення бактерій-поглиначів

ACC), молекулярні (екстракція ДНК, секвенування Illumina MiSeq), статистичні (аналіз і візуалізація результатів).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше встановлено вплив техногенного сольового забруднення хвостосховища м. Стебник на формування реакцій антиоксидантної та білоксинтезуючої систем енергетичної рослини верби прутівидної (*S. viminalis*). Показано участь ферментних та неферментних антиоксидантів *S. viminalis* у забезпеченні стрес-протекторної реакції організму за лабораторних та польових умов вирощування рослин на техногенно забрудненому субстраті хвостосховища. Доведено причинно-наслідковий зв'язок між збільшенням кількості забруднення в субстраті хвостосховища та вмістом проліну, розчинних цукрів, аскорбінової кислоти, активності антиоксидантних ферментів (КАТ, ПОД) в органах *S. viminalis* за дії техногенного забруднення хвостосховища.

Вперше встановлено наявність низькомолекулярних стресових білків (8 – 30 кДа) у органах *S. viminalis* та показано їх участь у адаптаційних процесах *S. viminalis* до стресових умов Стебницького хвостосховища за лабораторних умов вирощування.

Продемонстровано доцільність використання *S. viminalis* з метою фітореMediaції на техногенно забруднених територіях. Встановлено зменшення вмісту ВМ у субстраті хвостосховища шляхом їх накопичення в органах рослин.

Вперше одержано результати сумісного впливу техногенного забруднення хвостосховища та ризосферних бактерій *S. europaea* на склад ендofітних бактерій (ЕБ) коренів енергетичних рослин *S. viminalis* в умовах Стебницького хвостосховища. Для вивчення складу ЕБ коренів *S. viminalis* у дисертаційній роботі використано метод секвенування нового покоління Illumina MiSeq. Висвітлено наявність родів бактерій, які живуть у екстремальних умовах середовища, а саме *Halobacterium*, *Marinobacter*, *Idiomarina*, *Marinobacterium*.

Теоретичне та практичне значення роботи. Отримані експериментальні дані дисертаційної роботи доповнюють теоретичні уявлення про реакції стійкості рослин, зв'язок між процесами росту, активністю ензиматичних антиоксидантів та кількістю неферментних антиоксидантів, білоксинтезуючої системи, а також

фіторемедіаційні властивості рослин верби енергетичної *S.viminalis* за умов зростання на техногенно забруднених територіях. Дослідження дисертанта розширює фундаментальні знання про механізми стійкості та адаптації енергетичних рослин до умов техногенного забруднення. Практичне значення роботи полягає у більш детальному вивченні пристосування енергетичних рослин до росту на непродуктивних та забруднених ділянках з метою підвищення їх продуктивності та розвитку сільського господарства. Показано можливість практичного використання рослин із метою ремедіації. Дослідження складу ЕБ коренів досліджуваних рослин показали наявність бактерій, які живуть у екстремальних умовах середовища, представники яких відіграють важливу роль у стійкості рослин до засолення та впливу ВМ. Отримані результати сприятимуть подальшому розвитку використання представників даних родів в якості інокулянтів для підтримки росту рослин в техногенних умовах вирощування.

Результати дисертаційної роботи можуть бути використані при проведенні досліджень у галузі фізіології стійкості рослин та викладанні навчальних курсів на кафедрі фізіології та екології рослин біологічного факультету Львівського національного університету ім. І. Франка, а також у інших закладах. Отримані дані є важливими для розвитку галузі фізіології та екології рослин, крім того вони є вагомими для вирощування даного виду енергетичних рослин на території хвостосховища та інших техногенно забруднених територіях України.

Особистий внесок здобувача. Здобувач особисто виконала пошук та аналіз джерел літератури, обґрунтувала мету та завдання експериментів, освоїла відповідні методи досліджень та провела експерименти, а також написала усі розділи дисертації та значну частину тексту публікацій. Отримані результати проведених досліджень інтерпретовані, узагальнені і підготовлені до публікації за участю наукового керівника д.б.н., проф. Терек О. І., а також співробітників кафедри фізіології та екології рослин біологічного факультету Львівського національного університету ім. І. Франка асист. Буньо Л.В. та доц. Пацули О.І. Формування ідей роботи, планування комплексу лабораторних досліджень проведено за участю наукового керівника д.б.н., проф. Терек О. І. Для виконання дослідження скринінгу

ендофітних бактерій коренів рослин та їх метаболічних функцій здобувач пройшла стажування на базі кафедри мікології лісу та патології рослин Шведського університету сільськогосподарських наук (Department of Forest Micology and Plant Pathology, Swedish University of Agricultural sciences (SLU) (Уппсала, Швеція)) у рамках стипендійної програми Visby від Шведського інституту (Svenska Institutet (SI)) під керівництвом Dr. S.Timmusk.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційні дослідження виконувалися в межах науково-дослідної теми на кафедрі фізіології та екології рослин біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка – «Використання енергетичних рослин для фітореMediaції техноземів» (№ держреєстрації 0117U000893 (в межах робочого часу); та на кафедрі мікології лісу та патології рослин факультету природних ресурсів і сільськогосподарських наук Шведського університету сільськогосподарських наук (Уппсала, Швеція) в рамках проектів «Development of native rhizosphere community-based microbial consortia (CBC) for crop stress tolerance improvement» та «Bioremediation of pollution generated by manmade chemicals in the form of industrial activity, agricultural chemicals, or the improper disposal of waste» за підтримки Шведського інституту (Svenska Institutet).

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були представлені у доповідях на XII-XVI Міжнародних наукових конференціях студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2016; 2017; 2018; 2019; 2020), II-ому науково-методичному інтернет-семінарі «Фізіологія рослин у системі сучасних біологічних знань та наук» (Харків, 2016), XI-XII Міжнародних наукових конференціях «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2016), XV Міжнародній науковій конференції молодих вчених «Шевченківська весна» (Київ, 2017), Інтернаціональній науково-практичній конференції «Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences» (Lublin, 2017), IV Міжнародній науково-практичній конференції «Стан природних ресурсів: перспективи їх збереження та відновлення у контексті сталого розвитку» (Дрогобич, 2020), Міжнародній науковій

конференції «Актуальні проблеми фізіології рослин і генетики» (Київ, 2021), аспірантських днях факультету харчової інженерії, туризму та охорони навколишнього середовища Університету Арела Влаіку (Арад, Румунія, 2021).

Публікації результатів дослідження. За матеріалами дисертації опубліковано 19 наукових праць, із них – 6 статей, у тому числі 5 у фахових виданнях України та 1 у міжнародному виданні, що входить до наукометричної бази Scopus.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація містить наступні розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень, висновки та список використаних джерел. Дисертацію викладено на 182 сторінках друкованого тексту і проілюстровано 30 рисунками та 10 таблицями. Список літератури налічує 293 найменувань.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Техногенно забруднені території та шляхи їх відновлення

В Україні, зокрема у Прикарпатті, розташовані унікальні полімінеральні руди, аналогічних яким у світі дуже мало. В їх склад входить понад 10 різних мінералів (Павлюк, Ференц, Мелько, 2013). У Дрогобицькому районі Львівської області знаходиться Стебницьке родовище калійно-магнієвих солей. Його площа складає 30 км² (Дяків та ін., 2013). Поклади родовища за хімічним складом належать до солей сульфатного типу. Для них характерний дуже складний і своєрідний комплекс соляних мінералів і винятково великий вміст глинистого матеріалу. Ці поклади мінералів мають важливе промислове значення, оскільки вони є цінною сировиною для виробництва дефіцитних безхлорних калійних мінеральних добрив (Білоніжка, Дяків, 2009; Снітинський, Зеліско, 2013).

Інтенсивне розроблення полімінеральних руд м. Стебника велось ще з часів СРСР (Павлюк, Ференц, Мелько, 2013). У 1946 р. було сформоване Стебницьке державне гірничо-хімічне підприємство (ДГХП) «Полімінерал». У 1966–1967 рр. побудовано хімічну збагачувальну фабрику, яка випускала калійно-магнієве мінеральне добриво (калімагнезію) з вмістом К₂О до 17–18 %. Найінтенсивніше родовище експлуатувалося у 80-х роках ХХ ст. – понад 2,5 млн т на рік. У 1988 р. у зв'язку із утворенням підземних карстових порожнин, які становлять значну небезпеку і можуть призвести до техногенної катастрофи, та після роботи багатьох державних комісій, хімічну збагачувальну фабрику було закрито, а у 1993 р. припинено тампонажні роботи у карстових порожнинах (Куриляк, 2016). На сьогодні перероблення руди на ДГХП не здійснюється. Це пов'язано із недосконалістю, складністю й енерговитратністю способу хлоридного вилуговування (Білоніжка, Дяків, 2009; Парфенюк, 2011).

Внаслідок діяльності Стебницького калійного заводу ДГХП «Полімінерал» на північно-східній околиці м. Стебника накопичилось 22 млн т відходів, які зберігаються у хвостосховищі заводу. У хвостосховище скидали неперероблену руду, пісок, глинисті матеріали, ропу, яка містила залишки калійних солей, у тому

числі й ВМ (Ревага, 2006). Субстрат хвостосховища у повітряно-висушеному стані має забарвлення від темно-сірого до світло-сірого кольору. Забарвлення залежить від вмісту солей, які, кристалізуючись, надають світлішого забарвлення. Хвостосховище складається з двох секцій загальною площею близько 125 га. Площа першої секції — 69 га. Друга секція заповнена ропою і розділена перемичкою на дві ділянки — південну та північну, площею відповідно 28,9 та 26,9 га (Перекупко, 1998; Білоніжка, 2009; Фецюх та ін., 2020). За структурою субстрат дрібнозернистий, добре змочується водою. Тому внаслідок взаємодії атмосферних опадів зі субстратом хвостосховища відбувається вилуговування солей і утворюється вторинна ропка, яка стікає у знижені ділянки дна першої секції (Фецюх та ін., 2018). Основними компонентами хвостосховища є соляні розсоли, галітові та шламові тверді відходи. Розсоли, на жаль, не переробляються, а постійно засолюють прилеглі землі та води і становлять екологічну загрозу для районів виробництва та для басейну ріки Дністер (Яворський и др., 2012).

Негативний вплив хвостосховища на довкілля спричинений забрудненням гідросфери солоною водою, що зумовлене позитивним балансом води в хвостосховищі. Такі рукотворні «мертві» землі займають значні земельні ділянки, що вилучаються з сільськогосподарського користування, а також створюють постійну загрозу для природи та прилеглих населених пунктів (Павлюк, Ференц, Мелько, 2013). Однак, у зв'язку зі зниженням вологості та зменшення концентрації солей, у субстраті хвостосховища відбувається поступове проникнення фітоценозів. Напряма заростання має лінійний характер і чітко детермінований зміною засоленості й вологості. Піонерні стадії заростання формуються з рослин галофітних і солестійких екологічних груп, у яких немає представників автохтонної флори (Сабат, Цайтлер, 2014). Це свідчить про невідповідність субстрату хвостосховища умовам природних ґрунтів цієї території (Сашук, 2006). У зв'язку із цим хвостосховище Стебника належить до техногенних субстратів (Сабат, Цайтлер, 2014; Фецюх та ін., 2018).

Широке промислове забруднення та його серйозні еколого-економічні наслідки викликають актуальність розробки та вдосконалення підходів до

рекультивациі ґрунтів як ключового компонента екосистеми (Koptsik et al., 2021). Розв'язати дану екологічну проблему можна, розробляючи і впроваджуючи нову енергоощадну технологію комплексного перероблення таких розчинів, оскільки відомі технології складні та енерговитратні. Серед таких технологій є застосування органічних реагентів, які мають здатність селективно висолювати певні солі чи їх групи із багатокомпонентних систем: етанол (Блажівський та ін., 2011), ізопропіловий спирт (Яворский та ін., 2009). Дослідники довели, що використання певних видів рослин у процесі фіторекультивациі та фіторемедіациі продемонструвало певну надію на біоремедіацію (Самохвалова та ін., 2015; Asgari Lajayer et al., 2019). Створення штучних лісів визнано ефективним методом оздоровлення деградованих земель (Jabbarov et al., 2021). Для ефективного відновлення засолених ґрунтів доцільним є підбір культур, які були б невибагливими до умов зростання, конкурентоздатними по відношенню до інших рослин та придатні для зростання на забруднених ґрунтах. Тому виникає потреба у виявленні рослин, які здатні ефективно та в короткі терміни поглинати солі з ґрунтів, а також покращувати фізико-хімічні властивості ґрунтів та сприяти збільшенню в них вмісту гумусу (Лаврик, Павличенко, 2014).

З метою фіторемедіациі забруднених земель використовують певні види рослин для видалення або стабілізації забруднюючих речовин з навколишнього середовища або ж для зменшення їх шкідливого впливу. Однак більшість поширених рослин-фіторемедіаторів важко вирощувати на засолених ґрунтах (Shang et al., 2020). Проте фіторемедіація надає багато переваг, що робить її ефективною технологією, основною перевагою якої звичайно є низька вартість. Фіторемедіаційні механізми можуть бути класифіковані як (Sarwar et al., 2016; Пацула та ін., 2018; Asgari Lajayer et al., 2019; Yaashikaa et al., 2022):

1. Фітоекстракція – використання метал-акумулюючих рослин для нагромадження ВМ з ґрунту та подальше видалення надземних та підземних частин рослин із середовища.

2. Ризофільтрація – поглинання, нагромадження та детоксикація ВМ кореневими системами рослин із рідкого середовища.

3. Фітостабілізація (фітоімобілізація) – використання рослин, для зниження мобільності ВМ у ґрунті, запобігаючи проникненню у ґрунт та воду.

4. Фітоволаталізація – це ще один підхід, який передбачає перетворення металу в летючу форму і його викид в атмосферу через продиhi рослин. Цей метод в першу чергу ефективний для Hg, оскільки іон ртуті перетворюється у відносно менш токсичну елементну форму. Оскільки летка форма Hg, що виділяється в атмосферу, може бути повернута назад у ґрунт за допомогою опадів, тому цей метод є тимчасовим вирішенням проблеми (Sarwar et al., 2016).

5. Біоремедіація – кореневі системи рослин в асоціації із мікроорганізмами розкладають токсичні органічні сполуки (Пацула та ін., 2018). Мікроорганізми, які використовуються для виконання функції біоремедіації, відомі як біоремедіатори. До них належать види *Xanthofacter*, *Penicillium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium* та *Nitrosomonas* (Desoky et al., 2020). Слід відміти, що у біоремедіації забруднених ґрунтів важлива роль належить ріст-стимулюючим бактеріям (PGPR). Велика кількість ризобактерій, таких як *B. subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* та *Brevibacterium halotolerans* разом із рослинами-гіперакумуляторами, використовується для ризоремедіації різних токсичних металів, присутніх у асоційованому ґрунті. Крім цього, деякі штами бактерій виробляють біосурфактанти для посилення розчинення металів у ґрунтах.

Біотрансформація, біосорбція та біоаккумуляція є основними трьома видами мікробних процесів відновлення, які знижують токсичність і транспорт ВМ, відіграючи вирішальну роль у мікробній ремедіації ВМ. Використання ризобактерій для ремедіації ВМ є дешевою, неінфекційною та ефективною технологією, яку можна виконувати на забрудненій ділянці разом із фізичними та хімічними методами. Деякі роди ризобактерій, такі як *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Sphingomonas* і *Mycobacterium*, добре відомі щодо їх потенційної деградації та видалення металів Cr, As, Cu, Ni (Dixit et al., 2021). Стійкість рослин до комбінованої дії металів та властивості, що стимулюють ріст рослин можуть дати припущення, що штам *Paenibacillus sp.* РМ може бути використаний для біоремедіації від ВМ (Desoky et al., 2020).

Дешевий, енергоефективний метод детоксикації, який забезпечується фіторемедіацією, маніпулює внутрішніми характеристиками рослин, щоб накопичувати забруднення металами у біомасі рослин та зменшити біодоступність ВМ. Токсичний вплив ВМ на рослини пом'якшується мікробіомом ґрунту шляхом секреції кислот, білків, фітоантибіотиків та інших хімічних речовин, що свідчить про те, що бактерії є потенційними інструментами та тенденцією для сталого сільського господарства в майбутньому (Saud et al., 2014).

1.2. Вербя прутовидна (*Salix viminalis* L.) як вид енергетичних рослин та її фіторемедіаційний потенціал

Енергетичні рослини є одними із поновлювальних джерел енергії, які мають ряд переваг над викопним паливом, основними з яких є створення позитивного балансу Карбону в біосфері. В якості енергетичної сировини використовуються деревні рослини. У зв'язку із цим, виникло питання про штучне вирощування рослин для цих потреб (Пацула та ін., 2018).

Енергетичні рослини здійснюють вплив на довкілля наступним чином:

- один гектар плантацій енергетичних рослин поглинає з повітря понад 200 тон CO₂ за 3 роки;
- ідеально підходять для засадження забруднених земель, малопродуктивних, з точки зору вирощування сільськогосподарських культур;
- ефективно застосовуються у протиерозійних заходах для укріплення ґрунтів, збагачують ґрунти мінералами та мікроелементами, поживними речовинами природного походження;
- плантації енергетичних рослин є природними фільтрами для видалення відходів агропромислового виробництва, застосовуються як буферні зони в місцях накопичення біологічних відходів фермерських господарств;
- енергетичні рослини є природними фільтрами для очищення ґрунтів від пестицидів (Романчук, 2013).

Ідеальні енергетичні рослини повинні мати максимально ефективний механізм перетворення сонячної енергії у біомасу та мінімальний вплив на

оточуюче середовище, а також позитивний енергетичний баланс – їх енергетичний вихід має бути більшим за енергетичні витрати на їх вирощування та використання добрив. На сьогодні є кілька видів рослин, що відповідають цим вимогам та широко застосовуються у багатьох країнах світу. Серед них є верба прутовидна (*Salix viminalis* L.), тополя чорна (*Populus nigra* L.), а також багаторічні трави – просо деревовидне (*Panicum virgatum* L.), фаларіс тростиновидний (*Phalaris arundinacea* L.), тростина гігантська (*Arundo donax* L.) і міскантус (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.). Дані рослини висаджуються лише один раз та використовуються протягом 10 – 20 років для виготовлення паливних елементів (Пацула та ін., 2018; Roman et al., 2021).

Верба (*Salix* spp.) є одним з видів рослин, який часто використовується в природоорієнтованих рішеннях (ПОР) та еко-інженерних проектах (Gonzalez-Ollauri, Mickovski, 2020). Швидкозростаючі верби належать до родини *Salicaceae*, яка налічує багато видів та відіграє важливу роль у продукції деревини та біопалива, захисті навколишнього середовища, здоров'ї ґрунтів та залісненні деградованих земель (Khoma et al., 2021). Згідно Jia et al. (2020), верби відіграють важливу роль у відновленні деградованих земель. Крім того, рослини стійкі до абіотичного стресу. Це дозволяє використовувати їх у фіторе mediaції промислово забруднених земель (Fetsiukh et al., 2022).

Верба прутовидна (*Salix viminalis* L.), також відома як енергетична верба, має унікальну здатність поглинати, деактивувати та нагромаджувати великі кількості ВМ без зниження ростових показників (Wróbel, Mikiciuk, 2010; Пацула та ін., 2018). Ця властивість є досить високою, порівняно із іншими рослинами, що дозволяє сміло віднести її до гіперакумуляторів. Важливо, що верба нагромаджує більше ВМ у перерахунку на одиницю сухої маси (Пацула та ін., 2018). Клони *Salix* характеризуються великими відмінностями в накопиченні металу, залежно від структури, а також кількості та доступності ВМ у ґрунті. Виявлено, що деякі види верб ефективні в поглинанні не лише іонів ВМ, а й органічних сполук (Mleczeek et al., 2010; Mleczeek et al., 2018).

Слід наголосити, що використання біоенергетичних рослин з потенціалом стійкості до абіотичного стресу має подвійну перевагу фіторемедіації, а також хорошу економічну ефективність з точки зору виробництва біоенергії (Sameena, Puthur, 2021). Вчені стверджують, що вирощування *S. viminalis* в енергетичних цілях є одним із видів діяльності, що сприяє зупиненню зміни клімату (Janicka et al., 2020).

1.3. Механізми адаптації рослин до абіотичного стресу

Рослини, вирощені на забрудненому ґрунті, зазнають кількох стресів, таких як ВМ, засолення, нестача поживних речовин, фізіологічна посуха та іонна токсичність. Ці фактори негативно впливають на ріст, продуктивність та різні фізіологічні/біохімічні процеси рослин (Shankar, Evelin, 2019; Zahra et al., 2021; Fetsiukh et al., 2022). Унаслідок промислової діяльності багато територій світу одночасно постраждали від засолення та забруднення ВМ (Sharma et al., 2020; Ondrasek, G., & Rengel, 2021). Адаптація рослин до впливу ВМ у засоленому ґрунті привертає до себе все більше уваги та стає світовою екологічною проблемою (Shang et al., 2020; Ullah et al., 2021).

Поширеним наслідком стресу у рослинному організмі є індукція надмірного накопичення активних форм кисню (АФК), що може викликати перекисне окислення ліпідів (ПОЛ), окислення білка, інактивацію ферментів, пошкодження ДНК та/або взаємодія з іншими життєво важливими складовими клітини рослин, а також викликає пошкодження клітин, що призводить до запрограмованої загибелі клітин (Koyno et al., 2012; Parihar et al., 2015; Кавулич, 2020; Hasanuzzaman et al., 2020). Сольовий стрес може призвести до закриття продихів, що зменшує доступність вуглекислого газу в листках і пригнічує фіксацію Карбону, піддаючи хлоропласти надмірній енергії збудження, що, у свою чергу, збільшує утворення АФК, таких як супероксид ($O_2^{\cdot-}$), гідроген пероксид (H_2O_2), гідроксильний радикал ($OH\cdot$) і синглетний кисень (1O_2) (Parihar et al., 2015; Hasanuzzaman et al., 2020). Первинним місцем генерації АФК є хлоропласти, мітохондрії, пероксисоми, апопласти та плазматичні мембрани (Hasanuzzaman et al., 2020). Показано, що

опосередковане пошкодження мембран АФК є основною причиною токсичності засолення у таких рослин як рис, томати, цитрусові, горох та гірчиця (Parihar et al., 2015).

Перекисне окиснення ліпідів у клітині підтримується на фізіологічно нормальному, фоновому рівні завдяки наявності у біохімічному складі рослини великої кількості біологічно активних речовин (БАР), які володіють антиоксидантними властивостями та в цілому складають багаторівневу антиоксидантну захисну систему. Збалансованість між ПОЛ й антиоксидантною активністю є важливою умовою для забезпечення нормальної життєдіяльності рослинного організму. Проте, будь-який зовнішній вплив супроводжується посиленням вільнорадикальних процесів і зміщенням рівноваги у бік активації ПОЛ. Активація ПОЛ індукує перебудови у захисній АОС, зокрема, зміни активності антиоксидантних ферментів і пулу низькомолекулярних антиоксидантів (Zhai et al., 2020; Коротка, Шерстюк, 2021). Даний процес є одним із початкових етапів, які призводять до формування стресового стану. Ступінь розвитку оксидативного стресу та характер його впливу на рослину можна оцінити за інтенсивністю (ПОЛ), кінцевим продуктом якого є малоновий диальдегід (МДА). Малоновий диальдегід є токсичною речовиною, взаємодіє з вільними аміногрупами білків, фосфоліпідів, що призводить до порушення клітинних мембран. Накопичення МДА вказує на відповідь рослини до впливу зовнішніх факторів (Коротка, Шерстюк, 2021).

Рослини в основному справляються з окислювальним стресом за допомогою ендогенного захисного механізму, що складається з різних ферментних (супероксиддисмутази; каталази; аскорбатпероксидази; глутатіонредуктази; монодегідраскорбатредуктази; дегідраскорбатредуктази; глутатіон пероксидази; гваяколпероксидази; глутатіон-S-трансферази) та неферментативних (аскорбінова кислота; глутатіон; фенольні кислоти; алкалоїди; флавоноїди; каротиноїди; α -токоферол; небілкові амінокислоти тощо) антиоксидантів (Koуго et al., 2012; Hasanuzzaman et al., 2020). Каталаза (КАТ) і пероксидаза (ПОД) є ферментативними компонентами, які відіграють центральну роль у системі захисту рослин. Баланс

між продукцією АФК та біосинтезом антиоксидантів дуже важливий для контролю окислювально-відновного гомеостазу в клітинах рослин (Gajić et al., 2018). Більше того, антиоксидантна ферментна система визнана основним механізмом стійкості рослин до стресу навколишнього середовища (Alencar et al., 2021; Fetsiukh et al., 2022). Виявлено, що за дії осмотичного стресу значно збільшувалась активність антиоксидантних ферментів та вміст МДА. Підвищення активності антиоксидантних ферментів призвело до зниження окисного стресу під час посухи та сольового стресу, який зменшує АФК (Hafez et al., 2021). Встановлено, що тривале засолення призводить до значного збільшення H_2O_2 та ПОЛ у *Brassica napus* та *Triticum aestivum* (Parihar et al., 2014).

Рослини в основному є первинними акумуляторами ВМ, тому вивчення впливу ВМ на рослинні організми і механізми їх стійкості представляють великий фундаментальний і прикладний інтерес (Халін, Пиріжок, 2020). Рослини, які використовуються з метою фітореMediaції повинні мати добре розвинені механізми стійкості до важких металів. Важкі метали, які поглинаються цими рослинами по-різному і включають такі процеси, як видалення, перенесення, деградація або іммобілізація. Важкі метали впливають на рослини різними способами, наприклад: (а) імітуючи поживні іони, що призводить до конкуренції за поглинання на поверхні коренів; (б) взаємодія металів із сульфгідрильною групою білків, що призводить до інактивації білка; (в) витіснення незамінних іонів із специфічних сайтів зв'язування білків, що призводить до функціональної втрати білків; і (г) утворення активних форм кисню та пошкодження ДНК, РНК, білків і ліпідів. Тому важливо зрозуміти реакцію біоенергетичних рослин на стрес ВМ, з метою створення стійких сортів рослин за агрономічними ознаками (Sameena, Puthur, 2021).

Процес поглинання ВМ рослинами залежить від багатьох факторів, таких як біодоступність металів у ґрунті, вік та етап росту рослин, сезонні коливання та характеристики металу (Shang et al., 2020). Одним з основних шляхів надходження ВМ у рослину є поглинання коренями рослин з ґрунту (Шевчук, Мудрак, 2021).

Поглинання ВМ здійснюється корковими тканинами кореня симпластним або апопластним шляхом до транспортної системи ксилеми (Sarwar et al., 2016).

Швидкість надходження іонів ВМ у рослинний організм є різною і залежить від властивостей самого елемента, виду рослини, її захисних механізмів, а також від кислотності ґрунту та умов довкілля (Кавулич, 2020). Встановлено, що засолення впливає на рухливість металів та сприяє перенесенню ВМ від коренів до стебел. Визначено, що помірне додавання NaCl підвищує біодоступність свинцю у ризосфері, збільшує його поглинання та транслокацію від коренів до стебел і, як наслідок, підвищує загальний вміст металу у *S. salsa* (Shang et al., 2020).

Слід зазначити, що фітотоксичність ВМ залежить від різних чинників: від їхньої будови, а також від самої рослини — її фізіологічних функції та умов зростання. Такі ж різноманітні і впливи ВМ на рослинний організм (Кавулич, 2020). Значне збільшення пероксидації ліпідів разом із високим рівнем акумуляції пероксиду водню було визначено у проростків *O. sativa* за впливу 0,25 та 0,5 мМ NiSO₄. Подібні результати було отримано при дослідженні *Pisum sativum* за впливу 100 μМ NiCl₂. Вплив кадмію (100 μМ CdCl₂) спричинив збільшення МДА та H₂O₂ у *Arabidopsis thaliana* та проростках *Cucumis sativus*. Збільшення даних показників було також виявлено за впливу високого вмісту міді (1000 ppm) у базиліку, однак при меншій концентрації металу (500 ppm) значного збільшення МДА та H₂O₂ не виявлено (Hasanuzzaman et al., 2020). Показано значне підвищення активності антиоксидантних ферментів (АПО, КАТ, ПОД і СОД) та накопичення H₂O₂ і МДА у рослин бамії, які зазнали токсичного впливу іонів хрому. Окрім цього, стрес призвів до значного підвищення рівня неферментативних антиоксидантів, а саме фенолів, флавоноїдів та аскорбінової кислоти в порівнянні із контрольними умовами (Ashraf et al., 2021).

Толерантність рослин до екстремальних умов абіотичних стресів на молекулярному рівні визначається трьома основними факторами (Kosová et al., 2013):

1 – геномний рівень: толерантні рослини можуть мати деякі унікальні гени, що реагують на стрес, які відсутні у сприйнятливих рослин (відмінності на рівні структури геному);

2 – транскриптомний рівень: толерантні рослини виявляють змінену регуляцію експресії генів важливих генів, що реагують на стрес, у порівнянні із чутливими рослинами (якісні та кількісні відмінності на рівні експресії генів);

3 – протеомний рівень: білки, які беруть участь у реакції на стрес, виявляють змінену активність у толерантних рослин, порівняно із нестійкими рослинами (різниця в структурі білка та рівні активності). Засолення викликає сигнальні події, що призводять до змін у експресії генів, відносної кількості білка та активності. Білки, у свою чергу, викликають глибокі зміни в енергетичному метаболізмі, що призводить як до короткочасних (стресова реакція, спрямована на послаблення прямих впливів стресу, таких як зміни осмотичного потенціалу та активності іонів солі), так і до довготривалих адаптацій до стресу (структурні адаптації рослинних клітин у результаті зміни росту і розвитку рослин). Клітини рослин відповідають на стрес змінами процесу біосинтезу білків. Збереження структури білкових молекул і запобігання їх агрегації важливі для існування в стресових умовах. Протеомною пластичністю рослини адаптуються до змін навколишнього середовища. Розкриття механізму формування відповіді рослини на стрес і з'ясування ролі білків у забезпеченні їх стійкості мають велике практичне й теоретичне значення (Wang et al., 2004).

У відповідь на стрес, зокрема вплив ВМ, у рослин виробляються низькомолекулярні стресові білки — металотіонеїни, які зв'язують метал, є термостійкими і містять велику кількість цистеїну. До них відносять фітохелатини, які зв'язують іони ВМ у вигляді тіолатних комплексів. Крім металотіонеїнів та фітохелатинів на дію стресу можуть ще синтезуватися фітоалексини (Vatamaniuk et al., 1999; Кавулич, 2020).

Білки пізнього ембріогенезу (LEA-білки) належать до групи дегідринів. Ця категорія протеїнів знаходиться в ядрі, цитоплазмі, мітохондріях. Подібно до шаперонів, LEA можуть запобігати денатурації внутрішньоклітинних сполук у разі

зневоднення. Водночас встановлено, що іони кадмію спричиняють шкодочинний вплив на LEA (Сергєєва та ін., 2020). Утримання білків у їх функціональних конформаціях і запобігання агрегації ненативних білків особливо важливі для виживання клітин в умовах стресу. Білки теплового шоку (БТШ), які утворюються у відповідь на зміну таких чинників, як засолення та інші, відповідають за складання білків, транслокацію та деградацію в багатьох клітинних процесах, стабілізують білки й мембрани. Одночасно з активацією стресових білків сповільнюється синтез білків, що утворюються в нормальних умовах (Фецюх та ін., 2020).

Для того, щоб вижити в умовах стресу ВМ, рослини розвинули кілька захисних механізмів, таких як: зв'язування з фітохелатинами/металотіонеїнами, секверстування у вакуолях, зниження рівня поглинання ВМ та активація антиоксидантної системи. Потенціал толерантності рослин до металу залежить від зв'язування металів з клітинною оболонкою, активного транспорту іонів металів у вакуолю, хелатування іонів металів з білками та пептидами, а також утворення комплексів (Kosakivska et al., 2020; Patel et al., 2021). Фенольні сполуки, які належать до групи неензиматичних антиоксидантів, утворюють хелатні комплекси з ВМ, що транспортуються у вакуолю, зменшують плинність мембран, запобігаючи надходженню металів у клітину (Кавулич, 2020).

Рослини зазвичай індукують біосинтез кількох низькомолекулярних, високо гідрофільних органічних сполук, а також високомолекулярних гідрофільних білків (наприклад, білків LEA – late embryogenesis abundant proteins), які не тільки знижують внутрішньоклітинний осмотичний потенціал, але й підсилюють захисні властивості інших клітинних сполук, які постраждали від негативного впливу через зневоднення (Kosová et al., 2013).

Органічні речовини відіграють вирішальну роль у вищих рослин, які зростають на посушливих та засолених ґрунтах. Однак їх вплив залежить від виду, сорту та органів рослин (Koуро et al., 2012). Органічні низькомолекулярні осмоліти включають нітроген-вмісні сполуки, такі як вільні амінокислоти, сполуки четвертинного амонію, які називаються бетаїнами і поліаміни; осмоліти без

Нітрогену включають багатоатомні спирти з прямим ланцюгом, циклічні багатоатомні спирти і цукри (Koyno et al., 2012; Kosová et al., 2013). Їх основною функцією є зменшення водного потенціалу, підтримання тургору клітин та забезпечення балансу у рослинному організмі. Крім цього, висока концентрація органічних речовин зосереджена в основному в цитозолі для збалансування низького водного потенціалу, який виник у результаті високої апоплазматичної та вакуолярної концентрації Na^+ і Cl^- . Дослідження вказують на те, що осмоліти також захищають субклітинні структури та пом'якшують окисне пошкодження, спричинене вільними радикалами, які утворюються у відповідь на засолення (Ісаєнков, 2012; Koyno et al., 2012; Кияк, Буньо, 2017). Щоб зменшити шкідливу дію сольового стресу, пролін діє як осмоліт, поглинаючи АФК шляхом посилення антиоксидантної активності, а також стабілізує структуру біомолекул. Крім того, він також допомагає підтримувати тургор і стабілізує клітинні структури в умовах засолення (Sami et al., 2016). Пролін є одним з найбільш багатофункціональних стресових метаболітів рослин. Вважається, що крім осмопротекторної функції, він виконує шаперонну, антиоксидантну, сигнально-регуляторну та інші функції, надає осмо- і мембранопротекторну дію, бере участь в регуляції експресії генів антиоксидантних ферментів і у зв'язуванні металів зі змінною валентністю, впливає на баланс НАД(Ф)Н/НАД(Ф) (Колупаєв и др., 2014; Нестеренко, 2019). Накопичення АФК безпосередньо корелює з накопиченням цукру для акліматизації негативних наслідків стресу навколишнього середовища. Розчинні цукри відіграють подвійну функцію у рослинному організмі, оскільки вони пов'язані як з анаболізмом АФК, так і з катаболізмом, наприклад, окислювальним пентозофосфатним шляхом, який забезпечує вироблення НАДФН, бере участь у виведенні АФК (Sami et al., 2016).

1.4. Роль мікробіому в адаптації рослин до стресових умов

Стресові фактори навколишнього середовища формують мікробне «населення» ґрунту, що, у свою чергу, впливає на фізіологічні процеси у рослинному організмі та навпаки. Таким чином, виживання голобїонта залежить

від двонаправленого потоку сигналів, які допомагають йому адаптуватися до умов середовища та переносити його. Пов'язаний з рослинами мікробіом у стресових умовах має багатий пул бактерій з різноманітними функціями, які можна використовувати в якості біоінокулянтів (Anand et al., 2021). Група мікроорганізмів, які виділяються в цьому рослинному мікробіомі, — це корисні бактерії, відомі як ріст-стимулюючі бактерії рослин (PGPB – plant growth-promoting bacteria). Показано, що бактерії, такі як *Azospirillum*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter* і *Pseudomonas*, покращують стійкість до засолення у кількох рослинних культур (Orozco-Mosqueda et al., 2019). Використання інокулянтів ризобактерій, які стимулюють ріст рослин та є стійкими до засолення (галофільні бактерії) є альтернативним методом підвищення стійкості рослин до засолення (Chen et al., 2021).

Бактерії взаємодіють із виділеннями коренів та ґрунтовими мікробними угрупованнями, формують стійкі асоціації з рослинами. Бактерії, які стимулюють ріст рослин у природній екосистемі відіграють ключову роль у захисті рослин від багатьох стресових факторів, включаючи вплив високих концентрацій ВМ та засолення. За їх впливу формуються стійкі рослинно-мікробні асоціації для спільного виживання обох партнерів (Pishchik et al., 2021). Токсична дія цих забруднювачів впливає на їх виживання у різних середовищах, а саме, призводить до їх виснаження, або ж пристосування та розвитку певних механізмів (Desoky et al., 2020).

Ризоремедіація є екологічно чистим біологічним вирішенням для усунення токсичності ВМ. Для цього PGPR використовують різні механізми, зокрема такі як біоаккумуляція та біосорбція. Вони виділяють низькомолекулярні сидерофорні хелатори, які утворюють стабільні комплекси з такими металами, як залізо, кадмій, мідь, свинець і цинк (Ullah et al., 2021).

Ріст-стимулюючі бактерії рослин можуть сприяти росту та розвитку рослин прямим та непрямим способами (Glick, 2014; Ibort et al., 2017; Orozco-Mosqueda et al., 2020). Непряме стимулювання росту рослин відбувається, коли ці бактерії зменшують або запобігають деяким шкідливим ефектам рослинного патогена

(зазвичай гриба), використовуючи певні механізми. Пряме – сприяє полегшенню отримання поживних речовин із навколишнього середовища, включаючи фіксований азот, залізо та фосфор, або специфічне моделювання росту рослин шляхом зміни рівня рослинних гормонів, таких як ауксин, цитокінін та етилен (Glick, 2014; Shrivastava, Kumar, 2014; Mokrani et al., 2020). Дослідники припускають, що рослинні гормони відіграють важливу роль у покращенні толерантності рослин до абіотичного стресу, включаючи засолення (Rao et al., 2020).

Газоподібний гормон етилен (C_2H_4) є важливим модулятором нормального росту та розвитку рослин, який відіграє ключову роль у відповіді рослин на дію широкого спектру абіотичних та біотичних стресових факторів. У відповідь на стрес спостерігається підвищення рівня ендогенного етилену (Glick, 2014; Ali et al., 2018). Цей процес безпосередньо пов'язаний з концентрацією 1-аміноциклопропан-1-карбонової кислоти (ACC) у тканинах рослин (Fahad et al., 2015). Етилен є похідним метіоніну, який перетворюється на S-аденозил-L-метіонін (SAM) за допомогою SAM-синтетази, а SAM потім перетворюється на 1-аміноциклопропан-1-карбонову кислоту (ACC) за допомогою ACC-синтетази, після чого ACC перетворюється на етилен за допомогою ACC оксидази (Orozco-Mosqueda et al, 2020; Naing, Maung, Kim, 2021). Крім перетворення ACC прямо у етилен за допомогою ACC-оксидази, ACC може бути сполучений з іншими формами, такими як M-ACC (малоніл-ACC), G-ACC (глутаміл-ACC) і J-ACC (джасмоноіл-ACC), які можуть накопичуватися та транспортуватися у тканинах рослин (Glick, Nascimento, 2021).

Виявлено, що рослини містять декілька копій генів як ACC-синтази, так і ACC-оксидази. Транскрипція деяких генів ACC-синтази індукується різними стресовими факторами, включаючи забруднення ґрунту металами, а також високі концентрації солей в ґрунті (Orozco-Mosqueda et al, 2020).

Бактеріальна ознака, яка є ключовою для стимулювання росту рослин — це наявність ферменту 1-аміноциклопропан-1-карбоксилат (ACC) деамінази (ACCD). Цей фермент відповідає за розщеплення попередника рослинного етилену, а саме

ACC, на аміак і α -кетобутират (Glick, 2014). ACC-деаміназа конкурує з рослинним ферментом ACC-оксидазою, який підвищує рівень етилену шляхом окислення ACC в етилен (Barnawal et al., 2016). Рослини кукурудзи в умовах сольового стресу продемонстрували підвищену активність ACC-оксидази порівняно з рослинами в нормальних умовах. Застосування PGPR призвело до значного зниження активності ACC-оксидази – рослини кукурудзи, інокульовані *Bacillus safensis* NBRI 12 M, показали максимальне зниження, що узгоджується з низьким рівнем утворення етилену при сольовому стресі (Mokrani et al., 2020).

Знижуючи рівень ACC в рослинах, бактерії, що продукують ACCD, знижують рівень етилену, який у високих концентраціях може призвести до пригнічення росту рослин або навіть загибелі (Glick, 2014). Створено трансгенні сорти рослин, які мають кращі механізми стійкості до стресу завдяки експресії бактеріального гена ACCD. Використання бактеріальних ендofітів, що продукують ACCD, може бути більш економічно вигідним, доступним та екологічно чистим та більш прийнятним у порівнянні з трансгенними рослинами для тієї ж мети (Barnawal et al., 2016). Досліджено, що штам *Streptomyces sp.* GMKU 336, який містить ACCD, може покращити розвиток та стійкість рослин рису до засолення, за рахунок зниження концентрації етилену, знешкодження АФК та збереження іонного гомеостазу (Mokrani et al., 2020). Рослини гороху, інокульовані *Variovorax paradoxus* 5C-2, які продукують ACCD, мали підвищену інтенсивність фотосинтезу, транспорту електронів, збалансований іонний гомеостаз за рахунок збільшення надходження K^+ до пагонів та накопичення Na^+ на коренях, зниження резистентності продихів та тиску балансу ксилеми, а також збільшення біомаси за впливу засолення при 70 і 130 мМ NaCl. Для рослин бамії PGPR, які продукують ACC, сприяли толерантності рослин до засолення, підвищували активність антиоксидантних ферментів, а також активізували гени шляху АФК. Проростки кукурудзи, інокульовані *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9, мали підвищену толерантність до сольового стресу, включаючи підвищений вміст хлорофілу, порівняно з контролем (Backer et al., 2018).

Ріст-стимулюючі бактерії, які містять ACCD, присутні в різних ґрунтах і діють як бактеріальний інокулят для сприяння росту рослин, особливо за несприятливих екологічних умов, таких як повені, вплив ВМ, фітопатогени, посуха та високий вміст солей (Saud et al., 2014; Anand et al., 2021). Встановлено, що ці бактерії спочатку зв'язуються з поверхнею рослини (зазвичай насінням або корінням), однак ці бактерії також можуть бути на листках і квітках або у внутрішніх тканинах рослини (тобто як ендofіти) (Ali et al., 2013; Glick, 2014; Kumari et al., 2016). В результаті рослини, які ростуть в асоціації із ріст-стимулюючими бактеріями, які містять ACCD, мають довші корені та пагони, а також більш стійкі до пригнічення ростових показників за впливу етилен-індукуючих стресових факторів (Ali et al., 2013; Glick, 2014). Таким чином, взаємодія PGPR та рослин, які перебувають у стресовому стані, може знизити рівень етилену, збільшити витривалість та сприяти продукції біомаси у рослин (Fahad et al., 2015). Встановлено (Achard et al., 2006; Fahad et al., 2015), що у рослин арабідопсису етилен сприяє стійкості до засолення. Реакція рослин на сольовий стрес може залежати від балансу та/або взаємодії між рецептором та етиленом. Відомо, що за впливу стресових факторів на організм рослин у відповідь генеруються АФК у надлишку, які є надзвичайно шкідливими для живих організмів. Рослини інокульовані бактеріями показали меншу активність антиоксидантів за впливу засолення, що свідчить про те, що рослини піддаються меншому окисному стресу (Kumari et al., 2016).

Кілька родів бактерій, таких як *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Thiobacillus*, *Serratia* та *Streptomyces* були визначені стимуляторами росту рослин за впливу засолення. Солестійкі PGPR розвинули механізм стійкості до стресу через продукцію екзополісахаридів та формування біоплівки, яка зв'язує катіони Na^+ та обмежує їх поглинання в умовах засоленого ґрунту. Екзополісахариди відіграють фундаментальну роль у формуванні бактеріальної біоплівки, яка власне і посилює колонізацію бактерій на поверхні коренів рослин (Nadeem et al., 2010; Shultana et al., 2020; Fetsiukh et al., 2021).

Використання PGPR у сільському господарстві є потенційним інструментом та тенденцією в майбутньому. Тому існує потреба у дослідженнях для визначення корисних бактерій для різних умов навколишнього середовища та рослин, для того, щоб можна було вибрати та/або покращити оптимальні штами бактерій. Для видалення солі з ґрунту звичайні методи непрактичні та дорогі, тому в даний час розробляються комбінації корисних штамів бактерій, які взаємодіють синергічно. Дослідження показують багатообіцяючу тенденцію в області технології інокуляції (Etesamia, Maheshwarib, 2018).

Таким чином, стійкість та реакція рослинного організму до умов техногенного забруднення є особливо актуальною та передбачає ряд процесів, які спричинені комбінованим стресовим впливом забрудненого субстрату. Адаптація рослин до стресових умов проявляється у формуванні захисних механізмів, серед яких індукція синтезу антиоксидантних ферментів, а також стресових білків. Тому є доцільним вивчення механізмів захисту рослин на фізіологічному рівні. Водночас слід зазначити роль стійких рослинно-мікробних асоціацій, які забезпечують умови виживання для обох партнерів. Для цього доцільним є проведення скринінгу ендofітних бактерій коренів дослідних рослин в умовах техногенного забруднення. Важливим є вивчення перерозподілу ВМ у органах рослин з метою використання у фіторе mediaції. Тому проведення даного дослідження, а також відповідність вмісту ВМ у дослідному субстраті та органах дослідних рослин відносно екологічних норм, відіграє важливу роль у практичному використанні енергетичних рослин з метою відновлення техногенно забруднених ґрунтів .

РОЗДІЛ 2

УМОВИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Характеристика досліджуваних рослин *S. viminalis*

Прутовидна верба (*Salix viminalis* L.), також відома як енергетична верба, – вид верби (*Salix*), родини вербових (*Salicaceae*), що швидко росте та придатна для використання як біомаса (Гунчак, Никифорак, 2014). Це деревоподібна культура, яка представляє собою кущ або кущоподібне дерево висотою до 6 – 8 м (рис.2.1) Легко розмножується пагонами. *S. viminalis* – швидкоросла чагарникова верба – до 3-5 см на день (Толстушко та ін., 2014; Xia et al., 2021). Тому рослини використовуються для створення плантацій в енергетичних цілях в Європі. Завдяки високому елементному накопиченню, верба також широко використовується у фітореMediaції (Zou et al., 2021). Рослини можна вирощувати на ґрунтах різних типів, як легких (піщаних), середніх (суглинних) так і важких (глинистих) ґрунтах (Roman et al., 2021). Вчені стверджують, що вирощування *S. viminalis* в енергетичних цілях є одним із видів діяльності, який сприяє припиненню змін клімату (Janicka et al., 2020).



Рис. 2.1. Рослини верби прутовидної (*Salix viminalis* L.)

2.2. Відбір субстрату та закладання польового досліду на території хвостосховища м. Стебника

Відбір субстрату здійснювали згідно ДСТУ 17.4.4.02:2019 у весняно-літній період. Відбирали субстрат на глибині 0-25 см в місцях відновленого біогеоценозу

(49°18'39.8"N 23°33'59.3"E; 49°18'40.0"N 23°34'00.7"E; 49°18'41.1"N 23°33'57.7"E), середнього (49°18'45.0"N 23°34'07.7"E; 49°18'43.8"N 23°34'07.8"E; 49°18'43.3"N 23°34'07.4"E) та сильного (49°18'45.2"N 23°34'05.5"E; 49°18'45.4"N 23°34'03.4"E; 49°18'45.3"N 23°34'04.5"E) засолення, які визначали візуально за місцем росту рослин (рис. 2.2.). У лабораторних умовах субстрат висушували до повітряно-сухого стану, розтирали, відбирали рослинні залишки і просіювали через сита. Вносили по 2 – 3 кг субстрату у посудини об'ємом 3 л. Вологість субстрату на час зважування становила 10 %. З кожної дослідної посудини з субстратом брали одну змішану пробу, яку готували з 25 індивідуальних проб. Індивідуальні проби ретельно перемішували та з загальної маси ґрунту відбирали середню пробу масою 500 г та зсипали до паперових мішечків для зберігання (Грицаєнко та ін., 2003). Підготовлений субстрат використовували для подальших досліджень.



Рис. 2.2. Місця відбору проб субстрату з хвостосховища м. Стебник: 1 – місця відновленого біогеоценозу; 2 — місця поширення піонерних глікогалофітів; 3 — місця незначного поширення солонця європейського (*Salicornia europaea* L.)

Польовий дослід закладали на цих же ділянках, з яких відбирали субстрат (рис. 2.2.). В екологічних дослідженнях як контроль прийнято вважати такий же тип ґрунту, але без забруднень. Оскільки для роботи використовувався не ґрунт, а засолений субстрат, для контролю обрано місця відновленого біогеоценозу. Площа однієї дослідної ділянки складала 30 м². Повторюваність ділянок трикратна. На кожен ділянку навесні було висаджено по 150 вкорінених живців *S. viminalis*. Відбір зразків рослин верби здійснювали на 120 добу росту. На цей період рослини *S. viminalis* з ділянок із сильним засоленням (див. рис. 2.2.(3)) на 99 % загинули. Тому подальші дослідження проводили тільки із рослинами, які росли на ділянках поширення піонерних глікогалофітів (2) та відновленим біогеоценозом (1).

2.3. Визначення кислотності у субстраті Стебницького хвостосховища

Актуальну, обмінну та гідролітичну кислотність визначали за ДСТУ 8346:2015.

20 г повітряно-сухого ґрунту поміщали у колбу, заливали 50 мл дистильованої води для визначення актуальної кислотності, або 50 мл 1 н калій хлорид для визначення обмінної кислотності, або 50 мл 1 н натрій ацетату для гідролітичної кислотності. Збовтували упродовж 5 хв. Після перемішування, проби закривали та залишали на 24 години. Кислотність визначали у відфільтрованих розчинах за допомогою рН-метра Seven Compact (Mettler Toledo, США).

2.4. Визначення водорозчинних іонів у субстраті Стебницького хвостосховища

Водорозчинні іони визначено комплексометричним методом. Для проведення аналізу відбирали проби та готували витяжки за ДСТУ 4288:2004.

Визначення Ca²⁺: до витяжки додавали 2 мл 2 н NaOH до рН = 12-13 та додавали 1 мл кальконкарбонової кислоти. Розчин забарвлювався у вишневий колір. Відтитровували 0,1 н комплексоном III до зміни забарвлення на синій колір.

Визначення Mg²⁺: до водної витяжки субстрату додавали 5 мл аміачного буферу до рН = 10, декілька крупинок еріохрому чорного (забарвлення розчину

стало вишнево-червоне). Титрування проводили 0,1н комплексом III до зміни забарвлення на синій колір.

Визначення Fe^{2+} і Fe^{3+} : додавали до витяжки HCl, щоб рН = 2. Нагрівали до 50-60 °С, додавали 20-30 мл сульфосаліцилової кислоти, внаслідок чого розчин набував червоно-фіолетового кольору. Титрування проводили 0,01н комплексом III – розчин знебарвлювався. Після цього у цю ж пробу додавали 100 мл надсірчаноокислого амонію. Розчин забарвлювався у рожевий колір. Титрували 0,01 н комплексом III до знебарвлювання.

Визначення HCO_3^- : до витяжки додавали метилоранж. Титрування проводили 0,1 н HCl до зміни забарвлення з жовтого на рожеве.

Визначення Cl^- : доводили рівень рН витяжки до 7-10. Додавали 1 мл 5% калію хромовокислого. Титрували 0,1н $AgNO_3$ до зміни забарвлення на оранжево-жовтий колір.

Визначення SO_4^- : для виявлення цього аніону готували колонку (скляну трубку діаметром 2,5 см з краном (1000 мл), на шар скловати насипали КУ-2). Для регенерації катіону через колонку, пропускали 0,1н HCl поки рН вихідного розчину HCl не було рівним рН вихідного розчину. Аналізуючу витяжку пропускали через колонку з катіонітом КУ-2. Перші 20 мл фільтрату виливали. До 10 мл фільтрату додавали 10 мл етилового спирту, 2 каплі 0,2% нітхромазо. Відтитровували 0,02 н $BaNO_3$ до зміни забарвлення на голубий колір.

Кількість цих елементів у витяжці розраховували за формулою:

$$X = \frac{V \times C \times M \times 1000}{V_1},$$

де V – об'єм розчину, який використався на титрування,

C – концентрація розчину, який використовували для титрування,

M – еквівалентна маса іону,

1000 – коефіцієнт перерахунку,

V1 – об'єм проби водної витяжки, взятий для титрування.

2.5. Визначення ВМ у субстраті та рослинному матеріалі

Вміст важких металів (ВМ) визначали методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії на спектрофотометрі СТЭ-1 з вугільними електродами у полум'ї суміші ацетилен-повітря. Чутливість методу становить 10^{-4} % (Александрова и др., 2001).

Визначення ВМ у субстраті: до витяжки субстрату з 1М HNO₃ додавали ацетатно-амонійний буферний розчин рН = 4,8 у співвідношенні 1:10, збовтували протягом 1 години. Вимірювання проводили на атомно-абсорбційному спектрофотометрі. Вміст ВМ визначали за формулою:

$$X = \frac{V \times (A1 - A0)}{m},$$

де x – масова частка визначеного металу у повітряно-сухій пробі субстрату, млн^{-1} (мг/кг);

$A1$ – концентрація металу у дослідній буферній витяжці субстрату, знайдена за калібрувальним графіком, мг/дм^3 ;

$A0$ – концентрація металу у контрольній пробі, знайдена за градіювальним графіком, мг/дм^3 ;

V – об'єм дослідної витяжки, мл ;

m – маса повітряно-сухої проби субстрату, г .

Визначення ВМ у рослинному матеріалі: мінералізацію проб рослин проводили методом сухого озолення за ГОСТ 26657-85. Визначення металів проводили у розчині золи: додавали кілька крапель бідистильованої води та розбавлену (1:1) нітратну кислоту. Після цього тигель нагрівали на електроплитці до кипіння. Вміст тигля фільтрували та визначали метали у матеріалі. Для визначення вмісту важких металів використовували формулу:

$$X = \frac{V \times (A1 - A0)}{m} \times K,$$

де x – масова частка визначеного металу у рослинній пробі, млн^{-1} (мг/кг);

$A1$ – концентрація металу у розчині золи, знайдена за градіювальним графіком, мг/дм^3 ;

A_0 – концентрація металу у холостій пробі, знайдена за градіювальним графіком, мг/дм³;

V – об'єм дослідного розчину золи;

m – маса поітряно-сухої проби рослини, г;

K – коефіцієнт, який враховує зменшення наважки рослинного матеріалу ($K=1$, якщо матеріалу у 2 рази менше, то $K=2$).

2.6. Вирощування *S. viminalis* у лабораторних умовах



А)



Б)

Рис. 2.3. Вкорінені живці *S. viminalis*, які використовувались в якості посадкового матеріалу (А); вирощування рослин у лабораторних умовах (Б)

Живці рослин *S. viminalis* вирощували протягом 30 та 90 діб. Висаджували у субстрат вкорінені живці довжиною 25 ± 2 см та діаметром $0,8 \pm 0,2$ см з довжиною коренів $2 \pm 0,5$ см. В одну посудину висаджували по 5 живців (рис. 2.4). Усі варіанти поливали дистильованою водою в однакових кількостях. Вологість підтримували у межах 60 % від повної вологості. Згідно (Fagooc, 2002), дана вологість сприяє найкращому росту рослин. Після 14 днів росту на субстраті із місць незначного поширення солонця європейського (див. рис. 2.2.(3)), не вкорінені живці загинули. У результаті цього, більшість досліджень вирішено проводити на

субстраті із ділянок поширення піонерних глікогалофітів (дослід) та відновленого біогеоценозу (контроль) (див. рис. 2.2.).

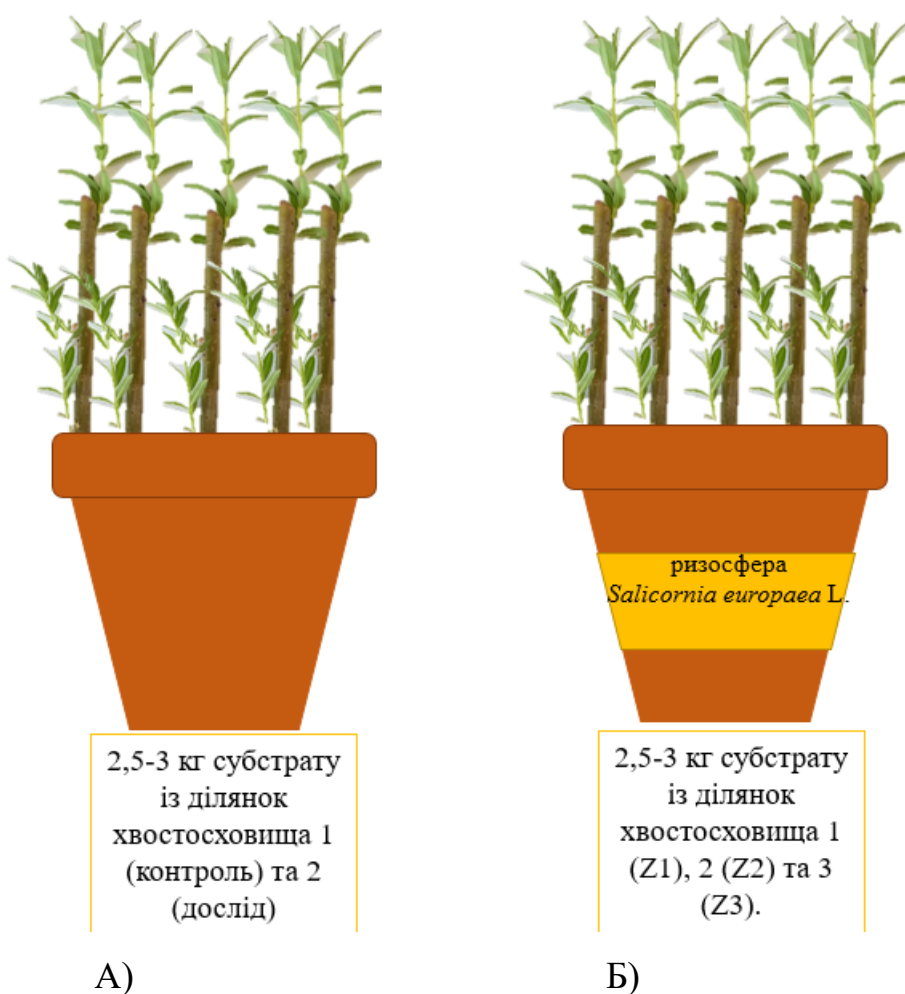


Рис. 2.4. Схема вирощування *S. viminalis* в лабораторних умовах протягом 30 (А) та 90 діб (Б) на субстраті хвостосховища м. Стебник

Однак для дослідження складу ЕБ коренів *S. viminalis*, вкорінені живці висаджувались у субстрат із найбільш забруднених ділянок хвостосховища (див. рис. 2.2.(3)). Також для цього дослід, середній шар горщиків із 5-ма вкоріненими живцями рослин був заповнений зразками субстрату із ризосферної зони *S. europaea* (див. рис. 2.4). Ризосферні зразки *S. europaea* відбирали на глибині 5-10 см із субстрату Стебницькому хвостосховища у літній період. Зразки переносили у стерильні пакети та транспортували до лабораторії. В якості контролю, рослини

S. viminalis вирощували на субстраті хвостосховища із трьох ділянок (рис. 2.2). Кожен із варіантів дослідження проводили у 6-ти повторностях.

2.7. Визначення морфометричних показників

Площу листка вимірювали за допомогою програми для визначення площі складних фігур «Easy Leaf Area Free» (<https://play.google.com/store/apps/details?id=com.heaslon.EasyLeafArea&hl=en&gl=US>), робота якої основана на скануванні двох фігур, площа одної з яких відома (шаблон), їх порівнянням з наступним розрахунком площі другої фігури. Похибка визначення площі не перевищує 0,001%.

Ростові процеси визначали вимірюванням окремих частин рослин за допомогою лінійки.

Об'єм кореневої системи визначали за методом Д. А. Сабініна і І. І. Колосова. Даний метод полягає у визначенні кількості води, яку витісняють корені під час занурення їх у мірний циліндр. Відносна похибка методу близько 5 % (Войцехівська та ін., 2010). Корені, відібрані для аналізу, складали у пучок, щоб кореневі шийки були на одному рівні. Корені злегка просушували фільтрувальним папером, відзначали положення меніска А' в піпетці. Кореневу систему рослин занурювали до кореневої шийки у воду. Рівень води у посудині підвищувався, і меніск у піпетці піднімався до положення В'. Збільшення об'єму води дорівнюватиме об'ємові кореневої системи досліджуваних рослин.

Для визначення вмісту води у різних органах верби, рослинний матеріал висушували при температурі 105 ° С у сушильній шафі до постійної маси. Вміст води в наважці розраховували за різницею мас сирої та сухої речовини. Виразали вміст води у % до маси сирої речовини (Терек та ін., 2005).

2.8. Визначення флуктуаційної асиметрії листкових пластинок

Визначення флуктуаційної асиметрії (ФА) проведено для рослин із місць відновленого біогеоценозу Стебницького хвостосховища (49.18409N; 23.34010E) та екологічно чистих територій (49.47130N; 23.52302E та 49.627531N; 23.463897E).

Відбирали по 5 листків із середньої частини 10 пагонів з кожної рослини. Для точності результату листки сканували та проводили вимірювання 5 білатеральних ознак для: 1 – ширина лівої і правої половинок листка; 2 – відстань від основи до кінця жилки другого порядку, другої від основи листка; 3 – відстань між основами першої і другої жилок другого порядку; 4 – відстань між кінцями першої і другої жилок; 5 – кут між головною жилкою і другою від основи листка жилкою.

Вимірювання довжини та ширини листкової пластинки визначали у пікселях за допомогою комп'ютерної програми Image Tools. Для вимірювання кута використовували транспортир. Для аналізу комплексу морфологічних ознак використовували інтегральний показник, який розраховували таким чином: 1) для кожної листкової пластинки обчислювали відносні величини асиметрії для кожної ознаки (різницю між промірами зліва (L) і праворуч (R) ділили на суму цих замірів: $(L-R)/(L + R)$); 2) обчислювали показник асиметрії для кожного листка (додавали значення відносних величин асиметрії за кожною ознакою і ділили на число ознак); 3) обчислювали інтегральний показник стабільності розвитку – величину середньої відносної відмінності між сторонами на ознаку (обчислювали середнє арифметичне всіх величин асиметрії).

Величину ФА оцінювали за існуючою методикою (Захаров, 1987). Для оцінки ступеня виявлених відхилень від норми використовували бальну шкалу, що характеризує рівень забруднення території на основі показника ФА. Значення інтегрального показника асиметрії, які відповідають першому балу, зазвичай спостерігаються у вибірках рослин сприятливих умов зростання, наприклад в природних заповідниках. П'ятий бал – критичне значення і такі дані показника асиметрії спостерігаються у вкрай несприятливих умовах, коли рослина перебуває в сильно пригніченому стані (Барабаш, 2019). Значення інтегрального показника асиметрії, які відповідають першому балу, зазвичай спостерігаються у вибірках рослин сприятливих умов зростання, наприклад в природних заповідниках. П'ятий бал – критичне значення і такі дані показника асиметрії спостерігаються у вкрай несприятливих умовах, коли рослина перебуває в сильно пригніченому стані (Барабаш, 2019).

2.9. Визначення вмісту білка за Лоурі

Наважку рослинного матеріалу (0,5 г) розтирали у ступці з охолодженим ацетоном тричі, порціями по 3,75 мл. Об'єднували і випаровували ацетон під вентилятором до порошку. Сухий порошок розчиняли в 5 мл 0,1 М розчину фосфатного буферу (рН 8,0), протягом 30 хв. Отриману суміш центрифугували 20 хв. при 3000 об/хв.

До 0,4 мл білка додавали 2 мл робочого розчину та перемішували. Через 10 хв додавали 0,2 мл реактиву Фоліна-Чекальтеу, перемішували і через 30 хв визначали оптичну густину одержаної суміші при довжині хвилі 750 нм (кювета 1 см) проти контролю, який готували аналогічно пробі (замість розчину білка додавали 0,4 мл дистильованої води). Вміст білка (мг/г маси сирової речовини) в пробі визначали за калібрувальним графіком (Lowry, 1951).

2.10. Хроматографічне розділення низькомолекулярних білків

Рослинний матеріал гомогенізували в ступці із рідким азотом. Додавали буферний розчин тріс-НСІ (рН = 6,8) для змочення, так щоб була лінза 1 мм. Потім соніфікували на ультразвуковому соніфікаторі на 5 потужності (30 с). Після цього центрифугували при 12 000 об./5 хв. та збирали супернатант. Білки осаджували ацетоном (12 год.) і потім знову центрифугували. Осад білків заливали ацетоном та просушували зразки. Згодом розчиняли їх у 30 мкл дистильованої води та додавали 10 мкл 4-кратного буферу Лемлі, який містить меркаптоетанол. Після цього зразки ставили на водяну баню (2хв) і наносили на 12% поліакриламідний гель, який фіксували в буфері, що містив 14% метанолу, 7% оцтової кислоти і решту – дистильована вода. Гель фарбували фарбою Coomassie G250, відмивали її 7% розчином оцтової кислоти.

Для порівняння, проводили осадження білків у зразках за допомогою ТХО, замість ацетону. До висушених зразків додавали 100 % розчин ТХО, осад відмивали ацетоном. Отримані зразки обробляли по тій же схемі (Павлинова, 1971).

2.11. Оцінка ефективності поглинання ВМ рослинами

Для кількісної оцінки ефективності фітоекстракції застосовували коефіцієнт біологічного накопичення (КБН) та фактор транслокації (ФТ) (Nawrot et al., 2021; Lamine, Saunders, 2022).

Коефіцієнт біологічного накопичення визначається співвідношенням вмісту металу в одиниці маси акцептора (рослини в перерахунку на її суху масу) і донора (грунту):

$$K_n = \frac{C_p}{C_r},$$

де K_n – коефіцієнт біологічного накопичення;

C_p – вміст металу в рослині, мг/кг;

C_r – вміст металу в ґрунтовому покриві, мг/кг.

Для групування ВМ у рядах за інтенсивністю біологічного накопичення використано п'ять градацій (Авессаламов, 1987):

Елементи біологічного накопичення ($K_n > 1$):

I група – $K_n - 10n$ і більше – елементи енергійного накопичення (Cd, Cs, Rb);

II група – $K_n - 10 - n$ – елементи сильного накопичення.

Елементи біологічного захвату ($K_n < 1$):

III група – $K_n - 0, n$ – елементи слабого накопичення і середнього захвату (Zn, Mo, Cu, Pb, As, Co);

IV група – $K_n - 0, 0n$ – елементи слабого захвату (Mn, Ni, Cr);

V група – $K_n - 0, 00n$ і менше – елементи дуже слабого захвату (Se, Fe, Ba, Te).

Фактор транслокації (ФТ) показує ефективність переміщення накопиченого металу з його підземних частин (К) до стебел (С) і листя (Л) та між надземними частинами (С і Л):

$$FT_C = \frac{BM_C}{BM_K},$$

$$FT_L = \frac{BM_L}{BM_K},$$

$$FT_{L/C} = \frac{BM_L}{BM_C}.$$

Для кількісного виразу загальної здатності виду рослин до концентрації ВМ використовували біогеохімічний показник активності (БХА) виду (Авессаламов, 1987), що являє собою сумарну величину, яка отримується від складання КБН окремих ВМ:

$$\text{БХА} = \sum \text{КБН}$$

2.12. Екологічна оцінка навантаження субстрату важкими металами

Екологічну інформативність отриманих величин фонового вмісту ВМ оцінювали за еколого-геохімічними коефіцієнтами, які висвітлюють особливості ландшафтних процесів міграції ВМ кларками концентрації (КК) і коефіцієнтами концентрації (Кк) (Клос, Бірке, Жовинський, 2012).

Оцінку техногенного навантаження проводили за Ю. Є. Саєтом, визначаючи коефіцієнти безпеки (Кб) та концентрації (Кс), і сумарний показник забруднення (ZC) (Саєт, 1990).

Коефіцієнти безпеки K_6 визначали за формулою:

$$K_6 = C / \text{ГДК},$$

де C — фактичний рівень вмісту речовин у ґрунті;

ГДК* — гранично допустима концентрація (згідно Розпорядження Кабінету Міністрів України № 93 від 20.01.2016 р., показник ГДК визнано таким, що втратив силу. Проте, не введено новий показник і до сьогодні використовується ГДК).

Коефіцієнт концентрації металу (Кс) визначали за відношенням реального вмісту хімічного елемента в ґрунті (C_a) до фонового вмісту цього ж елемента (C_f) в середовищі

$$K_c = C_a / C_f.$$

Коефіцієнт концентрації металу свідчить про активність процесів вилуговування ($K_c < 1$) і накопичення ($K_c > 1$) хімічних елементів у ґрунті.

Сумарний показник забруднення Z_C вираховували за формулою:

$$Z_C = \sum_1^n K_{c_n},$$

де K_c – коефіцієнт концентрації металу,

n – число елементів.

Рівень забруднення оцінювали за значеннями Z_c (табл. 2.1).

Таблиця 2.1.

Орієнтована шкала оцінки небезпеки забруднення ґрунтів за сумарним показником забруднення (Z_c) (Блінова та ін., 2009)

<i>Категорія забруднення ґрунтів (R)</i>	<i>Величина (Z_c)</i>
I категорія (допустима)	<16
II категорія (помірно небезпечна)	16-32
III категорія (небезпечна)	32-132
IV категорія (надзвичайно небезпечна)	>128

Нормування поелементного забруднення ґрунту ВМ проводили за методикою В. В. Снакіна (Снакин, 1992) та ґрунтово-екологічних принципів, які відкидають можливість знаходження поодиноких значень для всіх ґрунтів (Вальков и др., 2004). Поліелементне нормування здійснювали за оцінкою індексу забруднення ґрунту (ІЗГ). Показник ІЗГ дає змогу порівнювати результати отримані на різних територіях.

Розрахунок ІЗГ здійснювали за спрощеною схемою, запропонованою М. О. Богдановим (Богданов, 2013):

$$ІЗГ = \sum_n^i \left(\frac{C_i}{СГДК} \right) / n = \sum_n^i (Кб) / n,$$

де C_i – концентрація ВМ в ґрунті конкретно взятої ділянки (мг/кг);

СГДК – ГДК ВМ в ґрунті (мг/кг);

n – число елементів.

2.13. Визначення вмісту проліну

Екстрагування проліну проводили кип'ятінням рослинних зразків (300 мг рослинного матеріалу) в 5 мл $H_2O_{дист.}$ (10 хв). Після центрифугування (20 хв 3000 об/хв) до 1 мл супернатанту додавали 1 мл CH_3COOH і 1 мл нінгідринового

реактиву. Проби інкубували протягом 1 год у киплячій водяній бані, швидко охолоджували у льоді. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі СФ-2000 при довжині хвилі 510 нм (Bates, Waldren, Theare, 1973).

Вміст проліну (мкмоль/г маси сирової речовини) визначали за формулою:

$$X = \frac{A \times V \times 100}{1000 \times H},$$

де А – екстинція,

V – об'єм екстракту,

H – наважка рослинного матеріалу.

2.14. Визначення вмісту аскорбінової, дегідроаскорбінової та дикетогулонової кислот

Наважку рослинного матеріалу (0,5 г) поміщали у фарфорову ступку та заливали 10 мл 5% метафосфорної кислоти та розтирали. Після цього центрифугували для видалення осаду (20 хв при 3000 об/хв).

У дві пробірки з притертими корками наливали по 0,75 мл отриманого витягу і в одну додавали 0,001 н розчин 2,6-дихлоріндофенолу до появи слабо рожевого забарвлення, стійкого протягом 30 с.

У третю пробірку вносили 0,75 мл витягу, приготованого на $0,5 \times 10^{-3}$ М розчині меркаптоетанолу. Витяг отримували при розтиранні 0,5 г рослинного матеріалу в 10 мл розчину меркаптоетанолу приготованого на фосфатному буфері (рН=7,0). Витяг струшували та переносили на холод (10 хв) і центрифугували.

Осаджування білків проводили використовуючи метафосфорну кислоту. Для цього до 4 мл центрифуга та додавали 1 мл 5% метафосфорної кислоти, осад відцентрифугували (15 хв при 3000 об/хв).

До усіх трьох пробірок додавали по 0,25 мл розчину 2,4-динітрофенілгідразину і 3 мл дистильованої води. Пробірки поміщали у термостат на 20 хв. при температурі 100 °С. По закінченні терміну пробірки переносили на

льодяну баню і в кожну з них додавали по 1 мл (трьома порціями) сульфатної кислоти.

Через 1 годину забарвлені розчини фотоколориметрували при 520 нм в кюветі 10 мм (контрольний розчин – 3мл 5% метафосфорної кислоти + 1 мл 2,4-динітрофенілгідразину + 1 мл дистилляту, далі обробляли як і дослідні). За калібрувальною кривою визначали концентрацію кислоти. Вміст кислоти X на 1 г наважки визначали за формулою:

$$X = \frac{10 \times C}{0,75 \times n},$$

де C – концентрація розчину, знайдена за калібрувальним графіком, мкг/мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г;

10 – об'єм досліджуваного розчину;

0,75 – об'єм розчину, взятий для аналізу.

Кількісний вміст кислот розраховували за наступною схемою.

У пробірці з екстрактом, отриманим із меркаптоетанолом, визначали лише вміст ДКГК (мг/100 г сирової речовини), бо він відновлює ДАК до АК, яка з 2,4-динітрофенілгідразином не визначається.

У пробірці з кислотним екстрактом визначали ДАК і ДКГК, тому віднімаючи від цієї суми кількість ДКГК, знаходили вміст ДАК (мг/100 г сирової речовини).

У пробірці з кислотним екстрактом, де АК була окислена 2,6-дихлоріндофенолом до ДАК, визначиться сума трьох кислот (АК, ДАК, ДКГК). Знаючи величину ДАК і ДКГК, за різницею знаходили вміст АК (мг/100 г сирової речовини) (Окунцев и др., 1981).

2.15. Визначення вмісту малонового диальдегіду як показника активності процесів ПОЛ

Наважку рослинного матеріалу (0,5 г) розтирали у 3 мл дистильованої води. Додавали 3 мл 20 % ТХО і ще розтирали. З гомогенату відбирали у мірні пробірки 2 проби по 2 мл. В одну додавали 2 мл 20% ТХО – контроль, в другу – 2 мл 0,5 % ТБК. Проби індукували 30 хв. на киплячій водяній бані, після цього охолоджували

і центрифугували. Оптичну густину супернатанту вимірювали при довжині хвилі 532 нм (Мусієнко та ін., 2001).

Кількість малонового діальдегіду (МДА) (нмоль/г маси сирової речовини) розраховували за формулою:

$$X = \frac{D_{532} \times 1000000 \times V \times A}{H \times \varepsilon},$$

де D_{532} – значення оптичної густини при $\lambda=532$ нм,

V – об'єм реакційної суміші (4 мл),

A – відношення загального об'єму витяжки до об'єму проби, взятої для визначення,

ε – молярний коефіцієнт екстинції (155000 л/(см·моль)),

H – наважка рослинного матеріалу, г.

2.16. Визначення активності каталази (КФ 1.11.1.6)

Наважку рослинного матеріалу (1 г) гомогенізували у 3 мл 50 мМ Tris-HCl буфері (рН 7,8). Отриману суміш центрифугували 15 хв при 3000 об/хв. Каталазну реакцію запускали додаванням 1 мл гомогенату до 20 мл 0,03% H_2O_2 . У холосту пробу замість гомогенату вносили 1 мл H_2O дистильованої. Реакцію зупиняли через 10 хв додаванням 10 мл 4 % р-ну молібдату амонію. У якості контролю використовували дистильовану воду. Вимірювання проводили на спектрофотометрі при довжині хвилі 410 нм (Корольок та ін., 1988).

Активність каталази (мкмоль H_2O_2 /мг білка×хв) визначали за формулою:

$$A = \frac{\Delta E \times V \times n}{\varepsilon \times C \times t \times \alpha \times 1},$$

де ΔE – різниця екстинції холостої і дослідної проби,

V – загальний об'єм суміші в кюветі,

n – розведення вихідного екстракту,

ε – молярний коефіцієнт екстинції комплексу H_2O_2 з NH_4MoO_3 ($22,2 \text{ см}^{-1} \times \text{мкмоль}^{-1}$),

C – концентрація білка,
 t – час реакції,
 α – об'єм екстракту,
 l – довжина оптичного шляху.

2.17. Визначення активності пероксидази (КФ 1.11.1.7)

Наважку рослинного матеріалу (0,5 г) розтирали з 10 мл ацетатного буферу (рН=4,7). Після 10 хв. настоювання з періодичним перемішуванням витяжку центрифугували при 3000 об/хв 15 хв. Супернатант використовували для визначення активності ферменту. У дві пробірки наливали по 2 мл ферментного розчину, 2 мл бензидину і 2 мл H_2O дистильованої. У контрольну пробірку наливали 2 мл H_2O , а до дослідної – 2 мл H_2O_2 . Вимірювання проводили на спектрофотометрі при довжині хвилі 625 нм (Гавриленко и др., 1975).

Активність ферменту пероксидази (мкмоль H_2O_2 /мг білка) визначали по швидкості реакції за формулою:

$$A = \frac{E \times (a \times b)}{H \times C \times t},$$

де A – активність ферменту на 1 г наважки,

E – екстинція,
 a – об'єм витяжки,
 b – ступінь розведення,
 H – наважка рослинного матеріалу,
 C – товщина шару речовини в кюветі.

2.18. Визначення вмісту фенольних сполук

Біомасу ліофільно висушували і визначали суху масу. Суху тканину (50 мг) розтирали і переносили в епендорф та заливали 80 % етанолом (1,5 мл). Після цього ставили на водяну баню (80°C, 30 хв.).

Екстракт осаджували при 12 000 g ×10 хв. Супернатант переносили у пробірку-епендорф об'ємом 2 мл. До осаду додавали 0,5-0,7 мл 80% етанолу, змішували і ще раз центрифугували. Супернатанти об'єднували та кінцевий об'єм доводили до 2 мл.

Для визначення оптичної густини використовували таку реакційну суміш: 0,5 мл екстракту+2,5 мл розведеного реактиву Фоліна-Чокальтеу і через 3 хв додавали 2,0 мл Na₂CO₃. Після цього реакційна суміш отримала синій колір. До контрольної пробірки додавали по 0,5 мл 80% етанолу. Пробірки з реакційною сумішшю добре струшували та залишали на 2 години.

Вимірювання оптичної густини проводили на спектрофотометрі при довжині хвилі 765 нм (Singleton et al., 1999). Вміст внутрішньоклітинних фенольних сполук розраховували за формулою:

$$\Phi=(C\times V_{\text{екстракту}})/(m\times 1000),$$

де Φ – загальний вміст внутрішньоклітинних фенольних сполук, мг-екв гальної кислоти/г сухої маси,

C – концентрація фенольних сполук, отримана за калібрувальним графіком, виходячи із оптичної густини зразків, мг-екв гальної кислоти/л,

$V_{\text{екстракту}}$ – загальний об'єм екстракту, мл,

m – маса наважки, г,

1000 – коефіцієнт переведення л в мл (об'єм екстракту).

2.19. Визначення вмісту спирто- та водорозчинних цукрів спектрофотометричним методом

Подрібнений рослинний матеріал (0,5 г) переносили в пробірки та додавали 5 мл 95 % спирту. Пробірки поміщали на водяну баню та тричі доводили до кипіння, охолоджували та центрифугували (15 хв 5000 об/хв). Супернатант виливали у випарювальну чашку. Після цього у пробірки з рослинним матеріалом доливали 5 мл 80 % C₂H₅OH, вміст перемішували і двічі нагрівали до кипіння, охолоджували, центрифугували. Супернатант зливали у фарфорові випарювальні

чашки. Таку екстракцію проводили двічі. Спирт з випарювальних чашок видаляли випаровуванням за кімнатної температури.

Сухий вміст чашок розчиняли у 5 мл води та переносили у 50 мл колби та доводили до мітки. Закривали та перемішували. Далі проводили 10-кратне розведення отриманого розчину. Для цього 5 мл розчину переносили в колби на 50 мл.

Відбирали по 1 мл розчину, переносили у пробірки та додавали 1 мл 5 % розчину фенолу та 5 мл $H_2SO_{4\text{конц.}}$. Струшували та витримували 10 хв при кімнатній температурі. Для визначення водорозчинних цукрів проби екстрагували водою у співвідношенні 1:20 на протязі 2 год після чого фільтрували через скляні фільтри Шота №3. Відбирали 1 мл фільтрату і додавали 1 мл 5 % фенолу та 5 мл $H_2SO_{4\text{конц.}}$ ретельно перемішували і охолоджували. Вимірювали екстинкцію на спектрофотометрі при $\lambda=490$ нм. Вміст цукрів (мг/г маси сирової речовини) визначали за калібрувальним графіком, який будували по сахарозі (Dubois et al., 1956).

2.20. Екстракція ДНК та секвенування Illumina MiSeq

Для даного дослідження використовували 36 зразків коренів *S.viminalis*, вирощених на субстраті із ділянок Стебницького хвостосховища 1 (Z1), 2 (Z2) та 3 (Z3) (див. рис. 2.2.) та інокульованих нативними ризосферними бактеріями *Salicornia europea* L. Мікробну ДНК отримували з 200 мг дослідного матеріалу, використовуючи набір Nucleo Spin® Soil (Macherey-Nagel, Germany) на базі лабораторії UMBLA (Ultuna Metabarcoding Laboratory, SLU, Uppsala, Sweden). Кількісне визначення концентрації (нг/мкл) та чистоти ДНК (A260/280) виконували спектрофотометрично, використовуючи NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). Концентрацію ДНК визначали флуориметрично за допомогою Qubit 2.0 (Invitrogen, USA). Зразки ДНК зберігали при -20°C для подальших аналізів.

Бактерійні гени 16S рРНК (V3-V4 гіперваріабельні області) були ампліфіковані із використанням праймерів

Pro341F (TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG)
Pro805R (GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG).

та

Ампліфікація проводилась у два етапи. 15 мкл ПЛР №1 містили 4 мкл 2,5 нг ДНК, 0,375 мкл 10 мкМ кожного праймера, 7,5 мкл 2X Phusion Master Mix (Thermo Scientific). 30 мкл ПЛР №2 містила 3 мкл зразка ДНК із попередньої реакції, 3 мкл 2 мкМ кожного праймера, 15 мкл 2X Phusion Master Mix (Thermo Scientific). ПЛР-реакції проводили у термічному циклері MiniAmp Plus™ (Thermo Fisher Scientific, USA). Для очищення зразків між етапами ампліфікації використовували Sera-Mag (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Цикл ПЛР №1 був таким: 3 хв 98 °C (30 с 98 °C, 30 с 55 °C, 30 с 72 °C)×25 циклів після цього 10 хв 72 °C, 10° C холод. Для циклу ПЛР №2 умови були такі ж окрім подовження часу анілювання до 45 с, з 8 циклами. Ампліфіковані зразки об'єднували та очищували за допомогою набору E.Z.N.A.® Cycle-Pure Kit (Omega Bio-tek, Georgia). Розмір ампліконів перевіряли за допомогою гель-електрофорезу, а контроль якості проводили на BioAnalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, US). Після кількісного визначення за допомогою флуорометра Qubit (Invitrogen, Карлсбад, Каліфорнія, США) були створені бібліотеки. Після чого зразки були надіслані на секвенування Illumina MiSeq 2,250 bp (Illumina, USA) у лабораторію SciLifeLab (Uppsala, Sweden). Результати секвенування були отримані у вигляді FASTQ файлів.

Аналіз даних секвенування 16S рРНК було проведено у mothur MiSeq SOP (Kozich et al., 2013). Вирівнювання еталонного регіону 16S рРНК V3V4 було створено за допомогою послідовності гена 16S рРНК *L. acidophilus* та довідкового файлу SILVA (silva.seed_v123.align, https://mothur.s3.us-east-2.amazonaws.com/wiki/silva.seed_v123.tgz). Таксономічна класифікація збережених послідовностей була виконана за допомогою команди classify.seqs з reference="trainset16_022016.rdp.fasta" and taxonomy="trainset16_022016.rdp.tax", де v16 RDP довідкові файли отримані з mothur (https://mothur.org/wiki/rdp_reference_files/). Послідовності, класифіковані як такі, що належать до таксонів «Chloroplast-Mitochondria-unknown-Archaea-Eukaryota», були вилучені з подальшого аналізу. Послідовності були кластеризовані в

операційні таксономічні одиниці (ОТО) за допомогою команди `cluster.split` з параметрами `taxlevel=4` і `cutoff=0,03`. Підрахунок ОТО було отримано за допомогою команди `make.shared`, а консенсусну таксономію кожного ОТО було отримано за допомогою команди `classify.otu`.

2.21. Виділення бактерій та якісна оцінка активності АСС-дезамінази

Бактерії виділяли із зразків коренів методом серійного розведення в фосфатному буфері (рН=7,4). Розведення 10^{-2} та 10^{-3} у кількості 50 мкл були використані для інокуляції 5 мл рідкого середовища. Пробірки інкубували протягом 24-48 годин при 28°C та 150 об/хв. Після чого бактерії перевіряли на активність АССД на стерильному мінімальному середовищі Дворкіна-Фостера (Dworkin and Foster, 1958) (4,0 г KH_2PO_4 , 6,0 г Na_2HPO_4 , 0,2 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,0 г глюкози, 2,0 г глюконової кислоти і 2,0 г лимонної кислоти, мікроелементи: 1 мг, 10 мг H_3BO_3 , 11,19 мг $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 124,6 мг $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 78,22 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 мг MoO_3 , розчин заліза (10 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ у 10 мл дистильованої води), рН 7,2) із додаванням 3 мМ АСС як єдиного джерела нітрогену та 8.0 г мікро агару (Duchefa Biochemie, The Netherlands) (Nascimento et al., 2019). Чашки Петрі, які містили середовище Дворкіна-Фостера без АСС, використовували як негативний контроль, а чашки з $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 г на 1 л середовища) використовували як позитивний контроль. Інокульовані чашки інкубували при 28°C протягом 5 днів і щодня спостерігали за ростом. Збільшення кількості колоній на чашках із вмістом АСС порівнювали з негативним і позитивним контролем. Колонії, які росли на чашках із АСС, вважали продуценти АСС-дезамінази.

2.22. Нінгідриновий метод скринінгу бактерій-поглиначів АСС за допомогою 96-лункового ПЛР-планшету

Попередньо отримані колонії бактерій з чашок Петрі із середовищем Дворкіна-Фостера та 3 мМ АСС, переносили у стерильний 24-лунковий планшет для вирощування культур, кожна лунка якого містила 1 мл рідкого середовища Дворкіна-Фостера та 3 мМ АСС. Зразки інкубували протягом 24 год при 28°C та

200 об/хв. Шістдесят мікролітрів кожного десятикратно розведеного супернатанту використовували для скринінгу бактерій-поглиначів АСС (Li et al., 2011) у 96-лунковому ПЛР-планшеті. Середовище Дворкіна-Фостера використовували в якості контролю. Кожен розведений супернатант використовували у трьох повторностях, до якого додавали 120 мкл нінгідринового реактиву та перемішували за допомогою піпетки. Планшет переносили на водяну баню (30 хв). Після цього візуально визначали наявність бактерій-поглиначів АСС, порівнюючи глибину пурпуру в розведених зразків та розведеного середовища Дворкіна-Фостера-АСС без інокуляції. Після чого проводили вимірювання на спектрофотометрі SpectraMax 384 Plus Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA), використовуючи програму Soft Max 7.1, при довжині хвилі 570 нм. Варіанти бактерій, що відповідали помітно меншій глибині кольору або статистично нижчому рівню поглинання супернатанту, порівняно із контрольним середовищем Дворкіна-Фостера-АСС без інокуляції, розглядали як бактерії, які використовують АСС. Концентрацію АСС визначали за калібрувальним графіком, побудованим за концентраціями (0,005-0,50 ммол/л) нінгідринового розчину.

2.23. Статистично-математичне опрацювання результатів досліджень

Біохімічні та спектрометричні дослідження проводили у п'ятикратній повторності. У кожному варіанті дослідження використовували по три біологічні повторності, а у них – по три аналітичні. Візуалізацію результатів досліджень проведено за допомогою графічного функціоналу MS Excel 2016 та у програмі RStudio. Отримані результати біохімічних показників опрацьовані статистично з використанням програмного пакету MS Excel 2016 для персональних комп'ютерів. Визначали середнє арифметичне, стандартну похибку. Достовірність різниці між варіантами оцінювали за критерієм Стюдента, використовуючи 5% рівень достовірності.

Байєсове моделювання було виконано з використанням бібліотек R rstan vers. 2.21.3 (Stan Development Team 2020) та brms версії. 2.16.1 (Bürkner 2018). Моделі були визначені за допомогою розширеного синтаксису формули R lme4 (Bates et al.

2015), реалізованого в пакеті R brms. Виконано мінімум 2000 ітерацій і чотири ланцюжки, щоб підібрати моделі. Використовуючи brms, контрольний параметр Stan NUTS adapt_delta було збільшено до 0,95–0,99, а max_treedepth – до 12–15. Перевірку гіпотез проводили з використанням рівня альфа = 0,05, вказуючи Байєсовий довірчий інтервал (достовірний інтервал), що містить 1-альфа = 0,95 (95%) апостеріорних значень, щоб визначити наявність ефекту.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Морфометричні показники рослин *S. viminalis* за росту на субстраті хвостосховища м. Стебник

Адаптація рослин до умов навколишнього середовища насамперед позначається на процесі росту, який є функцією багатьох складних фізіолого-біохімічних реакцій (Терек, Пацула, 2011). Засолення та наявність ВМ у ґрунтах є одним із найбільш поширених абіотичних факторів зниження росту та продуктивності рослин у всьому світі (Hafez et al., 2021; He et al., 2021; Raklam et al., 2021). Абіотичний стрес спричиняє морфологічні, функціональні та молекулярні зміни, які призводять до зменшення продуктивності та деградації екосистем (Shanker, Venkateswarlu, 2011).

Реакції рослин на абіотичні стресори, серед яких засолення та вплив ВМ, залежать від тривалості впливу стресора і від етапу онтогенезу. Найбільш характерними ознаками впливу високих концентрацій солей та надлишку ВМ у рослин є численні фізіологічні та біохімічні процеси, а саме пошкодження мембран, зміна активності ензимів, зниження функціонування фотосинтетичного апарату, гальмування дихання, гормональний дисбаланс, порушення транспорту асимілятів, зміна водного режиму та ін. Всі ці процеси ведуть до ряду вторинних ефектів, які призводять до загального зниження росту та розвитку рослинного організму (Zhou et al., 2013; Кавулич, 2020).

Salix viminalis L. – рослина родини вербових, яка використовується для створення енергетичних плантацій у Європі, оскільки дані рослини характеризуються швидкими темпами росту та невразливістю до умов вирощування. Перевагою даних рослин є можливість їх вирощування на легких (піщаних), середніх (суглинних) та важких (глинистих) ґрунтах, а також нечутливість рослин до рН ґрунту (Roman et al., 2021). Дослідники повідомляють, що деякі ВМ викликають затримку росту і зниження продуктивності рослин (Ortiz-Oliveros et al., 2021). Однак встановлено, що рослини *S. viminalis* характеризуються унікальною здатністю поглинати, деактивувати та нагромаджувати елементи і воду

із ґрунту без зниження ростових показників. Ця властивість є досить високою, порівняно із іншими рослинами (Greger, Landberg, 1999; Толстушко та ін., 2014).

Візуальна оцінка впливу умов техногенного забруднення хвостосховища на рослини верби показала відмінності у зовнішньому вигляді (рис. 3.1.).



Рис. 3.1. Загальний вигляд *S. viminalis* на 30 добу росту в лабораторних умовах (1– контроль; 2 – дослід)

Крім змін загальної біомаси рослин, для оцінки впливу засолення використовують масу стебел, коренів та листків. Такі показники як довжина коренів і стебел, розгалуження коренів і кількість додаткових коренів, кількість листків використовуються як ростові параметри в умовах засолення (Soltabayeva et al., 2021). Коренева система рослин першою сприймає стресові сигнали в умовах засолення, тому її розвиток пригнічується зі збільшенням концентрації солі у ґрунті (Appenroth, 2010; Sánchez-Calderón et al., 2013; Zhou et al., 2013). Довжина та кількість коренів 30-ти добових *S. viminalis* з дослідного варіанту були меншими відносно контролю на 21 % та 17 % відповідно (табл. 3.1). Об'єм кореневої системи

у досліді теж був меншим порівняно із контролем. Галуження коренів у дослідному варіанті було лише до 3 порядку, а у контролі до 4.

Таблиця 3.1.

Вплив техногенного забруднення на морфометричні показники *S. viminalis*

	30 доба росту (лабораторні умови)		120 доба росту (польові умови)	
	КОНТРОЛЬ	ДОСЛІД	КОНТРОЛЬ	ДОСЛІД
Листкова пластинка				
Довжина, см	10,20 ± 0,92	8,07 ± 0,24	11,25±0,56	9,02±0,17*
Ширина, см	1,40 ± 0,08	1,30 ± 0,05	1,12±0,06	1,35±0,09
Площа листової поверхні, см ²	7,86 ± 1,37	5,77 ± 0,69	7,72±0,63	6,24±0,18
Кількість	33,50 ± 3,25	27,33 ± 2,44*	25,80±1,88	6,36±1,97*
Стебла				
Довжина, см	39,10 ± 3,30	29,68 ± 2,47*	57,60±3,60	25,05±2,91*
Кількість	4,67 ± 0,44	4,00 ± 1,00	3,20±0,64	1,92±0,50*
Корені				
Довжина, см	30,10 ± 1,00	23,75 ± 3,95*	18,60±1,30	13,57±1,93*
Кількість	30,00 ± 4,67	25,00 ± 2,00*	37±3,00	32±5,00*
Об'єм кореневої системи, мл	2,25 ± 0,25	1,50 ± 0,67	2,00±0,8	1,00±0,33
Галуження коренів, порядок	IV	III	IV	III

Примітка: * – тут і далі на всіх таблицях – різниця щодо контролю статистично достовірна при $p \leq 0,05$

Відомо, що тканини коренів піддаються оксидативному стресу, який спричинений засоленням (Hasanuzzaman et al., 2020). Слід врахувати також не лише вплив засолення, а й вплив ВМ на рослини. Встановлено пряму залежність інгібування росту коренів та стебел від концентрації іонів ВМ (Колупаєв, 2010). При цьому чутливіші є корені, що, мабуть пов'язане з їхньою бар'єрною функцією

(Кавулич, 2020). Відомо, що основна частина свинцю затримується у коренях рослин. У великих концентраціях цей метал пригнічує ріст рослин і викликає хлороз, який виникає внаслідок порушення надходження заліза (Шевчук, Мудрак, 2021).

Довжина коренів з дослідного варіанту була на 27 % меншою відносно контролю (табл. 1). Об'єм кореневої системи був у 2 рази меншим у дослідному варіанті відносно контролю. Галуження коренів у дослідному варіанті було до 3 порядку, а у контролі – до 4.

Результати наших досліджень показали, що рослини *S. viminalis* зазнали стресу в умовах росту на субстраті хвостосховища (табл. 3.1.). Довжина новоутворених стебел 30-ти добових *S. viminalis*, які росли на субстраті хвостосховища становила $29,68 \pm 2,47$ см, що на 24 % менше відносно контролю. Кількість стебел була у межах похибки. В польових умовах довжина новоутворених стебел та їх кількість у 120-ти добових рослин була на 57 % та 40 % відповідно меншою відносно контролю.

Зниження швидкості росту пагонів внаслідок засолення виражається зменшенням площі листків. Кінцевий розмір листка залежить від поділу клітин і їхнього росту розтягуванням (Терек, Пацула, 2011; Tuteja et al., 2012). Параметри листової пластинки дослідних рослин незначно відрізнялись від контрольних: довжина та ширина листової пластинки дослідних рослин на 30 добу росту були меншими відносно контролю, на 20,8 % та 7,14 % відповідно. Площа листової пластинки у дослідному варіанті теж була меншою щодо контролю за росту як у лабораторних, так і у польових умовах. Кількість листків на стеблах дослідних *S. viminalis*, станом на 30 добу росту, була рівна $27,33 \pm 2,44$, що на 18 % менше порівняно із контролем. Слід відмітити значне зменшення кількості листків на стеблі у дослідних 120-ти добових рослин за росту в польових умовах, а саме на 75 % менше відносно контролю. Дане пригнічення ростових параметрів можна пояснити дією засолення. Оскільки на етапі вегетативного росту існує прямопропорційна залежність між вмістом солей у середовищі та висотою рослини, площею листка, загальною кількістю листків (Деркач, Романюк, 2016).

Отримані дані нашого дослідження узгоджуються із твердженням щодо негативного впливу техногенного засолення на всі стадії росту рослин, а саме зниження висоти рослин та продуктивності (Dubey et al., 2020).

Листки рослин є дуже чутливими до умов навколишнього середовища, тому за впливу стресових факторів в них спостерігаються морфологічні зміни (Glukhov, Shtirts, 2015). Для встановлення ступеня впливу стресового чинника на рослини верби було визначено флуктуаційну асиметрію (ФА) листкової пластинки, яка виявляє незначні відмінності між правою і лівою сторонами листкової пластинки (Барабаш, 2019). При задовільному стані навколишнього середовища їх рівень мінімальний, коли ж негативний вплив збільшується, проявляється асиметрія (Барабаш, Лозова, Козлова, 2018).

Флуктуаційна асиметрія – це простий і недорогий біоіндикатор, який може слугувати тривожним сигналом впливу стресора на морфологію (Mabrouk et al., 2020). Відомо (Коровякова, 2013), що стреси різних типів можуть суттєво змінювати симетричність листкових пластинок. Попередньо достовірно встановлено (Притула, 2021), що за погіршення умов існування певного виду ФА особин зростає. В процесі дослідження виявлено незначне збільшення асиметрії листкових пластинок *S.viminalis*, які росли на субстраті хвостосховища із ділянок відновленого біогеоценозу, порівняно із листковими пластинками рослин із інтактних зон (рис. 3.2.).

Встановлено розбіжності між правою та лівою частинами листкової пластинки за такими ознаками, як кут між головною і другою від основи жилкою листка та шириною половини листка. Однак відстань між кінцями першої та другої жилок була більш симетрична. Щодо рослин із екологічно чистих ділянок, показник асиметрії був найбільшим у даних кута між головною та другою жилкою від основи листкової пластинки, а також довжиною другої жилки від основи листка та відстань між кінцями першої та другої жилок листкової пластинки. Інтегральний показник стабільності росту рослин *S. viminalis* на відновленому біогеоценозі та інтактних ділянках відповідає II та I балам відповідно згідно з 5-бальною шкалою оцінки стабільності розвитку рослин за величиною ФА. Дані результати можуть

свідчити про те, що на екологічно чистих ділянках *S. viminalis* росли в нормальних умовах, а на ділянці хвостосховища – в умовах переходу до стресових умов росту (від норми до забруднення).

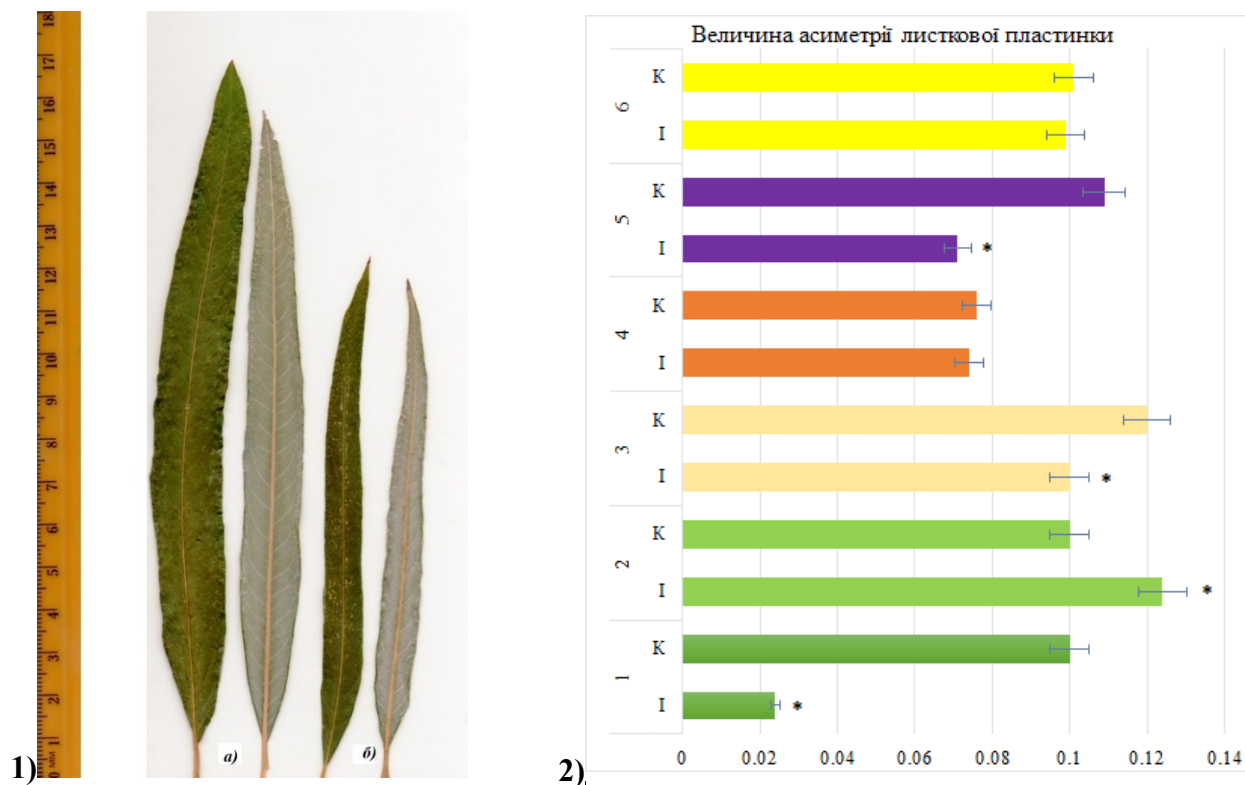


Рис. 3.2. 1) Листкові пластинки *S.viminalis* (а – з інтактних зон, б – ділянок хвостосховища із відновленим біогеоценозом); 2) Величина асиметрії листкових пластинок *S. viminalis* за росту на ділянках відновленого біоценозу хвостосховища м. Стебник (І – листки *S. viminalis* з інтактних зон, К – листки *S. viminalis* з ділянок відновленого біогеоценозу): 1 – ширина половини листка; 2 – довжина 2-ої жилки від основи листка; 3 – відстань між основами 1-ої та 2-ої жилки; 4 – відстань між кінцями жилок; 5 – кут між головною і 2-ою від основи жилкою; 6 – величина асиметрії листка). Примітка: * – тут і далі на всіх рисунках – різниця щодо контролю статистично достовірна при $p \leq 0,05$

Засолення призводить до порушення здатності до осморегуляції, тобто із збільшенням концентрації солі рослини втрачають здатність зберігати воду у органах, що негативно впливає на їх стійкість до засолення. Відомо, що на засолених ґрунтах у рослин порушується водний обмін. Дослідження впливу

техногенного забруднення Стебницького хвостосховища на вміст води у органах рослин показали (рис. 3.3), що на 30 добу росту *S. viminalis* у лабораторних умовах вміст води в органах *S. viminalis* відрізнявся від контролю. Вміст води у листках та стеблах 30-ти добових рослин був у межах похибки, а у коренях – більшим на 25 %, порівняно із контролем. Згідно із літературними даними (Жук, 2011), саме корені реагують на зміну вмісту води у ґрунті.

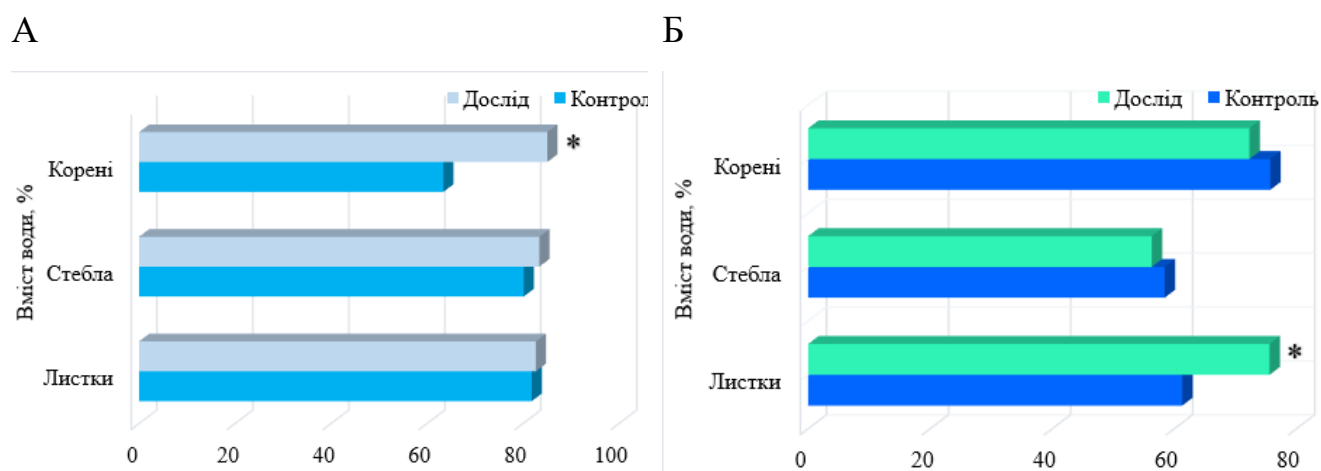


Рис. 3.3. Вміст води в органах *S. viminalis*: А. 30-та доба росту в лабораторних умовах; Б. 120-та доба росту в польових умовах

Результати польових досліджень показали, що найменше води накопичується у стеблах дослідних рослин, на 4 % нижче відносно контролю. Слід звернути увагу, що рослини, які росли на субстраті хвостосховища із ділянок поширення піонерних глікогалофітів, накопичували більше води у листках та перевищували контрольні показники на 23 %. Отримані дані щодо низького вмісту води у стеблах *S. viminalis* можуть свідчити про те, що енергетична сировина даних рослин буде високої якості.

Підсумок. Показано незначне пригнічення ростових параметрів *S. viminalis* за росту на субстраті Стебницького хвостосховища у лабораторних та польових умовах вирощування. Кількість стебел як у контролі, так і у досліді була практично однаковою на 30 добу росту. Однак за польових умов, показники 120-ти добових рослин були меншими. Параметри листової пластинки дослідних рослин незначно відрізнялись від контрольних. Площа листової пластинки у дослідному варіанті

була меншою щодо контролю за росту як у лабораторних, так і у польових умовах. Помічено значне зменшення кількості листків на стеблах дослідних рослин за росту у польових умовах. Виявлено асиметрію листкових пластинок за росту на ділянках відновленого біогеоценозу. Визначення інтегрального показника стабільності росту *S. viminalis* показало, що на ділянках відновленого біогеоценозу є умови переходу до стресових умов (від норми до забруднення). Виявлено накопичення води у коренях 30-ти добових рослин у лабораторних умовах та у листках 120-ти добових *S. viminalis* у польових умовах.

Отримані морфометричні показники *S. viminalis* за росту на субстраті хвостосховища м.Стебник опубліковані у наступних роботах:

1. **Fetsiukh, A.**, Bunio, L., Patsula, O., Timmusk, S., & Terek, O. (2022) Content of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in *Salix viminalis* L. grown on the Stebnyk tailing. *Acta Agrobotanica*, 75, 1-13. <https://doi.org/10.5586/aa.752>

2. **Фецюх, А.**, Буньо, Л., & Терек, О. (2021). Кінетика росту *Salix viminalis* L. за умов техногенного навантаження. *Актуальні проблеми фізіології рослин і генетики. Тези доповідей Міжнародної наукової конференції (Київ, 17 червня 2021 р.)* (С. 200-202). Київ: Інтерсервіс.

3. **Фецюх, А.**, & Буньо, Л. (2020). Флуктуаційна асиметрія листків *Salix viminalis* L. в інтактній зоні і зоні техногенного забруднення. *Стан природних ресурсів: перспективи їх збереження та відновлення у контексті сталого розвитку. Тези доповідей IV Міжнародної науково-практичної конференції (Дрогобич, 27–28 жовтня 2020 р.)* (С. 81-83). Дрогобич: ДДПУ.

4. Буньо, Л. В., **Фецюх, Н.**, Пацула, О. І., & Терек, О. І. (2017). Якість рослинної сировини одержаної з *Salix viminalis* L. вирощеної на засоленому субстраті хвостосховища м. Стебника. *Біологічні студії*, (11, № 3-4), 96-97.

5. **Фецюх, А.**, Библів, Х., Гузар, О., Пацула, О., & Буньо, Л. (2017). Водоутримуюча здатність листків рослин *Salix viminalis* L. за росту на засоленому субстраті хвостосховища м. Стебник. *Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/BioScience Advances. Тези доповідей XV Міжнародної наукової конференції молодих вчених (Київ, Україна, 18-21 квітня 2017)* (С. 124-125). Київ: Паливода А.В.

3.2. Вміст водорозчинних іонів у субстраті Стебницького хвостосховища

Важливою генетичною особливістю ґрунтового покриву Стебницького хвостосховища є засоленість ґрунтів, яка залежить від вмісту водорозчинних солей. Наявність у ґрунті водорозчинних солей значною мірою впливає на його фізичні властивості, а також на здатність опору до навантажень (Корнєєнко, 2016). Ступінь цих змін залежить від кількості та складу солей у ґрунтах. Вміст водорозчинних солей визначає ступінь засоленості ґрунтів, а відповідно, і можливість використання ґрунту (Назаренко та ін., 2003).

Внаслідок взаємодії атмосферних опадів з відходами твердої фази хвостосховища відбувається вилуговування наявних у ній солей, що виходять на денну поверхню, й утворення вторинної ропи, яка стікає у знижені ділянки дна першої секції (Іванов та ін., 2018). У субстраті хвостосховища відбувається поступове проникнення фітоценозів у зв'язку зі зниженням вологості та концентрації солей. Напряма заростання має лінійний характер і чітко детермінований зміною засоленості й вологості (Сабат, Цайтлер, 2014).

Отримані результати дослідження показали, що вміст солей у контролі становить $1,23 \pm 0,16$ г/кг, а у досліді – $2,49 \pm 0,32$ г/кг, що на 49 % більше контролю. Визначаючи вміст водорозчинних іонів, виявлено, що основними складовими є іони хлору та сульфату. Їх відсоток у порівнянні з іншими іонами був найбільшим. Серед катіонів домінували іони кальцію. (табл. 3.2).

Таблиця 3.2.

Вміст водорозчинних іонів у субстраті Стебницького хвостосховища,
мг/100 г ґрунту

Варіант	HCO_3^-	Cl^-	SO_4^{2-}	Сума аніонів	Ca^{2+}	Mg^{2+}	$(Na^+ + K^+)$	Сума катіонів
Контроль	134,21 $\pm 4,25$	266,12 $\pm 8,33$	499,22 $\pm 10,22$	899,55	204,41 $\pm 2,11$	107,27 $\pm 2,55$	27,60 $\pm 0,67$	339,28
Дослід	225,70 $\pm 5,22^*$	439,58 $\pm 3,45^*$	1133,51 $\pm 5,65^*$	1 798,79	352,70 $\pm 5,78^*$	192,13 $\pm 8,77^*$	144,84 $\pm 2,35^*$	589,67

У більшості випадків негативний вплив засолення пов'язаний із збільшенням в рослинному організмі вмісту іонів Na^+ та Cl^- , причому небезпечнішим є Cl^- (Suga, 2002). Ефект сольового стресу призводить до вторинних змін – сповільнення

розтягування клітин, фотосинтетичної активності, функціонування мембран, пригнічення метаболізму, а також зумовлюють розвиток оксидативного стресу, що в підсумку призводить до пригнічення росту, розвитку і продуктивності рослин (Chen, 2013).

Підсумок. Іони хлору та сульфату є основними складовими визначених водорозчинних іонів у субстраті хвостосховища м. Стебник. Серед катіонів переважають іони кальцію. Дані вмісту солей у дослідному субстраті перевищують контрольні на 49 %. У контрольному варіанті вміст солей є $1,23 \pm 0,16$ г/кг, а у дослідному – $2,49 \pm 0,32$ г/кг.

Ці результати опубліковані:

1. **Fetsiukh, A.,** Bunio, L., Patsula, O., Timmusk, S., & Terek, O. (2022) Content of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in *Salix viminalis* L. grown on the Stebnyk tailing. *Acta Agrobotanica*, 75, 1-13. <https://doi.org/10.5586/aa.752>

3. 3. Вміст ВМ у субстраті Стебницького хвостосховища та їх акумуляція в органах *S. viminalis*

Забруднення навколишнього середовища ВМ, спричиненого антропогенною діяльністю, викликає занепокоєння у всьому світі (Yang et al., 2021), оскільки даний вид забруднення ґрунту є незворотнім видом деградації. Важкі метали легко накопичуються у ґрунті, але надзвичайно повільно з нього виводяться. Накопичення, здебільшого, відбувається у верхньому родючому шарі ґрунту, де ВМ становлять пряму небезпеку для рослин та мікроорганізмів (Волощинська, 2008).

Фіторемедіація – це перспективна зелена стратегія меліорації забруднених ділянок через економічну ефективність та відновлення морфологічних і фізіологічних характеристик ґрунту без нанесення вторинної шкоди природному середовищу (Yang et al., 2021). *Salix viminalis* – типова дводомна чагарникова верба, яка широко використовується у цілях фіторемедіації ґрунтів, завдяки її швидкому росту, глибокій кореневій системі та стійкості до впливу ВМ (Zou et al., 2021; Sandil, Gowala, 2022). Ряд досліджень підтвердили високу ефективність верб (*Salix*

spp.) у використанні для очищення земель забруднених ВМ (Arsenov et al., 2020; Gautam et al., 2021; Sameena, Puthur, 2021).

Результати визначення вмісту ВМ (стануму, кадмію, молібдену, ванадію, свинець, купруму, цинку, цирконію, хрому, нікелю, стронцію, мангану, титану та феруму) у субстраті хвостосховища до та після 30 добового росту рослин *S. viminalis* висвітлено у таблиці 3.3. Виявлено, що у дослідному субстраті був більший вміст свинцю (на 33 %), міді (на 34 %), хрому (на 23 %), стронцію (на 60 %) і титану (на 20 %), порівняно із контрольним варіантом.

Помічено перевищення ГДК (Єгорова, 2014) щодо вмісту кадмію та феруму в субстратах хвостосховища, а також стронцію, але лише у дослідному варіанті до вирощування *S. viminalis*. Зокрема, вміст кадмію перевищував ГДК на 84,21 %, стронцію – на 33,33 % та феруму – на 97 %. У субстратах виявлено перевищення кларків кадмію, свинцю, міді, цинку, цирконію (лише в контролі), стронцію та мангану. Важливим є те, що *S. viminalis* є рослиною-ремедіантом і здатна поглинати деякі ВМ, а саме кадмій, нікель, цинк і мідь із ґрунту (Фецюх та ін., 2019). На 30 добу росту рослин у лабораторних умовах, результати наших досліджень показали зменшення вмісту цирконію, нікелю та стронцію, на 50 %, 33 % та 17 % відповідно у контрольному субстраті. Щодо зміни вмісту ВМ у дослідному субстраті після вирощування верби, виявлено зменшення вмісту ванадію (в 1,6 рази), міді (у 3 рази), цинку (в 11 разів), цирконію (в 1,3 рази), стронцію (в 1,5 рази), титану (в 1,7 рази), хрому (в 1,3 рази) та заліза (в 1,7 рази). Слід відзначити, що серед цих металів найбільше зменшився вміст цинку, порівняно із початковим вмістом, тобто до росту *S. viminalis*.

Отже, за умов вирощування *S. viminalis* на субстраті хвостосховища, виявлено коливання фонового вмісту ВМ у контрольному та дослідному варіантах. Отримані результати можна пояснити фіторемердіаційними властивостями рослин *S. viminalis*. Оскільки даний вид рослин належить до рослин-гіперакумуляторів, які можуть поглинати токсичні іони металів. Однак питання полягає у тому, у якій формі перебувають токсичні іони в організмі рослин і як саме ці рослини уникають

Таблиця 3.3.

Вміст ВМ у субстраті хвостосховища м. Стебник (до і після вирощування рослин *S. viminalis*), мг/кг

Проба	Sn ²⁺	Cd ²⁺	Mo ³⁺	V ²⁺	Pb ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Zr ²⁺	Cr ³⁺	Ni ²⁺	Sr ²⁺	Mn ²⁺	Ti ⁴⁺	Fe ³⁺
К	9,22 ±0,12	19,63 ±0,98	6,17 ±0,45	40,25 ±2,31	10,29 ±1,09	20,16 ±1,25	70,43 ±1,87	600 ±20,36	8,11 ±0,32	15,24 ±0,47	600 ±45,16	1000 ±6,23	1600 ±38,52	50000 ±152,33
К+	9,12 ±0,42	19,24 ±1,02	6,21 ±0,94	40,16 ±1,57	10,56 ±1,02	30,72 ±1,68	70,34 ±1,46	300 ±32,48	8,23 ±0,64	10,17 ±0,65	500 ±56,32	1000 ±22,68	1600 ±42,94	50000 ±230,38
Д	9,31 ±0,56	19,14 ±0,69	6,42 ±0,21	40,36 ±3,12	15,37 ±1,63*	30,43 ±1,24*	70,18 ±1,08	210 ±27,89*	10,36 ±0,46	10,11 ±0,67*	1500 ±87,42*	1000 ±46,12	2000 ±37,56*	50000 ±421,87
Д+	9,14 ±0,34	19,56 ±0,78	6,33 ±0,67	25,29 ±2,57*	20,64 ±1,35*	10,11 ±0,98*	6,98 ±1,32*	160 ±30,24	8,27 ±0,36	10,14 ±0,98*	1000 ±32,67*	1000 ±58,11	1200 ±39,23*	30000 ±563,12*
ГДК ВМ, мг/кг (Єгорова, 2014)	н.д.	3	н.д.	150	30	100	300	н.д.	100	85	1000	1500	н.д.	1500
Кларк, мг/кг (Войткевич та ін., 1970, Городній та ін., 2003)	н.д.	0,5	н.д.	100	10	20	50	300	75	40	300	850	4600	н.д.

токсичності цих металів. Вважається, що у рослин-гіперакумуляторів задіяно кілька механізмів, але зберігання металів у вакуолях є основним (Tangahu et al., 2011).

При надходженні в організм рослин верби ВМ поводять себе по-різному. Свинець, хром та мідь переважно нагромаджуються у коренях, а кадмій, нікель та цинк є більш мобільними та легко переміщуються у надземну частину (Mleczek et al., 2009; Фецюх та ін., 2019). Визначення вмісту ВМ у органах *S. viminalis* виявило відмінності у накопиченні металів різними органами рослини (табл. 3.4). Зокрема, показано високий рівень акумуляції молібдену, міді, мангану та заліза коренями рослин, а також збільшення вмісту цирконію, хрому та нікелю відносно контрольних показників. Дещо менше накопичувались ВМ у листках, порівняно із стеблами та коренями рослин. Однак у листках виявлено високий рівень акумуляції міді, цинку, цирконію, стронцію та мангану. У стеблах верби показано високий вміст кадмію, молібдену, ванадію, свинцю та цирконію.

Слід наголосити на тому, що ступінь поглинання металів залежить від їх кількості, форми сполук, складу та властивостей ґрунту, а також виду рослин. Найбільше ВМ накопичується у кореневій системі рослин, менше – в стеблах і найменше – в репродуктивних органах. Ця закономірність зберігається й при збільшенні концентрацій ВМ у ґрунті (Городній та ін., 2003; Фецюх та ін., 2019). Вище перелічені дані співпадають із отриманими результатами нашого дослідження, а саме значне накопичення металів у коренях *S. viminalis*, порівняно із іншими органами рослин.

При дослідженні впливу іонів кадмію і цинку на різні клони рослин верби було встановлено, що деякі клони були толерантними до цих металів, інші – лише до одного. Толерантні клони нагромаджували ВМ у діапазоні від 1 до 72 % (Landberg, Greger, 1996). Згідно із отриманими результатами, у стеблах дослідних *S. viminalis* помічено значне нагромадження кадмію, що на 43% перевищує контрольні показники.

Таблиця 3.4.

Вміст ВМ у органах *S. viminalis* на 30 добу росту, мг/кг

Проба	Sn ²⁺	Cd ²⁺	Mo ³⁺	V ²⁺	Pb ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Zr ²⁺	Cr ³⁺	Ni ²⁺	Sr ²⁺	Mn ²⁺	Ti ⁴⁺	Fe ³⁺	
листки	К	20,2 ±1,4	19,4 ±1,6	9,4 ±1,3	7,7 ±0,6	20,1 ±1,0	70,5 ±4,3	250,3 ±21,3	370,4 ±43,6	10,3 ±0,9	9,2 ±0,4	6000 ±47,6	1000 ±56,3	200 ±46,2	3000 ±124,6
	Д	9,2 ±0,9*	19,3 ±1,4	20,3 ±1,8*	7,4 ±0,5	10,2 ±0,9*	70,4 ±5,1	400,2 ±45,6*	380,2 ±23,8	80,3 ±1,2*	7,1 ±0,06*	1500 ±89,6*	1000 ±78,2	500 ±64,3*	3000 ±473,2
стебла	К	17,6 ±1,2	19,2 ±1,7	8,6 ±0,9	7,6 ±0,4	6,8 ±0,6	40,6 ±3,2	200,2 ±58,7	30,1 ±2,6	6,2 ±0,3	4,3 ±0,6	1000 ±67,8	400 ±73,2	400 ±21,3	2000 ±211,8
	Д	9,5 ±0,8*	33,7 ±1,7*	13,3 ±1,2*	13,6 ±0,7	33,4 ±1,4*	120,5 ±6,9*	330,5 ±42,1*	80,2 ±3,7*	17,4 ±0,6*	12,2 ±0,7*	5000 ±52,3*	670 ±45,8*	800 ±98,4*	4000 ±160,7*
корені	К	9,4 ±1,1	19,7 ±1,6	6,5 ±0,6	10,4 ±0,3	6,2 ±0,6	40,3 ±2,8	70,6 ±8,1	150,6 ±124,6	15,6 ±0,8	4,4 ±0,3	3000 ±43,7	90 ±12,3	2000 ±28,7	30000 ±231,2
	Д	9,7 ±1,0	19,2 ±1,3	70,1 ±1,8*	10,3 ±0,8	6,4 ±0,7	100,7 ±8,4*	70,2 ±7,3	200,3 ±48,7*	20,4 ±0,4	30,1 ±0,8*	1000 ±97,5*	1000 ±36,8*	1200 ±23,4*	50000 ±652,3*
ГДК			≤0,5			≤10	≤10	≤100		≤10	≤30				

Виявлено значне перевищення значень кадмію, міді та хрому щодо ГДК, а також у листках свинцю та листках і стеблах цинку. У листках контрольних та дослідних рослин вміст міді був у 7 разів більшим за ГДК, у стеблах та коренях контрольних рослин – у 4 рази. Значний вміст міді помічено у стеблах дослідних рослин, що у 12 разів перевищує дані ГДК, та у коренях дослідних рослин – у 10 разів.

Дослідники повідомляють про ефективність біоаккумуляції та транслокації ВМ рослинами (Mganga, 2014; Ganeshkumar et al., 2018; Ganeshkumar et al., 2019; Wani et al., 2020). Тому для визначення фітореMediaційного потенціалу рослин *S. viminalis* ми розраховували коефіцієнт біологічного накопичення (КБН) та фактор транслокації (ФТ). Результати наших досліджень показали, що за росту на техногенному субстраті хвостосховища м. Стебник, *S. viminalis* в найбільшій кількості акумулювали молібден, на другому місці – стронцій, на третьому – хром, і на четвертому – цинк (рис.3.4).

Згідно із Abdelaal et al. (2021), види із $КБН > 1$ та $ФТ < 1$ можуть використовуватись з метою фітостабілізації, в той час як види із $КБН = ФТ > 1$ можуть використовуватись у цілях фітоекстракції. Згідно із отриманими результатами, до елементів сильного накопичення ($КБН > 1$) *S. viminalis* за росту на субстраті хвостосховища, належать станум, кадмій, молібден, свинець, мідь, цинк, цирконій, хром, нікель та стронцій. Елементами слабого накопичення ($КБН < 1$) були ванадій, манган та залізо.

Отримані результати щодо фактора транслокації (рис. 3.5) між надземними органами та коренями *S. viminalis* варіювали залежно від вмісту ВМ у органах. Більшість показників перевищували 1 як у контрольному, так і в дослідному варіантах. У контрольному варіанті показники ФТ листки/корені були у межах 0,1-11,1, ФТ стебла/корені – 0,07-4,44 та ФТ листки/стебла – 1,01-12,02. Щодо дослідного варіанту, показники були нижчими для ФТ листки/корені (0,06-5,07) та ФТ листки/стебла (0,3-4,74) відносно контролю, а для ФТ стебла/корені (0,08-5,21) – вищі.

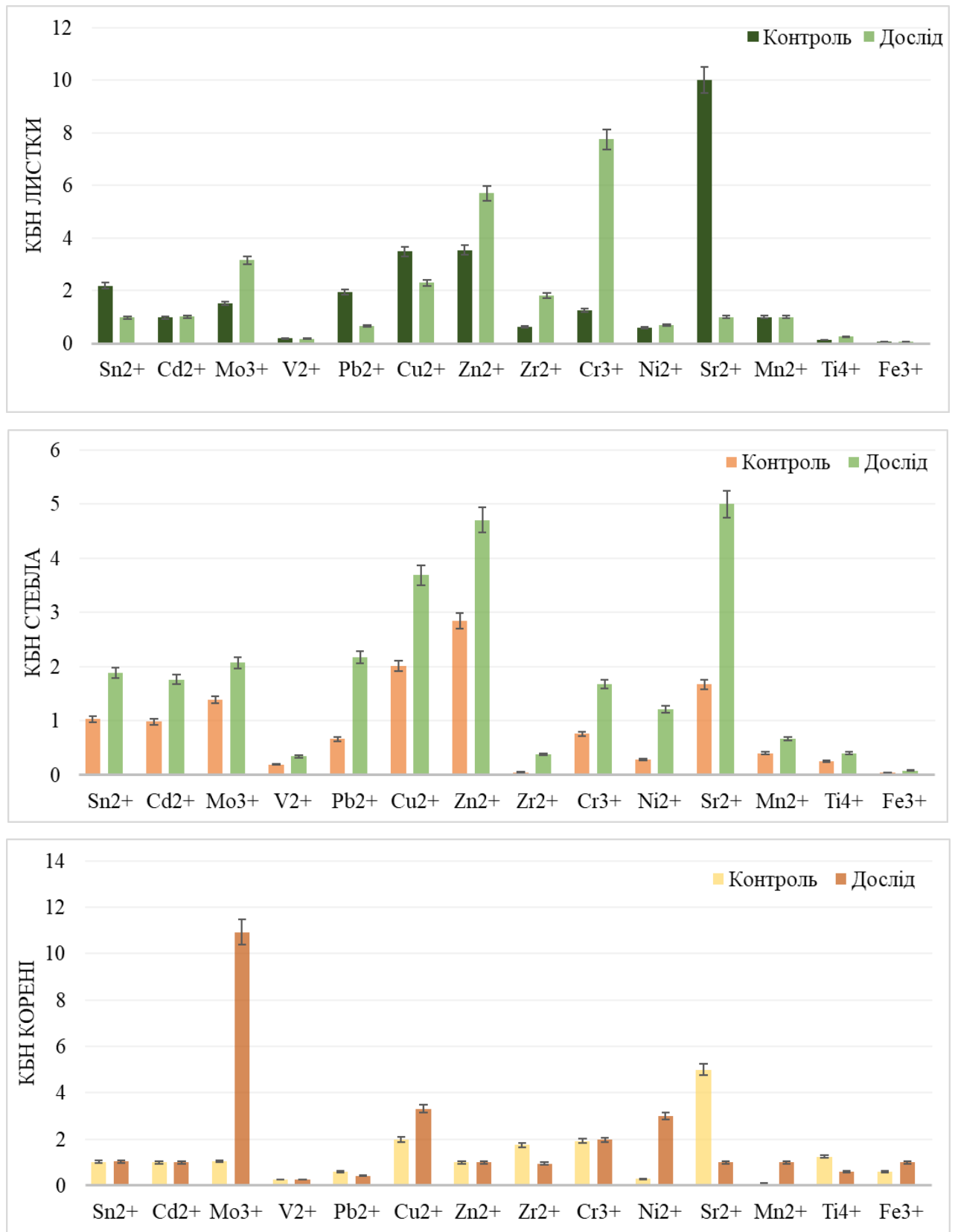


Рис. 3.4. Коефіцієнт біологічного накопичення (КБН) ВМ у органах 30-ти добових *S. viminalis*, вирощених на забрудненому субстраті з хвостосховища м. Стебник (лабораторні умови)

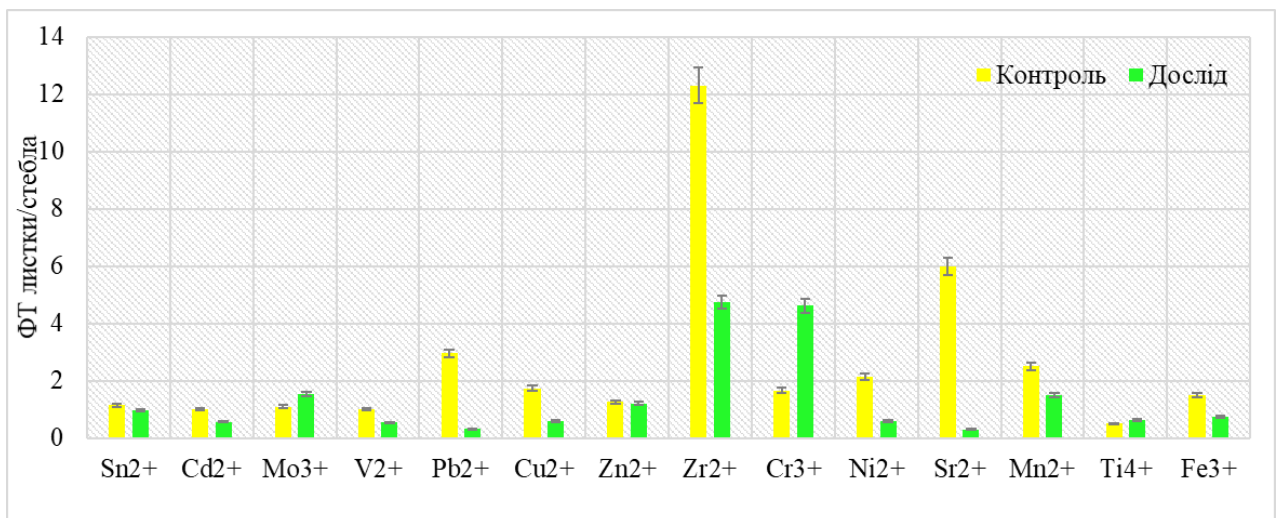
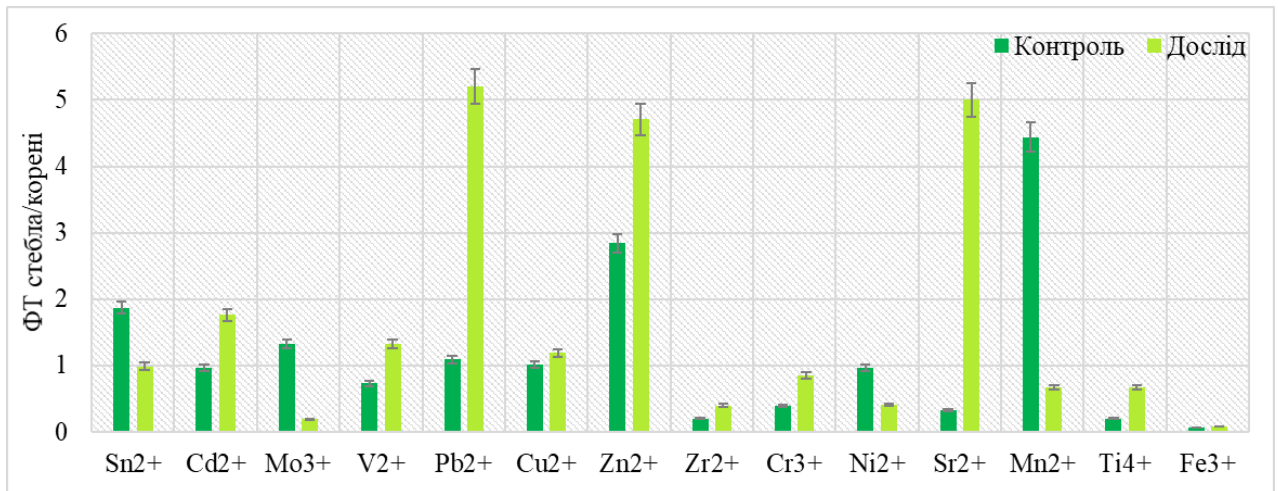
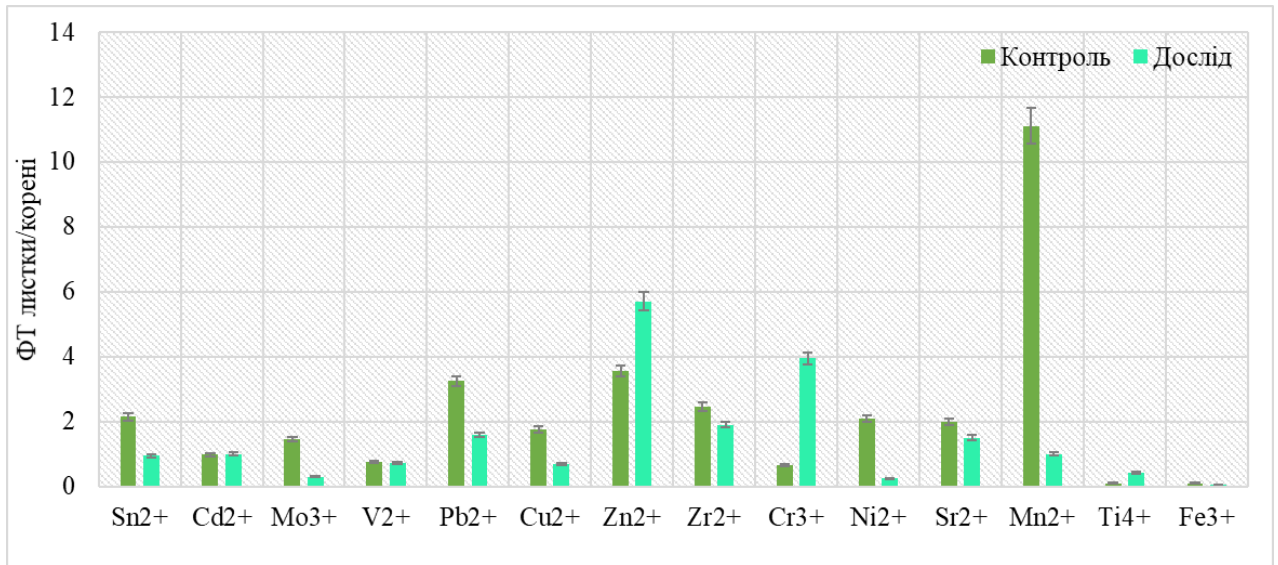


Рис. 3.5. Фактор транслокації ВМ у листках/коренях, стеблах/коренях та листках/стеблах 30-ти добових *S. viminalis* за росту на субстраті із Стебницького хвостосховища (лабораторні умови)

Для кількісного вираження загальної здатності рослин до концентрації ВМ ми розраховали показник біогеохімічної активності (БХА) досліджуваних рослин, який характеризує інтенсивність поглинання елементів рослинами та в нормі становить 5–10. Чим вищі значення цього показника, тим більшим техногенним навантаженням характеризується територія (Войтюк, 2016; Фецюх та ін., 2019).

Результати визначення показника БХА наведені на рис. 3.6. Виявлено, що у стеблах та коренях дослідних рослин біогеохімічна активність була вищою у порівнянні із контрольними показниками, на 51 % та 35 % відповідно. Слід звернути увагу, що дані мають вищі значення, ніж 5-10, що свідчить про те, що територія Стебницького хвостосховища характеризується техногенним навантаженням.

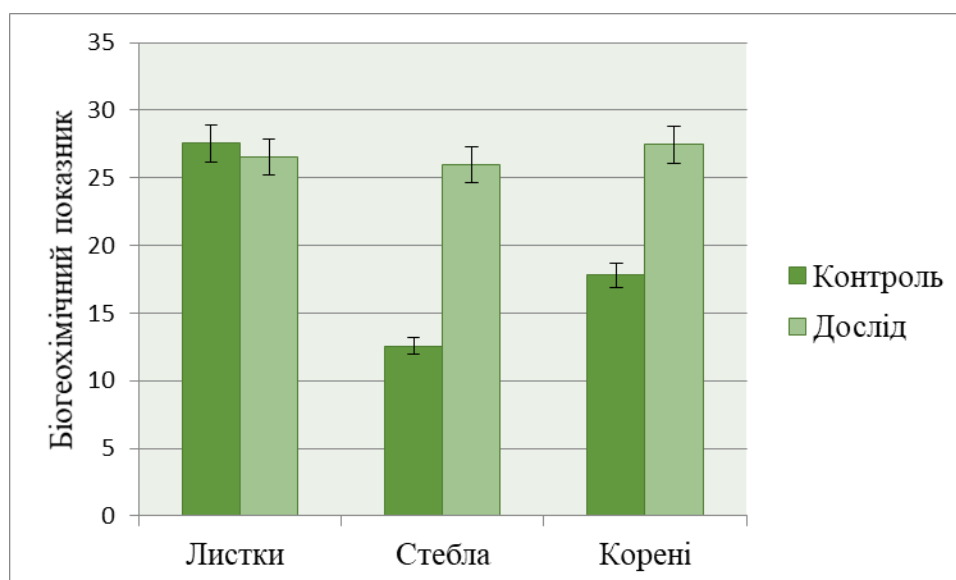


Рис. 3.6. Показник біогеохімічної активності (БХА) *S. viminalis* за умов росту на субстраті хвостосховища м. Стебник

На основі проведених досліджень ще рано давати ствердну відповідь щодо фітореMediaційних властивостей *S. viminalis* за росту на субстраті Стебницького хвостосховища. Однак, здатність дослідних рослин накопичувати та переміщувати деякі ВМ у органах рослин говорить про їх біореMediaційні властивості.

Підсумки. Ріст рослин *S. viminalis* зумовлював зміну кількості ВМ у субстраті хвостосховища. Виявлено, що збільшення вмісту ВМ у ґрунті призводить

до збільшення їх концентрації у рослинах. Найбільшу їхню кількість акумулювали стебла дослідних рослин, порівняно з іншими органами. У зв'язку із цим, надземна частина рослина може використовуватись як біопаливо. Значення КБН та ФТ для більшості ВМ були вищими 1. Елементами біологічного накопичення *S. viminalis* за росту на субстраті хвостосховища були станум, кадмій, молібден, свинець, мідь, цинк, цирконій, хром, нікель, та стронцій. Елементами слабого накопичення – ванадій, манган та залізо. Дослідження БХА виявили, що *S. viminalis* мають високу здатність накопичувати ВМ.

Ці результати опубліковані:

1. **Фецюх, А.,** Буньо, Л., Пацула, О., & Терек, О. (2019) Накопичення важких металів рослинами *S. viminalis* за росту на субстраті з Стебницького хвостосховища. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (81), 96-110. <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2019.81.11>

2. **Фецюх, А.,** Пацула, О., Буньо, Л., & Терек, О. (2019). Біогеохімічна активність рослин *Salix viminalis* L. за росту на відвалах переробки полімінеральних калійних руд м. Стебник. *Молодь і поступ біології. Тези доповідей XV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів (Львів, 9 – 11 квітня 2019)* (С. 180-181). Львів: ЛНУ.

3. **Фецюх, А. Б.,** Буньо, Л. В., & Пацула, О.І. (2016). Вміст важких металів у рослин *Salix viminalis* L. за росту на засоленому субстраті з хвостосховища м. Стебник. *Біологія: від молекули до біосфери. Тези доповідей XI Міжнародної наукової конференції (Харків, Україна, 29 листопада – 2 грудня 2016)* (С. 106-107). Харків: ХНУ.

3.4. Екологічна оцінка вмісту ВМ у субстраті та в органах *S. viminalis* за росту на субстраті Стебницького хвостосховища

Зважаючи на динамічні особливості розподілу і збалансування хімічних елементів у геохімічних ландшафтах, процеси міграції та відповідність екологічним нормам ранжовано за трьома категоріями: збалансованим станом і відповідністю екологічним нормам фонового вмісту ВМ за КК і Кс від 0,5 до 1,5; інтенсивним розсіюванням за КК і Кс менше 0,5; інтенсивною концентрацією за КК і Кс понад 1,5. Кларки концентрації (табл. 3.5) розраховано щодо кларків ґрунтів світу і кларків ґрунтів Європи; коефіцієнт концентрації (табл. 3.6) – до ГДК та статистичних оцінок регіонального фону для орних земель України (Фецюх та ін., 2019).

Наведені результати свідчать про незрівноважений геохімічний стан і невідповідність екологічним нормам фонового вмісту ВМ. Процеси інтенсивної концентрації (КК > 1,5), щодо вмісту кадмію, молібдену і стануму, зафіксовано до та після росту рослин, порівняно із фоновими оцінками зі світовими та європейськими кларками. Важливо відмітити значне перевищення фонового вмісту кадмію, на 99 % щодо ґрунтів світу. Виявлено процеси інтенсивної концентрації міді, цинку, мангану та феруму щодо ґрунтів Європи. Решта даних відповідають збалансованому стану й екологічним нормам фонового вмісту ВМ у субстраті хвостосховища.

Згідно із отриманими даними, найвищий коефіцієнт концентрації (Кс) був у кадмію, який значно перевищував середній вміст елемента в орних землях України, та молібдену – на 99 % та 59 % відповідно (табл.3.6). Наші результати засвідчують інтенсивну концентрацію, оскільки спостерігається перевищення даних понад 1,5 рази. Усі розраховані фонові значення ВМ для яких відомо ГДК були нижчими.

Таблиця 3.5.

Кларки концентрації вмісту важких металів у субстраті з хвостосховища м. Стебник
(до і після вирощування рослин *S. viminalis*)

Проба	Кларки концентрації фонового вмісту важких металів у субстратах відносно кларків ґрунтів світу (чисельник) і Європи (знаменник)													
	Sn ²⁺	Cd ²⁺	Mo ³⁺	V ²⁺	Pb ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Zr ²⁺	Cr ³⁺	Ni ²⁺	Sr ²⁺	Mn ²⁺	Ti ⁴⁺	Fe ³⁺
К	2,31	56,09	5,14	0,45	0,86	0,67	0,78	1,50	0,12	0,30	2,40	1,00	0,32	1,25
	4,61	н.д.	6,17	0,58	0,48	1,49	1,14	2,34	0,13	0,76	6,19	1,68	0,44	2,03
К+	2,28	54,97	5,18	0,45	0,88	1,02	0,78	0,75	0,12	0,20	2,00	1,00	0,32	1,25
<i>S.viminalis</i>	4,56	н.д.	6,21	0,57	0,49	2,27	1,13	1,17	0,13	0,51	5,15	1,68	0,44	2,03
Д	2,33	54,69	5,35	0,45	1,28	1,01	0,78	0,53	0,15	0,20	6,00	1,00	0,40	1,25
	4,66	н.д.	6,42	0,58	0,71	2,25	1,13	0,82	0,16	0,51	15,46	1,68	0,55	2,03
Д+	2,23	55,89	5,28	0,28	1,72	0,34	0,08	0,40	0,12	0,20	4,00	1,00	0,24	0,75
<i>S.viminalis</i>	4,57	н.д.	6,33	0,36	0,96	0,75	0,11	0,63	0,13	0,51	10,31	1,68	0,33	1,22
Кларки ґрунтів, мг/кг														
Ґрунти світу(Bowen, 1979)	4	0,35	1,2	90	12	30	90	400	70	50	250	1000	5000	40000
Ґрунти Європи(Клос та ін., 2012)	2	н.д.	1	70	21,5	13,5	62	256	63,5	20	97	597	3655	24650

Таблиця 3.6.

Коефіцієнт концентрації фонового вмісту ВМ відносно ГДК у субстраті з хвостосховища м. Стебник
(до і після вирощування рослин *S. viminalis*)

Проба	Коефіцієнти концентрації фонового вмісту важких металів у ґрунтах ландшафтів відносно ГДК (чисельник) і орних земель України (знаменник)													
	Sn ²⁺	Cd ²⁺	Mo ³⁺	V ²⁺	Pb ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Zr ²⁺	Cr ³⁺	Ni ²⁺	Sr ²⁺	Mn ²⁺	Ti ⁴⁺	Fe ³⁺
К	н.д.	н.д.	н.д.	0,27	0,51	н.д.	0,83	н.д.	0,08	0,61	н.д.	0,67	н.д.	н.д.
	2,56	115,47	3,86	0,59	0,59	1,39	1,39	1,49	0,11	0,58	6,12	1,59	0,42	2,21
К+	н.д.	н.д.	н.д.	0,27	0,53	н.д.	0,83	н.д.	0,08	0,41	н.д.	0,67	н.д.	н.д.
	2,53	113,18	3,89	0,58	0,61	2,12	1,39	0,74	0,11	0,39	5,09	1,59	0,42	2,21
Д	н.д.	н.д.	н.д.	0,27	0,77	н.д.	0,83	н.д.	0,10	0,40	н.д.	0,67	н.д.	н.д.
	2,59	112,59	4,01	0,59	0,89	2,09	1,38	0,52	0,14	0,39	15,29	1,59	0,53	2,21
Д+	н.д.	н.д.	н.д.	0,17	1,03	н.д.	0,08	н.д.	0,08	0,41	н.д.	0,67	н.д.	н.д.
	2,54	115,06	3,96	0,37	1,19	0,69	0,14	0,39	0,11	0,39	10,19	1,59	0,32	1,33
ГДК ґрунтів (Созінова, Прістераб 1994)	н.д.	н.д.	н.д.	150	20	н.д.	85	н.д.	100	25	н.д.	1500	н.д.	н.д.
Середній вміст у ґрунтах орних земель України (Клос та ін., 2012)	3,6	0,17	1,6	68,8	17,3	14,5	50,7	403,3	74,7	26,1	98,1	628,3	3772,1	22576,2

Небезпека забруднення ґрунтів є тим вищою, чим вищий фактичний рівень вмісту речовин перевищує ГДК. Тобто небезпека забруднення ґрунту тим вища, чим більше значення коефіцієнту безпеки (Кб) перевищує 1. Для таких елементів як кадмій та залізо у субстраті із дослідної та контрольної ділянок дані перевищували 1 (табл. 3.7). Коефіцієнт безпеки (Кб) стронцію у дослідному варіанті до росту рослин становив 1,50, проте у контрольному не виявлено показників, які б перевищували 1. Також меншим 1 були значення для ванадію, свинцю, міді, цинку, хрому, нікелю та мангану.

Таблиця 3.7.

Коефіцієнти безпеки (Кб) ґрунтів Стебницького хвостосховища

	<i>Cd</i>	<i>V</i>	<i>Pb</i>	<i>Cu</i>	<i>Zn</i>	<i>Cr</i>	<i>Ni</i>	<i>Sr</i>	<i>Mn</i>	<i>Fe</i>
К	6,54	0,26	0,34	0,20	0,23	0,08	0,18	0,60	0,67	33,32
К+	6,41	0,27	0,35	0,31	0,23	0,08	0,12	0,50	0,67	33,32
Д	6,38	0,27	0,51	0,30	0,23	0,10	0,12	1,50	0,67	33,32
Д+	6,52	0,17	0,69	0,10	0,02	0,08	0,12	1,00	0,67	20,00

Оцінюючи екологічний стан ґрунтів, завищені показники вмісту ВМ щодо ГДК можуть розглядатися в якості показника ступеня їх хімічної деградації. Ми виявили перевищення ГДК кадмію, стронцію та феруму.

За сумарним показником забруднення (*Zc*) субстрат зі Стебницького хвостосховища за вмістом ВМ належить до III категорії забруднення у контролі (47,35) та досліді (64,44).

Екологічні норми мають бути орієнтовані на вирішення завдань оптимального функціонування властивостей ґрунтів, забезпечення їх сталості, відновлення родючості, збереження земельних ресурсів шляхом мінімізації негативного впливу на ґрунти. Саме тому, за умов низьких фонових концентрацій та високих значень ГДК, виникає питання пошуку системи нормування для адекватної оцінки рівня екологічної небезпеки забруднення ґрунту (Яковишина, 2016).

Нормування поелементного забруднення субстрату згідно ґрунтово-екологічних принципів відносно кларків валової форми у ґрунтах та ГДК подано у таблиці 3.8. Як видно з нижче наведеної таблиці, відносно вмісту кадмію та феруму в субстратах хвостосховища є катастрофічна екологічна ситуація. Щодо цирконію та мангану ситуація є задовільною.

Таблиця 3.8

Забруднення ВМ субстрату із Стебницького хвостосховища
згідно із ґрунтово-екологічними принципами

Проба	Cd ²⁺		V ²⁺		Pb ²⁺		Cu ²⁺		Zn ²⁺		Zr ²⁺	Cr ³⁺		Ni ²⁺		Sr ²⁺		Mn ²⁺		Ti ⁴⁺	Fe ³⁺	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Контроль	К	К	Б	Б	Б	Б	Б	Б	Б	Б	ПК	Б	Б	Б	Б	Б	3	Б	3	Б	К	
К+	К	К	Б	Б	Б	Б	Б	Б	Б	Б	3	Б	Б	Б	Б	Б	Б	Б	3	Б	К	
Дослід	К	К	Б	Б	Б	Б	Б	Б	Б	Б	3	Б	Б	Б	Б	ПК	3	Б	3	Б	К	
Д+	К	К	Б	Б	Б	3	Б	Б	Б	Б	3	Б	Б	Б	Б	3	3	Б	3	Б	К	

Примітки: 1 – відносно кларків валової форми у ґрунтах, 2 - валові форми у ґрунтах відносно ГДК, К – катастрофічна екологічна ситуація, Б – благополучна, ПК – передкризова, 3 – задовільна.

Показник індексу забруднення ґрунту (ІЗГ) надає змогу порівнювати результати отримані на різних територіях, фактично є інтегральним рівнем ГДК (Яковишина, 2016; Фецюх та ін., 2019). Поліелементне забруднення субстрату із хвостосховища згідно ІЗГ (рис. 3.7) було однаковим у контрольному та дослідному варіантах, але після росту рослин показник зменшився на 32 % у дослідному варіанті відносно контролю.

Швидкість надходження іонів ВМ у рослинний організм є різною і залежить від багатьох чинників: властивостей самого елемента, виду рослини, її захисних механізмів, також від кислотності ґрунту та умов довкілля (за Кавулич, 2020). Токсичність ВМ обернено пропорційна значенню рН ґрунтових розчинів. У разі збільшення кислотності ґрунту, елементи ВМ із нерозчинних солей переходять в іонну форму і стають доступними для поглинання їх рослинами (Kumari et al., 2011). Тому важливим показником забруднення ґрунтів є їхня кислотність.

Результати наших досліджень показали, що субстрат хвостосховища з м. Стебника мав слаболужну реакцію (табл. 3.9).

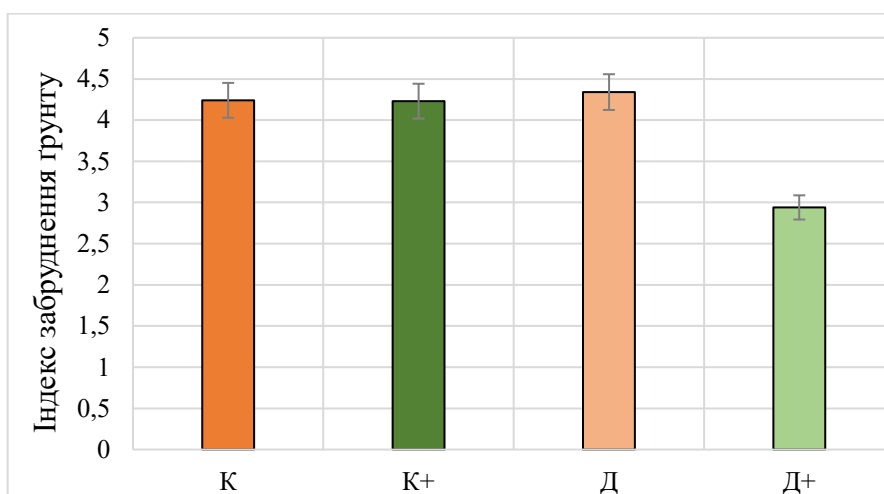


Рис. 3.7. Поліелементне нормування субстрату із Стебницького хвостосховища за оцінкою індексу забруднення ґрунту (ІЗГ) (К – контроль, Д – дослід, К+ – контроль після росту рослин, Д+ – дослідний субстрат після росту рослин)

Таблиця 3.9

Кислотність субстрату з ділянок Стебницького хвостосховища

Варіант	Актуальна кислотність (pH_{H_2O})	Обмінна кислотність (pH_{KCl})	Гідролітична кислотність (pH_{CH_3COONa})
<u>До посадки рослин верби</u>			
Контроль	7,3±0,03	7,4±0,01	7.9± 0,02
Дослід	7,5±0,15*	7,5±0,10*	8,0±0,05*
<u>Після 30-ти діб росту <i>S. viminalis</i></u>			
Контроль	7,3±0,04	7,4±0,15	8,0±0,10
Дослід	7,4±0,08*	7,4±0,04	8,1±0,05*

У контрольному варіанті після росту *S. viminalis* як актуальна, так і обмінна кислотність субстрату не змінювались. Показники дослідного субстрату незначно зменшувались. Гідролітична кислотність субстрату із контрольного та дослідного варіантів збільшувалась після росту рослин. Таким чином, ріст *S. viminalis* змінював стан ґрунту з слаболужного на лужний. Відповідно це може свідчити про

те, що ВМ знаходились у субстраті у менш доступній формі для поглинання рослинами.

Підсумки. Аналіз вмісту ВМ у субстратах є репрезентативним показником екологічного стану території. У субстраті було виявлено перевищення ГДК кадмію, заліза та стронцію. Поліелементне забруднення субстрату із території Стебницького хвостосховища було однаковим у контрольному та дослідному варіантах до росту рослин. Проте, за росту рослин у дослідному варіанті виявлено зниження показників.

Ці результати опубліковані:

1. **Фецюх, А.,** Буньо, Л., Пацула, О., & Терек, О. (2019) Накопичення важких металів рослинами *S. viminalis* за росту на субстраті з Стебницького хвостосховища. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (81), 96-110. <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2019.81.1>

3.5. Скринінг ендоефітних бактерій *S. viminalis* в умовах Стебницького хвостосховища

Мікробіом рослин впливає на функціональність рослинного організму та розглядається як важливий компонент системи рослина-господар, відомий як голобіонт. Окрім цього, мікробіом ризосфери рослин відіграє важливу роль в основних видах діяльності ґрунту. Вважається, що різні члени основного мікробіому відіграють вирішальну роль у формуванні мікробіоти, пов'язаної з рослинами, діючи як ключовий регулятор росту і розвитку рослин (Srivastava et al., 2022).

Ризосфера – це особлива ніша, де корисні бактерії конкурують з іншою мікробіотою за органічні речовини та взаємодіють із рослинами та ґрунтами шляхом колонізації коренів (Wang et al. 2021). Мікробне угруповання ризосфери варіює в залежності від виду, стадій росту та середовища існування рослин і часто включає RGPB, які колонізують їх корені. Деякі штами PGPR покращують здатність рослин адаптуватися до стресових умов середовища, наприклад до засолення (Gao et al., 2019). Тому такі штами RGPB можна використовувати як

біологічні інокулянти для стимулювання росту та розвитку рослин в умовах росту на забруднених ґрунтах.

Ріст-стимулюючі бактерії (PGPB) знаходяться в ризосфері або у вигляді ендofітів у міжклітинних просторах кори кореня. Останні визначаються як бактерії, які колонізують внутрішні тканини рослин, не завдаючи негативного впливу на рослину-господаря (Backer et al., 2018; Vandana et al., 2021). У порівнянні з бактеріями зовнішньої ризосфери, ендofітні бактерії (ЕБ), швидше за все, тісніше взаємодіють зі своїм господарем та забезпечують їм стійкість в умовах сольового стресу, а також тривалий ріст рослин у стресових умовах середовища (Zhang et al., 2020; Макар, Романюк, 2022).

У результаті проведеного дослідження проаналізовано всього 6 697 (після розрідження 3 231) та 8 693 (після розрідження 4 380) операційних таксономічних одиниць (ОТО) ЕБ коренів *S. viminalis*, вирощених на субстраті із Стебницького хвостосховища без та з додаванням ризосфери *S. europaеа* відповідно (рис. 3.8). Досліджено 36 зразків *S. viminalis*, що представляють 1 439 201 (після розрідження 245 448) зчитувань, що містять 10 137 унікальних ОТО (після розрідження 8255). Найменшу кількість ОТО виявлено у зразках *S. viminalis*, які росли на субстраті із ділянки 3 хвостосховища (Z3) без додавання ризосфери *S. europaеа* (1033), а найбільша кількість ОТО була у зразках *S. viminalis* вирощених на субстраті із ділянки 1 Стебницького хвостосховища (Z1) із додаванням нативних ризосферних бактерій *S. europaеа* (2994).

Зразки рослин верби, які росли на субстраті з трьох досліджуваних ділянок хвостосховища мали власне характерне мікробне співтовариство. Лише 321 та 346 ОТО були присутні у всіх зразках рослин, які росли на субстратах хвостосховища із додаванням та без нативних ризосферних бактерій *S. europaеа*, відповідно. Це становить 11,0% [95% CI, 9,8%-12,3%] та 8,6% [95% CI, 7,7%-9,6%] від загальної кількості ОТО (рис. 3.8 А, В).

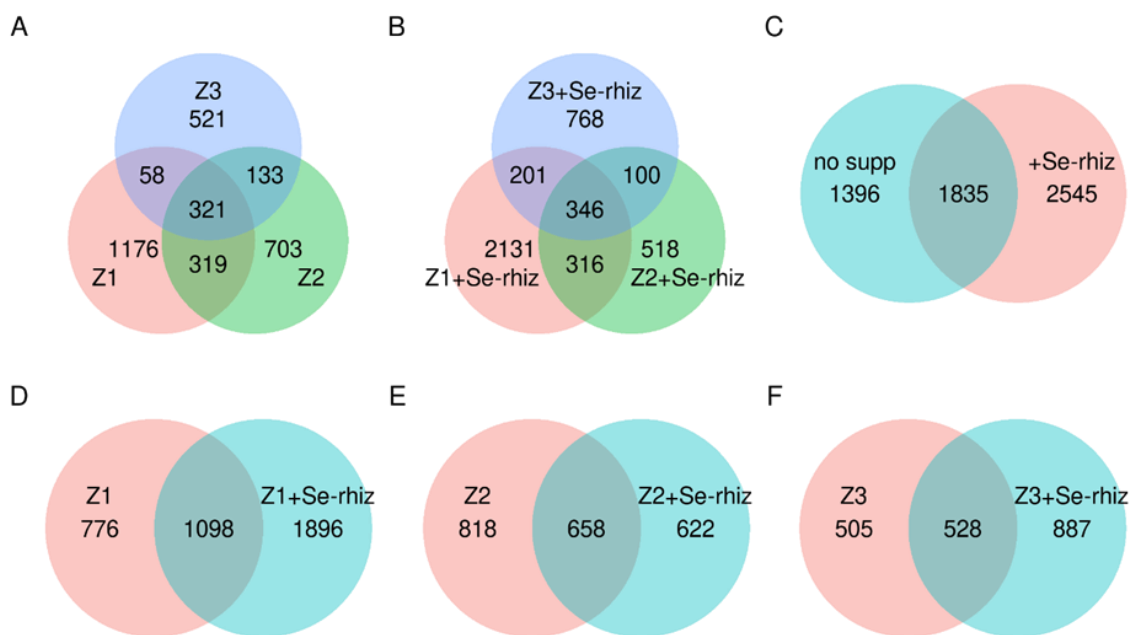


Рис. 3.8. Взаємозв'язки між наборами ОТО, ідентифіковані у ризосфері *S. viminalis*, вирощених на субстраті із трьох ділянок Стебницького хвостосховища (Z1, Z2, Z3) та на субстраті із хвостосховища з додаванням ризосфери *S. europaea* (Se-rhiz): А. ОТО *S. viminalis*, вирощених на субстраті із трьох ділянок Стебницького хвостосховища (Z1, Z2, Z3); В. ОТО *S. viminalis*, вирощених на субстраті із трьох ділянок Стебницького хвостосховищ із додаванням ризосфери *S. europaea* (Se-rhiz); С. Спорідненість між ОТО *S. viminalis*, вирощених на субстраті хвостосховища з (Se-rhiz) та без (no supp) додавання ризосфери *S. europaea*; D.-F. Попарні ОТО *S. viminalis*, вирощених на субстраті із ділянок хвостосховища Z1 (D), Z2 (E), та Z3 (F) без додавання та з додаванням ризосфери *S. europaea* (Se-rhiz)

У варіантах, де було додано ризосферні бактерії *S. europaea* виявлено більше унікальних ОТО, у порівнянні із зразками без ризосфери (рис. 3.8 С). Аналіз пар зразків наборів ОТО у трьох зонах без додавання ризосфери *S. europaea*, на протипагу зразкам із додаванням ризосфери *S. europaea* показав, що у зразках, вирощених на доповненому субстраті хвостоховища була більша частка унікальних ОТО порівняно із загальними ОТО зразків *S. viminalis* без додавання ризосферних бактерій *S. europaea*.

Важливо, що рослини *S. viminalis*, які росли на субстраті з хвостосховища без додавання ризосферних бактерій *S. europaea*, мали менше унікальних ОТО, у порівнянні із загальними ОТО. Кількість і частка загальних ОТО зменшувалися в залежності від досліджуваних ділянок хвостосховища, тобто зі збільшенням забруднення субстрату хвостосховища м.Стебник (рис. 1D-F). 198 ОТО з 5776, що становлять 2,5% [95% СІ, 2,2%-2,9%] від загальної кількості ОТО, були присутні у всіх варіантах дослідження.

Досліджуване багатство ОТО та індекс різноманітності Шеннона бактеріальних угруповань зменшувався із збільшенням забруднення у варіантах дослідження без додавання ризосфери *S. europaea* ($Z1 < Z2 < Z3$) (рис. 3.9. А, В, D, E). Встановлено зменшення виявлених ОТО за умов вирощування *S. viminalis* у варіантах досліджуваних ділянок 2 та 3 Стебницького хвостосховища ($Z2$ та $Z3$), однак значних змін у досліджуваному багатстві ОТО та індексі різноманітності Шеннона не було виявлено (рис. 3.9. С, F). Індекс Сімпсона не істотно знижувався у досліджуваних зразках (рис. 3.9. G-I). Отримані результати свідчать про те, що кількість ефективних видів бактерій зменшується зі збільшенням забруднення у субстраті Стебницького хвостосховища, при цьому більшість поширених видів зазнавали меншого впливу. Варіанти дослідження, де було додано ризосферу *S. europaea* показали збільшення кількості видів бактерій, які виживають у варіанті дослідження ділянки 3 хвостосховища ($Z3$) (див. рис. 2.2).

Результати бета-різноманітності проілюстровано на графіку NMDS, на основі відстаней Брея Кертіса для всіх досліджуваних зразків (Рис. 3.10 А). Зразки згруповані відповідно до рівня забруднення хвостосховища вздовж осі NMDS1 з більш забрудненими групами разом в асоціаційно-позитивних оцінках NMDS. Отримані дані показали, що спільноти зразків ЕБ коренів *S. viminalis* за впливу забруднення хвостосховища та ризосферних бактерій *S. europaea* групувалися разом з варіантами дослідження до яких не було додано бактерії *S. europaea*. Згідно із графіком, виявлено явне перекриття деяких зразків із ділянок

хвостосховища 1 та 2. Однак, забруднення Стебницького хвостосховища та додавання ризосфери *S. europaea* істотно не впливали на дисперсію спільноти (рис. 3.10 В).

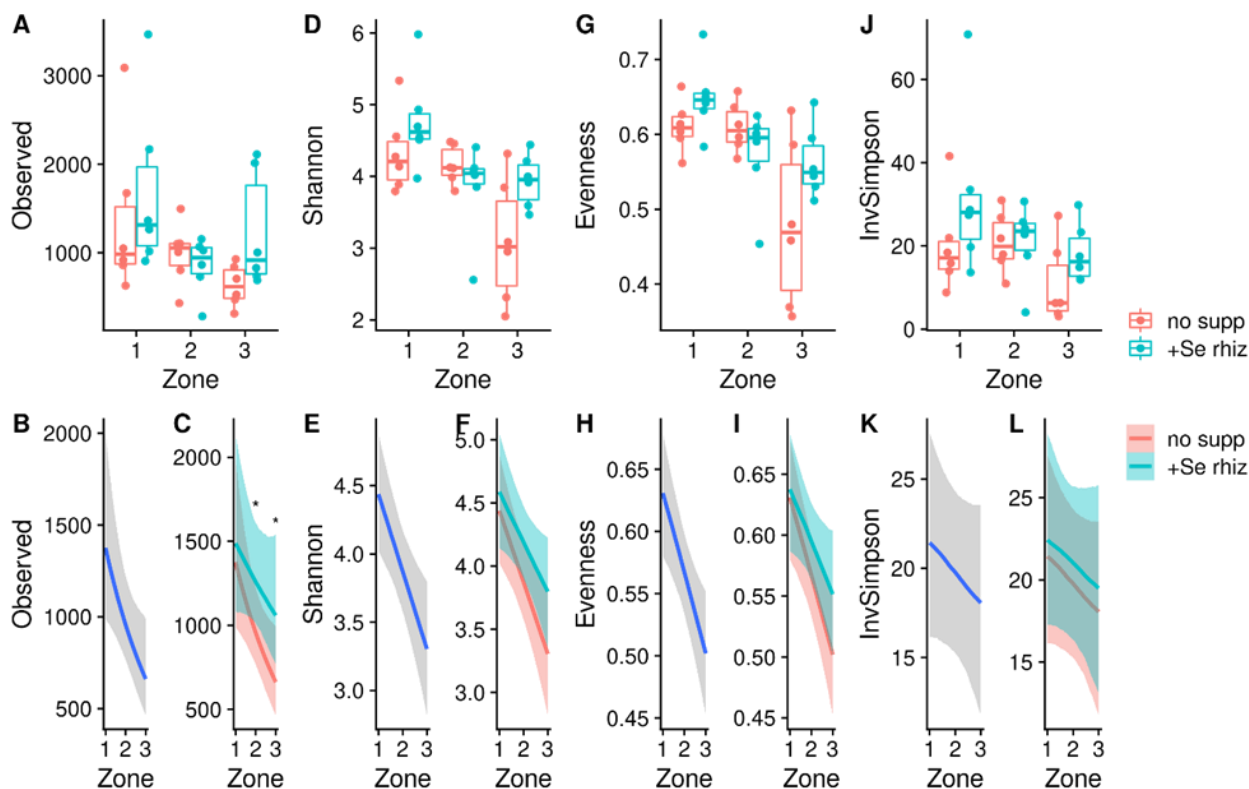


Рис. 3.9. Альфа-різноманітність визначених ОТО ендofітних бактерій коренів *S. viminalis*, вирощених на субстраті хвостосховища із трьох ділянок (Z1, Z2, Z3) Стебницького хвостосховища з (Se rhiz) та без додавання ризосфери *S. europaea*: А. Багатство ОТО; В. Вплив забруднення на досліджуване багатство ОТО у зразках *S. viminalis*, вирощених на субстраті із Стебницького хвостосховища без додавання ризосфери *S. europaea* з негативної біноміальної моделі досліджуване \sim зона + ризо + зона:ризо. Нахил досліджуваного багатства значно відрізнявся від нуля з апостеріорною ймовірністю $>95\%$, двостороння гіпотеза; С. Вплив забруднення хвостосховища та ризосфери *S. europaea* з негативної біноміальної моделі досліджуване \sim зона + ризо + зона:ризо. Зірочки позначають ділянки, де багатство було значно вищим у зразках із додаванням ризосфери *S. europaea* з апостеріорною ймовірністю $>95\%$, одностороння гіпотеза. Нахил досліджуваного багатства ОТО *S. viminalis*, вирощених на субстраті із додаванням ризосфери *S. europaea* суттєво

не відрізнявся від нуля з апостеріорною ймовірністю 0,17, двостороння гіпотеза; D. Індекс Шеннона; E. Вплив забруднення хвостосховища на різноманітність бактеріальних ендофітів коренів *S. viminalis* без додавання ризосфери *S. europaea* до індексу різноманітності Шеннона з надійної лінійної моделі Шеннона \sim зона + ризо + зона:ризо, t-розподіл Стюдента. Нахил досліджуваного багатства значно відрізнявся від нуля з апостеріорною ймовірністю >95%, двостороння гіпотеза; F. Умовний вплив забруднення хвостосховища з додаванням ризосфери *S. europaea* до індексу різноманітності Шеннона з надійної лінійної моделі Шеннона \sim зона + ризо + зона:ризо; G. Індекс Сімпсона; E. Умовний вплив забруднення хвостосховища без додавання ризосфери салікорні до інверсії індексу різноманітності Сімпсона від лінійної моделі InvSimpson \sim зона + ризо + зона:ризо, нормальний розподіл. Нахил досліджуваного багатства істотно не відрізнявся від нуля, двостороння гіпотеза; F. Вплив забруднення хвостосховища на різноманітність ЕБ коренів *S. viminalis* та додання ризосфери *S. europaea* до зворотнього (інверсійного) індексу різноманітності Сімпсона з лінійної моделі InvSimpson \sim зона + ризо + зона:ризо (Крапки позначають індивідуальні зразки, N =6. Лінії позначають модель, яка найкраще підходить. Затінені стрічки позначають 95% квантильних інтервалів)

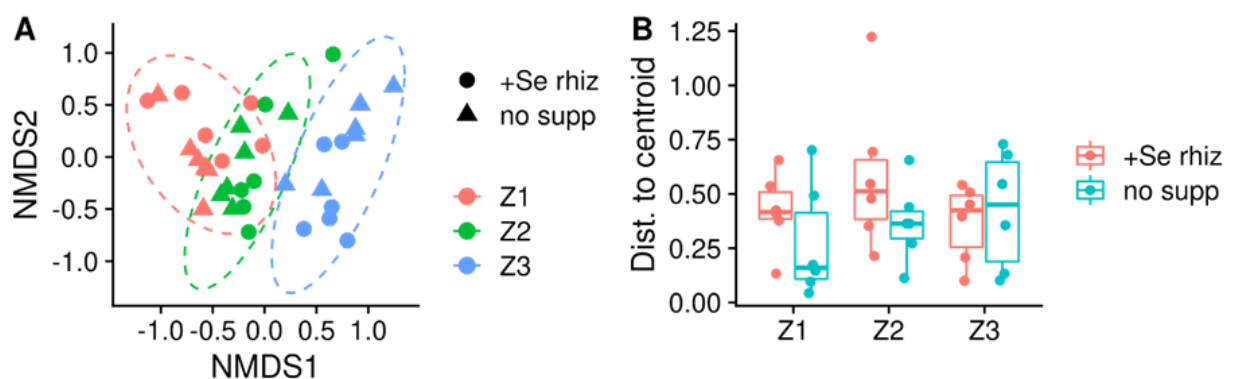


Рис. 3.10. А. Неметричне багатовимірне масштабування (NMDS) з використанням відстаней Брея-Кертиса. Колір позначає досліджувані зразки, вирощені на субстраті із трьох ділянок Стебницького хвостосховища (Z1, Z2 та Z3). Форма точки означає доповнення зразків ризосферою *S. europaea*. Еліпси – це 95% довірчі області t-розподілу. В. Відстані до центру, розраховані для відстаней Брея-Кертиса NMDS

Наші дані, що представляють градієнт забруднення Стебницького хвостосховища показали, що альфа- та бетарізноманітність бактеріальної спільноти зменшувалася, а склад спільноти змінювався відносно градієнту забруднення, що свідчить про гомогенізацію спільнот у міру появи забруднення.

Відомо, що попередні дослідження на рослинах із використання методів Illumina секвенування ампліконів показали, що ЕБ відіграють важливу роль у рості рослин (Lu et al., 2020). Однією з характерних рис секвенування нового покоління є можливість ідентифікувати мікробні таксони, відповідальні за зміни в структурі мікробної спільноти. За допомогою секвенування 16S рРНК виявлено наявність відносно багатой ендоефітної спільноти коренів *S. viminalis*, визначеної як кількість ідентифікованих ОТО (рис. 3.11).

Хоча структура спільнот ЕБ коренів *S. viminalis*, які росли на субстраті хвостосховища із ділянок 1 (Z1) та 2 (Z2) була відносно однорідною, значно більші зміни в спільноті спостерігалися у зразках *S. viminalis*, які росли на субстраті хвостосховища із ділянки 3 (Z3). У всіх досліджуваних зразках *S. viminalis* на рівні роду найбільше були представлені бактерії *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Rhizobacteriaceae* та *Flavobacterium*. Слід відмітити, що такі роди як *Marinobacterium*, *Idiomarina*, *Marinamicrobium* та *Halomonas* були рідко представлені в мікробних спільнотах ЕБ коренів *S. viminalis*, вирощених на субстраті хвостосховища із ділянок 1 та 2, однак у варіанті ділянки 3 їх кількість була значно більшою. Бактерії із вище перелічених родів належать до класу *Gamma*proteobacteria, представники родів якого характеризуються як помірно галофільні, а представники родини *Halomonadaceae* вважаються найкраще вивченими та найважливішими галофільними бактеріями (Biswas et al., 2018).

Багато ОТО, пов'язаних із вищезгаданими таксонами, часто також описуються як бактерії, які пов'язані із забрудненнями солями ВМ. Відомо, що декілька представників *Marinobacterium*, *Idiomarina*, *Marinamicrobium* та *Halomonas* використовуються в якості інокулянтів для покращення умов росту рослин за стресового впливу засолення та ВМ, демонструючи високу стійкість до

засолення та виняткові адаптаційні можливості до стресових умов (Kamika, Momba, 2014; Biswas et al., 2018; Li et al., 2019; Mukherjee, Mitra, Roy, 2019).

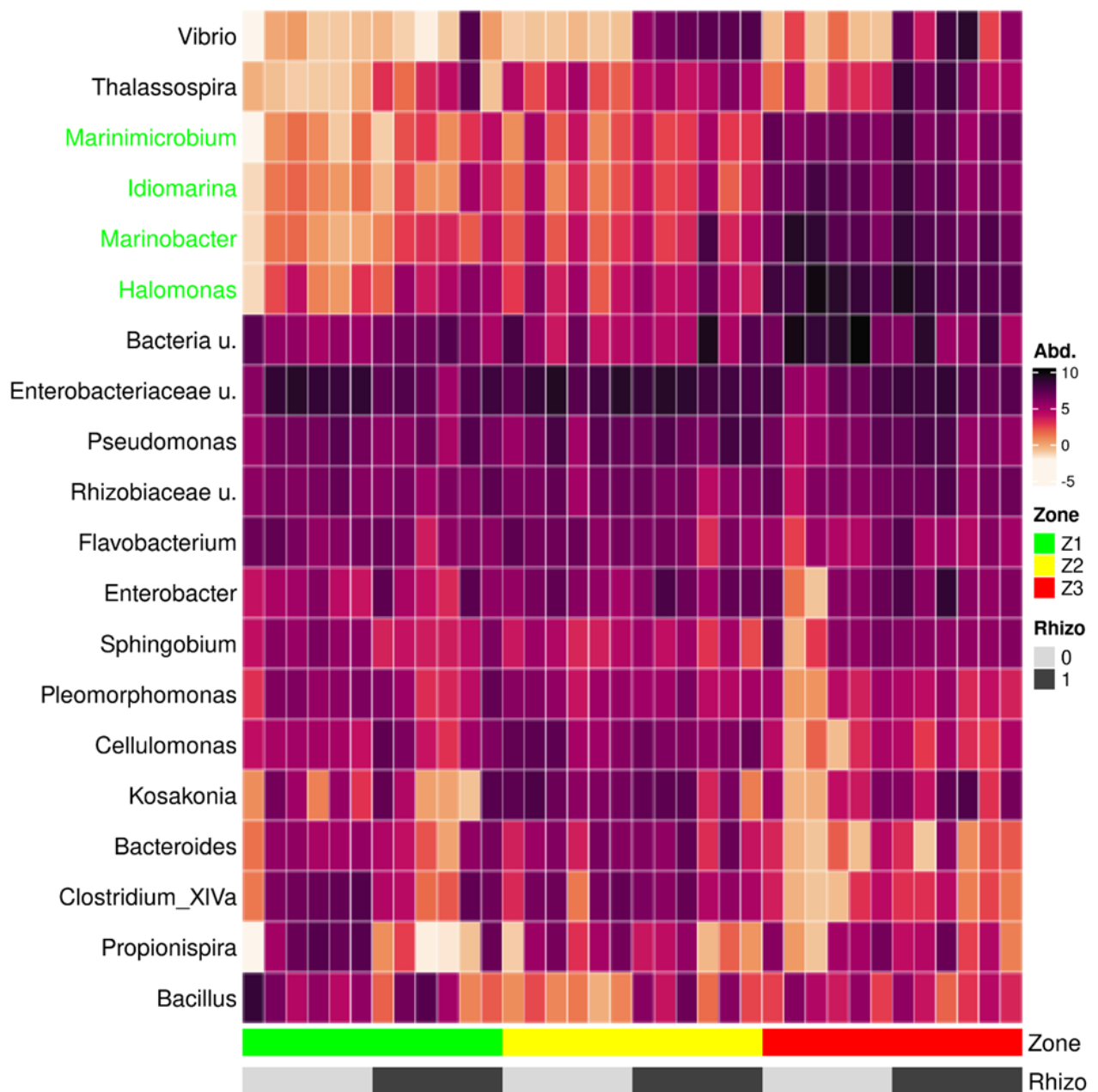


Рис. 3.11. Теплова карта складу ЕБ коренів *S. viminalis* на рівні роду. Кластеризація вказує на схожість окремих видів серед різних вибірок. Кольори теплової карти від бежевого до темно-червоного представляють відносну кількість родів бактерій від низької до високої

Наші результати дослідження узгоджуються із Luo et al. (2021) та підтверджують негативні наслідки техногенного забруднення субстрату, що включає в себе зміни біогеохімії, фізико-хімічних властивостей та складу субстрату, які безпосередньо впливають на різноманітність бактерій та склад мікробної спільноти. Слід врахувати також тривалий вплив ВМ на навколишнє середовище, що становить загрозу для мікробних популяцій та цілісності екосистеми. Дослідження на ділянках видобутку свинцю-цинку показало, що ВМ змінили різноманітність, багатство та структуру бактеріальної спільноти. Підтверджено (Berg et al., 2013), що стресовий вплив ВМ призвів до появи толерантних мікроорганізмів. Їх адаптація до стресових умов середовища пояснюється відмінностями в біосорбції, біопреципітації та хелатуванні (Luo et al., 2021).

Показано, що ЕБ мають здатність допомагати рослинам-господарям адаптуватися до несприятливих умов ґрунту та підвищити ефективність фітореMediaції, сприяючи росту рослин, зменшуючи фітотоксичність ВМ, змінюючи біодоступність металів у ґрунті та їх переміщення по рослині (Ma et al., 2016).

Підсумки. Дослідження впливу техногенного забруднення Стебницького хвостосховища, а також сумісної дії удобрення зразків *S. viminalis* ризосферою *S. europaea* дали змогу оцінити негативний вплив забруднення на склад та біорізноманітність ЕБ *S. viminalis*. Досліджуване багатство ОТО та індекс різноманітності Шеннона бактеріальних спільнот зменшувався із збільшенням забруднення у варіантах дослідження без додавання ризосфери *S. europaea* (Z1<Z2<Z3). Виявлено позитивний вплив ризосфери *S. europaea* на кількість унікальних ОТО у порівнянні із зразками *S. viminalis*, які вирощувались на субстраті хвостосховища без додавання ризосфери *S. europaea*. Встановлено, що у зразках *S. viminalis*, вирощених на субстраті із ділянки 3 хвостосховища м. Стебник (Z3) у більшій кількості виявлено наявність бактерій *Marinobacterium*, *Idiomarina*, *Marinamicrobium* та *Halomonas* у порівнянні із іншими варіантами дослідження.

Ці результати опубліковані:

1. **Фещюх, А.,** Пацула, О., Буньо, Л., & Терек, О. (2020). Роль ризосферних бактерій *Salix* sp. у мобілізації та фітоекстракції мікроелементів на забруднених ґрунтах. *Молодь і поступ біології. Тези доповідей XVI Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів (Львів, 27 – 29 квітня 2020)* (С. 210-211). Львів: ЛНУ.

2. **Fetsiukh, A., & Timmusk, S.** (2021). Phytostablization of Mine Tailing at Northeastern Outskirts of Stebnyk Region: The Role of Plant-Soil-Microbe Interactions and Extremophilic Microbial Ability to Decontaminate Pollution. Ph.D. students' days Faculty of Food Engineering, Tourism and Environmental Protection (Arad, Romania, November 26, 2021) (P. 12). Arad: Ministry of Education "Aurel Vlaicu" University.

3.6. Визначення АСС-поглинаючих ендofітних бактерій коренів

***S. viminialis* за умов вирощування на техногенному субстраті хвостосховища**

Рослини за допомогою своїх фотосинтетичних шляхів можуть поглинати та накопичувати забруднювачі, тоді як мікроорганізми здійснюють деградацію стійких забруднювачів за допомогою своїх метаболічних шляхів (Sandil, Gowala, 2022). Зокрема, ендofіти підвищують толерантність рослин-господарів до біотичних стресорів за допомогою багатьох механізмів, серед яких синтез деамінази 1-аміноциклопропан-1-карбонової кислоти (АСС), у свою чергу підвищуючи цим їх стійкість до впливу стресових факторів шляхом вироблення біоактивних метаболітів та сприяючи росту та розвитку рослин (Hazarika et al., 2021; Wang et al. 2021; Gupta et al., 2022; Moon, Ali, 2022).

Виявлено ряд різних PGPR, які виробляють даний фермент, який розщеплює АСС – небілкову амінокислоту і безпосередній попередник гормону етилену, та знижує рівень стресового етилену, який утворюється в умовах абіотичного стресу (Orozco-Mosqueda et al., 2020; Hazarika et al., 2021; Moon, Ali, 2022;). Активність АССD є ефективним маркером для бактерій, асоційованих з рослинами, для сприяння росту рослин шляхом зниження рівня етилену в рослин (Bonatelli et al., 2021; Goyal et al., 2021; Singh et al., 2021). Визначення та подальше використання ЕБ, що продукують АССD, може бути більш економічно вигідним, доступним та

екологічно чистим, а також більш прийнятним у порівнянні з трансгенними рослинами для тієї ж мети.

Результати вмісту АСС у інокульованому середовищі Дворкіна-Фостера показано на рис. 3.12. Слід відмітити, що глибина кольору розведених супернатантів досліджуваних ЕБ коренів *S.viminalis* була помітно слабшою порівняно з глибиною кольору розведеного неінокульованого середовища ДФ-АСС. Діаграми рисунку чітко засвідчують позитивний вплив ризосфери *S. europaеа* на показники щодо утилізації АСС ЕБ *S.viminalis*. Найбільше зменшення (на 20 %) вмісту АСС виявлено у третьому варіанті дослідження – за росту рослин верби на субстраті із найбільш забруднених ділянок хвостосховища (Z3). У другому варіанті дослідження (Z2) різниця була у межах похибки. Щодо варіанту із ділянки 1, показники були на 15 % менші за впливу ризосфери *S. europaеа*.

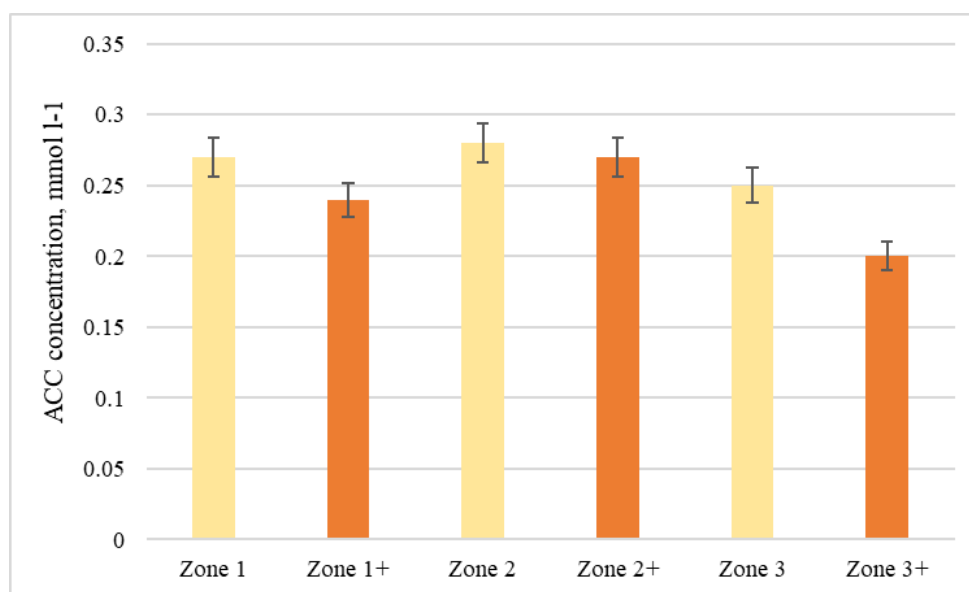


Рис. 3.12. Концентрація АСС у середовищі Дворкіна-Фостера-АСС після 24 годин інкубації колоній ЕБ коренів *S.viminalis*

Згідно із літературними даними, інокуляція рослин PGPR, які містять ACCD, підвищує їх стійкість до стресових факторів таких як засолення, ВМ, посуха і т.д. (Gupta, Pandey, 2019; Wang et al. 2021). Окрім цього, рослини за впливу бактерій-продуцентів ACCD характеризуються високою колонізацією, у порівнянні із рослинами, які не мали впливу даних бактерій (Moon, Ali, 2022). Відповідно,

отримані результати підтверджують збільшення кількості бактерій-поглиначів АСС за умов удобрення/інокуляції коренів *S. viminalis* ризосферними бактеріями *S. europaea* в умовах росту на техногенному субстраті хвостосховища. Використаний у даній роботі ПЛР-планшетний нінгідринний метод (Li et al., 2011) розширив рентабельність реакції з нінгідрином та полегшив скринінг бактерій-поглиначів АСС.

Бактеріальну активність АСС-дезамінази можна концептуально розділити на дві групи на основі високої або низької ферментативної активності (Souza et al., 2015). Мікроорганізми, що експресують дезаміназу з високим рівнем АСС, неспецифічно зв'язуються з різними поверхнями рослин, і ці мікроби включають ризосферні, філосферні та ендofітні мікроорганізми. Продемонстровано (Bal et al., 2013) ефективність бактерій, які виявляють активність АССD, таких як *Bacillus* sp. у індукванні солестійкості та покращенні росту рослин рису в умовах сольового стресу. Отримано результати щодо штаму *Pseudomonas* spp. з активністю АССD, який частково усунув вплив посухи на ріст *Pisum sativum* L. Подібним чином, рослини помідорів, попередньо оброблені ЕБ *P. fluorescens* і *P. migulae*, що виявляють активність АСС-дезамінази, були здоровішими та демонстрували кращий ріст під впливом сильного засолення порівняно з рослинами, попередньо обробленими мутантом з дефіцитом АССD або без бактеріальної обробки (Ali et al., 2014). Крім того, відбір ендofітів з активністю АССD може бути корисним підходом для розробки успішної стратегії фіторемедіації, враховуючи потенціал цих бактерій зменшувати стрес рослин (Souza et al., 2015).

Праці наукових дослідників показують, що використання RGPB стало багатообіцяючою альтернативою для полегшення стресу рослин, спричиненого засоленням та набуває все більшого значення (Shrivastava, Kumar, 2014)

Підсумки. Показано наявність бактерій-поглиначів АСС в усіх досліджуваних зразках коренів *S. viminalis*. Однак за умов інокуляції нативними ризосферними бактеріями *S. europaea* ризосферного шару рослин верби, у варіантах дослідження виявлено наявність більшої кількості бактерій-поглиначів АССD, що проявляється у зменшенні концентрації АСС. Отримані дані

підтверджують важливість бактерій-поглиначів АСС для рослин шляхом використання хімічного інгібітора біосинтезу етилену. Результати роботи демонструють потенціал ЕБ коренів *S.viminalis* у полегшенні впливу техногенного забруднення на рослини із розумінням важливості такого застосування на фізіологічні процеси рослин.

3.7. Накопичення білків у органах *S. viminalis* за росту на субстраті Стебницького хвостосховища

Важливим елементом адаптації рослин до стресових впливів є система контролю якості клітинних білків, оскільки адаптаційні захисні реакції рослин локалізовані всередині клітин і безпосередньо стосуються функціонування білоксинтезуючої системи (Kosová et al., 2013; Фецюх та ін., 2020). Завдяки своїм сильним окислювальним властивостям, підвищені концентрації АФК можуть викликати незворотні зміни в клітинних біомолекулах, таких як білки, ліпіди та нуклеїнові кислоти, що призводить до пошкодження мембран клітини та органел (Naliwajski, Skłodowska, 2021). Різноманітні стреси призводять до припинення або пригнічення синтезу білків, які мають місце в нормі, та синтезу специфічних стресових білків, характерних для відповіді на дію засолення, які відіграють важливу роль у забезпеченні клітинного гомеостазу в несприятливих умовах, захисті та відновленні рівноваги після стресу (Величко, 2012; Величко, 2014). У відповідь на зміну вищеперелічених чинників утворюються білки теплового шоку (БТШ), які відповідають за складання, збирання, транслокацію та деградацію білків у багатьох клітинних процесах, а також стабілізацію білків й мембран (Фецюх та ін., 2020; Халін, Пирі жок, 2020). Таким чином, дія стресу супроводжується синтезом високо- (Mr 60—100 кДа) та низькомолекулярних (Mr 15—45 кДа) стресових білків, а також убіквітину (Mr 8,5 кДа) (Косаківська, Голов'янок, 2006; Timperio, Egidi, Zolla, 2008; Kosová et al., 2013).

Результати електрофоретичних досліджень показали, що спектри білків у органах *S. viminalis* за контрольних та стресових умов мали якісні та кількісні відмінності – за складом компонентів та інтенсивністю окремих треків. В усіх

органах рослин *S. viminalis* не виявлено стресових білків, що належать до родин БТШ 60 та 70, але виявлено нмБТШ (низькомолекулярні білки теплового шоку) (рис. 3.13).

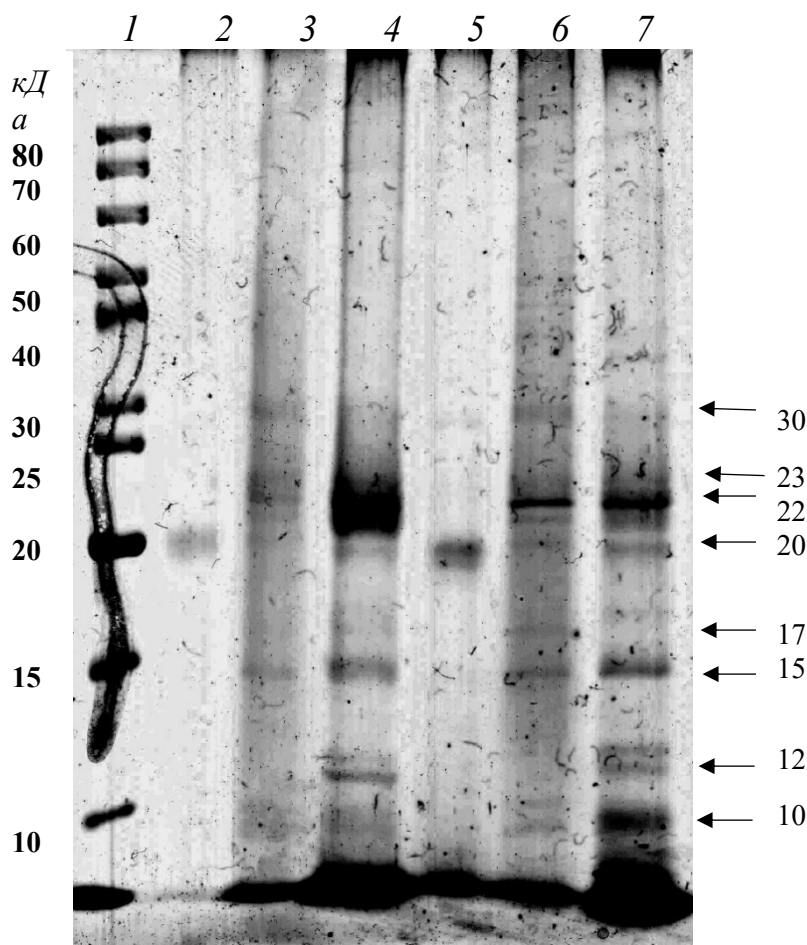


Рис. 3.13. Електрофоретичні спектри низькомолекулярних білків 30-добових *S. viminalis* за росту на субстраті із Стебницького хвостосховища (лабораторні умови): 1— маркер; 2 — контроль (корені); 3 – контроль (стебла); 4 – контроль (листки); 5 – дослід (корені); 6 – дослід (стебла); 7 – дослід (листки)

Згідно із даними, які висвітлені на електрофореграмі, в органах *S. viminalis* наявні низькомолекулярні поліпептиди з Mr 30, 23, 22, 20, 17, 15, 12, 10 та 8 кДа, вміст яких істотно варіював залежно від органа рослин. У профілі білків, які синтезуються за нормальних та стресових умов більшість білків була з ідентичними молекулярними масами. Однак у дослідних органах *S. viminalis*, зміни концентрації білків були виразнішими (рис.3.13). У листках *S. viminalis* синтезувались білки в більшості з такими ж молекулярними масами, однак у дослідному варіанті

спостерігалось зменшення вмісту білків із Mr 20-23 кДа, порівняно із контрольним варіантом. Такі результати можуть бути наслідком інгібування їх синтезу, або ж наслідком їх деградації.

Відомо, що абіотичні стреси призводять до деградації білків хлоропластів та утворення амінокислот (Stoychev, 2013; Фецюх та ін., 2020). За умов зростання на субстраті хвостосховища, у листках дослідних *S. viminalis* виявлено збільшення концентрації білків із Mr 10, у порівнянні із контрольними рослинами. Встановлено, що між трьома поліпептидами з Mr 10, 22 і 24 кДа існує тісна структурна асоціація (Ljungberg et al., 1986; Фецюх та ін., 2020).

Слід зазначити, що згідно із електрофореграмою, в дослідному варіанті наявні білки із Mr 8 кДа. Ці білки є ймовірно убіквітинами, які виконують функцію гідролізації денатурованих білків. Щодо фракційного складу білків у стеблах *S. viminalis*, під впливом сольового навантаження зростала кількість білків із Mr 22 кДа, порівняно із контрольним варіантом. Також у стеблах дослідного варіанту виявлено білки із Mr 17 кДа – ранні світло-індуцибельні білки (ELIP – early light-inducible protein). Дані білки функціонують лише протягом короткого періоду перетворення етіопластів в хлоропласти. Згідно з роботою К. Е. Steinback із співробітниками (1981), тилакоїдні мембрани, до яких був перенесений посттрансляційний білок 17 кДа, фракціонувалися у різні білкові комплекси і цей білок переважав у фракції, збагаченій частинками фотосистеми II (ФСII). Оскільки білок із Mr 17 кДа має специфічну функцію при складанні ФСII (Kloppstech, 1985).

У коренях *S. viminalis* виявлено нмБТШ із Mr 19-21 кДа, як у контрольному, так і в дослідному варіантах. Важливо, за умов техногенного забруднення хвостосховища їх кількість була більшою.

Згідно із літературними даними, при обробці пшеничного проса (*Eleusine coracana* Gaertn.) 200 мМ NaCl виявлено синтез білків із Mr 23 кДа (Uma, Prasad, Kumar, 1995). У листках ячменю виявлено інтенсивне накопичення білків з Mr 30, 27 та 6 кДа за дії засолення (Hellal et al., 2017). Встановлено (Величко, 2012) синтез низькомолекулярних білків (30-40 кДа) у листках сої у відповідь на стресові умови.

Дослідники вважають, що ВМ здатні індукувати так звані ознаки “окиснювального спалаху”, який активує антиоксидантну систему, що, у свою чергу, може підвищувати будь-яку ланку захисту, а саме синтез стресових білків (Кавулич, 2020). Більшість нМБТШ можуть діяти як незалежні від АТФ молекулярні шаперони, зв’язуючи денатуровані білки і тим самим захищаючи клітини від пошкодження внаслідок незворотної агрегації білків (Basha et al., 2012; Takemura, Tamura, 2016).

Низькомолекулярні стресові білки можуть сприяти підтриманню рівня транспорту електронів за індукованого ВМ стресу (Топчій, 2010). Відомо, що іони кадмію індукують синтез БТШ у багатьох рослин. За наявності цих іонів посилювалась експресія гена *Hvhsr 17*, який відповідає за синтез БТШ у кукурудзи та ячменю. У клітинній культурі *Lycopersicon peruvianum* (L.) Mill. за дії солей кадмію значні кількості БТШ 70 були зв’язані з мембранами органел.

Згідно із даними наших досліджень (Фецюх та ін., 2019), вміст кадмію перевищував ГДК у органах рослин *S. viminalis*, вирощених на субстраті хвостосховища. Відповідно це вказує на високий рівень акумуляції металу рослинами. Причини відсутності БТШ 70 в органах *S. viminalis* за стресових умов поки не з’ясовані та потребують подальшого дослідження. Можливо це пов’язано з відсутністю чи дуже низьким рівнем (за межами чутливості методу) синтезу БТШ 70. Хоча індукція синтезу цього стресового білка є одним з універсальних, значно поширених компонентів стрес-реакції до несприятливих умов, в окремих видів такий процес редукований або не визначається. Описаний феномен відомий для деяких спеціалізованих та ендемічних видів, вузько адаптованих до певних умов існування (Di Torri et al., 1999).

Результати нашого дослідження щодо загального вмісту білка в органах *S. viminalis* показали, що вміст білка у стеблах і коренях дослідних рослин достовірно збільшувався на 27,5 % та 39,8 % відповідно відносно контролю (рис. 3.14). У листках вміст білка був меншим на 32 % порівняно з контролем. Отримані результати нашого дослідження дають змогу свідчити про пристосування рослин

до умов росту на субстраті із хвостосховища. В листках дослідних рослин помічено вплив засолення, який проявлявся у зменшенні вмісту білка відносно контролю.

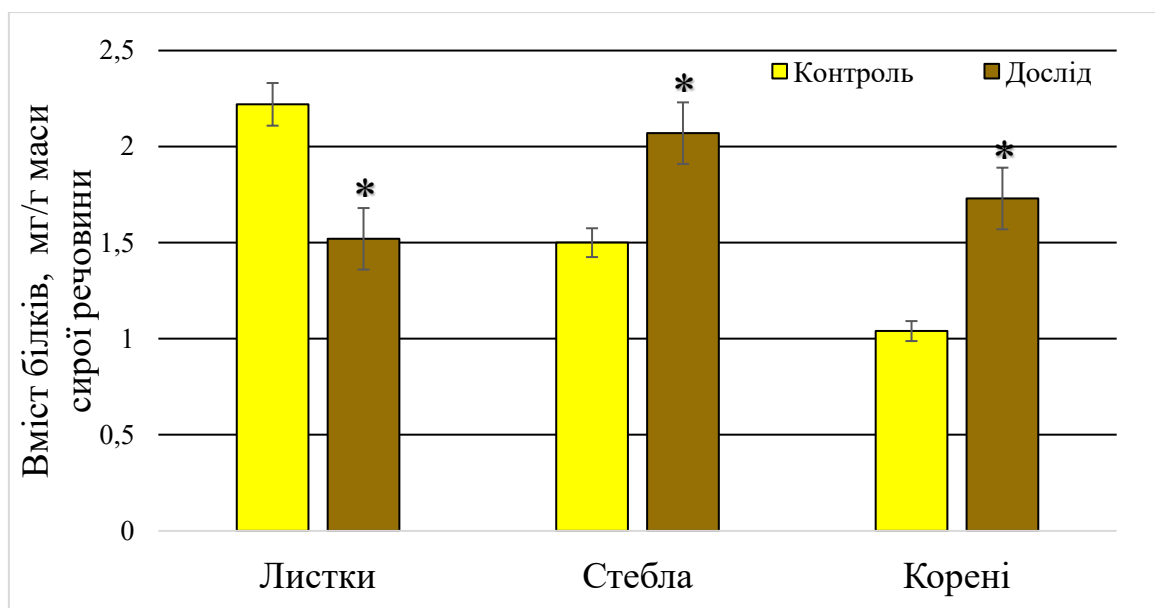


Рис. 3.14. Вміст білка в органах 30-ти добових *S. viminalis* за росту на субстраті із хвостосховища м.Стебник (лабораторні умови)

Встановлено (Hellal et al., 2017) високе накопичення загального білка у органах рослин вівса в умовах засолення, що підтверджується морфологічними властивостями рослин на стадії проростання. Однак у випадку пригнічення загального білкового синтезу в умовах стресу, як правило, відбуваються і зміни природи білків, які синтезуються. Активується накопичення нових транскриптів та кодуєчих ними поліпептидів – стрес-білків (Stoychev, 2013). Така ж тенденція спостерігалась і у рослин *S. viminalis* за росту на техногенному субстраті Стебницького хвостосховища. У листках дослідних рослин показано пригнічення синтезу загального білка, порівняно із контрольним варіантом, але відбувається активне накопичення білків із Mr 20-23, 10 та 8 кДа.

Отже, низькомолекулярні поліпептиди були виявлені в електрофореграмах всіх проаналізованих органів рослин *S. viminalis* у контролі та дослідному варіанті за росту на забрудненому субстраті хвостосховища. Отримані результати підтверджують значення нмБТШ у запобіганні пошкодження за стресових умов, а також підкреслюють їх участь у рості та розвитку рослин. Відомо, що нмБТШ

проявляють шаперонну активність, а їх синтез асоціюється з розвитком стійкості до дії стресу. Біосинтез нмБТШ свідчить про захисну функцію цих поліпептидів при зневодненні та/або регідратації (Cheng et al., 2008). Різноманітність рослинних нмБТШ відображає унікальність відповіді рослин на стрес та їх адаптацію і, напевно, є наслідком нерухомого способу життя рослин (Jianbo et al., 2018).

Підсумки. Результати проведеного дослідження підтвердили відмінності білкового спектру білків у рослинах *S. viminalis* в умовах росту на субстраті Стебницького хвостосховища. У всіх органах рослин виявлено нмБТШ. В основному, за контрольних та стресових умов, білки були ідентичними, проте у дослідних рослин *S. viminalis* зміни білків були більш виразнішими. Це є свідченням пристосування рослин верби до зростання на техногенному субстраті хвостосховища.

Ці результати опубліковані:

1. **Фецюх, А. Б.,** Буньо, Л. В., Пацула, О. І., & Терек, О. І. (2020). Вплив засолення на склад білків і вміст проліну в органах рослин *Salix viminalis* L. *Фізіологія рослин і генетика*, 52(5), 412—421. <https://doi.org/10.15407/frg2020.05.412>

3.8. Активація процесів ПОЛ у рослинних тканинах *S. viminalis* за утворенням МДА

У рослинному організмі одним із можливих компонентів швидкої реакції на стрес є активація перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) (Федотов, 2016; Коротка, Шерстюк, 2021). Встановлено, що цей процес є одним із універсальних індикаторів реакції клітин на вплив багатьох абіотичних чинників і повинен розглядатися як обов'язкова ланка стресу (Колупаев, Карпец, Обозный, 2011). Про активацію ПОЛ судять за швидкістю утворення малонового диальдегіду (МДА), який є його кінцевим продуктом (Федотов, 2016; Коротка, Шерстюк, 2021). Малоновий диальдегід взаємодіє з вільними аміногрупами білків, фосфоліпідів, що призводить до порушення клітинних мембран (Коротка, Шерстюк, 2021). Утворення МДА призводить до гідрофілізації мембран, порушення гідрофобного бар'єра, та

пов'язаного з цим збільшенням проникності і плинності мембрани, зниженням їх в'язкості, порушенням структури та локалізації рецепторів, ферментів та електричного заряду з можливим подальшим виникненням пор, розриву мембран та осмотичного шоку, що викликає вільнорадикальний некробіоз (Казначесва, 2010; Mallhi et al., 2020). Накопичення МДА вказує на відповідь рослини до впливу зовнішніх факторів (Коротка, Шерстюк, 2021). Високі показники МДА розглядаються як маркери важкості перебігу оксидативного стресу.

Результати наших досліджень показали, що умови росту на субстраті із дослідних ділянок хвостосховища індукували підвищення вмісту МДА у листках *S. viminalis*, що свідчить про інтенсивність перебігу процесів ліпопероксидації (рис. 3.15). Виявлено значне збільшення вмісту МДА у листках дослідних рослин, на 21,40 % відносно контролю. У стебла та коренях *S. viminalis* – значення були у межах похибки.

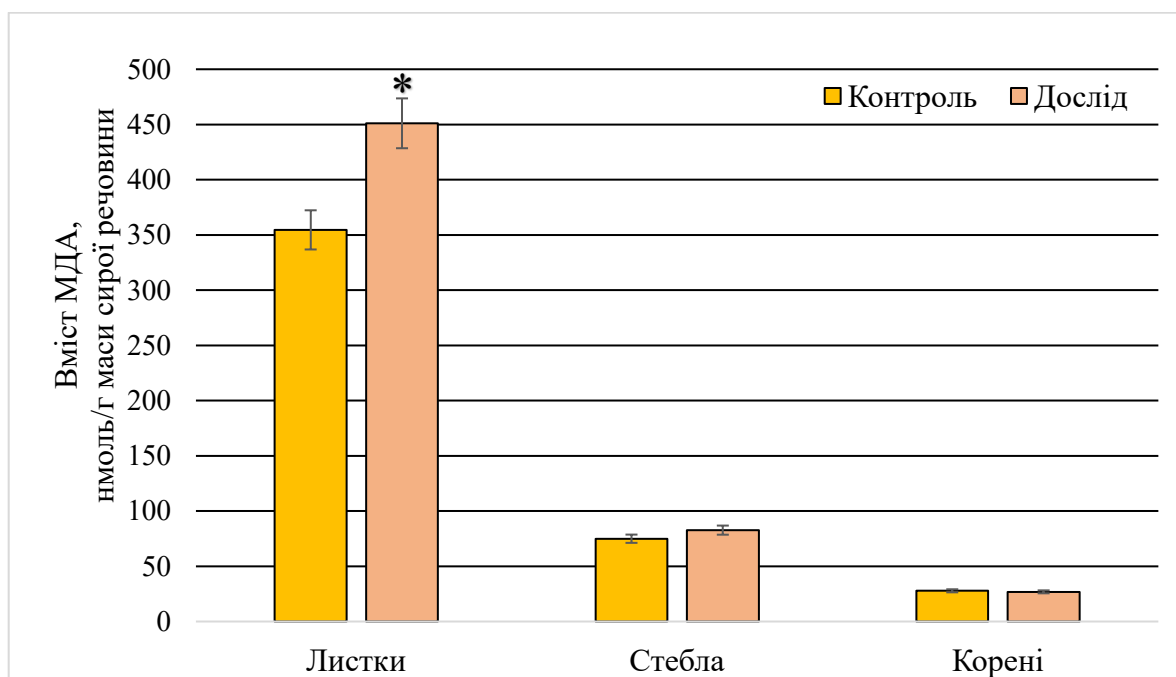


Рис. 3.15. Вміст МДА в органах 30-ти добових *S. viminalis* за умов росту на субстраті із Стебницького хвостосховища (лабораторні умови)

Автори стверджують, що за впливу стресових факторів, таких як осмотичний стрес, засолення, посуха, вплив ВМ, було виявлено значне збільшення вмісту МДА в органах рослин рису, арабідопсису, пшениці, бамії їстівної, люпину білого,

гарбуза звичайного, соняшника та ріпаку (Бакун та ін., 2011; Кокорев та ін., 2020; Labidi et al., 2020; Raklami et al., 2020; Коротка, Шерстюк, 2021; Ястреб та ін., 2021; Ashraf et al., 2021; Hafez et al., 2021). Дана реакція рослин викликала продукцію МДА як маркера пошкодження мембрани через ПОЛ (Raklami et al., 2020).

Накопичення МДА вказує на відповідь рослин до впливу зовнішніх факторів та вказує на згубну дію стресора (Кирпа-Несміян, 2016; Коротка, Шерстюк, 2021). Тому ми можемо стверджувати, що листки *S. viminalis* зазнавали найбільшої токсичної сумісної дії засолення та ВМ в умовах росту на техногенно забрудненому субстраті Стебницького хвостосховища. Зміна біодоступності цих металів у клітині сприяє їхній взаємодії з молекулярним киснем та утворенню гідроксильних радикалів – найактивніших прооксидантів, підвищена генерація яких призводить до швидкого наростання процесів ПОЛ (Vangronsveld et al., 1994; Cuypers et al., 2016).

Підсумки. Таким чином, несприятлива дія абіотичного стресу в умовах хвостосховища м. Стебник зумовлює оксидативний стрес в організмі рослин *S. viminalis*, який проявляється накопиченням продукту ПОЛ, а саме збільшується вміст МДА у листках дослідних рослин верби.

Ці результати опубліковані:

1. **Фецюх, А. Б.,** Буньо, Л. В., & Пацула, О. І. (2017). Прооксидантно-антиоксидантна система у рослин *Salix viminalis* L. за дії сольового забруднення. *International research and practice conference: Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences (Lublin, Poland, December 27-28, 2017)* (pp. 288-291). Lublin: Izdevnieciba «Baltija Publishing».

3.9. Вміст фенольних сполук в органах *S. viminalis* за росту на субстраті хвостосховища

Рослини виробляють велику кількість метаболітів, одними з яких є феноли, які синтезуються з коричної кислоти. Їх синтез і накопичення посилюються, коли рослини зазнають впливу ВМ. Дані сполуки належать до групи неензиматичних антиоксидантів та відомі своїми хелатуючими властивостями металів, що

транспортуються у вакуоллю, зменшують плинність мембран, запобігаючи надходженню металів у клітину. Фенольні сполуки, що містять гідроксильний іон, зв'язуються з металами, особливо із ферумом та купрумом. Вони також запобігають ПОЛ шляхом обміну ліпідних алкоксильних радикалів, які синтезуються в умовах стресу (Кавулич, 2020; Patel et al., 2021). Доведено протекторний ефект рослинних фенолів у випадках екстремальних стресорів, серед яких засолення, нестача мінеральних елементів (Saha et al., 2021; Nigam et al., 2022).

В залежності від виду рослин та від місцевості, на якій вони зростають, біологічна активність фенольних речовин є різна. Визначення їх вмісту може слугувати одним із показників стійкості рослин до несприятливих факторів довкілля (Бешлей та ін., 2015). Результати наших досліджень показали (рис. 3.16) достовірне зменшення вмісту фенольних сполук у всіх органах рослин за дії стресу, порівняно із контролем. У листках *S. viminalis*, за росту на субстраті хвостосховища, вміст фенолів зменшився на 22,6%, у стеблах – на 42 %, у коренях – на 27,8 %, порівняно із контролем.

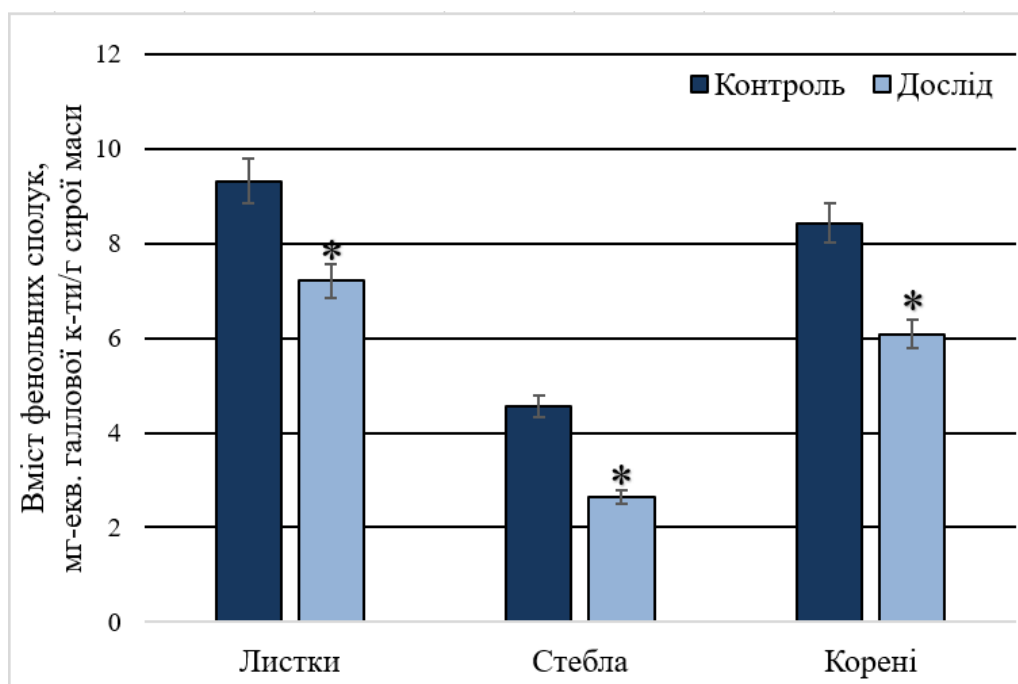


Рис. 3.16. Вміст фенольних сполук в органах 30-ти добових *S. viminalis* за умов росту на субстраті із хвостосховища м.Стебник (лабораторні умови)

Зменшення вмісту фенольних сполук у дослідних рослин можна пояснити дефіцитом вологи, який виникає при засоленні (Бешлей, 2015). Отримані дані можуть бути причиною активування ростових процесів рослин у стресових умовах (Кавулич, 2020). Однак у нашому випадку не помічено активування ростових процесів рослин верби прутовидної в умовах Стебницького хвостосховища. Слід зазначити, що багатьма дослідниками показано протилежний ефект впливу стресових умов на вміст фенольних сполук, тобто збільшення показників за впливу стресових факторів. Виявлено, значний приріст фенольних сполук у зв'язку із збільшенням концентрації NaCl у листках гречки (Saha et al., 2021). Досліджено (Gaşeska i inne, 2017) вміст фенольних сполук у листках рослин верби, вирощених за різних ґрунтових умов. Автори (Galović et al., 2021) відмічають, що надмірне засолення збільшує рівень фенольних сполук в організмі рослин. У роботі (Кавулич, 2020) виявлено накопичення фенолів у коренях та пагонах рослин пшениці за впливу іонів кадмію. Встановлено (Ashraf et al., 2021) значне підвищення неензиматичних антиоксидантів, а саме фенольних сполук у органах рослин за токсичної дії хрому.

Підсумок. Досліджено зміни вмісту фенольних сполук у дослідних органах *S. viminalis* за росту на субстраті Стебницького хвостосховища. Виявлено достовірне зниження вмісту фенольних сполук відносно контролю, що могло виникнути на фоні адаптації рослин до нових умов зростання, або ж за токсичної дії засолення.

Ці результати опубліковані:

1. **Фецюх, А. Б.,** Буньо, Л. В., & Пацула, О. І. (2017). Вплив сольового забруднення на вміст фенольних сполук в органах *Salix viminalis* L., вирощених на субстраті з хвостосховища м. Стебник. *Біологія: від молекули до біосфери. Тези доповідей XII Міжнародної конференції молодих науковців (29 листопада – 1 грудня 2017)* (С. 110-111). Харків: ФОП Шаповалова Т. М.

3.10. Вміст аскорбінової, дегідроаскорбінової та дикетогулонової кислот у органах *S. viminalis* за умов росту на субстраті Стебницького хвостосховища

Аскорбінова кислота (АК) – це антиоксидант, який є ключовим субстратом для детоксифікації АФК, що сприяє підвищенню стійкості рослин до багатьох несприятливих чинників (Gisbert et al., 2010; Akram et al., 2017). Аніон аскорбату (АН⁻) є життєво важливою молекулою водорозчинного антиоксиданту в біологічній системі (Akram et al., 2017). Дана кислота окислюється до дегідроаскорбінової (ДАК) кислоти, лактонове кільце якої легко гідролізується з утворенням кислоти з відкритим ланцюгом – дикетогулонової кислоти (ДКГК). За фізіологічних умов рівновага між ними сильно зміщена в бік АК (Кияк, 2014). Слід зазначити, що в умовах стресу зменшення вмісту АК відбувається внаслідок збільшення кількості дегідроаскорбінової (ДАК) та дикетогулонової (ДКГК) кислот (Терек та ін., 2009). Кількісний аналіз вмісту ДКГК може служити показником певної спрямованості фізіологічних процесів, так як реакція утворення ДКГК необоротна і дана кислота є кінцевим продуктом, що не проявляє біологічної активності (Кияк, 2014).

Результати досліджень вмісту АК, ДАК та ДКГК наведено на рис. 3.17. Згідно з отриманими даними, за росту рослин на субстраті із хвостосховища, показано збільшення кількості АК у листках та коренях дослідних рослин, на 7,70 % та 9,02 % відповідно порівняно із контролем. Проте у стеблах дослідних рослин вміст АК зменшувався за впливу стресу і був на 21,09 % меншим відносно контролю. Щодо ДАК, у всіх досліджуваних органах рослин верби вміст кислоти збільшувався. Однак, у стеблах виявлено достовірне збільшення кислоти на 41 % відносно контролю, у зв'язку із зменшенням у них АК. Дослідження вмісту ДКГК показали, що вміст кислоти у стеблах та коренях був вищим, порівняно із контролем на 48,19 % та 64 % відповідно. У листках спостерігалось зменшення вмісту кислоти на 31,25 % порівняно із контролем.

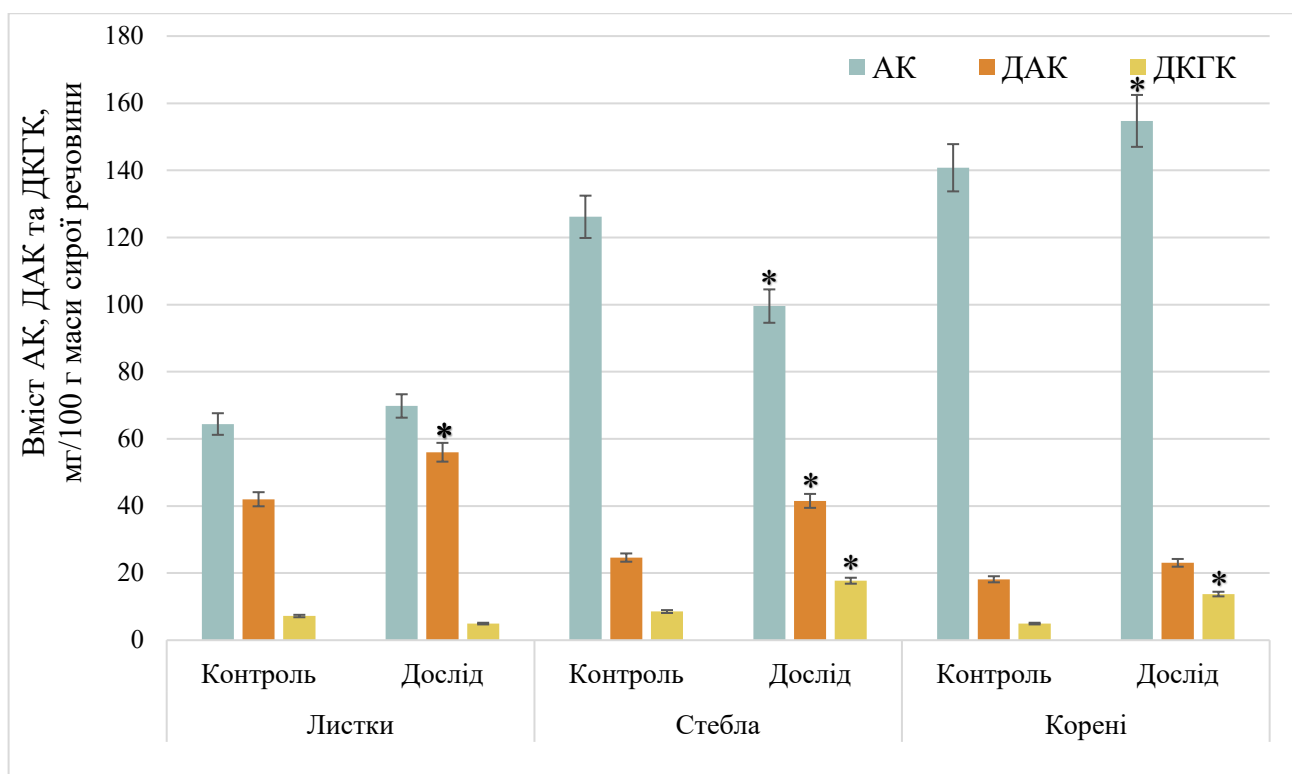


Рис. 3.17. Вміст аскорбінової (АК), дегідроаскорбінової (ДАК) та дикетогулонової (ДКГК) кислот у органах 30-ти добових *S.viminalis* за росту на субстраті із хвостосховища м. Стебник (лабораторні умови)

Головне місце синтезу АК – листки. Біохімічні реакції синтезу вітаміну корелюють з вуглеводневим обміном, оскільки головні шляхи біосинтезу АК відбуваються внаслідок перетворення вуглеводнів, особливо глюкози і галактози, які є головними продуктами фотосинтезу. Накопичення вітаміну позитивно корелює з інтенсивністю росту і розвитку рослин (Белчгазі, 2002). Переважання вмісту АК у листках є ознакою їхньої високої функціональної активності. Однак результати нашого дослідження показали переважання вмісту АК у коренях рослин верби.

Співвідношення вмісту АК/ДАК є показником фізіологічного стану рослини: висока інтенсивність процесів життєдіяльності – більше відновленої АК, низька інтенсивність – збільшується вміст дегідроформи (Кияк, Оксенюк, 2016). Співвідношення АК/ДАК у клітинах рослин має вплив на процеси дихання, у зв'язку із інгібуванням активності дегідрогеназ за участі ДАК, а також пригнічує

інтенсивність відновлювальних процесів та утворення макроергічних зв'язків (Кияк, 2014).

Оцінюючи співвідношення АК/ДАК у органах *S. viminalis* за умов росту на техногенному субстраті Стебницького хвостосховища (рис. 3.18) встановлено зменшення співвідношення відносно контролю у стеблах і незначно у коренях і листках. Отже, пагони дослідних рослини перебували в стані пригнічення процесів життєдіяльності.

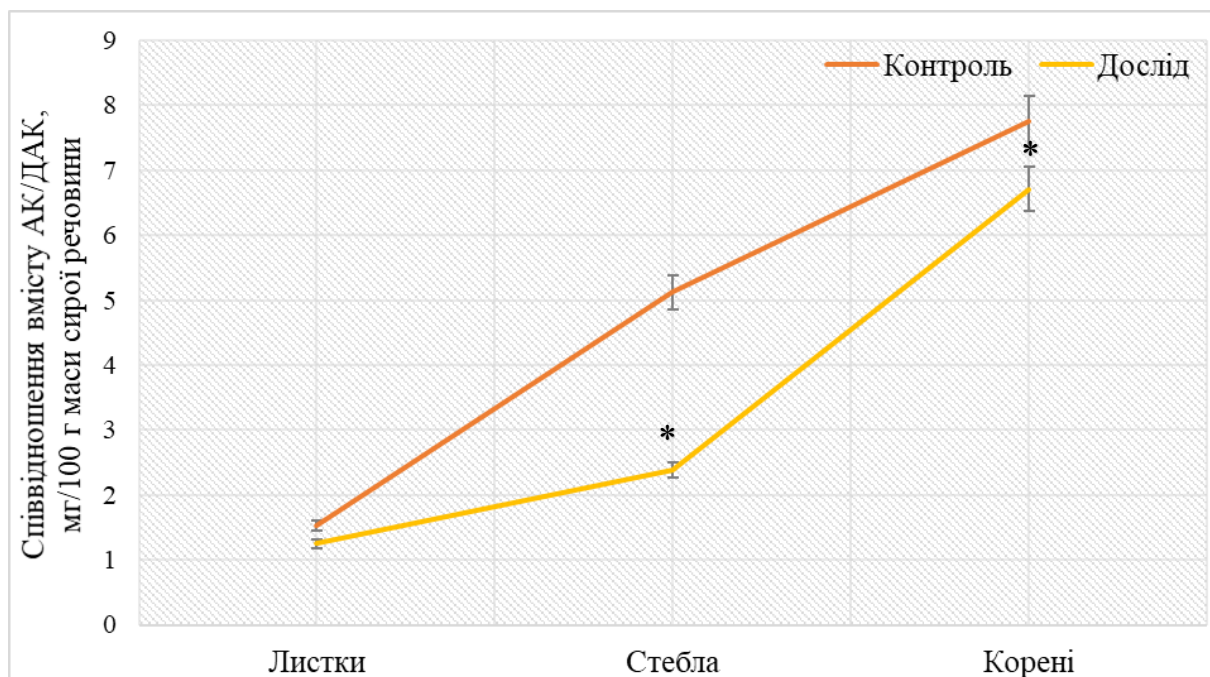


Рис. 3.18. Співвідношення вмісту АК/ДАК у органах 30-ти добових *S. viminalis* за умов росту на субстраті із Стебницького хвостосховища

За нормальних умов життєдіяльності підтримується рівновага між рівнем АК та продуктів її окиснення. Однак будь-які стресові умови, що порушують клітинний редокс – гомеостаз, можуть бути визначені як оксидативний стрес (Таран, 2004). Аскорбінова кислота завдяки відновлювальному потенціалу здатна безпосередньо взаємодіяти з АФК, а також брати участь у відновленні інших низькомолекулярних антиоксидантів шляхом неферментативних і ферментативних реакцій (Терек та ін., 2009).

За екстремальних умов унаслідок посилення окисно-відновних реакцій пул аскорбінової кислоти може вичерпуватися (Терек та ін., 2009). Виходячи із того ми

можемо стверджувати, що стебла рослин *S. viminalis* зазнають найбільшого сольового навантаження. Однак, слід відмітити, що у попередньо проведених польових дослідженнях (Fetsiukh et al., 2022), було виявлено накопичення АК у стеблах *S. viminalis* за росту на дослідних ділянках хвостосховища відносно інших органів рослин. Отримані дані узгоджуються із іншими працями, які засвідчують підвищення вмісту АК у деревних рослин на відповідь до стресових умов. Таку реакцію рослин на стрес можна пояснити високим рівнем продукції АФК, що, у свою чергу, може індукувати стійкість рослин до забруднення (Ashraf et al., 2021; Karmakar et al., 2021; Fetsiukh et al., 2022,).

Отже, збільшення вмісту ДКГК у стеблах та коренях – результат інтенсивного використання пулу аскорбінової та дегідроаскорбінової кислот на ліквідацію наслідків негативного впливу факторів середовища. Отримані результати можуть свідчити про пристосування рослин *S. viminalis* до дії стресу.

Підсумки. Узагальнюючи дані про вміст кислот, виявлено незначне зростання вмісту АК, ДАК та ДКГК у коренях та листках рослин, у порівнянні із контрольними рослинами. Така ж тенденція зберігалась і для листків. У стеблах *S. viminalis* за впливу сольового навантаження спостерігали інтенсивне використання АК, що підтверджувалось відповідним зростанням вмісту ДАК та ДКГК відносно контролю.

Ці результати опубліковані:

1. **Фецюх, А.,** Буньо, Л., Пацула, О., & Терек, О. (2018). Вплив засолення на вміст аскорбінової кислоти у органах рослин *Salix viminalis* L. *Молодь і поступ біології. Тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів (Львів, 10 – 12 квітня 2018)* (С. 309-310).

2. **Фецюх, А. Б.,** Буньо, Л. В., & Пацула, О. І. (2017). Прооксидантно-антиоксидантна система у рослин *Salix viminalis* L. за дії сольового забруднення. *International research and practice conference: Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences (Lublin, Poland, December 27-28, 2017)* (pp. 288-291). Lublin: Izdevnieciba «Baltija Publishing».

3. **Фецюх, А.,** Библів, Х., Гузар, О., Буньо, Л., & Пацула, О. (2017). Антиоксидантна система рослин *Salix viminalis* L. за росту на засоленому субстраті хвостосховища м. Стебник. *Молодь і поступ біології. Тези доповідей XIII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів (Львів, Україна, 25-27 квітня 2017 р.)* (С. 293-294). Львів: ЛНУ.

3.11. Активність каталази та пероксидази у органах *S. viminalis* за росту на субстраті Стебницького хвостосховища

Активація ПОЛ індукує перебудови у захисній антиоксидантній системі, зокрема, зміни активності антиоксидантних ферментів, які беруть участь у регулюванні концентрації АФК (Zhai et al., 2020; Коротка, Шерстюк, 2021; Labidi et al., 2021). Даний процес є одним із початкових етапів, які призводять до формування стресового стану. Ферменти є головними утилізаторами АФК, що генеруються в дихальному ланцюгу та інших метаболічних процесах (Коротка, Шерстюк, 2021). Активація антиоксидантної системи є фактором, який надає рослинному організму підвищену стійкість. Збалансованість між перекичним окисненням й антиоксидантною активністю є важливою умовою для збереження нормальної життєдіяльності клітини. Зміщення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги є однією з перших неспецифічних ланок у розвитку стрес-реакції, яка запускає інші механізми захисту (Бақун та ін., 2011; Mallhi et al., 2020; Коротка, Шерстюк, 2021). Оксидативний стрес призводить до інтенсифікації процесів ліпопероксидації та зниження активності ензимів системи антиоксидантного захисту (Маменко та ін., 2016).

Каталаза є потужним ферментним антиоксидантом, який належить до гемвмісних тетрамерних ферментів класу оксидоредуктаз (КФ 1.11.1.6), що каталізує розклад гідроген пероксиду з утворенням кисню і води. Даний фермент є одним з основних ферментів, який руйнує АФК та є одним із найактивніших ензимів (Казначеева, 2010; Jahantigh et al., 2016).

В результаті наших досліджень виявлено (рис. 3.19), що активність КАТ у *S.viminalis* на 30 добу росту достовірно зростала в листках та стеблах рослин, на 80

та 43 % відповідно порівняно із контролем. Однак у коренях дослідних рослин активність ферменту зменшувалась на 15 % відносно контролю.

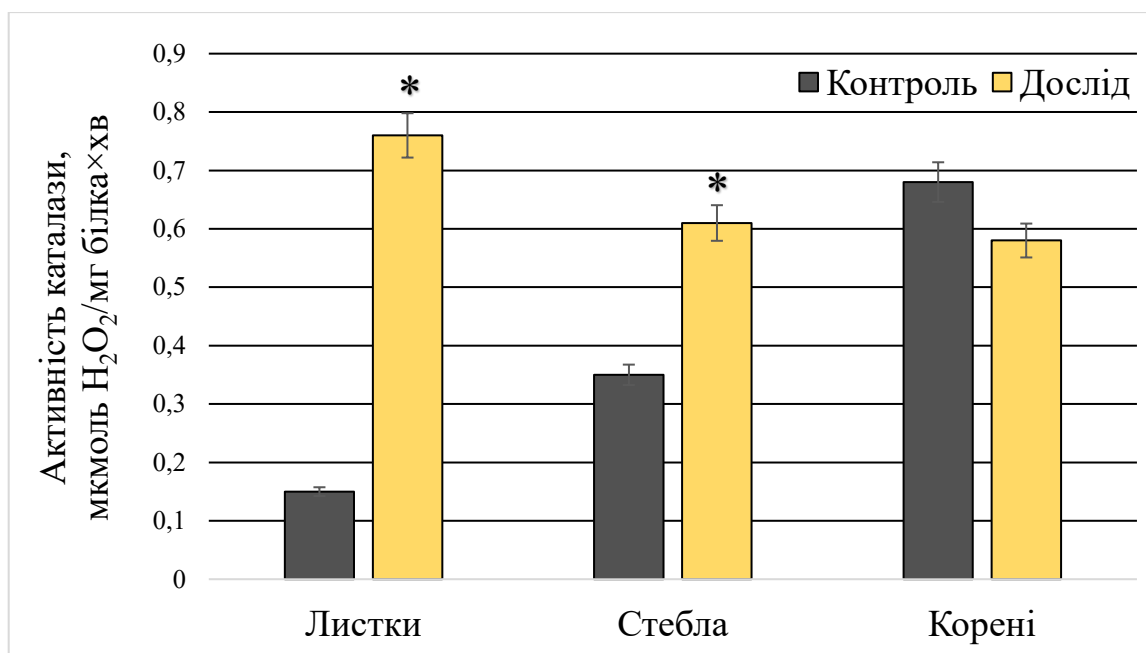


Рис. 3.19. Активність каталази в органах 30-ти добових *S. viminalis* за росту на субстраті із хвостосховища м.Стебник (лабораторні умови)

Дослідження активності КАТ у органах *S. viminalis* за росту в польових умовах Стебницького хвостосховища показано на рис. 3.20. Виявлено, що на 120 добу росту рослин на ділянках хвостосховища, у коренях дослідних рослин активність КАТ була найвищою відносно стебел та листків *S. viminalis*, а також достовірно підвищувалась активність ферменту відносно контролю на 63 %. У стеблах *S. viminalis* активність КАТ була вищою на 48 % порівняно із контрольним варіантом. У листках виявлено лише незначне збільшення активності ферменту за умов засолення, на 14 % порівняно з контролем.

Рослини мають потужні механізми стійкості та адаптації до засолення. У стійких рослин спостерігається зростання активності каталази, тим часом, як у солечутливих рослин – її зниження (Shalata, Tal, 1998). Зменшення активності КАТ виявлено у листках шовковиці (Harinasut, Poonsora, 2003), проростків кукурудзи (Куриленко, Палладіна., 2005), вігні (Cavalcanti, Oliveira, 2004) та проростків рису (Lee, Kim, Lee, 2001). Інші дослідники не встановили змін активності каталази ані

в листках (Fadzilla, Finch, Burdon, 1997), ані в коренях (Tsai et al., 2004). Встановлено (Більчук, Россихіна-Галича, 2014), що дія забруднювачів призводить до підвищення активності КАТ.

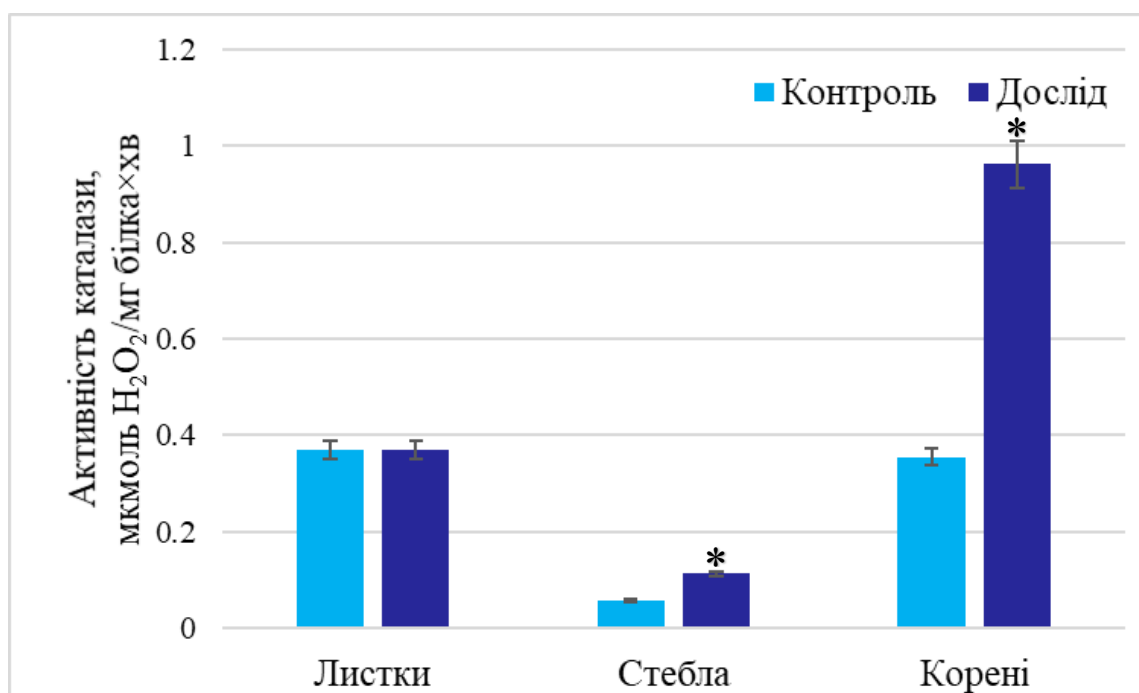


Рис. 3.20. Активність каталази в органах 120-ти добових *S. viminalis* за росту на субстраті хвостосховища м.Стебник (польові умови)

Отже, така зміна активності ферменту КАТ у органах *S. viminalis* за росту на хвостосховищі може свідчити про стійкість рослин до техногенного забруднення. Наші результати узгоджуються із даними інших дослідників, які виявили значне збільшення активності КАТ у листках та коренях рослин гісопу та льону звичайного, а також за впливу ВМ виявлено високий рівень КАТ у листках верби (Jahantigh et al., 2016; Arsenov, 2017; Dubey et al., 2020; Fetsiukh et al., 2022). Інші автори повідомляють про зменшення активності КАТ за дії різних концентрацій іонів кадмію у рослин гарбуза звичайного та за впливу сольового стресу в рослин кукурудзи (Шклярєвський та ін., 2019; Labidi et al., 2020).

Пероксидаза (ПОД) (КФ 1.11.1.7) бере участь у різних процесах рослинного організму, включаючи стійкість до засолення та впливу ВМ (Jahantigh et al., 2016). Пероксидазні реакції в клітині є неспецифічними реакціями рослинного організму на дію стресових факторів, а напрямок зміни активності фермента свідчить про

стан адаптації організму та рівень вільнорадикальних окислювальних процесів (Колупаєв, 2013).

За росту на забрудненому субстраті хвостосховища, у 30-ти добових *S. viminalis* активність ПОД була найбільшою у листках, порівняно із іншими органами рослин (рис. 3.21). У стеблах активність пероксидази достовірно зростала відносно контролю на 70 %. Найменша активність ферменту виявлено у коренях *S. viminalis* – на 50 % менше відносно контролю.

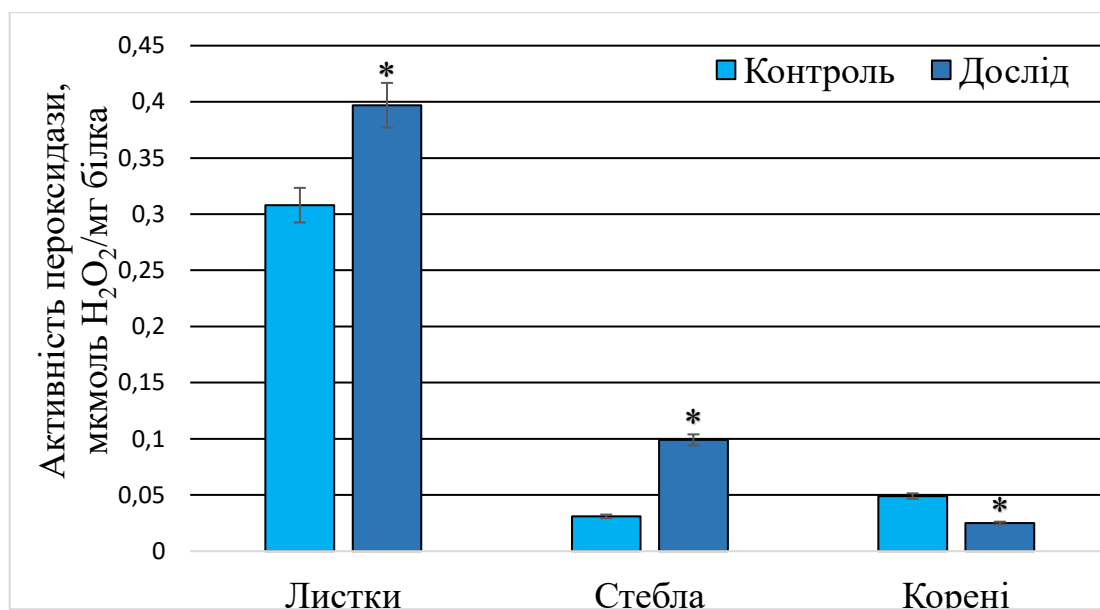


Рис. 3.21. Активність пероксидази в органах 30-ти добових *S. viminalis* за росту на субстраті із хвостосховища м.Стебник (лабораторні умови)

Щодо впливу стресора у польових умовах, виявлено достовірне збільшення активності ПОД у стеблах дослідних 120-ти добових рослин порівняно із контрольним варіантом на 28 % (рис. 3.22). У листках *S. viminalis* показано зниження активності фермента відносно контролю. Щодо коренів, значення активності ПОД були незначно нижчими відносно контролю. Однак інші дослідження виявили значно вищу активність ПОД у коренях і листках *S. matsudana* під час обробки NaCl (Wang et al., 2013; Li et al., 2018) та у рослин бавовни в умовах сольового стресу (Munavar et al., 2021). Виявлено збільшення активності КАТ та ПОД у рослин бамії їстівної за умов токсичного впливу хрому

(Ashraf et al., 2021). Встановлено, що активність антиоксидантних ферментів збільшувалась за дії стресового фактора (Mallhi et al., 2020).

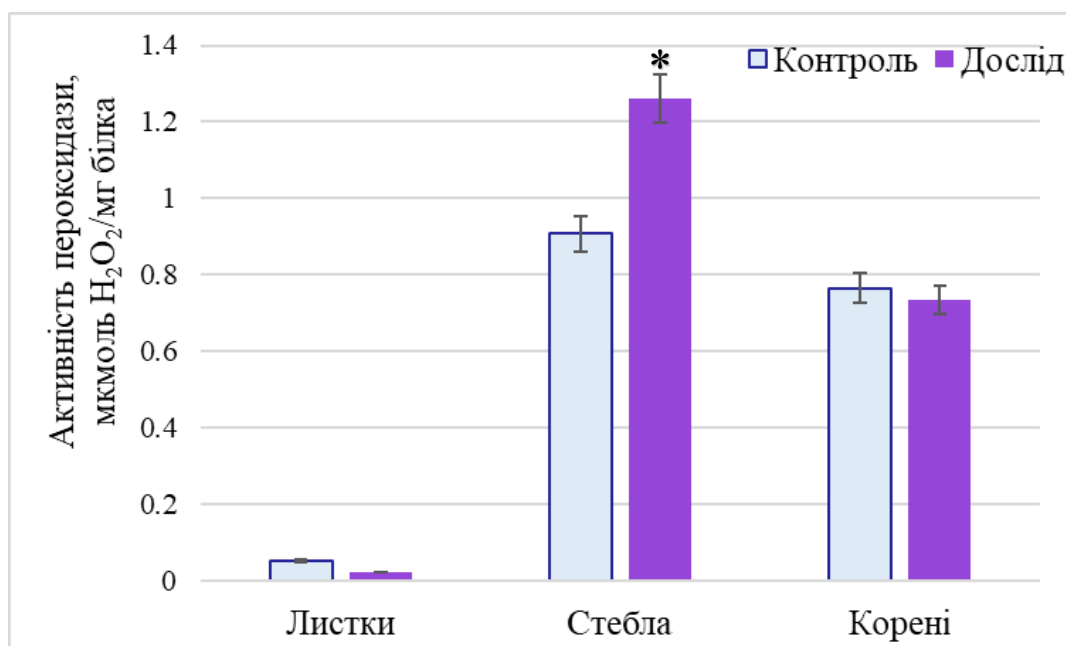


Рис. 3.22. Активність пероксидази в органах 120-ти добових *S. viminalis* за росту на субстраті Стебницького хвостосховища (польові умови)

Підсумки. Результати наших досліджень показали, що ферментативна активність у 30-ти добових рослин за умов росту на субстраті Стебницького хвостосховища була найвищою у листках *S. viminalis*, порівняно із контрольними рослинами. У польових умовах росту на хвостосховищі на 120 добу росту рослин показано високий рівень активності КАТ у коренях дослідних рослин верби, а ПОД – у стеблах. Отримані результати свідчать про різний рівень антиоксидантного захисту в органах рослин, а також здатність рослин ефективно знешкоджувати АФК. Таким чином рослинний організм мобілізує систему захисту від окислювальних пошкоджень, що проявляється у збільшенні антиоксидантної активності, і в свою чергу забезпечується його адаптація до стресових умов.

Ці результати опубліковані:

1. Fetsiukh, A., Bunio, L., Patsula, O., Timmusk, S., & Terek, O. (2022) Content of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in *Salix viminalis* L. grown on the Stebnyk tailing. *Acta Agrobotanica*, 75, 1-13. <https://doi.org/10.5586/aa.752>

2. **Фецюх, А.,** Библів, Х., Гузар, О., Буньо, Л., & Пацула, О. (2017). Антиоксидантна система рослин *Salix viminalis* L. за росту на засоленому субстраті хвостосховища м. Стебник. *Молодь і поступ біології. Тези доповідей XIII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів (Львів, Україна, 25-27 квітня 2017 р.)* (С. 293-294). Львів: ЛНУ.

3. **Фецюх, А. Б.,** Буньо, Л. В., & Пацула, О. І. (2017). Прооксидантно-антиоксидантна система у рослин *Salix viminalis* L. за дії сольового забруднення. *International research and practice conference: Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences (Lublin, Poland, December 27-28, 2017)* (pp. 288-291). Lublin: Izdewniciba «Baltija Publishing».

3.12. Вміст водо- та спирторозчинних цукрів у органах *S. viminalis* за росту на субстраті хвостосховища м. Стебник

Протягом останніх п'яти десятиліть велика увага приділяється вмісту цукрів у організмах за впливу різних стресових умов (Yasseen et al., 2018). Цукри є фізіологічно важливими біомолекулами, які діють як головне джерело вуглецю в рослинах. Вони також є важливими осмолітами, які підтримують клітинний осмотичний потенціал і тургор під час абіотичних стресів, таких як засолення та токсичність ВМ (Banerjee, Roychoudhury, 2021; Chakraborty et al., 2013). Розчинні цукри відіграють подвійну функцію, оскільки вони пов'язані як з анаболізмом АФК, так і з їх катаболізмом, наприклад, окислювальним пентозофосфатним шляхом, який забезпечує вироблення НАДФН, бере участь у виведенні АФК (Sami et al., 2016). Відомо, що розчинні цукри є одними з основних метаболітів, які підтримують ріст і розвиток рослин. За дії сольового стресу, у листках та коренях рослин зазвичай спостерігається накопичення розчинних цукрів, і найбільш толерантні сорти накопичують їх у більшій кількості (Song, Su, 2017; Fetsiukh et al., 2022).

Дані, отримані в результаті нашого дослідження (рис. 3.23), свідчать про накопичення цукрів (спирто- і водорозчинних) в органах *S. viminalis* за росту на дослідних ділянках Стебницького хвостосховища. Найбільша кількість розчинних

цукрів виявлена в коренях дослідних рослин, порівняно із контролем. Загальний вміст цукрів у листках та коренях був на 7,69 % та 35,74 % вищим відповідно, порівняно з контрольними рослинами. Натомість, у стеблах *S. viminalis* змін не спостерігалось.

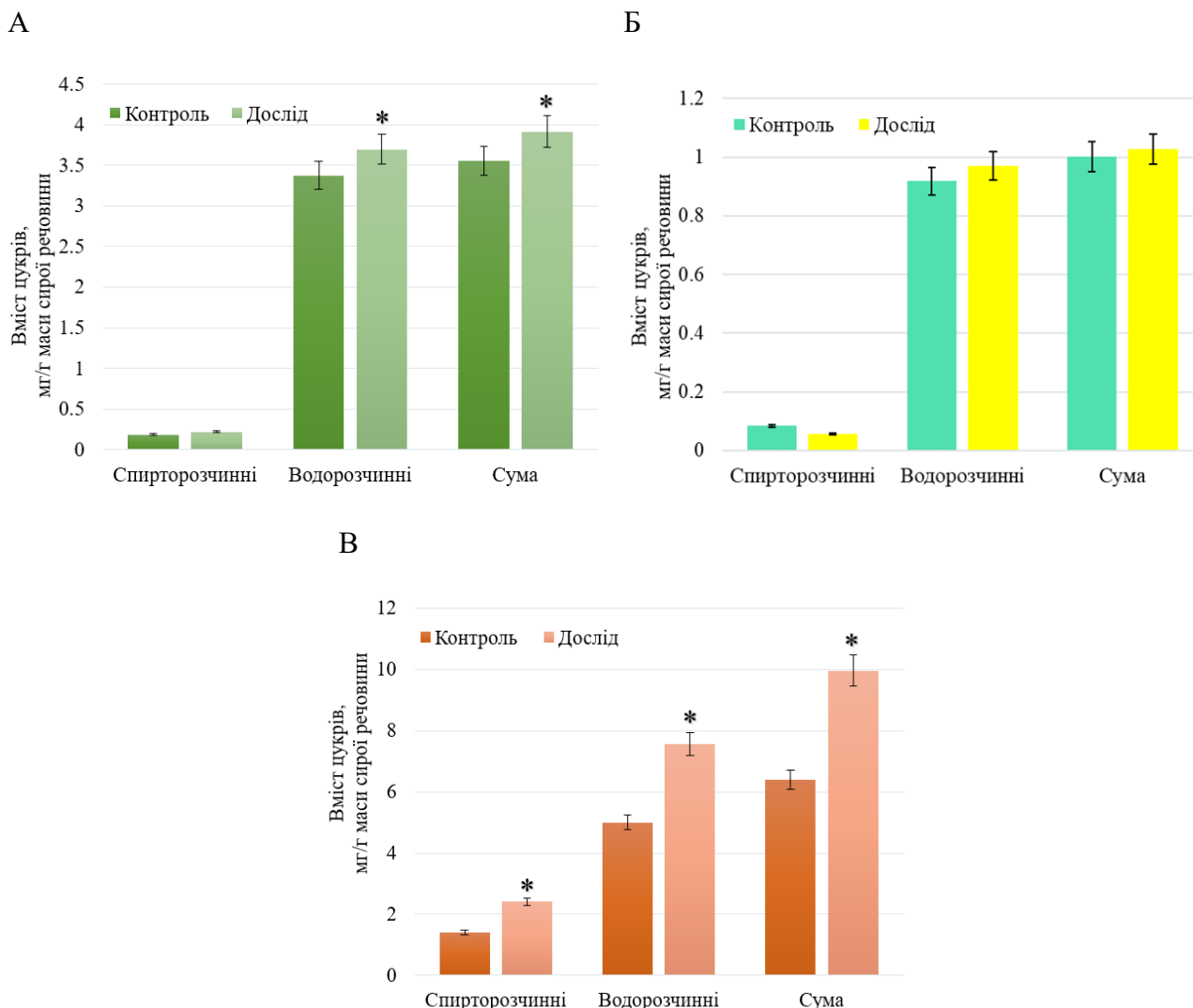


Рис. 3.23. Вміст спирто- та водорозчинних цукрів у органах 120-ти добових *S. viminalis* за росту на субстраті Стебницького хвостосховища (польові умови): А – листки, Б – стебла, В – корені

Отримані результати підтверджуються іншими авторами (Song, Su, 2017; Lu et al., 2021), які вказують на збільшення загальної кількості розчинних цукрів у органах деревних рослин за впливу засолення. Щодо значного накопичення цукрів

у коренях *S. viminalis* за росту на хвостосховищі, це є певною адаптаційною реакцією рослин, яка забезпечує збільшення осмотичного потенціалу клітин. Згідно із літературними даними, збільшення кількості досліджуваних сполук у тканинах рослин за дії стресового фактора відіграє важливу та позитивну роль у адаптації рослин до умов зростання (Rosa et al., 2009; Nemati et al., 2011; Bilek et al., 2020; Fetsiukh et al., 2022).

Підсумки. Встановлено зростання кількості спирто- та водорозчинних цукрів у листках та коренях *S. viminalis*, що є відповіддю рослин на умови зростання на Стебницькому хвостосховищі. Отримані результати можуть свідчити про адаптаційні механізми *S. viminalis*.

Ці результати опубліковані:

1. **Fetsiukh, A.,** Bunio, L., Patsula, O., Timmusk, S., & Terek, O. (2022) Content of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in *Salix viminalis* L. grown on the Stebnyk tailing. *Acta Agrobotanica*, 75, 1-13. <https://doi.org/10.5586/aa.752>

3.13. Вміст проліну в органах *S. viminalis* за умов росту на субстраті хвостосховища м.Стебник

Накопичення вільного проліну у тканинах рослин спричинене загальною реакцією рослин на засолення, ВМ та інші абіотичні стресори (Khoma et al., 2021; Hernández-Canseco et al., 2022). Вільні радикали, які утворюються внаслідок стресового впливу ВМ, можуть бути нейтралізовані проліном (Patel et al., 2021). Дана амінокислота контролює також процес морфогенезу та ріст рослин. Оскільки пролін є основним осморегулятором, він відіграє особливу роль у формуванні захисних бар'єрів на шляху проникнення «стресора», а також виконує шаперонну, антиоксидантну, сигнал-регуляторну та інші функції (Khoma et al., 2021).

За дії абіотичних факторів, які спричиняють осмотичний стрес, створюються умови для найбільш вираженого прояву стресового стану рослин, одночасно негативно впливаючи на вміст води в органах рослин. Тому критерій зміни концентрації проліну враховується для оцінки фізіологічного стану рослинних організмів (Нестеренко, 2019). У процесі адаптації рослин, як до короткочасної, так

і до тривалої дії несприятливих умов середовища, вміст проліну багаторазово зростає. Накопичення вільного проліну є показником інтенсивності стресу і чинником, який визначає можливості відновлення організму (Фецюх та ін., 2020).

Дослідження вмісту проліну на 30 добу росту показало (рис. 3.24), що за дії стресу вміст амінокислоти у стеблах верби був найбільшими, порівняно із іншими органами рослин. Щодо порівняння рослин із контролем, вміст проліну у стеблах та коренях достовірно збільшувався відносно контролю на 22 % та 18 %, а у листках був нижчим на 18 % відносно контролю. Наші дані співпадають із деякими літературними даними, які показують, що за дії стресових факторів пролін має тенденцію додатково накопичуватися у стеблах рослин *Salvadora persica* L., порівняно із коренями (Patel et al., 2021).

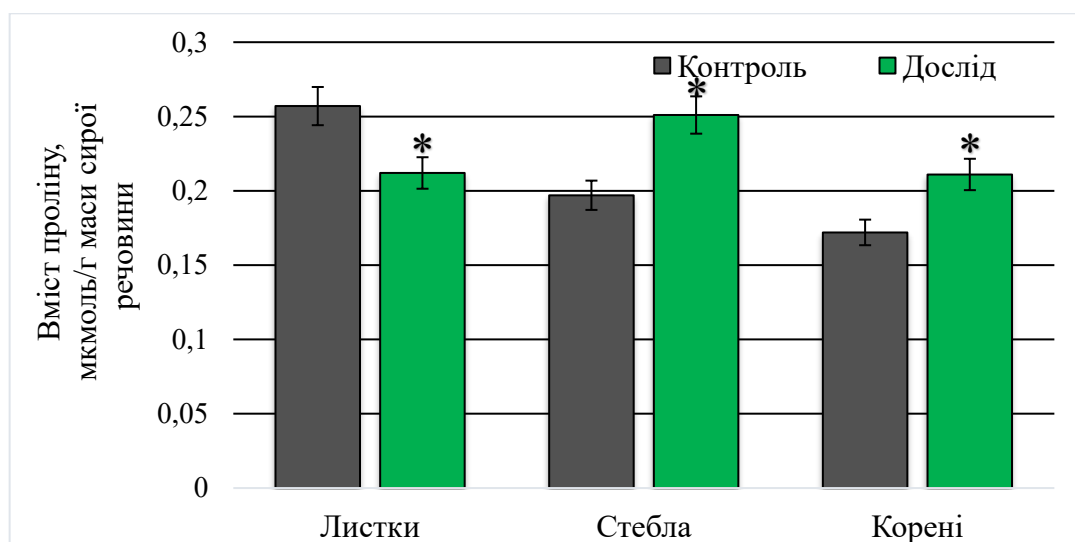


Рис. 3.24. Вміст проліну в органах 30-ти добових *S. viminalis* за росту на субстраті із Стебницького хвостосховища (лабораторні умови)

Аналізуючи вміст проліну в органах *S. viminalis* на 120 добу росту за впливу стресових факторів, було виявлено достовірне накопичення амінокислоти у стеблах дослідних рослин, а саме на 75 % більше відносно контролю (рис. 3.25). Водночас, у коренях рослин помічено зниження показників на 19 %, порівняно із контролем. Це може свідчити про пристосування коренів до забруднення під час адаптаційного процесу, а також є наслідком фізіологічної посухи, пов'язаної із

засоленням, яке, у свою чергу, збільшує накопичення проліну. У листках *S. viminalis* змін не виявлено, показники були у межах похибки.

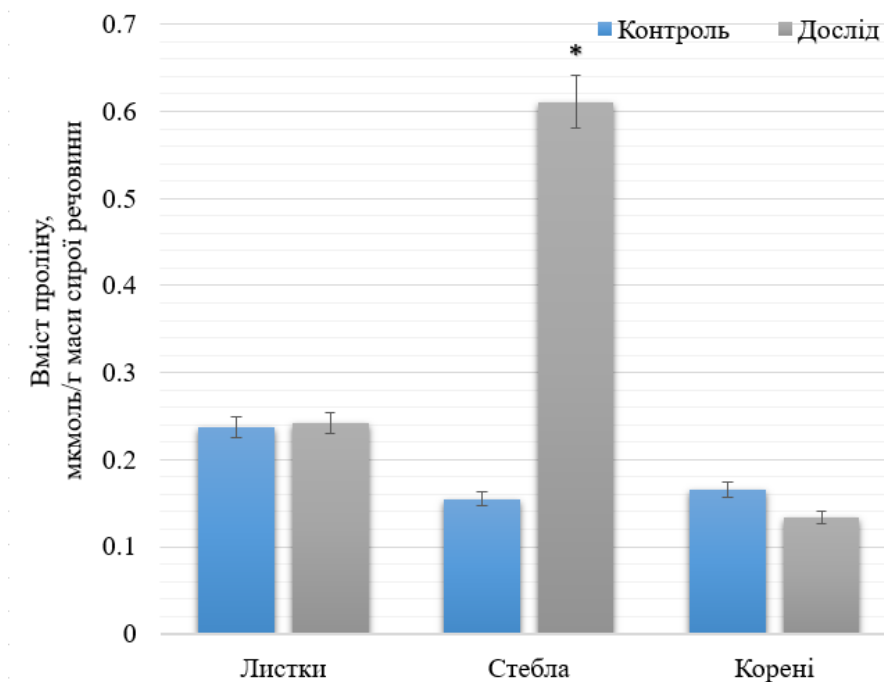


Рис. 3.25. Вміст проліну в органах 120-ти добових *S. viminalis* за росту на субстраті Стебницького хвостосховища (польові умови)

Отримані результати можна пояснити водним стресом, спричиненим засоленням. Відомо, що рівень проліну за однакових стресових умов може відрізнятися в різних видів, а також у сортів одного виду. Згідно із (Sami et al., 2016), накопичення розчинних цукрів збільшує вміст проліну при сольовому стресі. Наші дані із цим свідченням не узгоджуються, оскільки найбільший вміст цукрів виявлено у коренях та листках *S. viminalis*, а не у стеблах рослин.

Вміст проліну в листках *S. viminalis* виявився чудовим показником солестійкості серед різних генотипів (Stolarska, Wrobel, Przybulewska, 2008; Фецюх та ін., 2020). Автори (Watanabe et al., 2000; Kumar, Reddy, Shudhakar, 2003; Misra, Gupta, 2005; Stolarska, Klimek, 2008) повідомляють, що накопичення проліну в листах рослин *S. viminalis* відбувалось в основному через те, що вони росли на засоленому субстраті хвостосховища, оскільки висока розчинність проліну в поєднанні з його дуже низькою здатністю інгібувати ферменти може збільшувати

розчинювальний об'єм клітини, знижуючи цим концентрацію солей в цитозолі. Отримані результати відрізняються, оскільки накопичення амінокислоти у листках верби не виявлено. Однак, високий вміст проліну, виявлений у стеблах та коренях рослин, які зазнали важких і помірних стресових умов, відіграє важливу роль у відновленні рослин після стресу. Зазначимо, що накопичення вільного проліну є показником інтенсивності стресу і фактором, що визначає здатність рослин до відновлення організму (Hernandez-Nistal et al., 2002). Узагальнюючи дані щодо накопичення проліну в органах рослин за росту на субстраті хвостосховища, можна вважати, що стебла *S. viminalis* були піддані найбільшому сольовому навантаженню, оскільки стрес спричинив значне накопичення проліну.

Підсумки. За росту на субстраті Стебницького хвостосховища виявлено адаптаційна реакції *S. viminalis*, а саме накопичення проліну в стеблах та коренях дослідних рослин за росту в лабораторних умовах. Більш тривала дія стресу (120 доба експозиції у польових умовах) індукувала значне збільшення кількості проліну у стеблах дослідних рослин, відносно контролю. Проте у коренях, показники були нижчими від контролю.

Ці результати опубліковані:

1. **Fetsiukh, A.,** Bunio, L., Patsula, O., Timmusk, S., & Terek, O. (2022) Content of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in *Salix viminalis* L. grown on the Stebnyk tailing. *Acta Agrobotanica*, 75, 1-13. <https://doi.org/10.5586/aa.752>

2. **Фецюх, А. Б.,** Буньо, Л. В., Пацула, О. І., & Терек, О. І. (2020). Вплив засолення на склад білків і вміст проліну в органах рослин *Salix viminalis* L. *Фізіологія рослин і генетика*, 52(5), 412—421. <https://doi.org/10.15407/frg2020.05.412>

3. **Фецюх, А.,** Библів, Х., Гузар, О., Буньо, Л., & Пацула, О. (2017). Антиоксидантна система рослин *Salix viminalis* L. за росту на засоленому субстраті хвостосховища м. Стебник. *Молодь і поступ біології. Тези доповідей XIII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів (Львів, Україна, 25-27 квітня 2017 р.)* (С. 293-294). Львів: ЛНУ.

РОЗДІЛ 4

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Проблема адаптації та стійкості рослин є однією з головних у фізіології рослин у зв'язку із антропогенним впливом на загальне забруднення навколишнього середовища (Лихолат, 2013; Гащишин, 2015; Яремчук, 2021). Головним стресовим чинником, що гальмує процеси відновлення рослинності на території Стебницького хвостосховища є засолення субстрату (Кияк, 2017). Однак окрім солей, хвостосховище містить відходи, серед яких ВМ. Відомо, забруднення субстрату спричиняє зниження ростових параметрів та розвитку рослин на фоні осмотичного стресу, токсичності іонів Na^+ та Cl^- , продукції етилену, дисбалансу поживних речовин, продукції АФК та ін. (Gamalero et al., 2009; Панчук, Підлатюк, 2015; Dhiman et al., 2021).

Підвищення концентрації солей у ґрунті впливає в першу чергу на кореневу систему, а через неї і на життєдіяльність всієї рослини, обумовлюючи численні адаптації (Деркач, Романюк, 2016). Складовими негативного впливу солей є високий осмотичний тиск, значна іонна сила і великі значення електропровідності ґрунтового розчину, де містяться кореневі системи (Таран, 2004). Сольовий стрес призводить до порушень фізіолого-біохімічних функцій рослинного організму, які супроводжуються посиленням генерації продуктів вільнорадикального окислення та відбуваються адаптивні зміни у функціонуванні АОС та систем білкового обміну. Адаптація рослин до дії сольового навантаження є визначальною для формування врожаю (Колесніков, Пашенко, 2017). За дії сольового стресу у клітинах коренів розвивається оксидативний вибух, АФК виконують роль тригера каскаду передавання міжклітинних сигналів, в т. ч. за рахунок хвилеподібних змін АФК. Внаслідок чого відбувається пошкодження мембран і перекисне окислення ліпідів, що призводить до накопичення МДА (Деркач, Романюк, 2016; Ahmed et al., 2021).

Вивчення механізмів впливу техногенного забруднення на рослинний організм є одним із актуальних питань. Механізми дії високих концентрацій солей у ґрунті можуть значно відрізнятися залежно від рівня засолення та виду рослин

(Колупаєв, 2001). В умовах Стебницького хвостосховища окрім засолення, рослини зазнають впливу ВМ (Фецюх та ін., 2019). Це свідчить про те, що реакції організму *S. viminalis* слід розглядати як відповідь на полікомпонентний стрес в умовах техногенного забруднення. Схематичне зображення адаптивних реакцій рослин *S. viminalis* в умовах хвостосховища м. Стебник зображено на рис. 4.1.

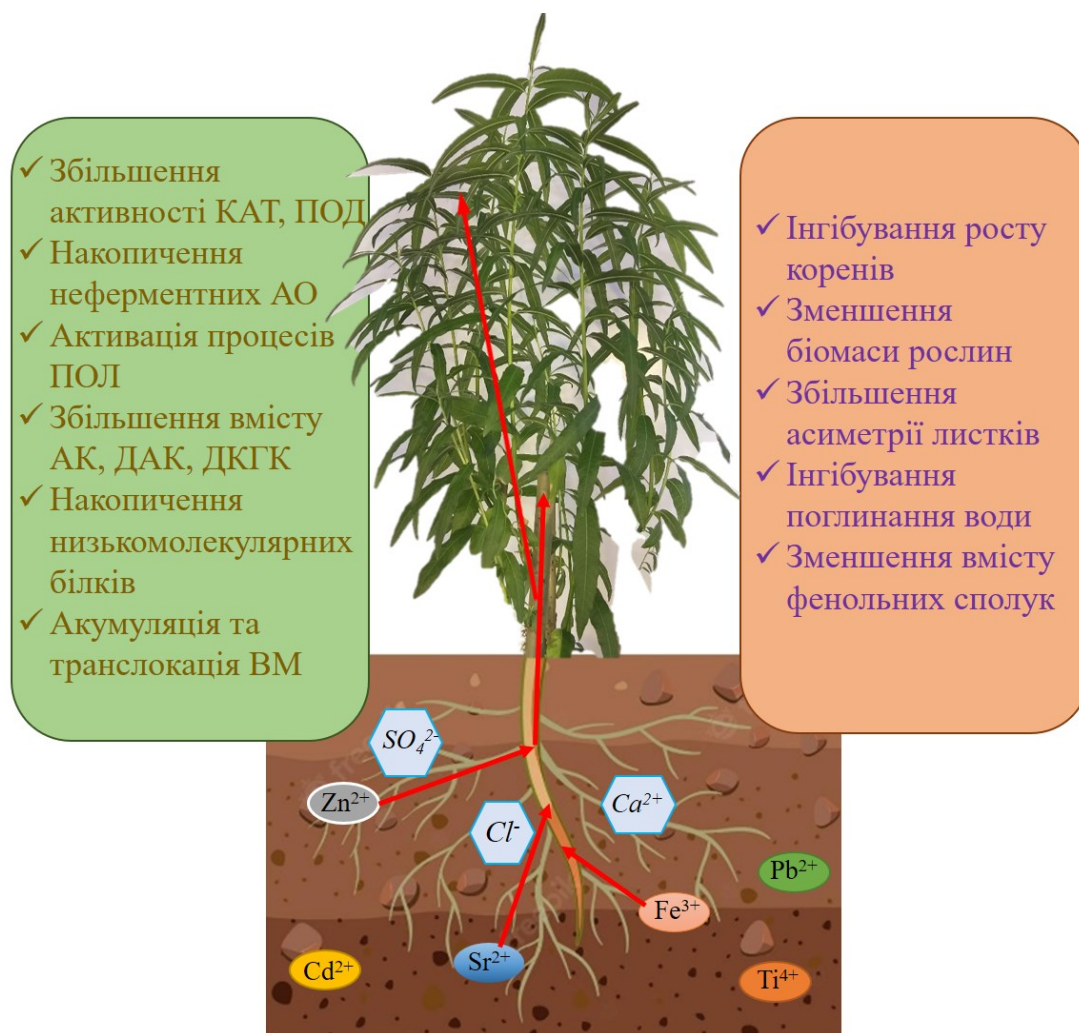


Рис. 4.1. Схематичне зображення полікомпонентного впливу техногенного забруднення на фізіологічні реакції рослин *S. viminalis* в умовах Стебницького хвостосховища

Проведені лабораторні та польові дослідження засвідчили вплив техногенного забруднення на ріст та розвиток *S. viminalis* в умовах Стебницького хвостосховища. Показано зменшення довжини коренів та об'єму кореневої системи у 30-ти добових *S. viminalis* за росту у лабораторних умовах відносно

контрольного варіанту. Галуження коренів було лише до 3 порядку в дослідному варіанті, а у контролі до 4.

Слід відмітити, що у польових умовах корені зазнавали більшого навантаження і відповідно показники були значно меншими у порівнянні із контрольними. Однак галуження коренів було таким же як і у лабораторних умовах. Стебла рослин теж зазнавали впливу техногенного забруднення. Показано зменшення довжини та кількості стебел у 30-ти та 120-ти добових рослин. Також виявлено незначні відмінності у параметрах листової пластинки дослідних та контрольних рослин. Довжина, ширина та площа листової пластинки дослідних рослин була меншою відносно контрольного варіанту. Відмічено значне зменшення кількості листків у 120-ти добових рослин дослідного варіанту за росту у польових умовах Стебницького хвостосховища. Отримані дані узгоджуються із твердженням щодо прямопропорційної залежності між наявністю солей у субстраті та морфометричними параметрами рослин, зокрема висотою рослин, площею листка та кількістю листків на стеблі. Встановлено зниження продуктивності біомаси *S. viminalis* із збільшенням забруднення ґрунту (Lamine, Saunders, 2022).

Для більш детального аналізу впливу техногенного навантаження Стебницького хвостосховища на рослини було визначено ФА листової пластинки *S. viminalis*. Встановлено незначне збільшення асиметрії листових пластинок за впливу техногенного забруднення за такими ознаками як кут між головною і другою від основи жилкою листка та шириною половини листка. Згідно зі шкалою оцінки стабільності розвитку рослин, рослини, які росли на субстраті із ділянок відновленого біогеоценозу росли в умовах переходу до стресових умов росту (від норми до забруднення).

У зв'язку із впливом засолення на рослинний організм, останні втрачають здатність зберігати воду в органах, що призводить до втрати стійкості рослин до стресових чинників. Згідно із отриманими даними, у коренях 30-ти добових *S. viminalis* виявлено зниження вмісту води відносно контролю. У стеблах та листках рослин показники були у межах похибки. Результати польових досліджень

показали зменшення вмісту води у стеблах 120-ти добових рослин, однак у листках рослин виявлено збільшення вмісту води в умовах техногенного забруднення.

Прикріплені до субстрату, рослини, як правило, розробляють складні стратегії адаптації до стресу. Для того, щоб вижити в умовах сильного засолення, рослини посилюють фізіологічні, молекулярні та метаболічні адаптації через взаємодію генів та їх регуляторних мереж, пов'язаних з толерантністю до засолення (Kumari et al., 2021). Тому визначення фізіолого-біохімічних показників, пов'язаних зі стресостійкістю, може бути використано як критерій відбору для покращення адаптації рослин до стресових умов.

Відомо, що накопичення МДА може вказувати на відповідь рослини до дії стресових чинників. Дослідження впливу техногенного засолення Стебницького хвостосховища на вміст продуктів ПОЛ у органах 30-ти добових *S. viminalis* показали накопичення МДА у листках дослідних рослин, порівняно із контрольними рослинами. Це вказує на те, що листки *S. viminalis* зазнавали найбільшого токсичного впливу техногенного забруднення та свідчить про проходження процесів ліпопероксидації в умовах росту на субстраті із Стебницького хвостосховища.

Як уже зазначалось раніше, рослини мають антиоксидантні системи, які захищають їх клітини від негативного впливу АФК. До них належать неферментні та ферментні антиоксиданти (Aazami et al., 2021; Alharby et al., 2021), зокрема аскорбінова кислота, фенольні сполуки, каталаза та пероксидаза. Деякі неферментні антиоксиданти, такі як пролін та цукри, виконують функцію сумісних осмолітів, які захищають клітини рослин буферизуючи клітинний окислювально-відновний потенціал, стабілізуючи мембрани та макромолекули, а також функціонуючи як безпосередні джерела енергії під час відновлення після стресу, що підтримує функціональний баланс клітини (El-Badri et al., 2021). Важливість проліну полягає в його здатності стабілізувати білки, мембрани та субклітинні структури, а також захищати їх від пошкодження шляхом поглинання АФК. Деякі дослідники показали, що в генотипах, стійких до засолення, таких як *Solanum tuberosum* L. та *Cucumis melo* L., є більший вміст проліну (Hnilickova et al., 2021). Дослідження

вмісту проліну, як важливого осмопротектора та антиоксиданта за впливу техногенного забруднення хвостосховища, показало значне накопичення амінокислоти у стеблах дослідних 30-ти та 120-ти добових рослин за лабораторних та польових умов вирощування відповідно. Отримані дані підтверджуються літературними даними (Patel et al., 2021), які свідчать про тенденцію накопичення проліну у пагонах рослин за дії стресових факторів. Згідно із результатами, стебла *S. viminalis* зазнавали найбільшого сольового навантаження в умовах хвостосховища.

Слід відмітити, що в умовах впливу засолення на рослинний організм, зазвичай збільшується вміст розчинних цукрів, зокрема, найбільш толерантні сорти накопичують більше розчинних цукрів (Song, Su, 2017). Це повністю узгоджується з нашими результатами, які показали високий рівень накопичення розчинних цукрів у листках і переважно коренях 30-ти добових *S. viminalis* за умов росту на субстраті хвостосховища. Отже, це може свідчити про адаптаційні процеси в рослинах та захисну реакцію рослин, що забезпечує підвищення осмотичного потенціалу клітин. Крім того, наші результати підтверджуються літературними даними про позитивну роль збільшення кількості цукрів у тканинах рослин за впливу засолення (Nemati et al., 2011; Rosa et al. , 2009; Vilek et al., 2020).

Фенольні сполуки беруть участь у забезпеченні стійкості рослин до несприятливих факторів навколишнього середовища (Кавулич, 2020). Наявність фенолів у органах рослин є свідченням свійкості рослин до стресових факторів (Бешлей та ін., 2015). Однак проведені дослідження показали протележний результат. Виявлено достовірне зниження вмісту фенольних сполук у листках, стеблах та коренях дослідних рослин за умов росту на субстраті Стебницького хвостосховища. Отримані результати можуть бути підтвердженням фізіологічної посухи як наслідку надмірного засолення.

Як вже зазначалось аскорбінова кислота відіграє важливу роль у стійкості рослин до оксидативного стресу такого як засолення чи вплив ВМ (Khan et al., 2011). У роботі проведено дослідження впливу техногенного забруднення хвостосховища на вміст АК, ДАК та ДКГК у органах 30-ти добових *S.viminalis* за

умов росту на засоленому субстраті хвостосховища у лабораторному експерименті. Оскільки відомо, що показником спрямованості фізіологічних процесів може бути вміст ДКГК в органах досліджуваних рослин. Проведені дослідження показали зростання вмісту АК, ДАК та ДКГК у листках та коренях дослідних рослин, у порівнянні із контрольними. Виявлено інтенсивне перетворення АК у стеблах рослин, що, відповідно, підтверджувалось зростанням вмісту ДАК та ДКГК відносно контролю. Згідно із даними дослідників, вплив надмірних концентрацій ВМ на рослини, призводить до збільшення загального вмісту АК (Bielen et al., 2013).

Представниками ферментативної ланки антиоксидантного захисту рослин є ПОД та КАТ, які здійснюють утилізацію надлишку гідроген пероксиду в клітині (Панчук, Підлатюк, 2015). З отриманих даних можна зробити висновок, що ПОД та КАТ залучені у відповіді рослинної клітини на дію полікомпонентного стресу. Активність ферментів у 30-ти добових *S. viminalis* була найвищою у листках, порівняно із контрольними рослинами. У 120-ти добових *S. viminalis*, вирощених у польових умовах хвостосховища м. Стебник, виявлено високий рівень активності КАТ у коренях дослідних рослин, а ПОД – у стеблах. Важливо, що захист за допомогою захисних ферментів ПОД та КАТ від надмірної генерації АФК та перекисного окислення мембранних ліпідів пов'язана із захистом клітинних мембран, що призводить до стійкості до засолення (El-Badri et al., 2021).

Дослідження функцій стресових білків є перспективним для вивчення молекулярних механізмів адаптаційних процесів у рослин (Косаківська, Голов'янка, 2006). Активація і синтез стресових білків належать до первинних неспецифічних процесів, що відбуваються у клітинах рослин за дії стресора (Дубова, 2016). Результати наших досліджень показали відмінність спектрів стресових білків у контрольному та дослідному варіантах. Важливо, що в органах дослідних *S. viminalis* спостерігались більш виразні зміни. Зокрема, у листках дослідних рослин виявлено менш інтенсивний синтез білків із Mr 20-23 кДа відносно контролю. Це може свідчити про вплив техногенного забруднення на інтенсивність їх синтезу, а саме його інгібування, а також процеси деградації.

Важливо відмітити, що у зразках дослідного варіанту виявлено білки із Mr 8 кДа – ймовірно убіквітини, які виконують функцію гідролізації денатурованих білків (Jianbo et al., 2018; Фецюх та ін., 2020). У стеблах дослідних *S. viminalis* виявлено інтенсивніший синтез білків із Mr 22 кДа та наявність ранніх індукцибельних білків (Mr 17 кДа) відносно контролю. У коренях спостерігався синтез білків із однаковими молекулярними масами, однак за дії стресу їх кількість була більшою. Слід відмітити, що в ході дослідження не виявлено наявності БТШ 60 та 70, індукція яких є однією з універсальних компонентів стрес-реакції до несприятливих умов середовища. Отримані результати можна пов'язати із відсутністю чи дуже низьким рівнем синтезу БТШ 70. Однак слід прийняти до уваги, що деякі спеціалізовані ендемічні види, які є вузько адаптованими до стресових умов існування не накопичують дані білки.

Одночасно із появою стресових білків відбувається ослаблення синтезу білків, що утворюються в нормальних умовах. Отримані результати щодо загального вмісту білка в органах *S. viminalis* показали збільшення вмісту білків у стеблах та коренях дослідних рослин відносно контролю. Отже за умов росту на техногенному субстраті хвостосховища спостерігали зміни вмісту білків та їх складу в органах *S. viminalis*, яке проявлялось у активації стресових білків, та свідчить про механізми адаптації досліджуваних рослин до умов Стебницького хвостосховища.

Науковці все більше проявляють інтерес у пошуку рішення щодо проблеми дослідження та розробки дешевих і відповідних технологій для відновлення ґрунтів забруднених ВМ (Oladoye et al., 2022). Відомо, що рослини мають здатність забезпечувати стабілізацію забруднення у ґрунті, зв'язуючи метали із частинками ґрунту, тим самим зменшуючи їх доступність і токсичність; однак у таких випадках забруднення не видаляються з ґрунту.

Верба, яка культивується для виробництва біоенергії, досліджується як можлива фітореMediaційна культура з 1990-х років. Показано зменшення концентрації кадмію, цинку та міді у ґрунті після культивування *S. viminalis* (Landberg, Greger, 2022). Дослідження дисертаційної роботи показали, що

вирощування *S. viminalis* на техногенно забрудненому субстраті хвостосховища м. Стебник впливало на вміст деяких ВМ у субстраті хвостосховища. Виявлено значне зменшення вмісту цинку в дослідному субстраті, порівняно з зразками субстрату до посадки рослин. Найбільша кількість ВМ акумулювалась у стеблах рослин. Особливо активно рослини *S. viminalis* акумулювали молібден, стронцій, хром і цинк. Проведення дослідження БХА виявили, що рослини мають високу здатність накопичувати ВМ. Найбільший показник накопичення був у стеблах і коренях дослідних рослин порівняно із контрольними.

Слід зауважити, що незважаючи на підвищені концентрації ВМ у субстраті хвостосховища, *S. viminalis* проявили високу стійкість до умов вирощування та фітореMediaційні властивості. Дослідники стверджують, що *S. viminalis* є придатною до використання із метою фітореMediaції забрудненого ґрунту на промислових територіях. Однак слід врахувати часові рамки проведення фітореMediaції. Тому при використанні *S. viminalis* для фітореMediaції за рахунок збільшення часу фітореMediaції можна збільшити видалення деяких забруднювачів (Landberg, Greger, 2022).

Використовуючи методику секвенування нового покоління (NGS) 16S рРНК виявлено наявність відносно багатой ендofітної спільноти коренів *S. viminalis*, визначеної як кількість ідентифікованих операційних таксономічних одиниць. Біорізноманіття та багатство бактеріальної ендofітної спільноти коренів *S. viminalis* оцінювали на основі виявленої кількості ОТО, індексів Шеннона та Сімпсона, а також індексу рівномірності. Моделювання показало, що виявлена кількість операційних таксономічних одиниць зменшувалася приблизно вдвічі починаючи із ділянки 1 (Z1) хвостосховища до ділянки 3 (Z3). За впливу нативних ризосферних бактерій *S. europaеа* виявлено значне збільшення кількості ОТО у зразках *S. viminalis*, які росли на субстраті із ділянок 2 (Z2) та 3 (Z3). Біорізноманіття значно зменшилося у досліджуваних зразках у зв'язку із забрудненням хвостосховища з апостеріорною ймовірністю >95%, що вказує на виявлену кількість ОТО та індекс Шеннона. У варіантах дослідження, які зазнали впливу ризосферних бактерій *S.europaеа* виявлено зменшення зниження

показників на основі виявлених операційних таксономічних одиниць, індексів Шеннона та рівномірності. Індекс Сімпсона не зазнав суттєвого впливу за умов додавання ризосфери *S. europaea* у жодному із варіантів дослідження. Це вказує на те, що кількість домінуючих ОТО у досліджуваних зразках не змінюється в залежності від додавання зразків ризосфери рослин салікорнії із Стебницького хвостоховищав, тоді як зниження багатства в основному спричинене низьким вмістом ОТО.

Останнім часом підходи мікробної біотехнології забезпечують найкраще розуміння взаємодії рослина-мікроби і потенційних застосувань рослинних мікробіомів для стимулювання росту та продуктивності рослин. Прагматичне використання RGPB, які продукують ACCD, у сільському господарстві є логічною та розумною технікою сталого сільського господарства (Moon, Ali, 2022). Важливо відмітити, активність ACCD є ефективним маркером для бактерій, асоційованих з рослинами, для сприяння росту рослин шляхом зниження рівня етилену в рослин (Jin et al., 2022). Для скринінгу ACC утилізуючих бактерій було використано ПЛР-планшетний нінгідринний метод, який розширює рентабельність реакції з нінгідрином та полегшує виявлення досліджуваних бактерій. Встановлено зменшення концентрації ACC у зразках коренів *S. viminalis* за сумісного впливу нативних ризосферних бактерій *S. europaea* та техногенного забруднення хвостосховища, що свідчить про наявність більшої кількості бактерій-поглиначів у досліджуваних зразках.

Отже, результати дисертаційної роботи щодо фізіологічних аспектів стійкості *S. viminalis* в умовах хвостосховища м. Стебник свідчать про активацію захисних та адаптаційних механізмів у органах дослідних рослин, що проявляється у накопиченні неферментних та активності ферментних антиоксидантів. Поряд із тим висвітлено позитивний вплив росту рослин на зменшення вмісту ВМ у субстраті хвостосховища та їх транслокацію у органах рослин, що свідчить про позитивний ефект фіторемедіації за використання *S. viminalis*. Показано наявність галофільних ендofітних бактерій у коренях *S. viminalis* за росту на субстраті хвостосховища з найбільш забруднених ділянок. Представники виявлених родів

володіють широким спектром адапційних можливостей до засолення та ВМ. Тому важливим та необхідним є подальше всебічне дослідження та аналіз взаємодії рослина-мікробіом в умовах техногенного забруднення для покращення фітореMediaційних властивостей *S. viminalis* та їх адапційних механізмів за впливу стресу.

ВИСНОВКИ

Дисертаційна робота доповнює фундаментальні знання про фізіологічні механізми стійкості енергетичних рослин, зокрема верби прутовидної (*Salix viminalis* L.), за умов росту на техногенно забрудненому субстраті на прикладі хвостосховища м. Стебник. Відповідно до поставленої мети, у роботі оцінено характер впливу техногенного забруднення на морфометричні та фізіологічні показники рослин *S. viminalis*, а також вивчено складу угруповань ендofітних бактерій коренів рослин в умовах Стебницького хвостосховища.

1. Показано зниження ростових параметрів рослин за росту на техногенно забрудненому субстраті. У лабораторних умовах (30 днів росту) виявлено зниження довжини стебел *S. viminalis* на 24 % відносно контролю, у польових умовах (120 днів росту) – на 57 %. Виявлено асиметрію листкових пластинок *S. viminalis* за росту на ділянках відновленого біогеоценозу.

2. Встановлено, що ріст *S. viminalis* впливав на зниження вмісту важких металів у субстраті хвостосховища. Виявлено закономірність підвищення концентрації важких металів у органах рослин із збільшенням їх концентрації у субстраті. Елементами біологічного накопичення в органах рослин верби прутовидної за росту на субстраті Стебницького хвостосховища є хром, стронцій, молібден та мідь – у листках, стеблах та коренях, станум, свинець та цинк – у листках та стеблах, цирконій – у листках та коренях, нікель – у стеблах та коренях, а також кадмій – у стеблах рослин.

3. Вперше ідентифіковано бактеріальні спільноти коренів *S. viminalis* за росту на субстраті із трьох ділянок Стебницького хвостосховища та сумісного впливу ризосферних бактерій *S. europaea*. У зразках *S. viminalis*, які росли на субстраті із найбільш забруднених ділянок хвостосховища виявлено наявність бактерій родів *Marinobacterium*, *Idiomarina*, *Marinamicrobium* та *Halomonas*.

4. Показано, що умови техногенного забруднення сприяють зміні білкового спектру в органах *S. viminalis*, а саме виявлено низькомолекулярні стресові білки із Mr 8-30 кДа. За контрольних та стресових умов, білки були ідентичними, однак у органах дослідних рослин зміни білків більш суттєвіші.

5. Техногенне забруднення хвостосховища індукувало достовірне підвищення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів (малонового диальдегіду) у листках 30-ти добових *S. viminalis* відносно контролю на 21,4 %.

6. Встановлено, що умови техногенно забрудненого субстрату хвостосховища мають вплив на вміст неферментних антиоксидантів (аскорбінової кислоти, фенольних сполук, цукрів та проліну) у органах *S. viminalis*. Показано зниження вмісту аскорбінової кислоти у стеблах 30-ти добових рослин на 21,1 % відносно контролю. Однак у листках та стеблах *S. viminalis* її вміст є більшим відносно контрольних рослин на 7,7 % та 9,0 % відповідно. Виявлено достовірне зниження вмісту фенольних сполук у листках (на 22,6 %), стеблах (на 42 %) та коренях (на 27,8 %) у 30-ти добових *S. viminalis* за дії стресу порівняно із контролем. Показано накопичення проліну у стеблах 30-ти добових рослин, на 22 % відносно контролю за лабораторних умов вирощування. У польових умовах на 120 добу росту верби прутувидної виявлено накопичення проліну у стеблах (на 75 %) та суми розчинних цукрів у листках та коренях (на 7,7 % та 35,7 % відповідно) щодо контролю.

7. Показано значне підвищення активності антиоксидантних ферментів (каталази та пероксидази) у листках (на 80 % та 61 % відповідно) та стеблах (на 43 % та на 70 % відповідно) 30-ти добових *S. viminalis* за лабораторних умов росту. На 120-ту добу росту рослин у польових умовах виявлено підвищення активності пероксидази та каталази у стеблах (на 28 %) та коренях (на 63 %) відповідно щодо контролю.

Отже, рослини *S. viminalis* виявляють адаптивні реакції на фізіологічному рівні за умов росту на техногенно забрудненому субстраті Стебницького хвостосховища. Це проявляється у чутливості антиоксидантної та білкової систем *S. viminalis*. Збільшення вмісту аскорбінової кислоти, проліну, розчинних цукрів та активності каталази і пероксидази в органах *S. viminalis* вказує на усунення наслідків негативного впливу техногенного засолення. Зниження вмісту фенольних сполук у органах дослідних рослин може бути наслідком дефіциту вологи, який виникає через засолення субстрату. При цьому рослини *S. viminalis* накопичують

важкі метали, що свідчить про можливість використання їх із метою фітореMediaції. Встановлено наявність екстремофільних ендofітних бактерій у коренях верби прутovidної, які відіграють важливу роль у стійкості рослин до важких металів та засолення.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Авессаламов, И. А. (1987). *Геохимические показатели при изучении ландшафтов*. Учебно-методическое пособие. МГУ.
2. Александрова, Э. А., Гайдукова, Н. Г., Кошеленко, Н. А., & Ткаченко, З. Н. (2001). *Тяжелые металлы в почвах и растениях и их аналитический контроль*. Краснодар: КГАУ.
3. Бакун, В., Пацула, О., & Терек, О. (2011). Інтенсивність перекисного окиснення ліпідів у рослин соняшнику і ріпаку за дії трептолему в умовах токсичного впливу іонів цинку та міді. *Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.*, 55, 194-200.
4. Барабаш, О. В. (2019). Оцінка рівня екологічної безпеки урбоекосистем за станом атмосферного повітря. *Екологічна безпека та природокористування*, 31(3), 57-63.
5. Барабаш, О. В., Лозова, Т. М., & Козлова, Т. А. (2018). Оцінка інтенсивності антропогенного впливу за рівнем флуктуаційної асиметрії морфологічних структур. *Біологія та екологія*, 4(1), 66-72.
6. Белчгазі, В. Й. (2002). Сортові особливості динаміки аскорбінової кислоти і глутатіону в органах винограду. *Наук. вісню Ужгород. ун-ту. Сер. біол.*, 11, 66–68.
7. Бешлей, С., Соханьчак, Р., Лобачевська, О., Карпинець, Л. (2015). Вміст фенолів і активність поліфенолоксидази в гаметофіті мохів *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. та *Bryum argenteum* Hedw. за умов росту на відвалі вугільної шахти “Надія”. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (69), 256-264.
8. Білоніжка, П., Дяків, В. (2009). Хімічний та мінеральний склад відходів збагачення калійних руд Стебницького родовища та їхній вплив на довкілля. *Вісник Львів. Університету. Серія геол.*, 23, 162–174.
9. Більчук, В., & Россихіна-Галича, Г. (2014). Зміни активності ферментів антиоксидантного захисту в вегетативних органах *Populus nigra* L. в умовах аеротехногенного забруднення середовища. *Вісник Львівського університету. Сер.: Біологічна*, (64), 293-299.

10. Блажівський, К. І., Максимович, І. Є., Світлицька, М. О. (2011). Висолювання сульфатних солей із хлорид-сульфатних розчинів етанолом. *Вісник Нац. ун-ту "Львівська політехніка". Хімія, технологія речовин та їх застосування*, 700, 30–33.
11. Блінова, Н. К. (2009). Екологічна стандартизація і сертифікація: Навч. посібник./Мохонько ВІ, Саломахіна СО Суворін ОВ Луганськ: Вид-во СНУ ім. В Даля, 2009. 128 с.
12. Богданов, Н. А., Чуйков, Ю. С., & Рыбкин, В. С. (2013). Метод оценки состояния земель по индексу загрязнения почв. *Астраханский вестник экологического образования*, (1 (23)), 102-112.
13. Борщук, Д. І., & Вольвач, О. В. (2022). Вирощування біоенергетичних культур в Україні як передумова покращення стану ґрунтів (на прикладі досвіду компанії по вирощуванню енергетичної верби SALIX ENERGY). *Матеріали студентської наукової конференції Одеського державного екологічного університету* (11-18 травня 2022 р.) (С. 349-350). Одеса: Одеський державний екологічний університет.
14. Вальков, В. Ф., Казеев, К. Ш., Колесников, С. И. (2004). *Экология почв. Ч. 3. Загрязнение почв*. УПЛ РГУ, 54.
15. Величко, О. І. (2012). Фракційний склад білків у органах рослин сої, адаптованих до умов нафтозабрудненого ґрунту. *Науковий вісник НЛТУ України*, 22(4), 91-96.
16. Величко, О. І. (2014). Роль білків у адаптації рослин конюшини лучної, інокульованої *Rhizobium leguminosarum* bv. Trifolii, до умов нафтозабрудненого ґрунту. *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Сер. Біологія*, 3 (60), 58–61.
17. Войтюк, Ю. Ю. (2016). Поглинання важких металів із ґрунту рослинністю зони техногенезу. *Journal of Geology, Geography and Geoecology*, 24(2), 11-17.
18. Войцехівська, О. В., Капустян, А. В., & Косик, О. І. (2010). *Фізіологія рослин: практикум*. Луцьк: Терен, 420.

19. Волощинська, С. С. (2008). Біоіндикація стану забруднення довкілля важкими металами (на прикладі автомагістралі «Київ–Варшава»). *Biosystems Diversity*, 16(2), 24-28.
20. Габриленко, В. Ф., Ладыгіна, М. Е., & Хандобина, Л. М. (1975). *Большой практикум по физиологии растений: Фотосинтез. Дыхание: Учебное пособие*. Высшая школа.
21. Гащишин, В. Р. (2015). Адаптивні реакції рослин ріпаку (*Brassica napus* L.) та соняшнику (*Helianthus annuus* L.) за дії важких металів цинку і міді та трептолеми : автореф. дис. ... канд. біолог. наук : [спец.] 03.00.12 "Фізіологія рослин". Ін-т фізіології рослин і генетики, 20.
22. Городній, М. М., Бикін, А. В., Нагаєвська, Л. М. (2003). *Агрохімія: підручник*. Альфа, 786 .
23. Грицаєнко, З. М., Грицаєнко, А. О., & Карпенко, В. П. (2003). *Методи біологічних та агрохімічних досліджень рослин і ґрунтів*. ЗАТ Нічлава, 320.
24. Гунчак, М. В., Никифорак, В. А. (2014). Особливості вирощування верби енергетичної для виробництва альтернативних видів палива.
25. Деркач, І. В., & Романюк, Н. Д. (2015). Вплив NaCl засолення на ріст та пігментну систему *Fagopyrum esculentum* Moench. та *Vicia faba* L. *Вісник Харківського національного університету імені ВН Каразіна. Серія: Біологія*, (25), 308-319.
26. Деркач, І. В., & Романюк, Н. Д. (2016). Вплив засолення ґрунту на рослинні організми. *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія : Біологія*, 3-4, 91-106.
27. Дубова, О. В. (2016). *Генетичні основи стійкості*. Конспект лекцій для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавра напряму підготовки «Біологія», 66.
28. Дяків, В. О., Павлишин, В. І., & Білик, Н. Т. (2013). Мінералогічні протектори дезінтеграції соляно-глинистих порід в процесі мокрої консервації гірничих виробок калійних родовищ Передкарпаття. *Мінералогічний журнал*, (35, № 1), 38-49.

29. Жук, О. І. (2011). Формування адаптивної відповіді рослин на дефіцит води. *Физиология и биохимия культурных растений*, 43(1), 26-37.
30. Іванов, Є., Ковальчук, І., Андрейчук, Ю., Ключник, В., & Тиханович Є. (2018). Функціонування і розвиток постмайнінгових геосистем західного регіону України. Міжнародна науково-технічна конференція молодих вчених «Geoterrace-2018», 13-15 грудня 2018, Львів, Україна, 65-70.
31. Ісаєнков, С. В. (2012). Фізіологічні та молекулярні аспекти сольового стресу рослин. *Цитологія и генетика*, 46(5), 50-71.
32. Кавулич, Я. З. (2020). Вміст фенольних сполук у рослин пшениці (*Triticum aestivum* L.) та гречки (*Fagopyrum esculentum* Moench.) за дії саліцилової кислоти та кадмію хлориду (*doctoral dissertation*, Львівський Національний Університет імені Івана Франка).
33. Казначєєва, М. С. (2010). Дослідження стану прооксидантно-антиоксидантної системи капусти білокачанної різних за рівнем стійкості сортів. *Природничий альманах. Серія: Біологічні науки*, (14), 102-109.
34. Кирпа-Несміян, Т. М. (2016). Фізіолого-біохімічна характеристика рослин *Nicotiana tabacum*, що несуть гени $\Delta 9$ та $\Delta 12$ -ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій вирощених *in vivo* в умовах заморозків. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 19, 139-142.
35. Кияк, Н. (2014). Сезонні зміни вмісту компонентів глутатіоно-аскорбатного циклу в мохах на території відвалу видобутку сірки. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (67), 189-197.
36. Кияк, Н. Я., & Оксенюк, У. А. (2016). Співвідношення компонентів аскорбатного циклу у пагонах мохів як біомаркер фізіологічного стану організму в несприятливих екологічних умовах. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції, 71-75.
37. Кияк, Н., & Буньо, Л. (2017). Механізми пристосування бріофітів до сольового стресу на території хвостосховища Стебницького гірничо-хімічного підприємства Полімінерал. ISSN 0206-5657 *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (76), 87-96.

38. Клос, В. Р., Бірке, М., Жовинський, Е. Я., Акінфієв, Г. О., Амаїюкелі, Ю. А., & Кламенс, Р. (2012). Регіональні геохімічні дослідження ґрунтів України в рамках міжнародного проекту з геохімічного картування сільськогосподарських та пасовищних земель Європи (GEMAS). *Пошукова та екологічна геохімія*, (1), 51-66.
39. Кокорев, О. І., Шкляревський, М. А., Швиденко, М. В., & Колупаєв, Ю. Є. (2020). Стрес-протекторний вплив путресцину і сперміну на рослини пшениці за ґрунтової посухи. *Вісник Харківського Національного Аграрного Університету. Серія біологія*, 3(51), 58-70. <https://doi.org/10.35550/vbio2020.03.058>
40. Колесніков, М. О., & Пашенко, Ю. П. (2017). Дія кремнієво-калійного добрива *agroglass stimol* на проростання пшениці озимої в умовах сольового стресу. *Збірник наукових праць Уманського національного університету садівництва*, (90 (1)), 135-141.
41. Колупаєв, Ю. Є., Вайнер, А. А., & Ястреб, Т. О. (2014). Пролин: физиологические функции и регуляция содержания в растениях в стрессовых условиях. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія: Біологія*, (2), 6-22.
42. Колупаєв, Ю. Є., Карпец, Ю. В., & Обозний, А. І. (2011). Антиоксидантная система растений: участие в клеточной сигнализации и адаптации к действию стрессоров. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія: Біологія*, (1), 6-34.
43. Колупаєв, Ю. Є. (2001). *Стресові реакції рослин (молекулярно-клітинний рівень)*. Харків: ХДУ.
44. Колупаєв, Ю. Є., & Обозний, О. І. (2013). Активні форми кисню і антиоксидантна система при перехресній адаптації рослин до дії абіотичних стресорів. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія: Біологія* (3), 18–31.
45. Корнеєнко, С. В. (2016). *Дослідження складу, фізичних і фізико-хімічних властивостей ґрунтів*: навчальний посібник. К., 217 с

46. Коровякова, Т. О., & Коровякова, Т. А. (2013). Флуктуаційна асиметрія листків деяких видів лучного різнотрав'я на пасовищах. *Укр. ботан. журн.*, 70(3), 330-335.
47. Королюк, М. А., Иванова, Л. К., Майорова, И. Г., & Токарева, В. А. (1988). Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*, (4), 44-47.
48. Коротка, І. О., Короткая, И. А., & Шерстюк, Ю. (2021). Система антиоксидантного захисту васильків справжніх залежно від компонентного складу субстрату.
49. Косаківська, І. В., & Голов'янко, І. В. (2006). Адаптація рослин: біосинтез та функції стресових білків. *Український фітоценологічний збірник*, (24), 3-17.
50. Куриленко, І. М., & Палладіна, Т. О. (2005). Вплив засолення та синтетичних регуляторів росту на активність каталази та пероксидази в проростках кукурудзи. *Український біохімічний журнал*, 77(6), 86 – 93.
51. Куриляк, М. (2016). Історія розробки Передкарпатських соленосних рудників.
52. Лаврик, М. О., & Павличенко, А. В. (2014). Використання рослин-фіторемедіантів для відновлення засолених ґрунтів в районах розташування ставків-відстійників шахтних вод. *Геотехнічна механіка*, 115, 209-218.
53. Лихолат, Ю. В. (2013). Конспект лекцій із курсу «Фізіологія адаптації рослин». Д.: РВВ ДНУ.
54. Макар О.О., Романюк Н.Д. (2022). Бактеріальні ендосфіти пшениці та їхня роль у покращенні мікроелементного складу зерна. *Біологічні студії/Studia Biologica*, 16(3), 101-128.
55. Маменко, Т. П., Ярошенко, О. А., & Троценко, В. А. (2016). Інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів та активність антиоксидантних ферментів у листках озимої пшениці за дії ґрунтової посухи. *Молодий вчений*, (7), 173-176.

56. Мусієнко, М. М., Паршикова, Т. В., & Славний, П. С. (2001). Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин. *К.: Фітосоціоцентр, 200*, 16.
57. Назаренко, І. І., Польчина, С. М., & Нікорич, В. А. (2003). *Грунтознавство*. Чернівці: Книги-XXI.
58. Нестеренко, О. Г. (2019). Модифікація радіобіологічних реакцій рослин гороху (*Pisum sativum L.*) абіотичними стресорами (*Doctoral dissertation*, Київ, 2019).
59. Окунцов, М. М., Боровик, З. И., Гребенников, А. С. и др. (1974). *Специальный практикум по биохимии и физиологии растений*. Томск: Изд-во Томского ун-та.
60. Павлинова, О. А. (ред.). (1971). *Биохимические методы в физиологии растений*. Москва: Наука.
61. Павлюк, Ю. Е., Ференц, Н. О., & Мелько, В. М. (2013). Техногенна небезпека гірничих виробок калійних мінеральних добрив. *Вісник Львівського державного університету безпеки життєдіяльності*, (7), 199-202.
62. Панчук, І. І., & Підлатюк, М. М. (2015). Активність пероксидази у нокаутної КО-Cat2 лінії *Arabidopsis thaliana* за дії сольового стресу. *Редакційна колегія: Касьяненко ГЯ, к. х. н., доцент; Литвиненко ЮІ, к. б. н., доцент (відп., 84*.
63. Пацула, О., Фецюх, А., & Буньо, Л. (2018). Використання *Salix viminalis L.* для фіторемедіації ґрунтів, забруднених важкими металами. *Екологічні науки*, 1(20), 101-106.
64. Перекупко, Т. В. (1998). Інтенсифікація процесів комплексної переробки полімінеральних калійних руд Прикарпаття застосуванням органічних реагентів і розчинників. Дис...д-ра техн. наук: 05.17.01. Львів, 306 с.
65. Притула, Н. (2021). Доцільність використання соняшнику (*Helianthus annuus L.*) як фітоіндикатора антропогенного навантаження середовища. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (84), 68-75. <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2021.84.06>

66. Ревега, О. (2006). Індукція хромосомних аберацій рідкими відходами виробництва стебницького ДГХП “Полімінерал” у Allium-тесті. *Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.*–2006.–*Вип, 41*, 46-53.
67. Романчук, Л. Д., Василюк, Т. П., & Можарівська, І. А. (2013). Ріст і розвиток сорго багаторічного в умовах Полісся України. *Вісник Житомирського національного агроекологічного університету*, (2 (1)), 3-8.
68. Сабат, І., Цайтлер, М. (2014). Відновлення фітоценозів на хвостосховищах Стебницького. ДГХП “Полімінерал”. *Acta Carpatica*, 12, 65–71.
69. Саєт, Ю. Е. (1990). *Геохимия окружающей среды*. М.: Недра.
70. Самохвалова, В. Л., Фатєєва, А. І., Зуза, С. Г., Погромська, Я. А., Зуза, В. О., Панасенко, Є. В., & Горпинченко, П. Ю. (2015). Фіторемедіація техногенно забруднених ґрунтів. *Агроекологічний журнал*, (1), 92-100.
71. Сашук, Л. З. (2006). Особливості формування рослинного покриву на територіях гірничих розробок міст Борислава і Стебника. *Проблеми екології та екологічної освіти: Матеріали V міжнародної науково-практичної конференції.– Кривий Ріг: Видавничий дім*, 119-121.
72. Сергєєва, Л., & Броннікова, Л. (2016). Пролін-опосередковані реакції тютюну на дію засолення. *Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки. Біологічні науки*, (12), 15-19.
73. Снакин, В. В. (1992). Химическое загрязнение почв и возможность его нормирования. *Теоретические основы охраны почв. М.: Институт охраны природы*, 17-21.
74. Снітинський, В., & Зеліско, О. (2013). Моніторинг якості поверхневих і підземних вод території Стебницького родовища калійних руд Дрогобицького району Львівської області. *Вісник Львівського національного аграрного університету. Агрономія*, (17 (1)), 13-17.
75. Таран, Н. Ю., Оканенко, О. А., Бацманова, Л. М., & Мусієнко, М. М. (2004). Вторинний оксидний стрес як елемент загальної адаптивної відповіді рослин на дію несприятливих факторів довкілля. *Физиология и биохимия культурных растений*, 36(1), 3-14.

76. Терек О. І., Цвілинюк О. М., Микієвич І. М., Романюк Н. Д. *Фізіологія рослин*. Методичні вказівки до лабораторних робіт з малого практикуму для студентів біологічного факультету / Львів, Піраміда. 2005. 160 с.
77. Терек, О. І., Величко, О. І., & Джура, Н. М. (2009). Фізіологічні аспекти адаптації рослин до нафтозабрудненого ґрунту. *Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку: зб. наук. пр. Київ: Логос, 1*, 217-225.
78. Терек, О. І., Пацула, О. І. (2011). *Ріст і розвиток рослин*: навч. посібник. Львів: ЛНУ імені Івана Франка.
79. Толстушко, Н. О., Пенкаля, В. Є., Вржещ, М. В., & Толстушко, М. М. (2014). Перспективи вирощування та переваги використання енергетичної верби в Україні. *Сільськогосподарські машини*, (29-30), 105-111.
80. Топчій, Н. М. (2010). Вплив важких металів на фотосинтез. *Физиология и биохимия культурных растений*, 42(2), 95-106.
81. Федотов, О. В. (2016). Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів штамів грибів порядків *Agaricales* і *Polyporales*. *Biosystems Diversity*, 24(2), 317-323.
82. Фецюх, А. Б., Буньо, Л. В., Пацула, О. І., & Терек, О. І. (2020). Вплив засолення на склад білків і вміст проліну в органах рослин *Salix viminalis* L. *Фізіологія рослин і генетика*, 52(5), 412—421. <https://doi.org/10.15407/frg2020.05.412>
83. Фецюх, А., Буньо, Л., Пацула, О., & Терек, О. (2019) Накопичення важких металів рослинами *S. viminalis* за росту на субстраті з Стебницького хвостосховища. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (81), 96-110. DOI: <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2019.81.11>
84. Фецюх, А., Буньо, Л., Пацула, О., & Терек, О. (2018). Екологічні проблеми, спричинені розробкою Прикарпатського родовища полімінеральних калійних руд у м. Стебник. *Біологічні студії*, (12, № 2), 157-166. <http://dx.doi.org/10.30970/sbi.1202.537>

85. Халін, С. Ф., & Пиріжок, В. С. (2020). Стійкість рослин до кадмію. Актуальні питання охорони праці у контексті сталого розвитку та європейської інтеграції України, 200.
86. Шевчук, В., & Мудрак, Г. (2021). Оцінка інтенсивності забруднення важкими металами ґрунтів задіяних під вирощування овочевих культур. *InterConf.*, 676-682.
87. Шклярєвський, М. А., Ястреб, Т. О., Швиденко, М. В., Лугова, Г. А., Карпець, Ю. В., & Колупаєв, Ю. Є. (2019). Вплив седаксану на стан антиоксидантної та осмопротекторної систем проростків кукурудзи за умов сольового стресу. *Фізіологія рослин і генетика*, 51(№5), 425-435. <https://doi.org/10.15407/frg2019.05.425>
88. Яворский, В. Т., Блаживский, К. И., Перекупко, Т. В., Костив, И. Ю., & Максимович, И. Е. (2009). Кислотная переработка труднорастворимых калийных руд с применением органических растворителей. *Журнал прикладной химии*, 82(5), 715-719.
89. Яворский, В. Т., Перекупко, Т. В., Блаживский, К. И., Максимович, И. Е., & Перекупко, А. В. (2012). Переработка растворов-хвостохранилищ калийных производств Прикарпатья в кондиционные продукты. *Энерготехнологии и ресурсосбережение*, (5), 71-75.
90. Яворський, В. Т., Блажівський, К. І., & Максимович, І. Є. (2013). Політермічна кристалізація солей із розчину Калуського хвостосховища. *Вісник Національного університету Львівська політехніка. Хімія, технологія речовин та їх застосування*, (761), 44-47.
91. Яворський, В. Т., Блажівський, К. І., Максимович, І. Є., & Гарват, У. І. (2012). Висолювання сульфатних солей із хлорид-сульфатних розчинів ізопропіловим спиртом. *Хімія, технологія речовин та їх застосування*, 726, 12–14.
92. Яковишина, Т. Ф. (2016). Нормування поелементного та поліелементного забруднення ґрунту важкими металами за допомогою ГДК. *Строительство. Материаловедение. Машиностроение. Серия: Создание*

высокотехнологических экокомплексов в Украине на основе концепции сбалансированного (устойчивого) развития, (87), 152-158.

93. Яремчук, Л. О. (2021). Оцінка адаптивних властивостей рослин до абіотичних стресових чинників.

94. Ястреб, Т.О., Шкляревський, М.А., Колупаєв, Ю.Є., Карпец, Ю.В., Дяченко, А. І. (2021). *Arabidopsis thaliana* у водній культурі як модельний об'єкт для досліджень фізіологічних ефектів сигнальних посередників і стресових фітогормонів. *Вісник харківського національного аграрного університету. Серія біологія*, 1 (52), 89-97. <https://doi.org/10.35550/vbio2021.01.089>

95. Aamir, M., Samal, S., Rai, A., Kashyap, S. P., Singh, S. K., Ahmed, M., & Upadhyay, R. S. (2021). Plant microbiome: diversity, distribution, and functional relevance in crop improvement and sustainable agriculture. In *Microbiome Stimulants for Crops* (pp. 417-436). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822122-8.00001-7>

96. Aazami, M. A., Rasouli, F., & Panahi Tajaragh, R. (2021). Influence of salinity stress on morphological, nutritional and physiological attributes in different cultivars of *Prunus amygdalus* L. *Journal of Plant Nutrition*, 44(12), 1758-1769. <https://doi.org/10.1080/01904167.2021.1881549>

97. Abdelaal, M., Mashaly, I. A., Srour, D. S., Dakhil, M. A., El-Liethy, M. A., El-Keblawy, A., El-Barougy, R.F., Halmy, M.W.A. & El-Sherbeny, G. A. (2021). Phytoremediation perspectives of seven aquatic macrophytes for removal of heavy metals from polluted drains in the Nile Delta of Egypt. *Biology*, 10(6), 560. <https://doi.org/10.3390/biology10060560>

98. Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten D, Peng J, & Harberd, N. P. (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*, 311(5757), 91-94. doi: 10.1126/science.1118642. PMID: 16400150.

99. Ahmed, K. B. M., Singh, S., Sadiq, Y., Khan, M. M. A., Uddin, M., Naeem, M., & Aftab, T. (2021). Photosynthetic and cellular responses in plants under saline

conditions. In *Frontiers in Plant-Soil Interaction* (pp. 293-365). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90943-3.00007-9>

100. Akram, N. A., Shafiq, F., & Ashraf, M. (2017). Ascorbic acid – a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Frontiers in plant science*, 8, 613. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00613>

101. Alencar, N. L. M., Oliveira, A. B., Alvarez-Pizarro, J. C., Marques, E. C., Prisco, J. T., & Gomes-Filho, E. (2021). Differential responses of dwarf cashew clones to salinity are associated to osmotic adjustment mechanisms and enzymatic antioxidative defense. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93, Article e20180534. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120180534>

102. Alharby, H. F., Nahar, K., Al-Zahrani, H. S., Hakeem, K. R., & Hasanuzzaman, M. (2021). Enhancing salt tolerance in soybean by exogenous boron: Intrinsic study of the ascorbate-glutathione and glyoxalase pathways. *Plants*, 10(10), 2085. <https://doi.org/10.3390/plants10102085>

103. Ali, S., & Kim, W. C. (2018). Plant growth promotion under water: decrease of waterlogging-induced ACC and ethylene levels by ACC deaminase-producing bacteria. *Frontiers in microbiology*, 9, 1096. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01096>

104. Ali, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2014). Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 160-167. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.04.003>

105. Amist, N., Bano, C., & Singh, N. B. (2019). Antioxidative machinery for redox homeostasis during abiotic stress. *Molecular plant abiotic stress: Biology and biotechnology*, 65-90. <https://doi.org/10.1002/9781119463665.ch4>

106. Anand, G., Bhattacharjee, A., Shrivastava, V. L., Dubey, S., & Sharma, S. (2021). ACC deaminase positive Enterobacter-mediated mitigation of salinity stress, and plant growth promotion of *Cajanus cajan*: a lab to field study. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(7), 1547-1557. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-01031-0>

107. Appenroth, K. J. (2010). Definition of “heavy metals” and their role in biological systems. In *Soil heavy metals* (pp. 19-29). Springer, Berlin, Heidelberg. DOI 10.1007/978-3-642-02436-8_2
108. Arsenov, D., Zupunski, M., Borisev, M., Nikolic, N., Orlovic, S., Pilipovic, A., & Pajevic, S. (2017). Exogenously applied citric acid enhances antioxidant defense and phytoextraction of cadmium by willows (*Salix* spp.). *Water, Air, & Soil Pollution*, 228(6), Article 221. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3405-6>
109. Arsenov, D., Župunski, M., Borišev, M., Nikolić, N., Pilipovic, A., Orlovic, S., Kebert M. & Pajevic, S. (2020). Citric acid as soil amendment in cadmium removal by *Salix viminalis* L., alterations on biometric attributes and photosynthesis. *International Journal of Phytoremediation*, 22(1), 29-39. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1633999>
110. Asgari Lajayer, B., Khadem Moghadam, N., Maghsoodi, M. R., Ghorbanpour, M., & Kariman, K. (2019). Phytoextraction of heavy metals from contaminated soil, water and atmosphere using ornamental plants: mechanisms and efficiency improvement strategies. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(9), 8468-8484. DOI: 10.1007/s11356-019-04241-y
111. Ashraf, M. A., Rasheed, R., Zafar, S., Iqbal, M., & Saqib, Z. A. (2021). Menadione sodium bisulfite neutralizes chromium phytotoxic effects in okra by regulating cytosolutes, lipid peroxidation, antioxidant system and metal uptake. *International Journal of Phytoremediation*, 23(7), 736-746. <https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1854171>
112. Babeanu, C., & Dodocioiu, A. M. (2018). Antioxidant enzymes activities and proline content in leaves of *Salix* species grown on fly ash dumps. *Annals of the University of Craiova-Agriculture, Montanology, Cadastre Series*, 47(2), 20–24.
113. Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in plant science*, 1473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>

114. Bal, H. B., Das, S., Dangar, T. K., & Adhya, T. K. (2013). ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. *Journal of basic microbiology*, 53(12), 972-984. DOI 10.1002/jobm.201200445
115. Banerjee, A., & Roychoudhury, A. (2021). Role of sugars in mediating abiotic stress tolerance in legumes. In *Abiotic Stress and Legumes* (pp. 93-103). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815355-0.00007-2>
116. Barnawal, D., Bharti, N., Tripathi, A., Pandey, S. S., Chanotiya, C. S., & Kalra, A. (2016). ACC-deaminase-producing endophyte *Brachy bacterium paraconglomeratum* strain SMR20 ameliorates *Chlorophytum* salinity stress via altering phytohormone generation. *Journal of plant growth regulation*, 35(2), 553-564. DOI 10.1007/s00344-015-9560-3
117. Basha, E., O'Neill, H., & Vierling, E. (2012). Small heat shock proteins and α -crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends in biochemical sciences*, 37(3), 106-117. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.11.005>
118. Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1-48. doi:10.18637/jss.v067.i01
119. Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39(1), 205-207.
120. Berg, G., Zachow, C., Müller, H., Philipps, J., & Tilcher, R. (2013). Next-generation bio-products sowing the seeds of success for sustainable agriculture. *Agronomy*, 3(4), 648-656.
121. Bielen, A., Remans, T., Vangronsveld, J., & Cuypers, A. (2013). The influence of metal stress on the availability and redox state of ascorbate, and possible interference with its cellular functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 6382-6413. doi: 10.3390/ijms14036382
122. Bilek, M. A., Soolanayakanahally, R. Y., Guy, R. D., & Mansfield, S. D. (2020). Physiological response of *Populus balsamifera* and *Salix eriocephala* to salinity and hydraulic fracturing wastewater: Potential for phytoremediation applications.

International Journal of Environmental Research and Public Health, 17(20), Article 7641. <https://doi.org/10.3390/ijerph17207641>

123. Biswas, J., Bose, P., Mandal, S., & Paul, A. K. (2018). Reduction of hexavalent chromium by a moderately halophilic bacterium, *Halomonas smyrnensis* KS802 under saline environment. *Environmental Sustainability*, 1(4), 411-423. <https://doi.org/10.1007/s42398-018-00037-x>

124. Bonatelli, M. L., Lacerda-Júnior, G. V., dos Reis Junior, F. B., Fernandes-Júnior, P. I., Melo, I. S., & Quecine, M. C. (2021). Beneficial plant-associated microorganisms from semiarid regions and seasonally dry environments: a review. *Frontiers in Microbiology*, 11, 553223. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.553223>

125. Bürkner, P.-C. (2018). Advanced Bayesian multilevel modeling with the R package brms. *R Journal*, 10(1), 395–411. <https://doi.org/10.32614/RJ-2018-017>

126. Cappelli, S. L., Domeignoz-Horta, L. A., Loaiza, V., & Laine, A. L. (2022). Plant biodiversity promotes sustainable agriculture directly and via belowground effects. *Trends in Plant Science*, 27(7), 674-687 <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.02.003>

127. Cavalcanti, F. R., Oliveira, J. T. A., Martins-Miranda, A. S., Viégas, R. A., & Silveira, J. A. G. (2004). Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. *New Phytologist*, 163(3), 563-571.

128. Chakraborty, K., Singh, A. L., Bhaduri, D., & Sairam, R. K. (2013). Mechanism of salinity stress tolerance in crop plants and recent developments. *Advances in plant physiology*, 14, 466-496.

129. Chen, J. T., Aroca, R., & Romano, D. (2021). Molecular aspects of plant salinity stress and tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4918. <https://doi.org/10.3390/ijms22094918>

130. Chen, Z., Pan, Y. H., An, L. Y., Yang, W. J., Xu, L. G., & Zhu, C. (2013). Heterologous expression of a halophilic archaeon manganese superoxide dismutase enhances salt tolerance in transgenic rice. *Russian journal of plant physiology*, 60(3), 359-366. DOI: 10.1134/S1021443713030059

131. Cheng, G., Basha, E., Wysocki, V. H., & Vierling, E. (2008). Insights into Small Heat Shock Protein and Substrate Structure during Chaperone Action Derived from Hydrogen/Deuterium Exchange and Mass Spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, 283(39), 26634-26642. DOI:<https://doi.org/10.1074/jbc.M802946200>
132. Chiappero, J., del Rosario Cappellari, L., Palermo, T. B., Giordano, W., Khan, N., & Banchio, E. (2021). Antioxidant status of medicinal and aromatic plants under the influence of growth-promoting rhizobacteria and osmotic stress. *Industrial Crops and Products*, 167, Article 113541. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113541>
133. Cuypers, A., Hendrix, S., Amaral dos Reis, R., De Smet, S., Deckers, J., Gielen, H., Jozefczak M, Loix C, Vercampt H, Vangronsveld, J., & Keunen, E. (2016). Hydrogen peroxide, signaling in disguise during metal phytotoxicity. *Frontiers in Plant Science*, 7, 470. doi: 10.3389/fpls.2016.00470
134. Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in environmental science*, 2, 53. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>
135. del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2020). ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): an efficient mechanism to counter salt stress in crops. *Microbiological research*, 235, 126439. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126439>
136. Desoky, E.-S. M., Merwad, A.-R. M., Semida, W. M., Ibrahim, S. A., El-Saadony, M. T., & Rady, M. M. (2020). Heavy metals-resistant bacteria (HM-RB): Potential bioremediators of heavy metals-stressed *Spinacia oleracea* plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 198, 110685. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110685>
137. Dhiman, P., Rajora, N., Bhardwaj, S., Sudhakaran, S. S., Kumar, A., Raturi, G., Chakraborty, K., Gupta, P., Devanna, B.N., Kumar, D. T., & Deshmukh, R. (2021). Fascinating role of silicon to combat salinity stress in plants: An updated overview. *Plant Physiology and Biochemistry*, 162, 110-123. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.02.023>
138. Di Toppi, L. S., & Gabbriellini, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and experimental botany*, 41(2), 105-130.

139. Dixit, A., & Siddaiah, N. S. (2021). Health and ecological risk assessment of metals in surface water from urban wetlands of Gurugram, India. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1-19. <https://doi.org/10.1080/03067319.2021.1974012>
140. Dubey, S., Bhargava, A., Fuentes, F., Shukla, S., & Srivastava, S. (2020). Effect of salinity stress on yield and quality parameters in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48(2), 954. [10.15835/nbha48211861](https://doi.org/10.15835/nbha48211861)
141. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
142. Dumanović, J., Nepovimova, E., Natić, M., Kuča, K., & Jaćević, V. (2021). The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: A concise overview. *Frontiers in plant science*, 11, 552969. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.552969>
143. El-Badri, A. M., Batool, M., AA Mohamed, I., Wang, Z., Khatab, A., Sherif, A., ... & Wang, B. (2021). Antioxidative and metabolic contribution to salinity stress responses in two rapeseed cultivars during the early seedling stage. *Antioxidants*, 10(8), 1227. <https://doi.org/10.3390/antiox10081227>
144. Eljebbawi, A., Guerrero, Y. D. C. R., Dunand, C., & Estevez, J. M. (2021). Highlighting reactive oxygen species as multitaskers in root development. *Iscience*, 24(1), Article 101978. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101978>
145. Etesami, H., & Maheshwari, D. K. (2018). Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and environmental safety*, 156, 225-246. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.013>
146. Fadzilla, N. A. M., Finch, R. P., & Burdon, R. H. (1997). Salinity, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. *Journal of Experimental Botany*, 48(2), 325-331.

147. Fahad, S., Hussain, S., Bano, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., ... & Huang, J. (2015). Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(7), 4907-4921. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3754-2>
148. Farooq, R., Wang, Y., Lin, F., Shaukat, S. F., Donaldson, J., & Chouhdary, A. J. (2002). Effect of ultrasound on the removal of copper from the model solutions for copper electrolysis process. *Water research*, 36(12), 3165-3169.
149. Fetsiukh, A., Bunio, L., Patsula, O., Timmusk, S., & Terek, O. (2022) Content of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in *Salix viminalis* L. grown on the Stebnyk tailing. *Acta Agrobotanica*, 75, 1-13. <https://doi.org/10.5586/aa.752>
150. Fetsiukh, A., Conrad, J., Bergquist, J., & Timmusk, S. (2021). Silica particles trigger the exopolysaccharide production of harsh environment isolates of growth-promoting rhizobacteria and increase their ability to enhance wheat biomass in drought-stressed soils. *International journal of molecular sciences*, 22(12), 6201. <https://doi.org/10.3390/ijms22126201>
151. Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, 17(7), 1866-1875. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033589>
152. Gajić, G., Djurdjević, L., Kostić, O., Jarić, S., Mitrović, M., & Pavlović, P. (2018). Ecological potential of plants for phytoremediation and ecorestoration of fly ash deposits and mine wastes. *Frontiers in Environmental Science*, 6, Article 124. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00124>
153. Galović, V., Kebert, M., Popović, B. M., Kovačević, B., Vasić, V., Joseph, M. P., Orlović, S., & Szabados, L. (2021). Biochemical and gene expression analyses in different poplar clones: The selection tools for afforestation of halomorphic environments. *Forests*, 12(5), 636. <https://doi.org/10.3390/f12050636>
154. Gamalero, E., Berta, G., & Glick, B. R. (2009). The use of microorganisms to facilitate the growth of plants in saline soils. In *Microbial strategies for crop improvement* (pp. 1-22). Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-642-01979-1_1

155. Ganeshkumar, A., Arun, G., Vinothkumar, S., & Rajaram, R. (2019). Bioaccumulation and translocation efficacy of heavy metals by *Rhizophora mucronata* from tropical mangrove ecosystem, Southeast coast of India. *Ecohydrology & Hydrobiology*, 19(1), 66-74. DOI: 10.1016/j.ecohyd.2018.10.006
156. Ganeshkumar, A., Rajendran, R., Ganesan, A., & Setu, R. (2018). Bioaccumulation and translocation of heavy metals in mangrove rhizosphere sediments to tissues of *Avicenia marina* – A field study from tropical mangrove forest. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 14, 100394. DOI: 10.1016/j.enmm.2018.07.005
157. Gao, J., Luo, Y., Wei, Y., Huang, Y., Zhang, H., He, W., ... & An, L. (2019). Screening of plant growth promoting bacteria (PGPB) from rhizosphere and bulk soil of *Caragana microphylla* in different habitats and their effects on the growth of Arabidopsis seedlings. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 921-930. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1629841>
158. Gąsecka, M., Mleczek, M., Jutrzenka, A., Goliński, P., & Stuper-Szablewska, K. (2017). Phenolic compounds in leaves of *Salix* species and hybrids growing under different soil conditions. *Chemistry and Ecology*, 33(3), 196-212.
159. Gautam, M., Mishra, S., & Agrawal, M. (2021). Causes, Effects and Sustainable Approaches to Remediate Contaminated Soil. In *Environmental Pollution and Remediation* (pp. 451-495). Springer, Singapore. , https://doi.org/10.1007/978-981-15-5499-5_16
160. Ghasemi-Omran, V. O., Ghorbani, A., & Sajjadi-Otaghsara, S. A. (2021). Melatonin alleviates NaCl-induced damage by regulating ionic homeostasis, antioxidant system, redox homeostasis, and expression of steviol glycosides-related biosynthetic genes in in vitro cultured *Stevia rebaudiana* Bertoni. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 57(2), 319-331. <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10161-9>
161. Gisbert Domenech, M. C., Sánchez-Torres, P., Raigón Jiménez, M., & Nuez Viñals, F. (2010). Phytophthora capsici resistance evaluation in pepper hybrids. Agronomic performance and fruit quality of pepper grafted plants. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 8(1), 116-121 <https://doi.org/10.1234/4.2010.1465>

162. Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, *169*(1), 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>
163. Glick, B. R., & Nascimento, F. X. (2021). Pseudomonas 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) Deaminase and Its Role in Beneficial Plant-Microbe Interactions. *Microorganisms*, *9*(12), 2467. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122467>
164. Glukhov, A. Z., & Shtirts, Y. A. (2015). Characteristics of the shape asymmetry of leaf tip and base in *Populus nigra* L. under industrial dump conditions. *Applied ecology and environmental research*, *13*(3), 819-831. [10.15666/aeer/1303_819831](https://doi.org/10.15666/aeer/1303_819831)
165. Gonzalez-Ollauri, A., & Mickovski, S. B. (2020). The effect of willow (*Salix* sp.) on soil moisture and matric suction at a slope scale. *Sustainability*, *12*(23), 9789. <https://doi.org/10.3390/su12239789>
166. Goyal, D., Kumar, S., Meena, D., Solanki, S. S., Swaroop, S., & Pandey, J. (2022). Selection of ACC deaminase positive, thermohalotolerant and drought tolerance enhancing plant growth-promoting bacteria from rhizospheres of *Cyamopsis tetragonoloba* grown in arid regions. *Letters in Applied Microbiology*, *74*(4), 519-535 <https://doi.org/10.1111/lam.13633>
167. Greger, M., & Landberg, T. (1999). Use of willow in phytoextraction. *International journal of phytoremediation*, *1*(2), 115-123.
168. Gupta, A., Mishra, R., Rai, S., Bano, A., Pathak, N., Fujita, M., Kumar, M., & Hasanuzzaman, M. (2022). Mechanistic Insights of Plant Growth Promoting Bacteria Mediated Drought and Salt Stress Tolerance in Plants for Sustainable Agriculture. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(7), 3741. <https://doi.org/10.3390/ijms23073741>
169. Gupta, R., Anand, G., Gaur, R., & Yadav, D. (2021). Plant–microbiome interactions for sustainable agriculture: a review. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *27*(1), 165-179. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-00927-1>

170. Gupta, S., & Pandey, S. (2019). ACC deaminase producing bacteria with multifarious plant growth promoting traits alleviates salinity stress in French bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1506. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01506>
171. Hafez, E. M., Osman, H. S., Gowayed, S. M., Okasha, S. A., Omara, A. E. D., Sami, R., El-Monem, A.M.A. & Abd El-Razek, U. A. (2021). Minimizing the adversely impacts of water deficit and soil salinity on maize growth and productivity in response to the application of plant growth-promoting rhizobacteria and silica nanoparticles. *Agronomy*, *11*(4), 676. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040676>
172. Hafez, E.M.; Gowayed, S.M.; Nehela, Y.; Sakran, R.M.; Rady, A.M.S.; Awadalla, A.; Omara, A.E.-D.; & Alowaiesh, B. F. (2021). Incorporated biochar-based soil amendment and exogenous glycine betaine foliar application ameliorate rice (*Oryza sativa* L.) tolerance and resilience to osmotic stress. *Plants*, *10*(9), 1930. <https://doi.org/10.3390/plants10091930>
173. Harinasut, P., Poonsopa, D., Roengmongkol, K., & Charoensataporn, R. (2003). Salinity effects on antioxidant enzymes in mulberry cultivar. *Science Asia*, *29*(2), 109-113.
174. Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., Masayuki F. & Fotopoulos, V. (2020). Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, *9*(8), 681. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>
175. Hazarika, S. N., Saikia, K., Borah, A., & Thakur, D. (2021). Prospecting endophytic bacteria endowed with plant growth promoting potential isolated from camellia *sinensis*. *Frontiers in microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.738058>
176. He, J., You, X., & Qin, L. (2021). High salinity reduces plant growth and photosynthetic performance but enhances certain nutritional quality of C4 Halophyte *Portulaca oleracea* L. grown hydroponically under LED lighting. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 651341. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.651341>

177. Hellal, F. A., Ei-Sayed, S. A., Abd Ei-Hady, M., Khatab, I. A., El-Shabrawi, H. M., & Ei-Menisy, A. M. (2017). Influence of salt stress on molecular and biochemical changes of barley at early seedling stage. *Bioscience Research*, *14*(2), 417-426.
178. Hernández-Canseco, J., Bautista-Cruz, A., Sánchez-Mendoza, S., Aquino-Bolaños, T., & Sánchez-Medina, P. S. (2022). Plant growth-promoting halobacteria and their ability to protect crops from abiotic stress: an eco-friendly alternative for saline soils. *Agronomy*, *12*(4), 804. <https://doi.org/10.3390/agronomy12040804>
179. Hernández-Nistal, J., Dopico, B., & Labrador, E. (2002). Cold and salt stress regulates the expression and activity of a chickpea cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase. *Plant Science*, *163*(3), 507-514. DOI: 10.1016/S0168-9452(02)00153-X
180. Hnilickova, H., Kraus, K., Vachova, P., & Hnilicka, F. (2021). Salinity stress affects photosynthesis, malondialdehyde formation, and proline content in *Portulaca oleracea* L. *Plants*, *10*(5), 845. <https://doi.org/10.3390/plants10050845>
181. Ibort, P., Molina, S., Núñez, R., Zamarreño, Á. M., García-Mina, J. M., Ruiz-Lozano, J. M., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Glick, B.R. & Aroca, R. (2017). Tomato ethylene sensitivity determines interaction with plant growth-promoting bacteria. *Annals of botany*, *120*(1), 101-122. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx052>
182. Jabbarov, Z., Jobborov, B., Fakhrutdinova, M., Iskhokova, S., Abdurakhmonov, N., Zakirova, S., & Makhhammadiev, S. (2021). Remediation of the technogenic soils. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 4503-4510.
183. Jahantigh, O., Najafi, F., Badi, H. N., Khavari-Nejad, R. A., & Sanjarian, F. (2016). Changes in antioxidant enzymes activities and proline, total phenol and anthocyanine contents in *Hyssopus officinalis* L. plants under salt stress. *Acta Biologica Hungarica*, *67*(2), 195–204. <https://doi.org/10.1556/018.67.2016.2.7>
184. Janicka, M., Kutkowska, A., & Paderewski, J. (2021). Diversity of segetal flora in *Salix viminalis* L. crops established on former arable and fallow lands in Central Poland. *Agriculture*, *11*(1), 25. <https://doi.org/10.3390/agriculture11010025>
185. Jianbo Li, Zhang J., Huixia J., Zhiqiang Y., Mengzhu Lu, Xuebing X., Jianjun H. Genome-Wide Characterization of the sHsp Gene Family in *Salix suchowensis*

Reveals Its Functions under Different Abiotic Stresses. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. 19 (10). P. 3246. <https://doi.org/10.3390/ijms19103246>

186. Jin, T., Ren, J., Li, Y., Bai, B., Liu, R., & Wang, Y. (2022). Plant growth-promoting effect and genomic analysis of the *P. putida* LWPZF isolated from *C. japonicum* rhizosphere. *AMB Express*, 12(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01445-3>

187. Kamika, I., & Momba, M. N. (2014). Microbial diversity of Emalahleni mine water in South Africa and tolerance ability of the predominant organism to vanadium and nickel. *PLoS One*, 9(1), e86189. doi:10.1371/journal.pone.0086189

188. Karmakar, D., Deb, K., & Padhy, P. K. (2021). Ecophysiological responses of tree species due to air pollution for biomonitoring of environmental health in urban area. *Urban Climate*, 35, Article 100741. <https://doi.org/10.1016/j.uclim.2020.100741>

189. Khan, T., Mazid, M., & Mohammad, F. (2011). A review of ascorbic acid potentialities against oxidative stress induced in plants. *Journal of agrobiolgy*, 28(2), 97. DOI 10.2478/v10146-011-0011-x

190. Khoma, Y. A., Nesterenko, O. G., Kutsokon, N. K., Khudolieieva, L. V., Shevchenko, V. V., & Rashydov, N. M. (2021). Proline content in the leaves of poplar and willow under water deficit. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12(3), 519-522. <https://doi.org/10.15421/022171>

191. Kloppstech, K. (1985). Diurnal and circadian rhythmicity in the expression of light-induced plant nuclear messenger RNAs. *Planta*, 165(4), 502-506.

192. Koptsik, G. N., Koptsik, S. V., Smirnova, I. E., & Sinichkina, M. A. (2021). Effect of soil degradation and remediation in technogenic barrens on the uptake of nutrients and heavy metals by plants in the Kola subarctic. *Eurasian Soil Science*, 54(8), 1252-1264. DOI: 10.1134/S106422932108010X

193. Kosakivska, I. V., Babenko, L. M., Romanenko, K. O., Korotka, I. Y., & Potters, G. (2021). Molecular mechanisms of plant adaptive responses to heavy metals stress. *Cell Biology International*, 45(2), 258-272. DOI: 10.1002/cbin.11503

194. Kosová, K., Prášil, I. T., & Vítámvás, P. (2013). Protein contribution to plant salinity response and tolerance acquisition. *International journal of molecular sciences*, *14*(4), 6757-6789. <https://doi.org/10.3390/ijms14046757>
195. Koyro, H. W., Ahmad, P., & Geissler, N. (2012). Abiotic stress responses in plants: an overview. *Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change*, 1-28. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0815-4_1
196. Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., & Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and environmental microbiology*, *79*(17), 5112-5120.
197. Kumar, S. G., Reddy, A. M., & Sudhakar, C. (2003). NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. *Plant Science*, *165*(6), 1245-1251.
198. Kumari, S., Chhillar, H., Chopra, P., Khanna, R. R., & Khan, M. I. R. (2021). Potassium: A track to develop salinity tolerant plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *167*, 1011-1023. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.09.031>
199. Kumari, S., Varma, A., Tuteja, N., & Choudhary, D. K. (2016). Bacterial ACC-deaminase: an eco-friendly strategy to cope abiotic stresses for sustainable agriculture. In *Plant-microbe interaction: an approach to sustainable agriculture* (pp. 165-185). Springer, Singapore. doi: 10.1007/978-981-10-2854-0_7
200. Labidi, O., Vives-Peris, V., Gómez-Cadenas, A., Pérez-Clemente, R. M., & Sleimi, N. (2021). Assessing of growth, antioxidant enzymes, and phytohormone regulation in *Cucurbita pepo* under cadmium stress. *Food science & nutrition*, *9*(4), 2021-2031. DOI: 10.1002/fsn3.2169
201. Lamine, S., & Saunders, I. (2022). Phytoremediation of Heavy-Metals-Contaminated Soils: A Short-Term Trial Involving Two Willow Species from Gloucester WillowBank in the UK. *Minerals*, *12*(5), 519. <https://doi.org/10.3390/min12050519>
202. Landberg, T., & Greger, M. (1996). Differences in uptake and tolerance to heavy metals in *Salix* from unpolluted and polluted areas. *Applied Geochemistry*, *11*(1-2), 175-180.

203. Landberg, T., & Greger, M. (2022). Phytoremediation Using Willow in Industrial Contaminated Soil. *Soil. Sustainability*, *14*(14), 8449. <https://doi.org/10.3390/su14148449>
204. Lebrun, M., Michel, C., Joulain, C., Morabito, D., & Bourgerie, S. (2021). Rehabilitation of mine soils by phytostabilization: Does soil inoculation with microbial consortia stimulate *Agrostis* growth and metal (loid) immobilization?. *Science of The Total Environment*, *791*, 148400. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148400>
205. Lee, D. H., Kim, Y. S., & Lee, C. B. (2001). The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of plant physiology*, *158*(6), 737-745.
206. Li, B., Ouyang, J., Li, C., Shang, X., & Zou, J. (2018). Response to NaCl stress in *Salix matsudana* Koidz seedlings. *Polish Journal of Environmental Studies*, *27*(2), 753–762. <https://doi.org/10.15244/pjoes/75820>
207. Li, H., Chi, Z., Li, J., Wu, H., & Yan, B. (2019). Bacterial community structure and function in soils from tidal freshwater wetlands in a Chinese delta: potential impacts of salinity and nutrient. *Science of The Total Environment*, *696*, 134029. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134029>
208. Li, Z., Chang, S., Lin, L., Li, Y., & An, Q. (2011). A colorimetric assay of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) based on ninhydrin reaction for rapid screening of bacteria containing ACC deaminase. *Letters in applied microbiology*, *53*(2), 178-185. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03088.x>
209. Ljungberg, U., Ekerlund, H. E., Andersson, B. (1986). Isolation and characterization of the 10-kDaa and 22-kDaa polypeptides of higher plant photosystem 2. *European journal of biochemistry*, *158*(3), 477-482.
210. Lowry, O. H. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol Chem*, *193*, 265-275.
211. Lu, Y., Zeng, F. J., Li, X. Y., & Zhang, B. (2021). Physiological changes of three woody plants exposed to progressive salt stress. *Photosynthetica*, *59*(1), 171–184. <https://doi.org/10.32615/ps.2021.007>

212. Luo, Y., Yuan, H., Zhao, J., Qi, Y., Cao, W. W., Liu, J. M., ... & Bao, Z. H. (2021). Multiple factors influence bacterial community diversity and composition in soils with rare earth element and heavy metal co-contamination. *Ecotoxicology and environmental safety*, 225, 112749. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112749>
213. Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C., & Freitas, H. (2016). Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of environmental management*, 174, 14-25. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.047>
214. Mabrouk, L., Mabrouk, W., & Mansour, H. B. (2020). High leaf fluctuating asymmetry in two native plants growing in heavy metal-contaminated soil: the case of Metlaoui phosphate mining basin (Gafsa, Tunisia). *Environmental Monitoring and Assessment*, 192(6), 1-15. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08385-0>
215. Mallhi, A. I., Chatha, S. A. S., Hussain, A. I., Rizwan, M., Bukhar, S. A. H., Hussain, A., Mallhi, Z. I., Ali, S., Hashem, A., Abd_Allah, E. F., Alyemeni, M. N., & Ahmad, P. (2020). Citric acid assisted phytoremediation of chromium through sunflower plants irrigated with tannery wastewater. *Plants*, 9(3), 380. doi:10.3390/plants9030380
216. Mganga, N. D. (2014). The potential of bioaccumulation and translocation of heavy metals in plant species growing around the tailing dam in Tanzania. *International Journal of Science and Technology*, 3(10), 690-697.
217. Misra, N., & Gupta, A. K. (2005). Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram. *Plant science*, 169(2), 331-339. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.02.013>
218. Mleczek, M., Gąsecka, M., Waliszewska, B., Magdziak, Z., Szostek, M., ... & Niedzielski, P. (2018). *Salix viminalis* L. – A highly effective plant in phytoextraction of elements. *Chemosphere*, 212, 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.055>
219. Mleczek, M., Łukaszewski, M., Kaczmarek, Z., Rissmann, I., & Golinski, P. (2009). Efficiency of selected heavy metals accumulation by *Salix viminalis* roots. *Environmental and experimental botany*, 65(1), 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.03.003>

220. Mokrani, S., Nabti, E. H., & Cruz, C. (2020). Current advances in plant growth promoting bacteria alleviating salt stress for sustainable agriculture. *Applied Sciences*, 10(20), 7025. <https://doi.org/10.3390/app10207025>
221. Moon, Y. S., & Ali, S. (2022). Possible mechanisms for the equilibrium of ACC and role of ACC deaminase-producing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-11. [10.1007/s00253-022-11772-x](https://doi.org/10.1007/s00253-022-11772-x)
222. Mukherjee, P., Mitra, A., & Roy, M. (2019). Halomonas rhizobacteria of *Avicennia marina* of Indian Sundarbans promote rice growth under saline and heavy metal stresses through exopolysaccharide production. *Frontiers in microbiology*, 10, 1207. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01207>
223. Munawar, W., Hameed, A., & Khan, M. K. R. (2021). Differential morphophysiological and biochemical responses of cotton genotypes under various salinity stress levels during early growth stage. *Frontiers in Plant Science*, 12, 622309. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.622309>
224. Mushtaq, Z., Faizan, S., & Gulzar, B. (2020). Salt stress, its impacts on plants and the strategies plants are employing against it: A review. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 8(3), 81–91. <https://doi.org/10.7324/JABB.2020.80315>
225. Nadeem, S. M., Zahir, Z. A., Naveed, M., & Ashraf, M. (2010). Microbial ACC-deaminase: prospects and applications for inducing salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(6), 360-393. <http://dx.doi.org/10.1080/07352689.2010.524518>
226. Naing, A. H., Maung, T., & Kim, C. K. (2021). The ACC deaminase-producing plant growth-promoting bacteria: Influences of bacterial strains and ACC deaminase activities in plant tolerance to abiotic stress. *Physiologia Plantarum*. [doi:10.1111/ppl.13545](https://doi.org/10.1111/ppl.13545)
227. Naliwajski, M., & Skłodowska, M. (2021). The relationship between the antioxidant system and proline metabolism in the leaves of cucumber plants acclimated to salt stress. *Cells*, 10(3), 609. <https://doi.org/10.3390/cells10030609>
228. Nascimento, F. X., Glick, B. R., & Rossi, M. J. (2019). Isolation and characterization of novel soil-and plant-associated bacteria with multiple phytohormone-

degrading activities using a targeted methodology. *Access microbiology*, 1(7). DOI: 10.1099/acmi.0.000053

229. Nawrot, N., Wojciechowska, E., Pazdro, K., Szmagliński, J., & Pempkowiak, J. (2021). Uptake, accumulation, and translocation of Zn, Cu, Pb, Cd, Ni, and Cr by *P. australis* seedlings in an urban dredged sediment mesocosm: Impact of seedling origin and initial trace metal content. *Science of The Total Environment*, 768, 144983. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.144983>

230. Nemati, I., Moradi, F., Gholizadeh, S., Esmaeili, M. A., & Bihamta, M. R. (2011). The effect of salinity stress on ions and soluble sugars distribution in leaves, leaf sheaths and roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant, Soil and Environment*, 57(1), 26–33. <https://doi.org/10.17221/71/2010-PSE>

231. Nigam, B., Dubey, R. S., & Rathore, D. (2022). Protective role of exogenously supplied salicylic acid and PGPB (*Stenotrophomonas* sp.) on spinach and soybean cultivars grown under salt stress. *Scientia Horticulturae*, 293, 110654. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110654>

232. Oladoye, P. O., Olowe, O. M., & Asemoloye, M. D. (2022). Phytoremediation technology and food security impacts of heavy metal contaminated soils: A review of literature. *Chemosphere*, 288, 132555. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132555>

233. Ondrasek, G., & Rengel, Z. (2021). Environmental salinization processes: detection, implications & solutions. *Science of the Total Environment*, 754, 142432. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142432>

234. Orozco-Mosqueda, M. D. C., Duan, J., DiBernardo, M., Zetter, E., Campos-García, J., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2019). The production of ACC deaminase and trehalose by the plant growth promoting bacterium *Pseudomonas* sp. UW4 synergistically protect tomato plants against salt stress. *Frontiers in microbiology*, 10, 1392. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01392>

235. Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental science and pollution research*, 22(6), 4056-4075. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3739-1>

236. Patel, M., & Parida, A. K. (2021). Salinity alleviates the arsenic toxicity in the facultative halophyte *Salvadora persica* L. by the modulations of physiological, biochemical, and ROS scavenging attributes. *Journal of Hazardous Materials*, *401*, 123368. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123368>
237. Patel, M., Surti, M., Ashraf, S. A., & Adnan, M. (2021). Physiological and Molecular Responses to Heavy Metal Stresses in Plants. In *Harsh Environment and Plant Resilience* (pp. 171-202). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65912-7_8
238. Penrose, D. M., & Glick, B. R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia plantarum*, *118*(1), 10-15. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00086.x>
239. Pishchik, V., Mirskaya, G., Chizhevskaya, E., Chebotar, V., & Chakrabarty, D. (2021). Nickel stress-tolerance in plant-bacterial associations. *PeerJ*, *9*, e12230. <https://doi.org/10.7717/peerj.12230>
240. Raklami, A., Tahiri, A. I., Bechtaoui, N., Pajuelo, E., Baslam, M., Meddich, A., & Oufdou, K. (2021). Restoring the plant productivity of heavy metal-contaminated soil using phosphate sludge, marble waste, and beneficial microorganisms. *Journal of Environmental Sciences*, *99*, 210-221. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.06.032>
241. Rao, Y. R., Ansari, M. W., Singh, A. K., Bharti, N., Rani, V., Verma, A., ... & Kumar, V. R. (2020). Ethylene mediated physiological response for in vitro development of salinity tolerant tomato. *Journal of Plant Interactions*, *15*(1), 406-416. <https://doi.org/10.1080/17429145.2020.1820591>
242. Roman, K., Roman, M., Szadkowska, D., Szadkowski, J., & Grzegorzewska, E. (2021). Evaluation of physical and chemical parameters according to energetic willow (*Salix viminalis* L.) cultivation. *Energies*, *14*(10), 2968. <https://doi.org/10.3390/en14102968>
243. Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J. A., Hilal, M., & Prado, F. E. (2009). Soluble sugars: Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. *Plant Signaling & Behavior*, *4*(5), 388–393. <https://doi.org/10.4161/psb.4.5.8294>

244. Saha, B., Chowardhara, B., Awasthi, J. P., Panda, S. K., & Panigrahi, K. C. (2021). Salinity Stress and Plant Secondary Metabolite Enhancement: An Overview. *Biotechnological Approaches to Enhance Plant Secondary Metabolites*, 49-60.
245. Sameena, P. P., & Puthur, J. T. (2021). Heavy metal phytoremediation by bioenergy plants and associated tolerance mechanisms. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 30(3), 253-274. <https://doi.org/10.1080/15320383.2020.1849017>
246. Sami, F., Yusuf, M., Faizan, M., Faraz, A., & Hayat, S. (2016). Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.005>
247. Sánchez-Calderón, L., Ibarra-Cortés, M. E., & Zepeda-Jazo, I. (2013). Root development and abiotic stress adaptation. *Abiotic stress-plant responses and applications in agriculture. Rijeka: InTech*, 135-168.
248. Sandil, S., & Gowala, N. (2022). Willows: Cost-Effective Tools for Bioremediation of Contaminated Soils. In *Advances in Bioremediation and Phytoremediation for Sustainable Soil Management* (pp. 183-202). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-89984-4_12
249. Santoyo, G., Guzmán-Guzmán, P., Parra-Cota, F. I., Santos-Villalobos, S. D. L., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Glick, B. R. (2021). Plant growth stimulation by microbial consortia. *Agronomy*, 11(2), 219. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020219>
250. Sarwar, N., Imran, M., Shaheen, M. R., Ishaque, W., Kamran, M. A., Matloob, A., ... & Hussain, S. (2017). Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: modifications and future perspectives. *Chemosphere*, 171, 710-721. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.116>
251. Shalata, A., & Tal, M. (1998). The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiologia Plantarum*, 104(2), 169-174.
252. Shang, C., Wang, L., Tian, C., & Song, J. (2020). Heavy metal tolerance and potential for remediation of heavy metal-contaminated saline soils for the euhalophyte

Suaeda salsa. *Plant Signaling & Behavior*, 15(11), 1805902.
<https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1805902>

253. Shankar, V., & Evelin, H. (2019). Strategies for reclamation of saline soils. In *Microorganisms in saline environments: Strategies and functions* (pp. 439-449). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18975-4_19

254. Shanker, A., & Venkateswarlu, B. (Eds.). (2011). *Abiotic Stress Response in Plants: Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*. BoD—Books on Demand.

255. Sharma, P., Tripathi, S., & Chandra, R. (2020). Phytoremediation potential of heavy metal accumulator plants for waste management in the pulp and paper industry. *Heliyon*, 6(7), e04559. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04559>

256. Shrivastava, P., & Kumar, R. (2015). Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi journal of biological sciences*, 22(2), 123-131. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.12.001>

257. Shultana, R., Tan Kee Zuan, A., Yusop, M. R., Mohd Saud, H., & Ayanda, A. F. (2020). Effect of salt-tolerant bacterial inoculations on rice seedlings differing in salt-tolerance under saline soil conditions. *Agronomy*, 10(7), 1030. doi:10.3390/agronomy10071030

258. Singh, R. P., Pandey, D. M., Jha, P. N., & Ma, Y. (2022). ACC deaminase producing rhizobacterium *Enterobacter cloacae* ZNP-4 enhance abiotic stress tolerance in wheat plant. *PloS one*, 17(5), e0267127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267127>

259. Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.

260. Soltabayeva, A., Ongaltay, A., Omondi, J. O., & Srivastava, S. (2021). Morphological, physiological and molecular markers for salt-stressed plants. *Plants*, 10(2), 243. <https://doi.org/10.3390/plants10020243>

261. Song, H. J., & Su, K. M. (2017). Physiological responses against salt stress of *Salix gracilistyla*. *Journal of Agriculture & Life Science*, 51(3), 1–10. <https://doi.org/10.14397/jals.2017.51.3.1>

262. Souza, R. D., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and molecular biology*, 38, 401-419. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
263. Srivastava, A. K., Das, A. K., Jagannadham, P. T. K., Bora, P., Ansari, F. A., & Bhate, R. (2022). Bioprospecting Microbiome for Soil and Plant Health Management Amidst Huanglongbing Threat in Citrus: A Review. *Frontiers in Plant Science*, 13, 858842-858842. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.858842>
264. Stolarska, A., & Klimek, D. O. M. I. N. I. K. A. (2008). Free proline synthesis in leaves of three clones of basket willow (*Salix viminalis*) as a response to substrate salinity. *Environ Prot Eng*, 34(4), 97-101.
265. Stolarska, A., Wróbel, J., & Przybulewska, K. (2008). Free proline content in leaves of *Salix viminalis* as an indicator of their resistance to substrate salinity. *Ecological Chemistry and Engineering. A*, 15(1-2), 139-146.
266. Stoychev, V., Simova-Stoilova, L., Vaseva, I., Kostadinova, A., Nenkova, R., Feller, U., & Demirevska, K. (2013). Protein changes and proteolytic degradation in red and white clover plants subjected to waterlogging. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(6), 1925-1932.
267. Suga, S., Komatsu, S., & Maeshima, M. (2002). Aquaporin isoforms responsive to salt and water stresses and phytohormones in radish seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 43(10), 1229-1237.
268. Takemura, Y., & Tamura, F. (2016). Induction of Heat Shock Proteins During the Bud Dormancy Stage in Woody Fruit Plants. In *Heat Shock Proteins and Plants* (pp. 65-77). Springer, Cham. DOI 10.1007/978-3-319-46340-7_4
269. Tangahu, B. V., Sheikh Abdullah, S. R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., & Mukhlisin, M. (2011). A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/939161>
270. Timperio, A. M., Egidi, M. G., & Zolla, L. (2008). Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *Journal of proteomics*, 71(4), 391-411.

271. Tsai, Y. C., Hong, C. Y., Liu, L. F., & Kao, C. H. (2004). Relative importance of Na⁺ and Cl⁻ in NaCl-induced antioxidant systems in roots of rice seedlings. *Physiologia Plantarum*, 122(1), 86-94.
272. Tuteja, N., Gill, S. S., Tiburcio, A. F., & Tuteja, R. (Eds.). (2012). *Improving crop resistance to abiotic stress*. John Wiley & Sons.
273. Ullah, A., Bano A., & Javed, H. (2021). PGPR assisted bioremediation of heavy metals and nutrient accumulation in zea mays under saline sodic soil. *Pak. J. Bot*, 53(1), 31-38. [https://doi.org/10.30848/PJB2021-1\(39\)](https://doi.org/10.30848/PJB2021-1(39))
274. Uma, S., Prasad, T. G., & Kumar, M. U. (1995). Genetic variability in recovery growth and synthesis of stress proteins in response to polyethylene glycol and salt stress in finger millet. *Annals of Botany*, 76(1), 43-49.
275. Vandana, U. K., Rajkumari, J., Singha, L. P., Satish, L., Alavilli, H., Sudheer, P. D., ... & Pandey, P. (2021). The endophytic microbiome as a hotspot of synergistic interactions, with prospects of plant growth promotion. *Biology*, 10(2), 101. <https://doi.org/10.3390/biology10020101>
276. Vangronsveld, J., & Clijsters, H. (1994). Toxic effects of metals. *Plants and the chemical elements: biochemistry, uptake, tolerance and toxicity*, 149-177. DOI:10.1002/9783527615919
277. Vatamaniuk, O. K., Mari, S., Lu, Y. P., & Rea, P. A. (1999). AtPCS1, a phytochelatin synthase from Arabidopsis: isolation and in vitro reconstitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(12), 7110-7115. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.7110>
278. Wang, C., Wang, H., Li, Y., Li, Q., Yan, W., Zhang, Y., ... & Zhou, Q. (2021). Plant growth-promoting rhizobacteria isolation from rhizosphere of submerged macrophytes and their growth-promoting effect on Vallisneria natans under high sediment organic matter load. *Microbial Biotechnology*, 14(2), 726-736. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13756>
279. Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science*, 9(5), 244-252. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.006>

280. Wang, Y., Yuan, H., Li, M., Li, Y., Ma, X., Tan, F., & Zhang, J. (2013). Phenotypic and physiological responses of two willow varieties to salt stress. *Israel Journal of Plant Sciences*, 61(1–4), 73–82. <https://doi.org/10.1080/07929978.2014.977548>
281. Wani, K. A., Sofi, Z. M., Malik, J. A., & Wani, J. A. (2020). Phytoremediation of heavy metals using *Salix* (Willows). *Bioremediation and Biotechnology*, Vol 2, 161-174. DOI: 10.1007/978-3-030-40333-1_9
282. Watanabe, S., Kojima, K., Ide, Y., & Sasaki, S. (2000). Effects of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in *Populus euphratica* in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63(3), 199-206.
283. Wróbel, J., & Mikiciuk, M. (2010). Water and Ionic Balance in the Leaves of Basket Willow (*Salix viminalis* L.) Cultivated in Hydroponics with Different Salinity Levels. *Ecological Chemistry and Engineering. A*, 17(10), 1315-1321.
284. Xia, L., Xiaodong, M., Yunhe, C., Junxiang, L., Junzhu, Z., Feifei, Z., Zhenyuan, S, & Lei, H. (2021). Transcriptomic and metabolomic insights into the adaptive response of *Salix viminalis* to phenanthrene. *Chemosphere*, 262, 127573. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.127573
285. Xie, D. L., Zheng, X. L., Zhou, C. Y., Kanwar, M. K., & Zhou, J. (2022). Functions of redox signaling in pollen development and stress response. *Antioxidants*, 11(2), 287. <https://doi.org/10.3390/antiox11020287>
286. Yaashikaa, P. R., Kumar, P. S., Jeevanantham, S., & Saravanan, R. (2022). A review on bioremediation approach for heavy metal detoxification and accumulation in plants. *Environmental Pollution*, 119035. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119035>
287. Yang, J., Yang, J., Zhao, L., Gu, L., Wu, F., Tian, W., Sun, Y., Zhang, S., Su, H., & Wang, L. (2021). Ectopic expression of a *Malus hupehensis* Rehd. myo-inositol oxygenase gene (MhMIOX2) enhances tolerance to salt stress. *Scientia Horticulturae*, 281, Article 109898. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109898>

288. Yasseen, B. T., Al-Thani, R. F., Alhadi, F. A., & Abbas, R. A. A. (2018). Soluble sugars in plants under stress at the arabian gulf Region: possible roles of microorganisms. *J Plant Biochem Physiol*, 6(4). DOI: 10.4172/2329-9029.1000224
289. Zahra, N., Wahid, A., Hafeez, M. B., Shaukat, K., Shahzad, S., Shah, T., & Alyemeni, M. N. (2021). Plant growth promoters alleviate oxidative damages and improve the growth of milk thistle (*Silybum marianum* L.) under salinity stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-26. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10498-w>
290. Zhai, F. F., Li, H. D., Zhang, S. W., Li, Z. J., Liu, J. X., Qian, Y. Q., Ju, G. S., Zhang, Y. X., Liu, L., Han L. & Sun, Z. Y. (2020). Male and female plants of *Salix viminalis* perform similarly to flooding in morphology, anatomy, and physiology. *Forests*, 11(3), 321. <https://doi.org/10.3390/f11030321>
291. Zhang, J., Wang, P., Tian, H., Tao, Z., & Guo, T. (2020). Transcriptome analysis of ice plant growth-promoting endophytic bacterium *Halomonas* sp. strain MC1 to identify the genes involved in salt tolerance. *Microorganisms*, 8(1), 88. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010088>
292. Zhou, M., Li, D., Li, Z., Hu, Q., Yang, C., Zhu, L., & Luo, H. (2013). Constitutive expression of a miR319 gene alters plant development and enhances salt and drought tolerance in transgenic creeping bentgrass. *Plant Physiology*, 161(3), 1375–1391. <https://doi.org/10.1104/pp.112.208702>
293. Zou, J., Zhang, Y., Li, X., Ma, X., Liu, J., Peng, X., & Sun, Z. (2021). Sexual differences in root growth and antioxidant characteristics in *Salix viminalis* exposed to cadmium stress. *International Journal of Phytoremediation*, 23(14), 1466-1475. <https://doi.org/10.1080/15226514.2021.1904825>

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Статті, в яких висвітлені основні наукові результати дисертації:

1. **Fetsiukh, A.,** Bunio, L., Patsula, O., Timmusk, S., & Terek, O. (2022) Content of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in *Salix viminalis* L. grown on the Stebnyk tailing. *Acta Agrobotanica*, 75, 1-13. <https://doi.org/10.5586/aa.752> (Scopus). (Особистий внесок дисертанта: участь у виконанні основної частини експериментів, обробка та інтерпретація результатів, написання та оформлення статті)
2. **Фецюх, А. Б.,** Буньо, Л. В., Пацула, О. І., & Терек, О. І. (2020). Вплив засолення на склад білків і вміст проліну в органах рослин *Salix viminalis* L. *Фізіологія рослин і генетика*, 52(5), 412—421. <https://doi.org/10.15407/frg2020.05.412> (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка та інтерпретація результатів, підготовка та оформлення тексту статті)
3. **Фецюх, А.,** Буньо, Л., Пацула, О., & Терек, О. (2019) Накопичення важких металів рослинами *S. viminalis* за росту на субстраті з Стебницького хвостосховища. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (81), 96-110. <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2019.81.11> (Особистий внесок дисертанта: виконання основної частини досліджень, обробка та інтерпретація результатів, написання та оформлення статті)
4. **Фецюх, А.,** Буньо, Л., Пацула, О., & Терек, О. (2018). Екологічні проблеми, спричинені розробкою Прикарпатського родовища полімінеральних калійних руд у м. Стебник. *Біологічні студії*, (12, № 2), 157-166. <http://dx.doi.org/10.30970/sbi.1202.537> (Особистий внесок дисертанта: збір, аналіз та узагальнення джерел літератури, написання та оформлення статті)
5. Пацула, О., **Фецюх, А.,** & Буньо, Л. (2018). Використання *Salix viminalis* L. для фітореMediaції ґрунтів, забруднених важкими металами. *Екологічні науки*, 1(20), 101-106. (Особистий внесок дисертанта: аналіз та узагальнення джерел літератури, участь у підготовці тексту статті)

6. Буньо, Л. В., **Фецюх, Н.**, Пацула, О. І., & Терек, О. І. (2017). Якість рослинної сировини одержаної з *Salix viminalis* L. вирощеної на засоленому субстраті хвостосховища м. Стебника. *Біологічні студії*, (11, № 3-4), 96-97. (Особистий внесок дисертанта: виконання основної частини досліджень, обробка результатів)

Праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

7. **Фецюх, А.**, & Пацула, О. (2016). Вплив важких металів на морфологічні показники рослин верби прутовидної (*Salix viminalis* L.). *Молодь і поступ біології. Тези доповідей XII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів (Львів, 19-21 квітня 2016 р.)* (С.343-344). Львів: ЛНУ.

8. **Фецюх, А. Б.**, Буньо, Л. В., & Пацула, О. І. (2016). Міцність зв'язку хлорофілу з білково-ліпідним комплексом рослин *Salix viminalis* L. за росту на засоленому субстраті з хвостосховища м. Стебник. *Фізіологія рослин у системі сучасних біологічних знань та наук. Тези доповідей II-го науково-методичного інтернет-семінару (Харків, Україна, 14 грудня 2016 р.)* (С. 32-33). Харків: ХНУ.

9. **Фецюх, А. Б.**, Буньо, Л. В., & Пацула, О.І. (2016). Вміст важких металів у рослин *Salix viminalis* L. за росту на засоленому субстраті з хвостосховища м. Стебник. *Біологія: від молекули до біосфери. Тези доповідей XI Міжнародної наукової конференції (Харків, Україна, 29 листопада – 2 грудня 2016)* (С. 106-107). Харків: ХНУ.

10. **Фецюх, А.**, Библів, Х., Гузар, О., Буньо, Л., & Пацула, О. (2017). Антиоксидантна система рослин *Salix viminalis* L. за росту на засоленому субстраті хвостосховища м. Стебник. *Молодь і поступ біології. Тези доповідей XIII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів (Львів, Україна, 25-27 квітня 2017 р.)* (С. 293-294). Львів: ЛНУ.

11. **Фецюх, А.**, Библів, Х., Гузар, О., Пацула, О., & Буньо, Л. (2017). Водоутримуюча здатність листків рослин *Salix viminalis* L. за росту на засоленому субстраті хвостосховища м. Стебник. *Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/BioScience Advances. Тези доповідей XV Міжнародної наукової конференції молодих вчених (Київ, Україна, 18-21 квітня 2017)* (С. 124-125). Київ: Паливода А.В.

12. **Фецюх, А. Б.,** Буньо, Л. В., & Пацула, О. І. (2017). Вплив сольового забруднення на вміст фенольних сполук в органах *Salix viminalis* L., вирощених на субстраті з хвостосховища м. Стебник. *Біологія: від молекули до біосфери. Тези доповідей XII Міжнародної конференції молодих науковців (29 листопада – 1 грудня 2017)* (С. 110-111). Харків: ФОП Шаповалова Т. М.
13. **Фецюх, А. Б.,** Буньо, Л. В., & Пацула, О. І. (2017). Прооксидантно-антиоксидантна система у рослин *Salix viminalis* L. за дії сольового забруднення. *International research and practice conference: Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences (Lublin, Poland, December 27-28, 2017)* (pp. 288-291). Lublin: Izdawnictwo «Baltija Publishing».
14. **Фецюх, А.,** Буньо, Л., Пацула, О., & Терек, О. (2018). Вплив засолення на вміст аскорбінової кислоти у органах рослин *Salix viminalis* L. *Молодь і поступ біології. Тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів (Львів, 10 – 12 квітня 2018)* (С. 309-310).
15. **Фецюх, А.,** Пацула, О., Буньо, Л., & Терек, О. (2019). Біогеохімічна активність рослин *Salix viminalis* L. за росту на відвалах переробки полімінеральних калійних руд м. Стебник. *Молодь і поступ біології. Тези доповідей XV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів (Львів, 9 – 11 квітня 2019)* (С. 180-181). Львів: ЛНУ.
16. **Фецюх, А.,** Пацула, О., Буньо, Л., & Терек, О. (2020). Роль ризосферних бактерій *Salix* sp. у мобілізації та фітоекстракції мікроелементів на забруднених ґрунтах. *Молодь і поступ біології. Тези доповідей XVI Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів (Львів, 27 – 29 квітня 2020)* (С. 210-211). Львів: ЛНУ.
17. **Фецюх, А.,** & Буньо, Л. (2020). Флуктуаційна асиметрія листків *Salix viminalis* L. в інтактній зоні і зоні техногенного забруднення. *Стан природних ресурсів: перспективи їх збереження та відновлення у контексті сталого розвитку. Тези доповідей IV Міжнародної науково-практичної конференції (Дрогобич, 27–28 жовтня 2020 р.)* (С. 81-83). Дрогобич: ДДПУ.

18. **Фещюх, А.,** Буньо, Л., & Терек, О. (2021). Кінетика росту *Salix viminalis* L. за умов техногенного навантаження. *Актуальні проблеми фізіології рослин і генетики. Тези доповідей Міжнародної наукової конференції (Київ, 17 червня 2021 р.)* (С. 200-202). Київ: Інтерсервіс.

19. **Fetsiukh, A.,** & Timmusk, S. (2021). Phytostablization of Mine Tailing at Northeastern Outskirts of Stebnyk Region: The Role of Plant-Soil-Microbe Interactions and Extremophilic Microbial Ability to Decontaminate Pollution. Ph.D. students' days Faculty of Food Engineering, Tourism and Environmental Protection (Arad, Romania, November 26, 2021) (P. 12). Arad: Ministry of Education "Aurel Vlaicu" University.