

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ГРЕЧИШКІНА СВІТЛАНА ВІКТОРІВНА

УДК 574.5:57.084

ДИСЕРТАЦІЯ
ПОТЕНЦІАЛ ПЛЕЙСТОФІТІВ ДЛЯ ФІТОРЕМЕДІАЦІЇ ТЕХНОГЕННО
ЗАБРУДНЕНИХ ВОДОЙМ

Спеціальність 091 біологія

Галузь знань 09 біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі біології
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____Гречишкіна С. В.

Науковий керівник:

Мусієнко Микола Миколайович, доктор біологічних наук, професор.

Київ - 2023

АНОТАЦІЯ

Гречишкіна С.В. Потенціал плейстофітів для фіторемедіації техногенно забруднених водойм. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 091 Біологія. Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, 2023.

Дисертаційна робота присвячена вивченню ефективності застосування плейстофітів у фіторемедіації технічних водойм, забруднених наночастинками металів.

Досліджено здатність *Pistia stratiotes*, *Limnobium laevigatum* та *Salvinia natans* до вилучення наночастинок металів з водного середовища, а також вплив наночастинок металів на фізіологічні параметри рослин, які виступають маркерами стійкості до пошкодження, з метою надання рекомендацій щодо оптимізації методів фіторемедіації з використанням плейстофітів для очищення стічних вод промислових підприємств та природних і штучних водойм, забруднених наночастинками металів. Робота набуває ще більшої актуальності в зв'язку з воєнним конфліктом внаслідок вторгнення Російської Федерації на територію України, який спричинює катастрофічне забруднення природних екосистем, в тому числі водних. Отримані результати досліджень та надані рекомендації матимуть надзвичайно важливе значення у післявоєнному відновленні забруднених токсичними сполуками водойм України.

В роботі наведені переваги фіторемедіації, як ефективного методу очищення водойм, зокрема такі, як висока ефективність очищення, низька вартість впровадження та екологічна безпека. Зокрема, акцентується увага на здатності водних рослин до поглинання різних забруднюючих речовин, включаючи наночастинки металів, з водного середовища.

Досліджено вплив наночастинок металів на рослинні організми, зокрема спричинені їхнім впливом зміни на біохімічному рівні (у вмісті фотосинтетичних пігментів, амінокислот, ацилкарнітинів, терпеноїдів та фенольних сполук, активності каталази), які сприяли стійкості, чи призводили до порушення регуляторних процесів.

На основі проведених досліджень по з'ясуванню акумуляційної здатності досліджуваних рослин по відношенню до наночастинок металів встановлено, що усі досліджувані плейстофіти (*P. stratiotes*, *S. natans* і *L. laevigatum*) проявили високу ефективність у видаленні наночастинок таких металів, як Mn, Cu, Zn і Ag. Однак, вищу акумуляційну здатність по відношенню до досліджуваних наночастинок металів проявили *P. stratiotes* та *S. natans*. Одночасно, відмічено видоспецифічність ефекту стосовно різних металів. *P. stratiotes* мала найкращі результати під час видалення наночастинок Mn (94%) і Zn (65%), *S. natans* показала високу здатність до видалення наночастинок Mn (86%) і Cu (69%) і однаковим був результат по видаленню Ag (76%) у обох видів. Отже, дані види плейстофітів можуть бути рекомендовані для очищення водойм від наведених наночастинок.

Досліджені зміни у вмісті хлорофілів, каротиноїдів, фенольних сполук, терпеноїдів, амінокислот та ацилкарнітинів, активності каталази у водних рослинах під впливом наночастинок металів виявили загальні прояви токсичного ефекту. Так, вони спричинили зниження вмісту хлорофілів *a* та *b* в досліджуваних рослинах, але спочатку (на 7-му добу) може спостергатися збільшення вмісту пігментів у таких видів, як *P. stratiotes* та *S. natans*, що є проявом захисної реакції. Найбільше вміст хлорофілів знижувався у *L. laevigatum*. Також виявлено, що у *P. stratiotes* спостерігалось збільшення вмісту каротиноїдів, які беруть участь у захисті фотосинтетичної системи, що свідчить про стійкість її фотосинтетичного апарату до наночастинок металів. У *L. laevigatum* та *S. natans*, навпаки, спостерігалось зниження вмісту каротиноїдів, що свідчить про порушення фотосинтетичного апарату в цих рослинах. Узагальнюючи, *P. stratiotes* виявилась найстійкішим плейстофітом за стабільністю вмісту фотосинтетичних пігментів.

В результаті досліджень встановлено зниження кількісного вмісту білка у *L. laevigatum* та *S. natans* за впливу наночастинок металів. Це зниження може бути наслідком порушення метаболізму азоту, який є важливим елементом у живленні рослин. Зміна вмісту білка може призвести до гальмування процесів росту та суттєвого зниження продуктивності цих водних рослин. У випадку з *P. stratiotes* вміст білка залишився без змін, що свідчить про стійкість системи білкового метаболізму цього виду до наночастинок металів.

В ході дослідження ми ідентифікували 17 амінокислот, які є складовими білкових компонентів досліджуваних рослин, і визначили їх кількісний вміст. Під впливом наночастинок металів в усіх досліджуваних рослинах відбулося зниження загального вмісту амінокислот. Зокрема, для *S. natans* цей показник становив 23%, а для *P. stratiotes* та *L. laevigatum* лише 8%. Також був проаналізований вміст окремих амінокислот, насамперед тих, що беруть безпосередню участь в механізмах стійкості. У рослин, які мали вищу стійкість, суттєвих змін у вмісті цих амінокислот не спостерігалось.

Досліджено вплив наночастинок металів на ліпідний метаболізм у трьох досліджуваних плейстофітів. Виявлені зміни у кількісному вмісті ацилкарнітинів свідчать про змінений метаболізм мітохондрій та можуть слугувати маркерами стрес-толерантності рослин до впливу наночастинок металів. Виявлено, що у *P. stratiotes* не спостерігалось зниження вмісту жодного з ацилкарнітинів, що свідчить про стійкість цього виду до впливу наночастинок металів. У *L. laevigatum* спостерігалось зменшення вмісту семи ацилкарнітинів, а в *S. natans* - чотирьох. Одночасно виявлено збільшення вмісту певних ацилкарнітинів у кожного виду. Зокрема, під впливом наночастинок металів відбулось збільшення вмісту трьох ацилкарнітинів (C5, C8, C18:1) у *S. natans* та семи (C0, C2, C3, C4, C6, C16, C18:1) у *P. stratiotes*, тоді як у *L. laevigatum* не відбулось збільшення вмісту цих сполук. Такі зміни вмісту ацилкарнітинів свідчать про складний процес, який включає в себе захисні реакції за участю ліпідного обміну для збереження гомеостазу та життєздатності рослинного організму під впливом наночастинок металів.

Проведено аналіз зміни активності каталази (маркерного ферменту щодо стійкості рослини до стресора, який забезпечує захист рослин від оксидативного стресу шляхом знешкодження пероксиду водню, кількість якого збільшується за будь-якого негативного впливу) у *P. stratiotes*, *S. natans*, *L. laevigatum* за впливу наночастинок металів, які перебували у водному колоїдному розчині. Виявлено, що у *L. laevigatum* спостерігалось зниження активності каталази на 17%, а у *P. stratiotes* та *S. natans*, навпаки, підвищення її активності на 19% та 63% відповідно. Враховуючи інші маркери стійкості рослин, було зроблено висновок, що види, у яких підвищувалася активність каталази, мали вищу стійкість до пошкоджень, спричинених наночастинками металів.

Досліджено вміст фенольних сполук та терпеноїдів у водних рослинах. Виявлено, що рівень накопичення цих сполук значно відрізняється, в залежності від видових особливостей рослини та змінюється під впливом наночастинок металів. У *P. stratiotes* вміст фенольних сполук залишився незмінним, тоді як у інших видів спостерігалось зниження. Відмічено також зміни вмісту терпеноїдів: зниження у *L. laevigatum* та збільшення у *P. stratiotes*. Одночасно у *S. natans* зберігався стабільний рівень впродовж всього експерименту.

Отримані результати свідчать про різну відповідь досліджуваних рослин на вплив наночастинок металів, що може бути пов'язано зі специфічними механізмами підтримання гомеостазу і механізмами регуляції захисних систем.

Результати досліджень свідчать, що серед трьох досліджуваних видів *P. stratiotes* та *S. natans* є більш стійкими за фізіологічними та біохімічними показниками стійкості та одночасно ефективними в поглинанні наночастинок металів, ніж *L. laevigatum*.

Проаналізувавши вплив інвазійного виду *P. stratiotes* на життєздатність природних для водойм України видів і виявивши негативні наслідки такого впливу, рекомендовано використовувати *P. stratiotes* для фітореMediaції з метою вилучення наночастинок металів виключно у закритих технічних водоймах з замкнутим водообігом і неможливістю її потрапляння зі стічними водами до відкритих очисних споруд та природних водних об'єктів. Для відкритих

технічних та природних водойм придатною для фіторемедіаційних методів виявилася лише *S. natans*.

Отримані результати можуть бути використані для розробки зелених технологій очищення забруднених наночастинками металів технічних та природних водойм з метою збереження чистоти природних вод та біологічного різноманіття водних екосистем.

Ключові слова: фіторемедіація, плейстофіти, наночастинки металів, хлорофіли, каротиноїди, амінокислоти, ацилкарнітини, активність каталази, терпеноїди, феноли, стрес-толерантність, акумуляція, водні екосистеми

SUMMARY

Hrechishkina S.V. Potential of pleustophytes for phytoremediation of technogenically polluted water bodies. – Manuscript.

Thesis for a scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 091 «Biology». – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, – Kyiv, 2023.

The thesis focuses on studying the effectiveness of phytoremediation of industrial water bodies contaminated with metal nanoparticles using pleustophytes, floating aquatic macrophytes. The ability of *Pistia stratiotes*, *Limnobium laevigatum*, and *Salvinia natans* to remove metal nanoparticles from the aquatic environment was investigated, along with the impact of these nanoparticles on plant physiological parameters. The aim was to provide recommendations for phytoremediation using higher aquatic plants to purify industrial wastewater and natural/artificial water bodies contaminated with metal nanoparticles. The research becomes even more relevant due to the ongoing war conflict resulting from the Russian Federation's invasion of Ukraine, which causes catastrophic pollution of natural ecosystems, including water bodies. The obtained research results and recommendations could have high importance in the post-war restoration of polluted water bodies in Ukraine.

The work highlights the advantages of phytoremediation as an effective method of water purification, including high efficiency, low implementation cost, and ecological safety. Specifically, attention is drawn to the ability of aquatic plants to absorb various pollutants, including metal nanoparticles, from the aquatic environment.

The influence of metal nanoparticles on plant organisms was investigated, including their effects on cellular changes, biological molecule functions, and disruption of regulatory processes.

Based on the conducted research, it was established that all studied pleustophytes (*Pistia stratiotes*, *Salvinia natans*, and *Limnobium laevigatum*) demonstrated high efficiency in removing metal nanoparticles (Mn, Cu, Zn, and Ag) from colloidal solutions. However, *Pistia stratiotes* and *Salvinia natans* showed higher potential for

removing water solutions. *Pistia stratiotes* showed the best results in removing Mn (94%) and Zn (65%) nanoparticles. *Salvinia natans* demonstrated high capability in removing Mn (86%) and Cu (69%) nanoparticles, as well as equal performance for Ag (76%) in both species. Thus, these pleustophyte species can be recommended for the purification of water bodies from the mentioned nanoparticles.

Changes in the content of chlorophylls, phenolic compounds, terpenoids, amino acids, and acylcarnitines in aquatic plants under the influence of metal nanoparticles were investigated.

It was found that metal nanoparticles led to a decrease in the content of chlorophyll *a* and *b* in the studied plants, but on the 7th day, an increase in pigment content was observed in *Pistia stratiotes* and *Salvinia natans*. The highest reduction in chlorophyll content was observed in *Limnobium laevigatum*. It was also discovered that the carotenoid content increased in *Pistia stratiotes*, indicating the resilience of its photosynthetic apparatus to metal nanoparticles. In contrast, *Limnobium laevigatum* and *Salvinia natans* showed a decrease in carotenoid content, indicating the damage of the photosynthetic apparatus of these plants. In summary, *Pistia stratiotes* demonstrated the highest resilience among the studied pleustophytes based on photosynthetic indicators.

The research results demonstrate a decrease in protein content in *Limnobium laevigatum* and *Salvinia natans* under the influence of metal nanoparticles. This decrease may be a consequence of nitrogen metabolism disruption, which is an essential element in plant nutrition. Changes in protein content can lead to growth inhibition and reduced productivity of these aquatic plants. In case of *Pistia stratiotes*, protein content remained unchanged, indicating the stability of the protein metabolism system in this species.

During the experiment, we identified 17 amino acids as components of the protein content in the investigated plants and determined their quantitative content. Under the influence of metal nanoparticles, a decrease in the total amino acid content was observed in all studied plants. Specifically, for *Salvinia natans*, it decreased by 23%, while for *Pistia stratiotes* and *Limnobium laevigatum*, the amino acid content decreased by 8%. The content of individual amino acids was also analyzed.

The impact of metal nanoparticles on lipid metabolism in the three studied pleustophytes was investigated. Changes in the quantitative content of acylcarnitines indicate altered mitochondrial metabolism and can serve as markers of plant stress tolerance to the influence of metal nanoparticles. It was found that *Pistia stratiotes* did not show a decrease in the content of any acylcarnitines, indicating the resistance of this species to the impact of metal nanoparticles. *Limnobium laevigatum* exhibited a decrease in the content of seven acylcarnitines, while *Salvinia natans* showed a decrease of four acylcarnitines. Simultaneously, an increase in the content of specific acylcarnitines was observed in each species. *Salvinia natans* exhibited an increase in the content of three acylcarnitines (C5, C8, C18:1), and *Pistia stratiotes* showed an increase in seven acylcarnitines (C0, C2, C3, C4, C6, C16, C18:1). There was no increase in the content of acylcarnitines in *Limnobium laevigatum*. These changes in acylcarnitine content indicate a complex process involving protective reactions through lipid metabolism to maintain homeostasis and viability of the plant organism under the influence of metal nanoparticles.

The catalase activity of *Pistia stratiotes*, *Salvinia natans*, and *Limnobium laevigatum* under the influence of metal nanoparticles in an aqueous solution was analyzed. Catalase is an important enzyme that provides protection against oxidative stress by turning hydrogen peroxide into water and oxygen. It was found that *Pistia stratiotes* and *Salvinia natans* showed an increase in catalase activity by 19% and 63%, respectively, while *Limnobium laevigatum* showed a decrease in activity by 17%. Considering other markers of plant resistance, it can be concluded that the species with increased catalase activity were more resistant to damage caused by metal nanoparticles.

The content of phenolic compounds and terpenoids in aquatic plants was investigated. It was found that the level of accumulation of these compounds significantly differed depending on the plant species and changed under the influence of metal nanoparticles. The content of phenolic compounds remained unchanged in *Pistia stratiotes*, while a decrease was observed in the other species. Changes in the content of terpenoids were also investigated: an increase in *Pistia stratiotes*, a decrease in *Limnobium laevigatum*, and stable levels in *Salvinia natans*.

The obtained results indicate different responses of plants to the influence of metal nanoparticles, which may be associated with specific mechanisms of regulation. The results demonstrate that *Pistia stratiotes* and *Salvinia natans* are more resistant due to physiological indicators and effectiveness in absorbing metal nanoparticles.

It is recommended to use pleustophytes for phytoremediation of technogenically polluted water bodies contaminated with metal nanoparticles, specifically *Pistia stratiotes* in closed technical water bodies and *Salvinia natans* in open natural water bodies.

The obtained results can be used for the development of green technologies for the purification of water bodies from metal nanoparticles, aiming to preserve natural waters and the biodiversity of aquatic ecosystems.

Keywords: phytoremediation, pleustophytes, metal nanoparticles, chlorophylls, carotenoids, amino acids, acylcarnitines, catalase activity, terpenoids, phenols, stress tolerance, accumulation, aquatic ecosystems.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

1. **S.V. Hrechyshkina**, O. P. Olkhovych, M. M. Musienko, O. O. Panyuta, N. Yu. Taran. Evaluation of Physiological Parameters of Resistance and Perspectivity of *Salvinia natans* Use for Extraction of Colloid Metal Nanoparticles. Hydrobiological Journal. Volume 58, Issue 3, 2022, pp. 46-53.

DOI: 10.1615/HydrobJ.v58.i3.40

2. O. O. Olkhovych, **S. V. Hrechyshkina**, O. O. Panyuta, Nataliya Yu. Taran, R. V. Ivannikov Secondary Metabolites of Pleustophytes as Markers of Resistance to Metal Nanoparticles. Hydrobiological Journal. Volume 58, Issue 2, 2022, pp. 44-50

DOI: 10.1615/HydrobJ.v58.i2.40

3. Olga Olkhovych, Nataliia Taran, **Svitlana Hrechyshkina**, Olena Voitsekhivska, Olga Panuta, Volodymyr Voitsekhivskyi Evaluation of Hyper-Tolerance of Aquatic Plants to Metal Nanoparticles. Journal of Ecological Engineering. 2022; 23(8):249-259

DOI: <https://doi.org/10.12911/22998993/150719>

4. Olkhovych O., Taran N., **Hrechyshkina S.**, Musienko M. Influence of alien species *Pistia Stratiotes* L., 1753 on representative species of genus *Salvinia* in Ukraine. Transylvanian Review of Systematical and Ecological Research. 22.1 (2020). 'The Wetlands Diversity' – P. 43-56.

5. O. P. Olkhovich, **S. V. Grechyshkina**, Nataliya Yu. Taran, L. M. Batsmanova, N. B. Svetlova Capability for Accumulating Metals and Remediation Potential of *Pistia stratiotes*. Volume 53, Issue 3, 2017, pp. 90-99.

DOI: 10.1615/HydrobJ.v53.i3.90

6. O. Olkhovych, N.Svietlova, Y.Konotop, O.Karaushu, **S. Hrechishkina** Removal of metal nanoparticles colloidal solutions by water plants. Nanoscale Research Letters. (2016) 11:518

DOI 10.1186/s11671-016-1742-9

Опубліковані праці апробаційного характеру:

1. **Svitlana Hrechyshkina**, Olga Olkhovych, Mykola Musienko, Nataliya Taran Changes In Catalase Activity in pleuston species under the influence of metal nanoparticles. Book of Abstracts of 6th International Conference “Nanotechnology”, 4 - 7 October 2021, Tbilisi, Georgia. P. 43.
2. **Hrechyshkina S.**, Olkhovych O., Musienko M., Taran N. Stress-tolerance evaluation of pleuston by changes in catalase activity and amino acids content under the influence of metal nanoparticles. «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances»: Матеріали XVIII Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених (м. Київ, 23-25 квітня 2020 р.) – Київ: ПАЛИВОДА А.В., 2020. 269 – 270 с.
3. **Hrechyshkina S. V.**, Olkhovych O. P., Taran N. Y., Musienko M. M Changes in the content of photosynthetic pigments in pleuston under the influence of metal nanoparticles. Abstract book of participants of the International Summer School and International research and practice conference, 27-30 August 2019, Lviv. Edited by Dr. Olena Fesenko. – Kiev: LLC “Computer-publishing, information center”, 2019. – P. 693.
4. **Гречишкіна С.В.**, Ольхович О. П., Таран Н. Ю., Мусієнко М.М. Вміст ацилкарнітинів як показник стрес-толерантності водних макрофітів до наночасток металів. Сучасні аспекти збереження здоров'я людини: збірник праць XII Міжнародної міждисциплінарної наук.-практ. конф. / За ред. проф. Т.М. Ганича. - Ужгород: ДВНЗ «УжНУ», 2019. – С. 234-236.
5. **Гречишкіна С.**, Ольхович О., Мусієнко М. Визначення здатності плейстофітів до вилучення наночасток металів та оцінка їх стрес-толерантності за зміною вмісту фотосинтетичних пігментів. Матеріали XV Міжнародної наукової конференції “Молодь і поступ біології”, присвяченій 135 річниці від дня народження Якуба Парнаса. Львів, Україна, 9–11 квітня 2019 року. – С. 175-176.

6. **Гречишкіна С.В.**, Ольхович О.П. Оцінка стрес-толерантності плейстофітів та гідатофітів до наночасток металів за зміною вмісту фотосинтетичних пігментів та показниками білкового обміну. Біотехнологія: звершення та надії: збірник тез VII Міжнародної науково-практичної конференції НУБіП України (29-30 листопада 2018 року, м. Київ). - КОМПРИНТ. – С. 110-111.

7. Olkhovych O.P., Karaushu O.V., Voitsekhivska O.V., **Hrechishkina S.V.**, Karpenko N.I. Changes in the content of amino acids and protein in different hydromacrophytes under the influence of metal nanoparticles. The International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials“ (NANO-2017). Abstract Book of participants of the International Summer School and International research and practice conference, 23-26 August 2017, Chernivtsi, Ukraine P.638.

8. Olkhovych O.P., Svetlova N.B., Karaushu O.V., Konotop Y.O., **Hrechishkina S.V.** Removal of Metal Nanoparticles Colloidal Solutions by Water Plants International Research and Practice Conference “Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2016)” Lviv, August 24-27, 2016 – P. 506.

9. **Гречишкіна С.В.**, Алексієнко М.В., Таран Н.Ю., Ольхович О.П. Можливості використання інвазійного виду *Pistia stratiotes* L. в фіторемедіації технічних водойм. //Шевченківська весна 2016: Біологічні науки. Матеріали XIV міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених. 6-8 квітня. Київ. – 2016. С.72.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	16
ВСТУП	17
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	23
1.1. Застосування наночастинок металів у сучасних технологіях.....	23
1.2. Проблема забруднення водою наночастинками металів.....	24
1.3. Вплив наночастинок металів на живі організми.....	25
1.4. Фіторе mediaція як ефективний метод очищення водою від забруднюючих речовин.....	26
1.5. Застосування водних макрофітів у фіторе mediaції водою.....	28
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	29
2.1. Матеріали досліджень.....	29
2.1.1. Умови культивування досліджуваних плейстофітів.....	33
2.2. Методи досліджень.....	35
2.2.1. Визначення вмісту фотосинтетичних пігментів.....	35
2.2.2. Визначення вмісту білка, амінокислот та ацилкарнітинів із однієї наважки.....	35
2.2.3. Визначення вмісту фенольних сполук та терпеноїдів.....	36
2.2.4. Визначення активності каталази.....	37
2.2.5. Визначення вмісту мінеральних елементів у тканинах рослин та воді.....	38
2.2.6. Вимірювання гідрохімічних показників води.....	38
2.2.7. Статистична обробка результатів.....	39
2.3. Схема експериментальної моделі для вивчення впливу інвазійного виду <i>Pistia stratiotes</i> на <i>Salvinia natans</i> та <i>Limnobium laevigatum</i>	39
РОЗДІЛ 3. ВИЗНАЧЕННЯ ЗДАТНОСТІ ПЛЕЙСТОФІТІВ ДО ВИЛУЧЕННЯ НАНОЧАСТИНОК МЕТАЛІВ З ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА	41
РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК МЕТАЛІВ НА ФІЗІОЛОГІЧНИЙ СТАН ПЛЕЙСТОФІТІВ	45
4.1. Оцінка морфологічних параметрів для визначення впливу наночастинок металів на окремі органи плейстофітів.....	45

4.2. Фотосинтетичні параметри, як показники стрес-толерантності до наночастинок металів.....	48
4.3. Оцінка вмісту білка та амінокислот у водних макрофітів за дії наночастинок металів для з'ясування ступеня пошкодження основних метаболічних систем цих рослин.....	52
4.4. Аналіз змін вмісту ацилкарнітинів як показник стійкості ліпідного метаболізму.....	58
4.5. Аналіз змін активності каталази.....	62
4.6. Оцінка стресостійкості рослин за зміною вмісту фенольних сполук та терпеноїдів.....	63
РОЗДІЛ 5. ОЦІНКА РИЗИКУ ВИКОРИСТАННЯ ІНВАЗІЙНОГО ВИДУ <i>PISTIA STRATIOTES</i> ДЛЯ ОЧИСТКИ ТЕХНІЧНИХ ВОДОЙМ СТОСОВНО ПРИРОДНИХ ВИДІВ.....	69
5.1. Використання фотосинтетичних параметрів для прогнозування продуктивності фітоугруповань плейстофітів водойм України за впливу інвазійного виду <i>P. stratiotes</i>	69
5.2. Оцінка змін гідрохімічних показників при сумісному зростанні інвазійного виду <i>P. stratiotes</i> з <i>L. laevigatum</i> та <i>S. natans</i>	74
5.2.1. Зміни вмісту кисню у воді.....	74
5.2.2. Зміни рівня рН води.....	76
5.2.3. Зміни показників мінералізації.....	78
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	82
ВИСНОВКИ.....	85
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	87

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФК – активні форми кисню

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ЖК – жирні кислоти

НЧ – наночастинки

РНК – рибонуклеїнова кислота

ВСТУП

Актуальність. Надзвичайно важливою задачею сьогодення є вирішення проблеми очищення стічних вод, а також вод природних і штучних водойм від значної кількості забруднюючих речовин.

Ця проблема набуває все більшого значення у зв'язку з повномасштабним вторгненням Російської Федерації на територію України. Існує низка відомостей про катастрофічний вплив військової активності на природні екосистеми, в тому числі і водні. Військовий конфлікт зазвичай пов'язаний з випробуванням, виробництвом, транспортуванням та використанням військової техніки, озброєння, оптичних та електронних приладів та засобів захисту. На кожному з етапів існує потенційна загроза забруднення навколишнього середовища токсичними речовинами, в тому числі металами [1]. Ступінь впливу на екосистеми та її складові військових дій, повністю залежить від стійкості біологічної системи, характеру та тривалості впливу [2].

В сучасному світі все більшого розвитку набувають нанотехнології з метою отримання наноматеріалів, нанотрубок, наноелектроніки та наносенсорів, що використовуються у багатьох сферах, зокрема у промисловості, медицині, сільському господарстві, а також у військовій сфері [3].

Присутність наночастинок металів у природних водоймах може призвести до небажаних змін у різних гідробіонтів, включаючи водні макрофіти. Оскільки екологічний вплив наночастинок металів на навколишнє середовище ще не достатньо вивчений [4, 5], але вже існує певна кількість даних, що вказує на те, що ці речовини мають цитотоксичний ефект, викликають оксидативний стрес та запальні реакції в живих організмах [6, 7, 8], необхідно заздалегідь з'ясувати можливі методи вилучення їх із водного середовища, задля збереження якості природних вод і біологічного різноманіття водних екосистем. Саме тому, фітореMediaція технічних водойм забруднених наночастинками металів сьогодні набуває особливого значення. Забруднення водойм наночастинками металів

потребує вивчення їх взаємодії з водними рослинами для створення універсальних комплексних біотехнологій очищення водойм.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота була виконана на базі кафедри біології рослин Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках бюджетної теми: «Вирішення проблемних питань різноманітності та стрес-толерантності представників флори та мікобіоти України за глобальних змін клімату» (2019-2023 рр № 16 КФ 036-07).

Мета і завдання дослідження. У світовій практиці отримано позитивний досвід відновлення технічних та природних водойм методами фіторемедіації [9, 10, 11], але в Україні широке застосування водних макрофітів для очистки водойм стримується відсутністю відповідних розробок і рекомендацій, що пов'язано із неопрацьованістю багатьох питань з акумуляційної здатності та фізіології самих рослин в умовах забруднення.

Пошук стійких до забруднення видів водних рослин, здатних вилучати наночастинки металів, для здійснення фіторемедіації технічних водойм є важливим завданням сьогодення. Тому, метою нашої роботи було з'ясувати фіторемедіаційні властивості плейстофітів для вдосконалення технологій вилучення наночастинок металів із водного середовища.

Відповідно до мети завданнями дослідження були:

1. Визначити здатність плейстофітів (*Pistia stratiotes*, *Limnobium laevigatum*, *Salvinia natans*) до вилучення наночастинок металів з водних розчинів.
2. Для оптимізації методів фіторемедіації здійснити скринінг рослин-ремедіантів за фізіологічними маркерами стійкості.
3. З'ясувати вплив наночастинок металів на морфо-фізіологічні параметри макрофітів (ріст, вміст фотосинтетичних пігментів, білка, амінокислот, ацилкарнітинів, фенольних сполук, терпеноїдів та активність каталази).

4. Дослідити фотосинтетичну продуктивність плейстофітів природних водойм України та зміни гідрохімічних показників води за присутності інвазійного виду *P. stratiotes*.

5. З'ясувати екологічні ризики виходу за межі очисних споруд у разі використання інвазійного виду *P. stratiotes* для фітореMediaції технічних водойм.

6. Визначити види плейстофітів придатні для фітореMediaції природних водойм України.

Об'єкт дослідження: акумуляційна здатність та стресс-толерантність до наночастинок металів потенційних видів-ремедіантів з екологічної групи плейстофітів.

Предмет дослідження: неспецифічні реакції плейстофітів на вплив наночастинок металів.

Методи дослідження: Вміст фотосинтетичних пігментів визначали спектрофотометричним методом за допомогою спектрофотометра «ShimadzuUV-1800». Вміст елементів у зразках води та в рослинних тканинах - методом ІСР-спектрометрії на емісійному спектрофотометрі ІСАР6300 DuoMEC (США). Вміст білка - Біуретовим методом. Вміст амінокислот та ацилкарнітинів - методом тандемної мас-спектрометрії за допомогою мас-спектрометра АВ Sciex 2000 з автосамплером Ultimate 3000 (Dionex). Вміст фенольних сполук та терпеноїдів - методом високоефективної рідинної хроматографії на приладі Agilent 1100. Визначення активності каталази - методом Баха і Опаріна.

Вміст кисню у воді за допомогою портативного приладу – Hanna, рівень рН – за допомогою рН-Meter PH-107, рівень мінералізації води – за допомогою TDS Meter TDS-2. Візуальне обстеження та обміри рослин класичними морфологічними методами. Методи статистичної обробки результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. Біоінженерні спороди з застосуванням водних макрофітів, здатних до ефективного вилучення токсичних речовин, вже використовуються для очищення стічних вод, забруднених важкими металами. [12]. Проте важливим та малодослідженим питанням залишається вилучення саме наночастинок металів шляхом фіторемедіації. За багаторічними дослідженнями [13, 14, 15, 16, 17], перспективними в цьому плані є плейстофіти – рослини, метаболізм яких може швидко перебудовуватися у разі зміни чинників середовища. Тому дослідження стійкості гідромacroфітів за біохімічними та морфометричними показниками, визначення акумуляційної здатності та порівняння рослин за переліченими характеристиками дає змогу визначити види, найпридатніші для фіторемедіації техногенно забруднених водойм від наночастинок металів.

Практичне значення отриманих результатів: Плейстофіти, що виявились найкращими акумуляторами наночастинок, при цьому зберігаючи свою життєздатність в умовах забруднення, можуть бути використані для:

- розробки технології доочищення стічних вод від наночастинок металів;
- створення біологічних ставків для промислових підприємств, які задіяні у нановиробництві;
- очищення антропогенно забруднених наночастинками металів природних водойм.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом проведено пошук необхідної інформації, підтримувався в акваріумній культурі матеріал дослідження, виконано експериментальні дослідження, аналіз і статистичну обробку результатів, а також графічну підготовку результатів до написання та публікації статей. Ідею роботи, тему, мету та завдання узгоджено з науковим керівником, д.б.н., професором Мусієнко М. М. Консультаційна підтримка та супровід при проведенні досліджень, інтерперетації та узагальненні результатів надавались д.б.н, професоркою, завідуючою кафедрою біології рослин Таран Н.Ю. та к.б.н,

доцентом кафедри біології рослин Ольхович О. П. В обговоренні результатів брали участь співавтори публікацій.

Апробація матеріалів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи доповідались на наступних наукових конференціях:

1. Шевченківська весна 2016: Біологічні науки. 6-8 квітня. Київ. – 2016;
2. International Research and Practice Conference “Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2016)” Lviv, August 24-27, 2016;
3. XIII міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології». Львів, 25-27 квітня 2017;
4. Біотехнологія: звершення та надії VII Міжнародна науково-практична конференція НУБіП України (29-30 листопада 2018 року, м. Київ);
5. XV Міжнародна наукова конференція “Молодь і поступ біології”, присвячена 135 річниці від дня народження Якуба Парнаса. Львів, Україна, 9–11 квітня 2019 року.;
6. Сучасні аспекти збереження здоров’я людини. XII Міжнародна міждисциплінарна науково-практична конференція, Ужгород, 2019.;
7. International research and practice conference (NANO-2019), 27-30 August 2019, Lviv.;
8. XVIII Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances» (м. Київ, 23-25 квітня 2020 р.);
9. 6th International Conference “Nanotechnology” G T U n a n o 2 0 2 1. Georgian Technical University. Tbilisi. Georgia 4 – 7 October. 2021.

Публікації: За матеріалами дисертаційного дослідження опубліковано 15 наукових праць: 6 статей у міжнародних виданнях , 5 з яких індексуються в наукометричній базі даних SCOPUS та 9 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з вступу, п'яти розділів (огляд літератури, матеріали та методи дослідження, та три розділи з результатами власних досліджень та їх обговоренням, узагальнення результатів, висновки, список використаних джерел, що містить 153 джерела. Дисертаційну роботу викладено на 102 сторінках, в ній представлено 30 рисунків та 6 таблиць.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Застосування наночастинок металів у сучасних технологіях

Застосування новітніх технологій сьогодні передбачає використання металів у формі наночастинок та набуває значної популярності в різних галузях промисловості, в тому числі в медичній, військовій, сільськогосподарській та електроніці [18], що підвищує ризик їх потрапляння до навколишнього середовища та потенційних негативних наслідків [19].

Наночастинками, зазвичай, називають частинки розміром від 1 до 100 нм. Підвищений інтерес до наноб'єктів викликаний особливими фізичними та хімічними властивостями, специфічною біологічною дією, яка часто радикально відрізняється від властивостей цієї ж речовини у формі суцільних фаз або мікроскопічних дисперсій. Деякі з них мають покращену теплопровідність та електропровідність, інші проявляють себе як більш міцні та стійкі матеріали (залишаючись при цьому легкими), мають покращену каталітичну активність та високі оптичні властивості [18].

Сьогодні наночастинки металів використовують у промисловості: при створенні нових каталізаторів для потреб нафтохімічної промисловості (одними з найбільш перспективних є наночастинки мангану), при виробництві прозорих покривних покриттів, для створення сплавів, керамік і композитів з покращеними властивостями, мастильних та абразивних матеріалів, покриттів і захисних плівок. Нанотехнології набули широкого використання практично у всіх сферах сільськогосподарства: рослинництві, тваринництві, птахівництві, ветеринарії, переробній промисловості, виробництві сільськогосподарської техніки і т.д. [20], Їх застосовують як нанодобрива, для пришвидшення росту та розвитку культур. Розчинами з наночастинками металів проводять передпосівну та післязборову обробку насіння пшениці, буряків, картоплі, що зумовлює підвищення їх

урожайності та терміну зберігання [21, 22]. Така обробка підвищує стресостійкість рослин та поліпшує якість сільськогосподарської продукції.

Наночастинки срібла (Ag) належать до найпоширеніших інженерних наноматеріалів, що застосовують в медицині, промисловості та сільському господарстві [23]. В медичній сфері, зокрема, для доставки ліків і діагностики ушкоджень. Є дані про можливість застосування наночастинок для діагностики та лікування різноманітних (в тому числі онкологічних) захворювань, а також в імунохімічних методах. Показано, зокрема, що наночастинки срібла можна використовуватис для отримання різноманітних матеріалів з бактерицидними властивостями [24]. На основі наноструктурованих мембран виготовляють сорбенти з високими адсорбційними характеристиками та фільтри для очищення рідин. Поширеним матеріалом є оксид цинку (ZnO), який широко використовують у промисловості при нанесенні композиційних покриттів [25]. Наночастинки металів також активно використовуються в сучасній військовій сфері, з метою покращення процесів отримання, обробки, зберігання та відображення інформації (наноелектроніка); властивостей матеріалів (наноматеріали); і як захист від хімічної та біологічної зброї (наносенсори) [3].

1.2. Проблема забруднення водою наночастинками металів

У зв'язку зі стрімким залученням продуктів нанотехнологій у різні сфери виробництва [26, 27, 28], потрапляння їх з промисловими викидами до природного середовища, насамперед водного, є неминучим.

Потрапляння наночастинок металів у природні водойми може призвести до небажаних змін [4, 5]. Оскільки вплив наночастинок металів на екосистему водойм досі не є з'ясованим, він потребує подальшого вивчення.

1.3. Вплив наночастинок металів на живі організми

Оскільки наночастинки металів мають зовсім інші фізико-хімічні властивості, ніж основні форми металів, вони по-іншому впливають на живі організми [29].

Відомо, що наночастинки металів спричиняють зміни на клітинному рівні, підвищуючи або знижуючи ефективність біохімічних реакцій, що лежать в основі стійкості рослин до пошкоджуючих факторів. Наночастинки, потрапляючи в організм, здатні пошкоджувати біологічні мембрани, впливати на функції біологічних молекул, в тому числі і молекул генетичного апарату клітини та клітинних органел (мітохондрій, хлоропластів), що призводить до порушення регуляторних процесів і загибелі клітини. Механізм негативного впливу нанооб'єктів на живі структури пов'язаний з утворенням за їх присутності вільних радикалів, в тому числі пергідратів, а також з виникненням комплексів з нуклеїновими кислотами [30].

Токсичність наночастинок залежить від їх розмірів, площі поверхні, кількості, середовища, в якому вони знаходяться. Із зменшенням розмірів токсичність підвищується. Експериментальні дані свідчать про здатність наночастинок з неймовірною легкістю долати захисні механізми та бар'єри організму [31]. Проникнувши через мембрани клітин, вони отримують доступ до ядра, де можуть прямо взаємодіяти з ДНК, спричиняючи пошкодження геному. Крім того, якщо наноматеріали накопичуються в клітині, не потрапивши до ядра, вони все ще мають змогу прямо контактувати з ДНК під час мітозу під час руйнування ядерної мембрани, призводячи до виникнення хромосомних аберацій [18].

Утворення вільних радикалів є важливим фактором, що підтверджує токсичні властивості наночастинок. Сучасні дослідження свідчать про те, що більшість негативних ефектів наноматеріалів на клітини, органи і тканини організму пов'язані з механізмами вільнорадикального перекисного окислення. Ці процеси зумовлені АФК, які утворюються на поверхні наночастинок через процеси

гетерогенного хімічного каталізу. Виявлення каталітичних властивостей у наночастинок має велике значення при оцінці їхньої потенційної небезпеки [32, 33, 34].

1.4. Фіторемедіація як ефективний метод очищення водойм від забруднюючих речовин

Фіторемедіація водойм з використанням вищих водних рослин є особливо перспективним методом. Ефективність її застосування залежить від умов, біотехнологічного процесу та виду рослини [35]. Рослини-ремедіанти різняться між собою за інтенсивністю накопичення токсикантів у тканинах і за швидкістю приросту біомаси [36].

Фіторемедіація відбувається за рахунок таких механізмів як фітоекстракція, фітостабілізація, фітоволатилізація та ризофільтрація під час поглинання або накопичення важких металів у рослині [10, 37]. Фітоекстракція, також відома як фітоаккумуляція, передбачає поглинання металів коренями рослини, а потім їх перенесенням до стебла та листків. Після завершення фітоекстракції рослину біомасу можна зібрати і спалити з метою отримання енергії, а також за необхідності відновити накопичений метал з рослинного попелу [38, 39]. Фітоекстракція є одним з механізмів, що використовують плейстофіти при вилученні металів з води [40, 41]. Фітостабілізація передбачає використання рослин для комплексування та дезактивації забруднювачів. Ця технологія в основному застосовується для очищення ґрунтів [42, 43]. Ризофільтрація - це метод, що ґрунтується на здатності рослин створювати мікросередовище, що сприяє концентрації поллютантів навколо кореневої системи та проникненню їх в рослинний організм [44, 45]. Такі фактори, як зміна рН у ризосфері та кореневі виділення, сприяють накопиченню важких металів на поверхні коренів. Після того, як рослина поглине всі забруднення, їх разом з рослиною легко можна видалити і утилізувати [46]. Рослини для ризофільтрації повинні утворювати сильно розгалужену кореневу систему. Ризофільтрацію можна використовувати

для очищення водоїм за допомогою водних макрофітів [47, 48]. Фітоволатилізація є процесом, в якому рослина перетворює забруднення на газоподібні речовини, з подальшим виділенням їх у навколишнє середовище через породи рослини [49, 50]. Плаваючі на поверхні води макрофіти використовують механізми фітоекстракції та ризофільтрації (рис 1.1).

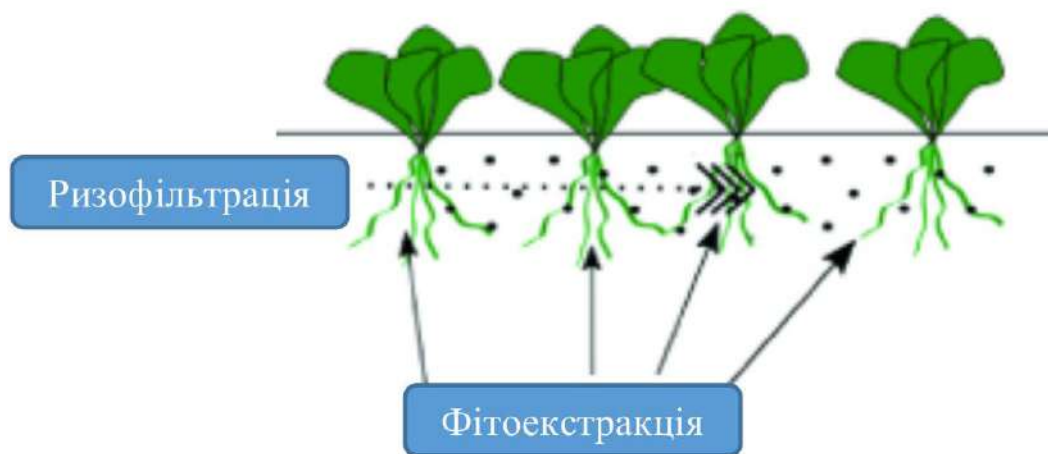


Рис.1.1. Механізми вилучення забруднюючих речовин з водного середовища
плейстофітами

Відомо, що водні рослини здатні до інтенсивного поглинання різних забруднюючих речовин з води [51, 52, 53]. Фіторемедіація має численні переваги, серед яких варто відзначити високу ефективність очищення, що не поступається фізичним та хімічним методам, низьку вартість впровадження, екологічну безпеку, можливість подальшої екстракції цінних речовин з рослинної біомаси [54, 55] і можливість моніторингу процесу очищення. Легкість культивування водних макрофітів, висока продуктивність біомаси, швидкий темп росту та висока стійкість до несприятливих умов навколишнього середовища, разом з високим потенціалом акумуляції забруднюючих речовин, роблять їх потенційними фіторемедіантами [56].

1.5. Застосування водних макрофітів у фіторемерації водоєм

Фіторемерація із застосуванням водних макрофітів є економічно ефективною та ресурсозберігаючою технікою очищення від забруднень [57].

Акумуляція та вилучення важких металів з навколишнього середовища шляхом фіторемерації вже широко застосовується. Акумуляція арсену, кадмію та інших важких металів такими видами як *Pteris vittata* та *Brassica juncea* вже добре вивчена. Є дані про акумуляцію важких металів в листках та коренях *Arabidopsis* та *Tobacco* [58], ефективне поглинання наночастинок оксиду цезію рослинами кукурудзи [59].

В багатьох дослідженнях була продемонстрована здатність водних макрофітів ефективно вилучати ВМ з водного середовища [60, 61, 62, 63]. Ця здатність обумовлена поглинанням токсичних металів і утворенням комплексних сполук [64, 65].

Водні рослини, зокрема плейстофіти також вже встигли зарекомендувати себе як ефективні фіторемеранти: *Eichhornia crassipes* [66], *Salvinia minima* [67], *Lemna minor*, *Spirodela intermedia* [68, 69], *Pistia stratiotes* [70], water cress *Nasturtium officinale* [71]. Потенціал цих плейстофітів для видалення важких металів детально вивчається в наступних дослідженнях [72, 73, 74].

Водні рослини не однаково реагують на присутність у середовищі високого вмісту металів. Є види, які, завдяки особливостям метаболізму, мають переваги в стійкості по відношенню до токсичного впливу металів і здатні вилучати їх із водного середовища [75, 76, 77, 78]. У деяких роботах досліджена здатність різних частин рослин видаляти наночастинок [79, 80].

Біоінженерні споруди з такими рослинами як *Pteris vittata* та *Eichhornia crassipes* вже використовуються для очищення стічних вод, забруднених важкими металами. *Spartina alterniflora* та *Phragmites australis* також показали високу ефективність у вилученні важких металів із стічних вод у біоінженерних спорудах [81].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали досліджень

Для визначення акумулюючої здатності, можливості вилучення наночастинок із водного розчину, стійкості до ушкодження та перспективності використання водних рослин як фіторемедіантів технічних водойм були досліджені три види плейстофітів (плаваючих на поверхні води рослин) – *Limnobium laevigatum* (Humb.& Bonpl.Ex Willd.), *Pistia stratiotes* L., *Salvinia natans* (L.) All. (Рис 2.1 - 2.3). Дані рослини були обрані, ґрунтуючись на результатах наших досліджень [82], в яких плейстофіти показали значно вищу стійкість до пошкоджуючого впливу наночастинок металів, ніж гідатофіти (занурені у товщу води макрофіти). Нами було зроблено припущення, що це пов'язано з відсутністю безпосереднього контакту фотосинтезуючих частин рослин з наночастинками металів та наявністю бар'єру між ними та кореневою системою, що лімітує надходження наночастинок в листки рослин, тим самим захищаючи найважливіші для функціонування рослини органи.

***Pistia stratiotes* L.** (Пістія тілорізоподібна)

Таксономічне положення:

Царство: Зелені рослини (*Viridiplantae*)

Відділ: Вищі рослини (*Streptophyta*)

Надклас: Покритонасінні (*Magnoliophyta*)

Клас: Однодольні (*Liliopsida*)

Порядок: Частухоцвіті (*Alismatales*)

Родина: Ароїдні (*Araceae*)

Рід: *Pistia*

Вид: *Pistia Stratiotes*



Рис. 2.1. Пістія тілорізоподібна (*Pistia stratiotes* L.).

Pistia stratiotes є плейстофітом, що має розетку великих, бархатистих листків блакитно-зеленого кольору. Діаметр розетки може досягати 25 см, а висота - 15 см. *P. stratiotes* має добре розвинену кореневу систему, що складається з великої кількості довгих корінців завдовжки до 25-30 см. Розмножується *P. stratiotes* переважно вегетативно за допомогою дочірніх розеток, але також може самозапильоватися. Утворення заростей відбувається переважно за рахунок насінневого розмноження. Насіння *P. stratiotes* проростають після кількох тижнів періоду спокою при температурі не нижче 20°C. Насінина зберігають життєздатність при температурі до 4°C і можуть пережити короткотривалий вплив температур нижче -5°C. Оптимальна температура води для дорослих рослин виду коливається від 24 до 30°C, а рівень рН середовища повинен бути в діапазоні від 6 до 9. *P. stratiotes* не стійка до морозу, і при температурах нижче 10°C рослина гине [83].

***Salvinia natans* (L.) All. (Сальвінія плаваюча)**

Таксономічне положення:

Царство: Зелені рослини (*Viridiplantae*)

Відділ: Папоротеподібні (*Polypodiophyta*)

Клас: Папоротеві (*Polypodiopsida*)

Порядок: Сальвінієві (*Salviniales*)

Рід: *Salvinia*

Вид: *Salvinia Natans*



Рис. 2.2. Зовнішній вигляд рослини *Salvinia natans* (L.) All.

Salvinia natans - це невелика плаваюча різноспорова папороть. У неї є горизонтальне стебло завдовжки 3-8 см, яке часто утворює відгалуження, що можуть відділятися від материнської рослини. Під час розвитку листків у *S. natans* два листкові примордії перетворюються на плаваючі ваї, а третій - формує коренеподібну структуру, яка розсічена на багато сегментів. У рослини відсутня коренева система. В науковій літературі визнано, що занурені органи у представників роду *Salvinia* фактично є видозміненими листками [84, 85]. Оскільки на поверхні плаваючих вай міститься велика кількість гідрофобних трихом, вони не змочуються водою. *S. natans* є гідрофітом з літньо-зеленим феноритмотипом. Восени, з приходом холодів, вегетативні органи рослини поступово відмирають. Біля основи стебла формуються зимуючі бруньки, відомі як туріони, які потім осідають на дно водойми. Навесні вони спливають на поверхню та розпочинають новий цикл росту. *S. natans* також розмножується за допомогою спор, які дозрівають у сорусах восени та випадають на дно водойми.

Навесні спори проростають і дають початок новим рослинам. Вид є невибагливим до хімічного складу води, проте вимагає високої температури та яскравого освітлення. Оптимальна температура води становить 20-28°C, а рН знаходиться у діапазоні 5.5-9.0.

***Limnobium laevigatum* (Humb.& Bonpl.Ex Willd.)** (Лімнобіум)

Таксономічне положення:

Царство: Зелені рослини (*Viridiplantae*)

Відділ: Вищі рослини (*Streptophyta*)

Надклас: Покритонасінні (*Magnoliophyta*)

Клас: Однодольні (*Liliopsida*)

Порядок: Частухоцвіті (*Alismatales*)

Родина: Водокрасові (*Hydrocharitaceae*)

Рід: *Limnobium*

Вид: *Limnobium laevigatum*



Рис. 2.3. Загальний вигляд рослини *Limnobium laevigatum* (Humb.& Bonpl.Ex Willd.)

Limnobium laevigatum є водною рослиною з округлою розеткою, утвореною з плаваючих листків діаметром 2-3 см. Це прісноводна багаторічна рослина. Її

пагони вільно плавають і не розгалужуються. Листки розташовані на поверхні води або підняті на черешках. Вони широко еліптичної форми з серцеподібним або тупим кінцем. Нижня поверхня плаваючого листка має добре розвинену аеренхіму, а верхня поверхня гладенька, глянцева і вкрита кутикулою. *Limnobium laevigatum* легко розмножується за допомогою молодих пагонів. Ця рослина є однодомною, тобто на одній рослині розвиваються як чоловічі, так і жіночі квітки. Квітки мають зеленувато-білий або жовтуватий колір. Температура води, в якій може рости *Limnobium laevigatum*, коливається від 20 до 30 °С, проте, тривале перебування в холодній воді сповільнює його ріст. *Limnobium laevigatum* потребує інтенсивного освітлення впродовж щонайменше 12 годин на добу [86].

2.1.1. Умови культивування досліджуваних плейстофітів

Культури досліджуваних плейстофітів вирощували в акваріумах місткістю 40-120 л на відстояній водогінній воді за оптимальних умов: освітлення 4000 - 5500 лк, періодичності освітлення – 16 год світла/8 годин темряви, температури води 17-26°C, рН 6-8.

В експерименті використано колоїдні розчини наночастинок металів, які були отримані з НУБіП України. Їх було створено на кафедрі технології конструкційних матеріалів і матеріалознавства способом диспергування гранул металів імпульсами електричного струму у воді за амплітуди 100-2000 А. Розділення частинок за розмірами було досить вузьке, при цьому їх максимальний розмір не перевищував 100 нм [87].

Дослідні рослини (1 г на 100 мл води), вміщували у скляні посудини об'ємом 0,5 л заповнені сумішшю колоїдних розчинів наночастинок металів (Mn – 0,75 мг/л, Cu – 0,37 мг/л, Zn – 0,44 мг/л, Ag⁺ Ag₂O – 0,75 мг/л) і витримували впродовж 14 діб за таких самих умов температури, інтенсивності та періодичності освітлення, що і під час вирощування (рис 2.4).



А



Б



В

Рис 2.4. Загальний вигляд плеїстофітів під час експозиції (А – *P. stratiotes*; Б – *S. natans*; В – *L. laevigatum*).

На 7-му та 14-ту добу проводили візуальне обстеження рослин, визначення вмісту пігментів, білка, амінокислот, ацилкарнітинів, фенольних сполук, терпеноїдів, каталазної активності та вмісту досліджуваних наночастинок у воді, в якій експонували рослини.

2.2. Методи досліджень

2.2.1. Визначення вмісту фотосинтетичних пігментів

Для визначення вмісту пігментів наважку повітряно-сухої маси рослин (0,1 г) гомогенізували з 0,5 г скляного порошку та 0,5 г $\text{Na}_2(\text{SO}_4)_{\text{безв.}}$. Гомогенат переносили в скляну колонку з фільтром, додавали 3 мл ацетону і відфільтровували. Для визначення вмісту пігментів 100 мкл ацетонового екстракту переносили в пробірку і додавали 3 мл ацетону. Екстракт пігментів аналізували на спектрофотометрі «ShimadzuUV-1800» за довжини хвиль 440, 649 та 665 нм.

Кількісний вміст пігментів (мг/мл) розраховували за відповідними формулами [88]. Вміст пігментів розраховували на 1 г сухої речовини.

2.2.2. Визначення вмісту білка, амінокислот та ацилкарнітинів із однієї наважки

Для визначення вмісту білка, амінокислот та ацилкарнітинів наважку повітряно-сухої маси рослини (0,2 г) гомогенізували з 0,5 г скляного порошка та 0,5 г $\text{Na}_2(\text{SO}_4)$ безв. Гомогенат переносили в скляну колонку з фільтром, додавали 3 мл ацетона і відфільтровували.

Вміст білка визначали біуретовим методом [89]. Оптичну щільність при 550 нм вимірювали на спектрофотометрі «Shimadzu UV-1800».

Визначення вмісту амінокислот та ацилкарнітинів проводили методом тандемної мас-спектрометрії [90] за допомогою мас-спектрометра AB Sciex 2000 з автосамплером Ultimate 3000 (Dionex).

2.2.3. Визначення вмісту фенольних сполук та терпеноїдів

Для визначення вмісту вторинних метаболітів, а саме – фенольних сполук та терпеноїдів 2 г сировини рослини (рис 2.5) заморожували при температурі -20°C , потім ретельно розтирали і заливали метанолом з розрахунку 10 см^3 на 1г сировини. Екстракцію проводили методом мацерації протягом 24 годин [91].



А



Б



В

Рис. 2.5. Зовнішній вигляд дослідних зразків плеїстофітів (А – *P. stratiotes*; Б – *S. natans*; В – *L. laevigatum*).

Вміст досліджуваних вторинних метаболітів визначали методом високоефективної рідинної хроматографії на приладі Agilent 1100. Розділення проводили на колонці Poroshell 120 EC-C18 2,1x150 мм 2,7 мкм. Ідентифікацію речовин здійснювали за допомогою діодно-матричного детектора при довжині хвиль 206, 254, 300, 350 та 450 нм. Для зручності інтерпретації результатів досліджень, всі значення за досліджуваними показниками було переведено у відсотки. Відсотковий вміст розраховували за площами піків без використання поправочних коефіцієнтів. За 100% було прийнято найбільшу кількість певної досліджуваної сполуки із усіх досліджуваних зразків.

2.2.4. Визначення активності каталази

Активність каталази визначали методом Баха і Опаріна. Цей метод ґрунтується на здатності нерозкладеного під дією каталази пероксиду водню, кількісно взаємодіяти з розчином перманганату у кислому середовищі. Реакція пероксиду з розчином KMnO_4 призводить до зміни його кольору [92].

Зміну забарвлення вимірювали спектрофотометричним методом. Концентрацію каталази у зразку визначали за калібрувальною кривою, побудованою на основі відомих стандартних розчинів каталази.

Розрахунок активності каталази (С, МО/г) проводили за формулою:

$$C = \frac{(A - B) \cdot 50 \cdot V}{V_{AL} \cdot \tau \cdot m}, \text{ де}$$

А – об'єм 0,1 н розчину KMnO_4 , витраченого на титрування контрольного зразка, мл; В – об'єм 0,1 н розчину перманганату калію, витраченого на титрування дослідного зразка, мл; 50 – титр KMnO_4 (1 мл 0,1 н розчину перманганату калію відповідає 50 мкмоль пероксиду водню); V – об'єм водної витяжки ферменту (100 мл); V_{AL} – об'єм аліквоти каталази (20 мл); m – маса наважки, г; τ – час, хв (30 хв). Для зручності інтерпретації результатів досліджень, всі значення за досліджуваними показниками було переведено у відсотки.

2.2.5. Визначення вмісту мінеральних елементів у тканинах рослин та воді

Для кількісного визначення мінеральних елементів у тканинах коренів та листків, рослини попередньо висушували за температури 105°C у сушильній шафі до досягнення сталої маси. Отриманий сухий матеріал подрібнювали та озолювали за допомогою азотної кислоти за методикою мікрохвильової пробопідготовки у Multiwave 3000 AntonPaar (Австрія). Вміст елементів в рослинних тканинах та зразках води визначали методом ІСР-спектрометрії на емісійному спектрофотометрі ІСАР6300 DuoMEC (США).

2.2.6. Вимірювання гідрохімічних показників води

Вміст кисню у воді вимірювали за допомогою портативного приладу – Hanna, рН – за допомогою рН-Meter PH-107, мінералізацію – за допомогою TDS Meter TDS-2.

2.2.7 Статистична обробка результатів

Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою програми Microsoft Office Excel, вони вважалися достовірними (за t-критерієм Стьюдента) за рівня значущості $p \leq 0,05$.

Кількість біологічних повторів та аналітичних повторностей у досліді – не менше трьох.

2.3. Схема експериментальної моделі для вивчення впливу інвазійного виду *Pistia stratiotes* на *Salvinia natans* та *Limnobium laevigatum*

Для прогнозування продуктивності фітоугруповань плейстофітів за впливу інвазійного виду *P. stratiotes* до скляних ємностей були внесені рослини за відповідною схемою:

1-ий варіант – 50% площі (S) поверхні води скляної ємності була вкрита *P. stratiotes*, 25% площі (S) поверхні води скляної ємності була вкрита *S. natans* (або *L. laevigatum*);

2-ий варіант – 25% площі (S) поверхні води скляної ємності була вкрита *P. stratiotes*, 25% площі (S) поверхні води скляної ємності була вкрита *S. natans* (або *L. laevigatum*);

3-ій варіант, або контроль – 25% площі (S) поверхні води скляної ємності була вкрита *S. natans* (або *L. laevigatum*) (рис. 2.6).



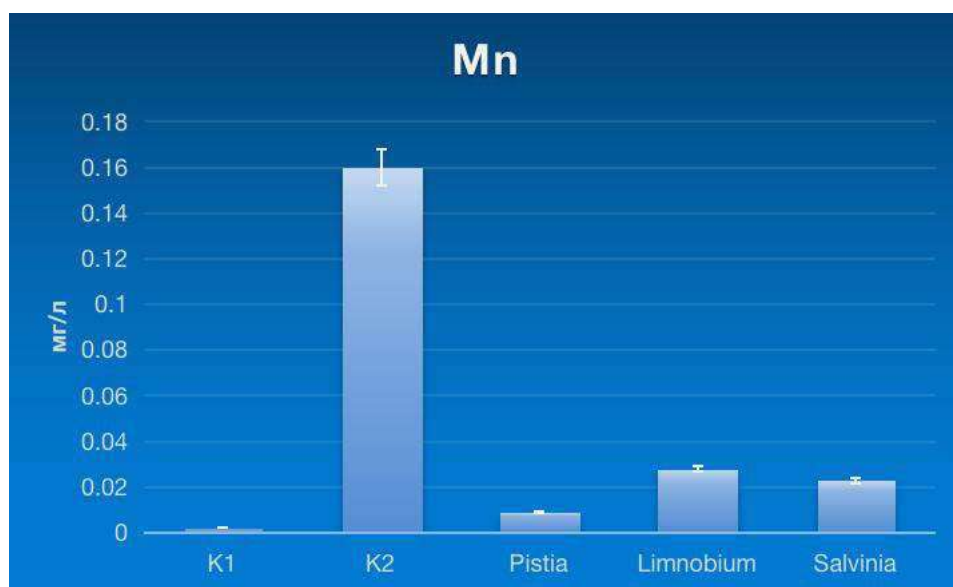
Рис. 2.6. Експериментальна модель для оцінки впливу *P. stratiotes* на *S. natans* та *L. laevigatum* за сумісної експозиції.

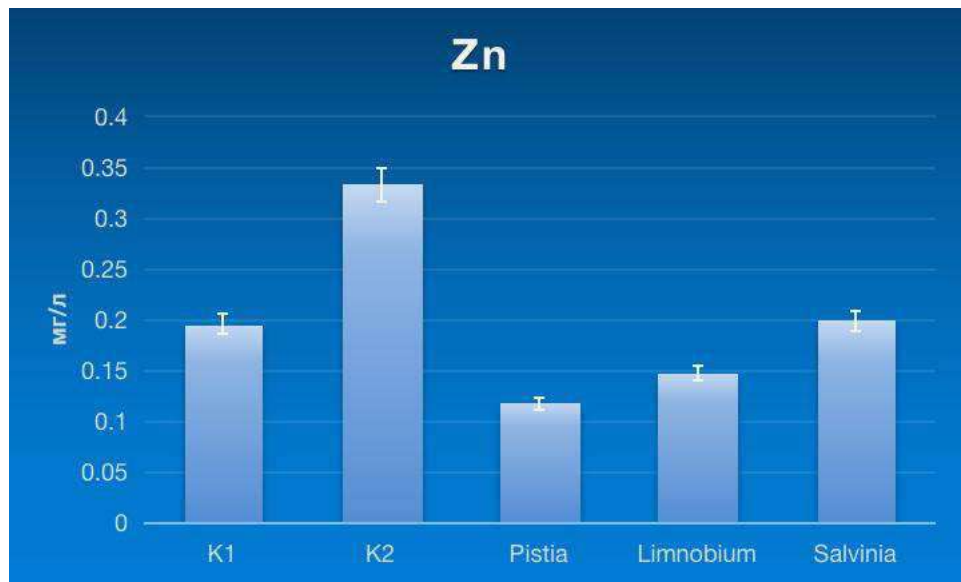
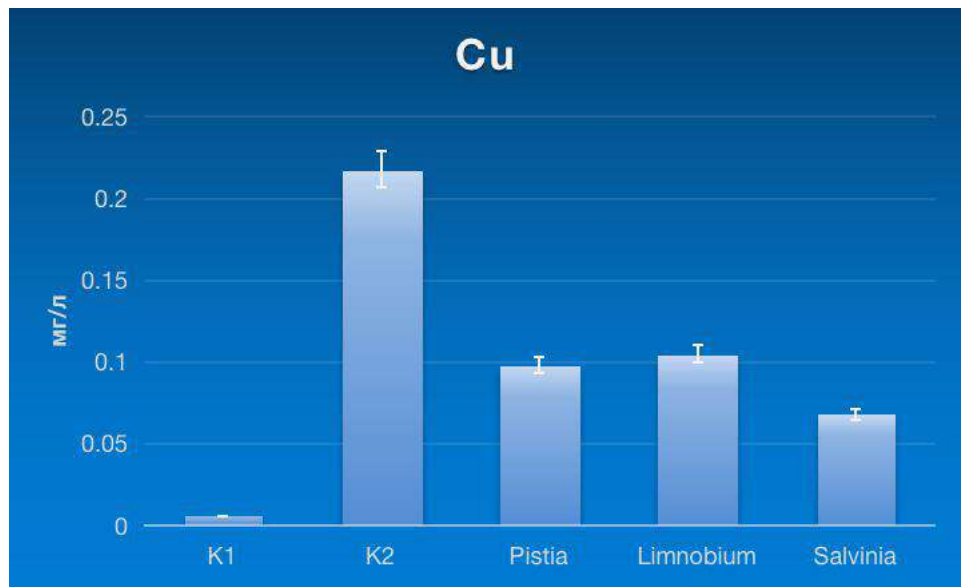
РОЗДІЛ 3

ВИЗНАЧЕННЯ ЗДАТНОСТІ ПЛЕЙСТОФІТІВ ДО ВИЛУЧЕННЯ НАНОЧАСТИНОК МЕТАЛІВ З ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА

Оскільки основною метою фітореMediaції є очищення водного середовища від забруднюючих речовин, важливо було визначити здатність до вилучення плейстофітами наночастинок металів із води [93].

Показано, що різні види плейстофітів мають різну здатність до вилучення наночастинок металів з водного середовища (Рис. 3.1).





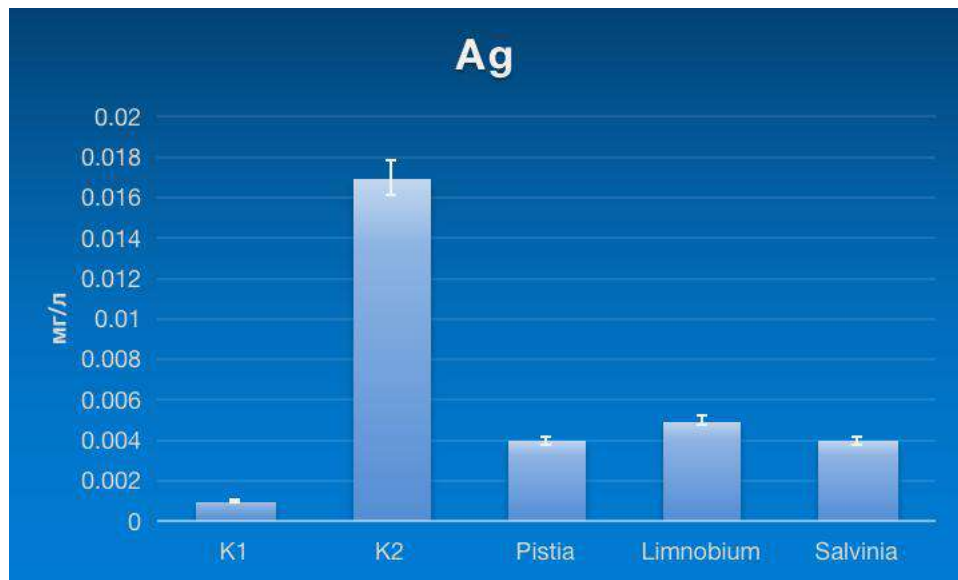


Рис. 3.1. Вміст елементів у воді після експозиції водних рослин впродовж 7-ми діб (K1 – відстояна водогінна вода, K2 – відстояна водогінна вода з додаванням колоїдних розчинів наночасток металів (Mn – 0,75 мг/л, Cu – 0,37 мг/л, Zn – 0,44 мг/л, Ag+Ag₂O – 0,75 мг/л))

Усі досліджувані плейстофіти показали високу здатність щодо видалення наночастинок Mn із суміші колоїдних розчинів досліджуваних елементів. Однак, за експозиції у водному розчині *P. stratiotes* видалення елементу відбувалось найкраще (аж на 94%). Показник вилучення наночастинок Mn двома іншими плейстофітами виявився не набагато нижчим: *S. natans* (на 86%) та *L. laevigatum* (на 82%).

Щодо такого елементу, як Cu у вигляді наночастинок, найкращий результат показала *S. natans* (відбулось вилучення елемента на 69%). Трохи нижчі та схожі між собою показники виявились у *P. stratiotes* (на 55%) та *L. laevigatum* (52%).

Отримано дані щодо вилучення плейстофітами наночастинок Zn з колоїдного розчину досліджуваних металів. Даний елемент найкраще вилучався за експозиції *P. stratiotes* (на 65%).

Кількість такого елементу, як Ag виявилась мінімальною після присутності у колоїдних розчинах наночастинок *P. stratiotes* і *S. natans* (на 76%), однак за експозиції *L. laevigatum* показник вилучення Ag виявився не набагато гіршим (на

71%), отже всі досліджувані види плейстофітів можуть бути рекомендовані для очищення водою від даного елемента.

Беручи до уваги усі досліджувані наночастинки металів можна стверджувати, що кращу здатність до вилучення їх з водного середовища мали *P. stratiotes* та *S. natans*.

Якщо оцінювати потенціал досліджуваних трьох видів плейстофітів щодо вилучення окремих елементів, найвищу здатність до вилучення Mn та Zn мала *P. stratiotes*, до видалення Cu – *S. natans*, а щодо наночастинок Ag – обидва види *P. stratiotes* та *S. natans* виявились однаково ефективними.

Існує багато даних щодо ефективності видалення досліджуваних наночастинок металів (Mn, Cu, Zn, Ag) плейстофітом *P. stratiotes* [14, 15, 94, 95] та *S. natans* [13, 96] в іонній формі.

У наукових роботах показаний негативний вплив металів на водні рослини у концентраціях, які є вищими за порогові значення для того, чи іншого виду. Відбуваються негативні зміни у фотосинтетичній системі, ушкодження різноманітних клітинних структур, зниження вмісту фізіологічно активних речовин (хлорофілу, білку, вільних амінокислот, РНК та ДНК). Це слід брати до уваги при рекомендації того, чи іншого виду для фітореMediaційних заходів. Тож дослідження резистентності водних рослин до різних концентрацій металів, зокрема визначення їх порогових показників набуває особливого значення і все активніше досліджується науковцями [97, 98, 99, 100].

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК МЕТАЛІВ НА ФІЗІОЛОГІЧНИЙ СТАН ПЛЕЙСТОФІТІВ

4.1. Оцінка морфологічних параметрів для визначення впливу наночастинок металів на окремі органи плейстофітів.

Під час експозиції рослин в розчинах наночастинок металів відбувалися чіткі зміни морфології коренів та забарвлення листків. Виявлено відмінності між станом рослин на 7-му та 14-ту добу. У *P. stratiotes* спостерігалися суттєві зміни лише на 14-ту добу (Рис. 4.1). У *L. laevigatum* – виявлено різку зміну пігментації листків і на 7-му і на 14-ту добу (Рис. 4.2). Щодо *S. natans* – стан плейстофіта залишився майже без змін на 7-му та на 14-ту добу (Рис. 4.3).



Рис. 4.1. Морфологічні зміни *P. stratiotes* за дії наночастинок металів (Mn, Cu, Zn, Ag) на 7-му та 14-ту добу.



Рис. 4.2. Морфологічні зміни *L. laevigatum* за дії наночастинок металів (Mn, Cu, Zn, Ag) на 7-му та 14-ту добу.



Рис. 4.3. Морфологічні зміни *S. natans* за дії наночастинок металів (Mn, Cu, Zn, Ag) на 7-му та 14-ту добу.

Відбулися значні морфологічні зміни кореневої системи рослин, що росли за присутності наночастинок. Коренева система усіх рослин у контрольних варіантах була гарно розвинена, мала світло-зелене забарвлення, на відміну від дослідних варіантів, де спостерігалось суттєве зменшення розмірів, і відповідно маси коренів, та зміна забарвлення зі світлого на темно-буре (рис. 4.4).

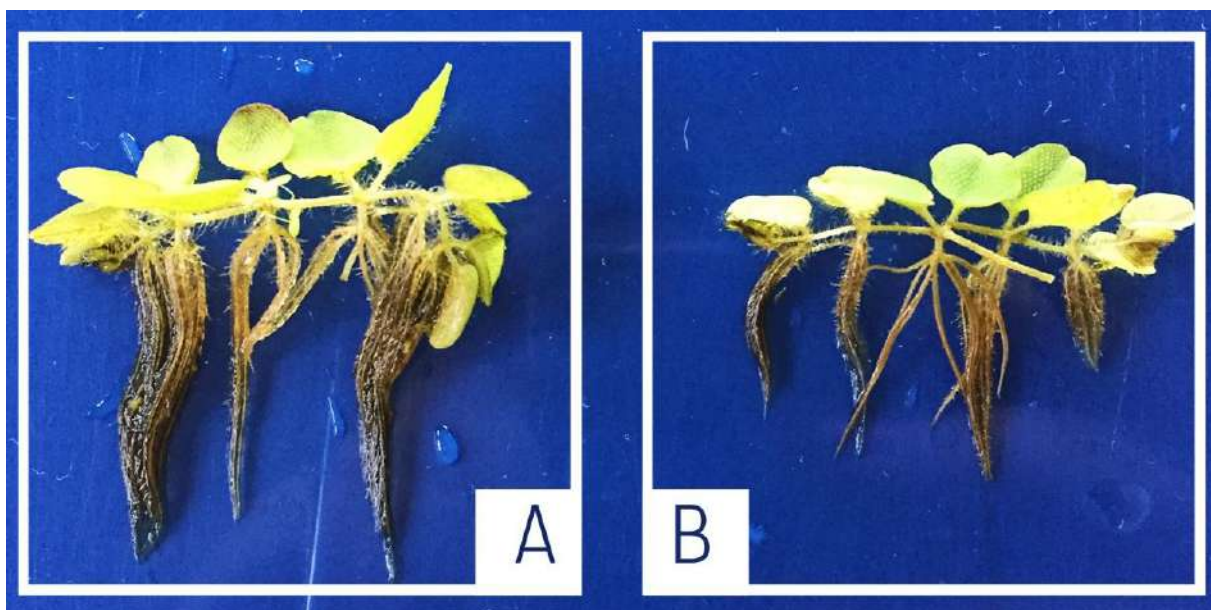


Рис 4.4. Морфологічні зміни кореневої ситеми *S. natans* за дії наночастинок металів (Mn, Cu, Zn, Ag) на 14-ту добу, А – контроль, В – дослід.

Відомо, що розвиток кореневої системи водних рослин пов'язаний з забезпеченням субстрату або водного розчину поживними речовинами. Нестача поживних елементів в контрольних варіантах стимулював ріст коренів. Наночастинки металів, в перші дні експерименту до 7-ї доби, на нашу думку, відігравали роль поживних елементів, гальмуючи ріст кореня, а вже на 14 добу, відмічався негативний ефект пов'язаний з пошкодженням коренів.

4.2. Фотосинтетичні параметри, як показники стрес-толерантності до наночастинок металів

Оскільки було виявлено морфологічні зміни та в деяких випадках суттєві зміни у забарвленні рослин, доцільним було провести аналіз вмісту хлорофілів та каротиноїдів всіх досліджуваних об'єктів, щоб встановити взаємозв'язок між змінами у морфології та станом фотосинтетичної системи плейстофітів для визначення видів, які є найбільш життєздатними та стійкими до наночастинок металів. Отримано дані щодо зміни вмісту хлорофілу *a* (рис. 4.5), хлорофілу *b* (рис. 4.6) та каротиноїдів (рис. 4.7) на 7-му та 14-ту добу.

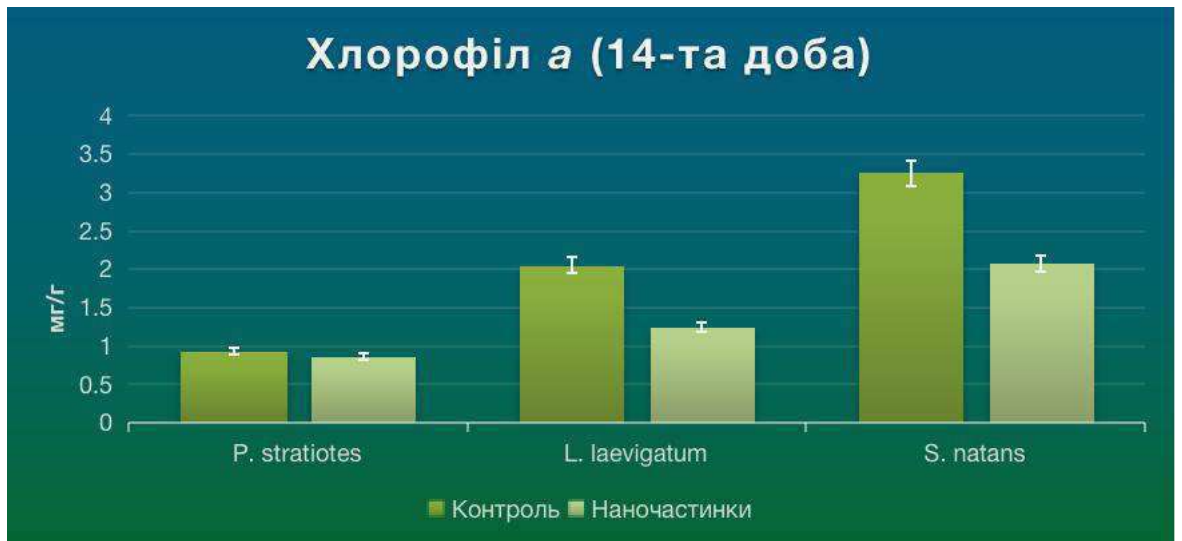
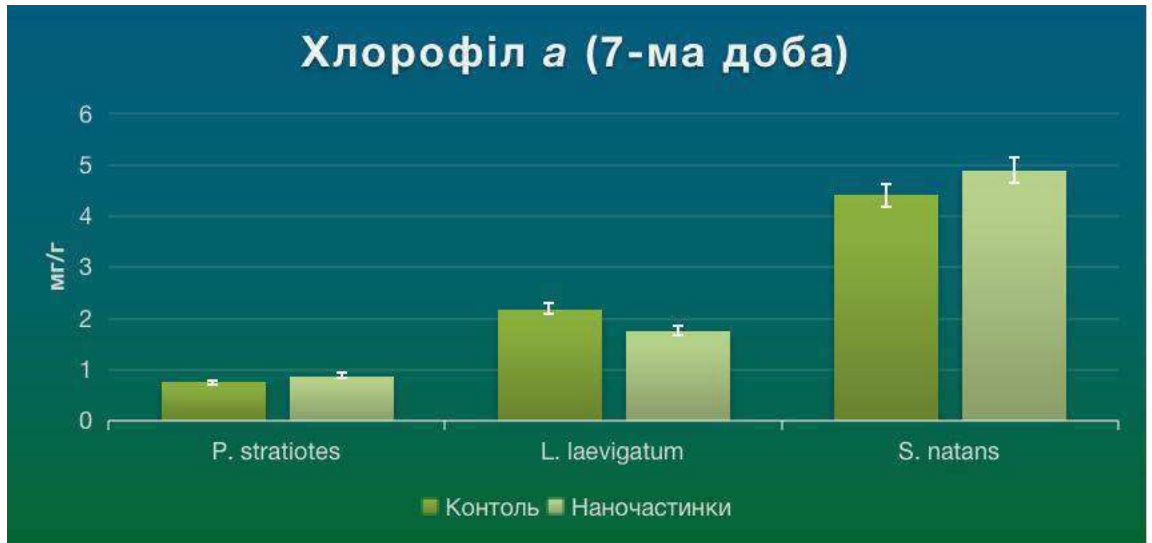


Рис. 4.5. Вміст хлорофілу *a* у досліджуваних плейстофітів за впливу суміші колоїдних розчинів наночасток металів (Mn, Cu, Zn, Ag) на 7-му та 14-ту добу.

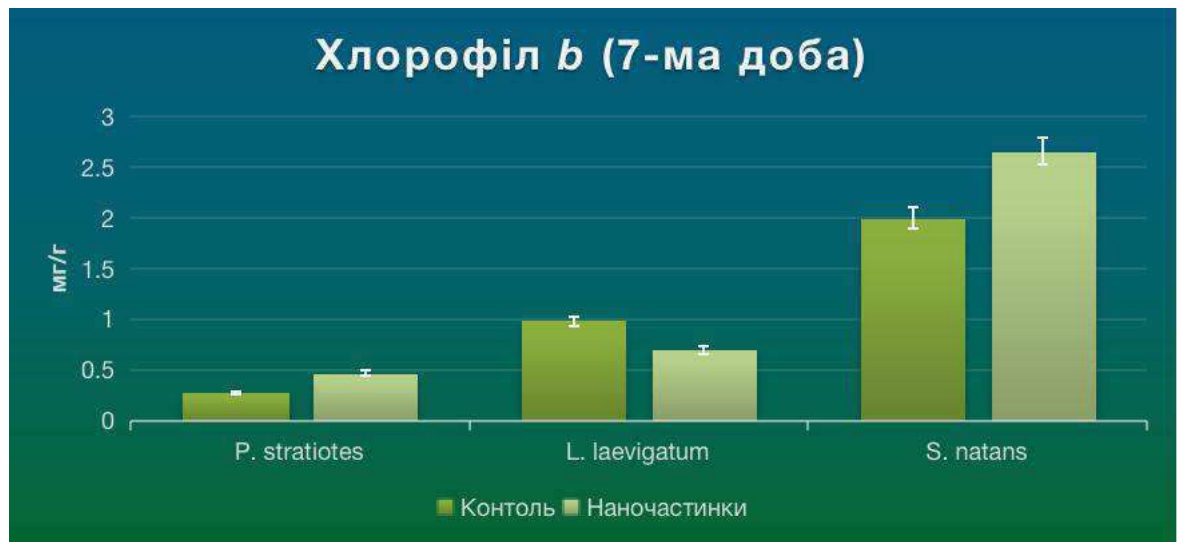


Рис. 4.6. Вміст хлорофілу *b* у досліджуваних плеїстофітів за впливу суміші колоїдних розчинів наночасток металів (Mn, Cu, Zn, Ag) на 7-му та 14-ту добу.

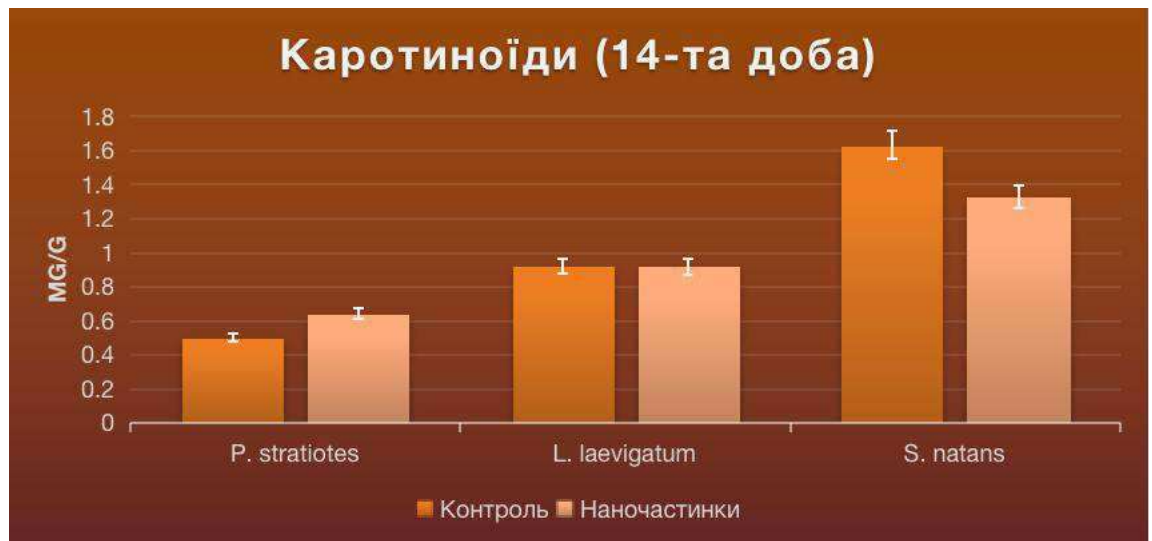
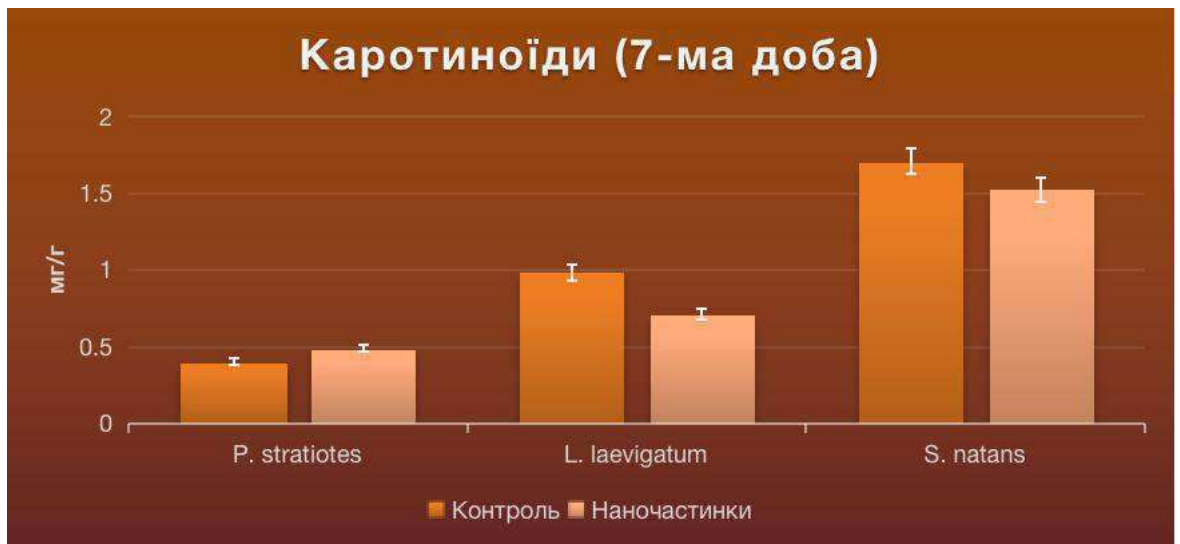


Рис. 4.7. Вміст каротиноїдів у досліджуваних плейстофітів за впливу суміші колоїдних розчинів наночасток металів (Mn, Cu, Zn, Ag) на 7-му та 14-ту добу.

Наночастинки металів спричинювали зменшення вмісту хлорофілу *a* та *b* в усіх досліджуваних рослин на 14-й день. Проте на 7-му добу у *P. stratiotes* та *S. natans*, навпаки, спостерігалось збільшення вмісту пігментів (хлорофілу *a* – на 18% та 11% відповідно, хлорофілу *b* – на 72% у *P. stratiotes* та 33% у *S. natans*). У *L. laevigatum* відбулося різке зниження вмісту хлорофілів *a* та *b* за дії наночасток металів: на 7-му добу – приблизно на 25% та 40% на 14-ту. Найменших змін зазнала *P. stratiotes*: вміст пігментів не знижувався більше ніж на 15% навіть на 14-ту добу.

Як правило, коли пошкодження та негативні зміни у вмісті хлорофілів є незначними, можна спостерігати підвищення кількісного вмісту каротиноїдів. У нашому випадку, цей ефект можна спостерігати у *P. stratiotes*, в якій вміст каротиноїдів збільшився більш ніж на 20%, що свідчить про стійкість фотосинтетичного апарату даного плейстофіта до досліджуваних наночастинок металів. Каротиноїди відіграють важливу роль в організмі рослин – перш за все, вони є активними учасниками процесу фотосинтезу, а також задіяні в ростових процесах, беруть участь в морфогенезі та розмноженні. Будучи допоміжними пігментами фотосинтетичної системи, розширюють спектр поглинання квантів двома піками в синьо-фіолетовій та синій областях спектра (420...490 нм) і незначною мірою в зеленій (490...550 нм). Таким чином, каротиноїди покращують ефективність фотосинтезу, поглинаючи до 20% енергії сонячних квантів, приблизно 50 % якої поглинається в області, що є короткохвильовою і є зоною високих енергій. Поглинаючи світло, каротиноїди передають енергію свого електронно-збудженого стану хлорофілу *a*.

Показано, що вплив наночастинок металів спричинив зниження вмісту каротиноїдів у *L. laevigatum* (на 7%) та *S. natans* (на 22%). Це свідчить про порушення всього фотосинтетичного апарату у цих рослин.

Отже, беручи до уваги отримані дані, найстійкішим плейстофітом за фотосинтетичними показниками виявилась *P. stratiotes*.

4.3. Оцінка вмісту білка та амінокислот у водних макрофітів за дії наночастинок металів для з'ясування ступеня пошкодження основних метаболічних систем цих рослин

Білковий обмін відіграє важливу роль у підтриманні життєздатності рослин, адже велика кількість білкових сполук бере активну участь у захисних реакціях рослинного організму на несприятливі фактори навколишнього середовища. Вміст білка у рослин залежить від видових особливостей. А також, ми припустили, що під негативним впливом наночастинок металів загальний вміст

білкових сполук, так як і їх амінокислотний склад, буде змінюватись. Зокрема за кількісним вмістом цих сполук можна визначити ступінь пошкодження та можливість адаптації до несприятливих умов. Зміна загального вмісту білка під дією наночастинок металів представлена на рис. 4.8.

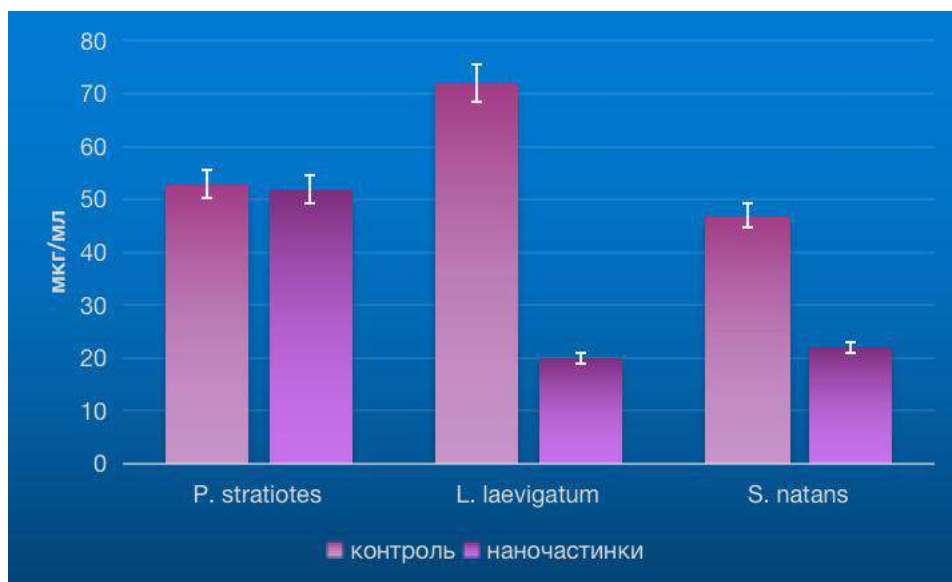


Рис. 4.8. Вміст білка у досліджуваних плейстофітах за сумісної дії наночасток металів (Mn, Cu, Zn, Ag) на 7-му добу.

Результати дослідження [101, 102] показали, що за дії наночастинок металів відбулось зниження кількісного вмісту білка у *L. laevigatum* та *S. natans*. Зменшення вмісту білкових сполук може бути наслідком порушення метаболізму азоту, спричиненого негативним впливом наночастинок на вказані вище плейстофіти. Враховуючи той факт, що азот є одним з найважливіших елементів у мінеральному живленні рослин та бере участь в утворенні ряду сполук, таких як нуклеїнові кислоти, коферменти, амінокислоти, то зміна вмісту даної речовини буде спричиняти гальмування росту та погіршення продуктивності водних рослин [103]. Щодо *P. stratiotes*, то вміст білка залишився без змін, що вказує на стійкість системи білкового метаболізму даного виду.

Щоб дослідити механізми захисту досліджуваних плейстофітів, в яких задіяний саме білковий метаболізм, нами було ідентифіковано 17 амінокислот

(5Oxo-Pro – 5-оксипролін, Ala – аланін, Arg – аргінін, Asp – аспарагінова кислота, Cit – цитрулін, Glu – глютамінова кислота, Gly – гліцин, His – гістидин, Leu – лейцин, Met – метіонін, Orn – орнітин, Phe – фенілаланін, Pro – пролін, Ser – серин, Trp – триптофан, Tyr – тирозин, Val – валін), також визначено їх кількісний вміст. Проведена порівняльна оцінка вмісту та співвідношення амінокислот, які є складовими білкових компонентів досліджуваних плейстофітів, після експозиції у суміші колоїдних розчинів наночастинок металів та в контрольних умовах (рис. 4.9-4.11).



Рис. 4.9. Вміст амінокислот у *P. stratiotes* за сумісної дії наночастинок металів (Mn, Cu, Zn, Ag) на 7-му добу.



Рис. 4.10. Вміст амінокислот у *L. laevigatum* за сумісної дії наночастинок металів (Mn, Cu, Zn, Ag) на 7-му добу.

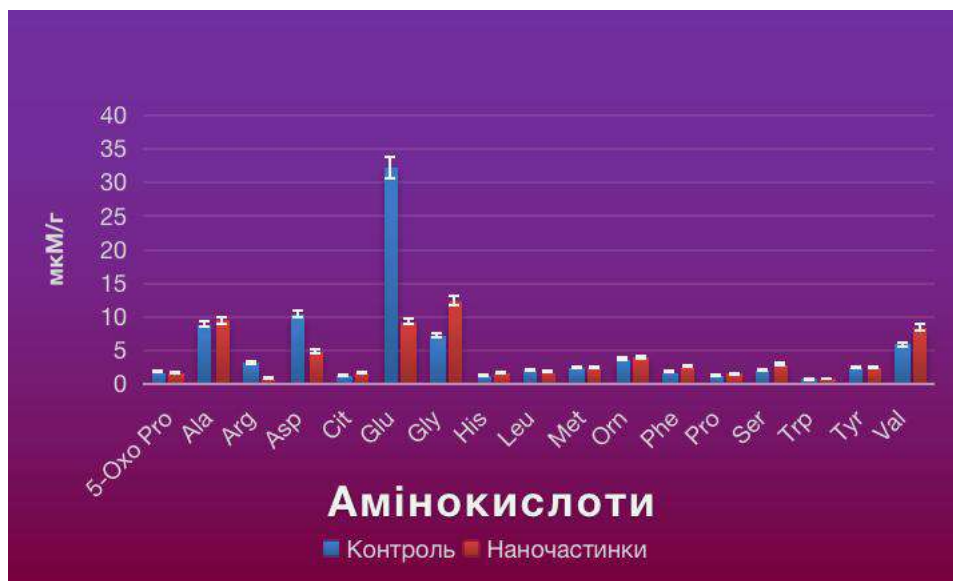


Рис. 4.11. Вміст амінокислот у *S. natans* за сумісної дії наночастинок металів (Mn, Cu, Zn, Ag) на 7-му добу.

Під впливом суміші колоїдних розчинів наночастинок металів у всіх досліджуваних плейстофітів відбулось зниження загального вмісту амінокислот. Для *S. natans* цей показник становив 23% (вміст зменшився з 90,08 мкМ/г до 69,59 мкМ/г), а для *P. stratiotes* та *L. laevigatum* відсотковий показник виявився

однаковим, вміст амінокислот зменшився на 8% (з 210,65 мкМ/г до 193,77 мкМ/г у *P. stratiote* та з 155,0 мкМ/г до 142,60 мкМ/г у *L. laevigatum*).

Оскільки у кожного плейстофіта відбулось зниження вмісту певного числа досліджуваних амінокислот, доцільним було проведення аналізу отриманих даних, щоб з'ясувати наскільки знизився вміст та яких саме амінокислот для кожного плейстофіта.

Вміст найменшого числа амінокислот (5-ти) зменшився у *P. stratiotes*. Ними були: 5-оксопролін, аргінін, аспарагінова кислота, лейцин та серин, не змінився у 3-х амінокислот, таких як гліцин, гістидин та пролін. Збільшення вмісту зазнали 6 амінокислот, а саме аланін, цитрулін, глутамінова кислота, метіонін, орнітин та фенілаланін.

У *S. natans* знизився кількісний вміст шести амінокислот, таких як 5-оксопролін, аргінін, аспарагінова кислота, глутамінова кислота, лейцин та триптофан, найбільше знизився вміст аргініну (у 3 рази), глутамінової (у 3 рази) та аспарагінової (у 2 рази) кислот, і, навпаки, підвищився вміст 9-ти амінокислот, а саме, аланіну, цитруліну, гліцину, гістидину, орнітину, фенілаланіну, проліну, серину та валіну. Підвищення вмісту амінокислот внаслідок негативної дії на плейстофіт наночастинок металів, може відбуватись внаслідок активації у рослині механізмів захисту, що супроводжується утворенням нових білкових сполук.

Вміст найбільшого числа амінокислот (9-ти) знизився у *L. laevigatum*, найзначніше – аргініну (в 10 разів). Вміст аспарагінової кислоти та метіоніну зменшився в 3 рази, глутамінової кислоти та триптофану в 2 рази та фенілаланіну в 1,7 раз. Вміст гліцину та тирозину залишився незмінним. Вміст шести інших амінокислот зменшився: найзначніше цитруліну - в 8 разів, 5-оксипроліну - в 2,4 рази, аланіну - в 2,1 рази, лейцину - в 1,7 рази, гістидину та серину - в 1,2 рази.

Проаналізувавши зміни вмісту окремих амінокислот виявили, що у *L. laevigatum* та *S. natans* внаслідок дії наночастинок металів підвищується вміст гістидину. Існують дані, що ця амінокислота активно синтезується в рослинах гіперакумуляторах металів [104]. Саме тому, можна зробити припущення, що дані види матимуть високий потенціал до акумуляції металів і у формі наночастинок.

Наші дослідження підтвердили, що підвищення вмісту гістидину в рослинах сприяє акумуляції більшої кількості металу. Відомо, що концентрація гістидину у рослин збільшується у відповідь на підвищення концентрації металу в навколишньому середовищі, утворюючи комплекси, наприклад є відомості про Zn-гістидиновий комплекс [105], та подібний до нього, комплекс з аспарагіною кислотою [106]. Проте у наших дослідженнях відбувалося зниження вмісту цієї амінокислоти у *L. laevigatum* в 3 рази, а у *S. natans* в 2 рази. У *P. stratiotes* вміст аспарагіну залишався сталим.

Також важливу роль в акумуляції металів відіграють такі амінокислоти, як гліцин та глютамінова кислота, вони задіяні в утворенні ряду сполук, що здатні зв'язувати метали, такі як глутатіон і фітохелатини [107]. Збільшення вмісту гліцину внаслідок впливу наночастинок металів відбулось лише у *S. natans*, а глютамінової кислоти – у *P. stratiotes*.

Існують відомості, що за участі аргініну відбувається синтез поліамінів - сполук, яким притаманні сигнальні та антиоксидантні властивості [107], але в жодного з досліджуваних нами плейстофітів не відбувалось підвищення вмісту аргініну під дією наночастинок металів.

Є дані про ще одну амінокислоту, яка відіграє важливу роль у захисті рослинного організму. Пролін - це амінокислота, що синтезується з глютамату чи орнітину, яка може слугувати акцептором вільних радикалів, стабілізатором макромолекул [108] а також хелатором [107]. Відомо, що рослини інтенсивно накопичують пролін у відповідь на несприятливі умови, такі як, наприклад, низька або висока температура, водний дефіцит, підвищена солоність, вплив підвищених концентрацій важких металів [109, 110, 111]. Збільшення вмісту проліну під дією наночастинок металів відбувалось у *S. natans* та *L. laevigatum*, а орнітину – у *S. natans* та *P. stratiotes*

Дані, що отримані в результаті дослідження, свідчать, що для захисту від надмірних концентрацій наночастинок металів активується ряд механізмів, внаслідок чого змінюється кількісний вміст окремих амінокислот. Отримані нами результати щодо синтезу окремих амінокислот узгоджуються з вже існуючими

даними стосовно взаємодії рослин з металами в іонній формі. В обох випадках відбувається активний синтез певних амінокислот, необхідних для захисту від негативного впливу металів, який проявляється у підтримці гомеостазу та включенні механізму репарації рослинного організму з метою збереження його життєздатності [76].

Таким чином, найстійкішою за показниками білкового обміну в умовах впливу наночастинок досліджуваних металів виявилась *P. stratiotes*. Здатність даного плейстофіту ефективно вилучати з водного середовища такі важкі метали як As, Cd, Cu, Ni, Zn, Pb, Cr, Mn, Co доведена в ряді праць інших дослідників, однак за високих концентрацій може відбуватись пошкодження органів рослини, внаслідок зниження вмісту важливих фізіологічно активних сполук: хлорофілів, білка, вільних амінокислот та РНК [14, 112, 113, 114].

Найчутливішим до досліджуваних наночастинок металів за показниками білкового метаболізму виявилась *S. natans*, хоча згідно з існуючими даними цей вид здатний до ефективної акумуляції [115], та вже успішно використовується з метою видалення важких металів [75, 76, 96]. Отже даний вид вартий подальшого вивчення та може бути використаний з метою фіторемедіації водойм, забруднених наночастинками металів.

4.4. Аналіз змін вмісту ацилкарнітинів як показник стійкості ліпідного метаболізму

Ліпідний метаболізм може відігравати роль маркера стрес-толерантності рослин до пошкоджуючого впливу наночастинок металів, оскільки відіграє важливу роль у формуванні механізмів стійкості рослин. Здатність швидко адаптуватись до несприятливих умов на рівні мембран мітохондрій, забезпечує сталість енергетичного обміну рослини. Ацилкарнітини є естерами L-карнітину та жирних кислот. За допомогою ацилкарнітинів відбувається включення довголанцюгових ЖК у процес β -окислення (рис 4.12).

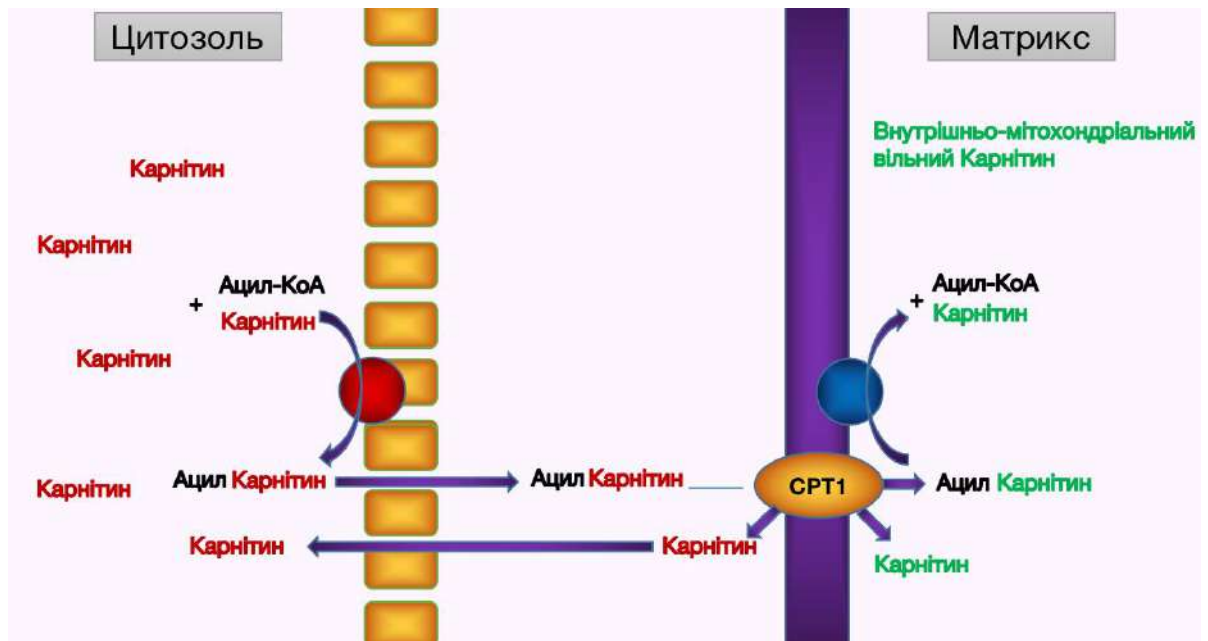


Рис. 4.12. Схематичне зображення процесу β -окислення ЖК

Вони відіграють роль переносників, транспортуючи активовані жирні кислоти до мітохондрій для подальшого β -окислення та надання енергії для клітинних процесів [116, 117]. Значне збільшення чи зменшення кількісного вмісту ацилкарнітинів та зміна їх складу є невід’ємними ознаками зміненого метаболізму мітохондрій [118].

Після експозиції досліджуваних плейстофітів у контрольних умовах та за дії наночастинок металів ми ідентифікували та визначили кількісний вміст наступних 11-ти ацилкарнітинів: C0 (вільний карнітин), C2 (ацетилкарнітин), C3 (пропіонілкарнітин), C4 (бутирилкарнітин), C5 (ізовалерилкарнітин), C6 (гексаноїлкарнітин), C8 (октаноїлкарнітин), C10 (деканоїлкарнітин), C16 (пальмітоїлкарнітин), C18:1 (олеїлкарнітин) та C18:2 (лінолеїлкарнітин).

Отримані дані щодо вмісту ацилкарнітинів у досліджуваних водних рослин вказують як на зменшення одних, так і на збільшення вмісту інших окремих ацилкарнітинів (рис. 4.13-4.15).



Рис. 4.13. Вміст ацилкарнітинів у *P. stratiotes* за сумісної дії наночастинок металів (Mn, Cu, Zn, Ag) на 7-му добу



Рис. 4.14. Вміст ацилкарнітинів у *L. laevigatum* за сумісної дії наночастинок металів (Mn, Cu, Zn, Ag) на 7-му добу



Рис. 4.15. Вміст ацилкарнітинів у *S. natans* за сумісної дії наночастинок металів (Mn, Cu, Zn, Ag) на 7-му добу

У *P. stratiotes* не спостерігалось зменшення вмісту жодного з ацилкарнітинів. У *L. laevigatum* знизився вміст семи ацилкарнітинів: C0, C2, C5, C6, C8, C16, C18:2. У *S. natans* – чотирьох: C2, C4, C16, C18:2. Тим часом, у кожного з досліджуваних плейстофітів відмічено збільшення вмісту певних ацилкарнітинів. За впливу наночастинок металів відбулось збільшення вмісту трьох ацилкарнітинів (C5, C8, C18:1) у *S. natans* та семи (C0, C2, C3, C4, C6, C16, C18:1) у *P. stratiotes*, у *L. laevigatum* взагалі не відбувалося збільшення вмісту ацилкарнітинів.

Вміст вільного карнітину (C0) зменшувався у *L. laevigatum*, в той час як у *P. stratiotes*, він навпаки, збільшувався.

Вільний карнітин (C0) є амонійною четвертинною сполукою і відіграє важливу роль у транспортуванні жирних кислот в клітинах організму [119]. Зниження вмісту вільного карнітину у *L. laevigatum* зумовлює порушення процесу перетворення карнітину в ацилкарнітини, що і є причиною їх зниженого вмісту у даного плейстофіта.

Отже, отримані дані вказують на складний процес, що включає в себе захисні реакції за участі ліпідного обміну з метою підтримання гомеостазу та

збереження життєздатності рослинного організму за умов пошкоджуючого впливу наночастинок металів. Згідно з отриманими даними, можна зробити висновок, що під негативним впливом наночастинок металів, порушується мембранний транспорт жирних кислот всередині мітохондрій, внаслідок чого відбувається зниження інтенсивності дихання і погіршення ефективності енергетичного метаболізму клітини.

Серед трьох досліджуваних плейстофітів найбільш стійкими видами за показниками ліпідного обміну виявились *P. stratiotes* та *S. natans*.

4.5. Аналіз змін активності каталази

Для визначення стійкості плейстофітів до стресових умов, спричинених впливом суміші наночастинок металів у водному розчині, була проаналізована зміна активності каталази досліджуваних видів. Фермент каталаза є важливим компонентом захисної реакції рослин, захищаючи рослинну клітину від пошкоджень спричинених оксидативним стресом, перетворюючи пероксид водню на воду та молекулярний кисень [120].

Було виявлено підвищення активності каталази у двох досліджуваних видів: на 19% у *P. stratiotes* та на 63% у *S. natans*. У *L. laevigatum*, навпаки, відбулось зниження активності фермента на 17%. За візуальним спостереженням та беручи до уваги інші досліджені в даній роботі маркери стійкості рослин, можна стверджувати, що види, у яких підвищувалась активність каталази були більш стійкими до пошкоджуючого впливу наночастинок металів.

Отже, за показником активності даного ферменту, найбільш стійким видом серед досліджуваних плейстофітів до суміші розчинів наночастинок металів, можна вважати *S. natans*.

4.6. Оцінка стресостійкості рослин за зміною вмісту фенольних сполук та терпеноїдів

Оскільки терпеноїди та фенольні сполуки є важливими речовинами вторинного метаболізму водних рослин і відіграють важливу роль у регулюванні життєвих процесів, було проведено визначення вмісту цих сполук у досліджуваних плейстофітів за впливу суміші колоїдних розчинів наночастинок Mn, Cu, Zn, Ag.

Терпеноїди беруть участь у ключових обмінних процесах, фотохімічних реакціях, регуляції проникності мембран, трансформації енергії, біосинтезі різних речовин, сприяючи захисту рослинного організму та його адаптації до несприятливих умов. Вони зменшують концентрацію активних форм кисню, тим самим запобігаючи пошкодженням ДНК та білків у клітинах, а також беруть участь в механізмах відновлення [121,122, 123, 124].

Відомо, що видам гіперакумуляторам важких металів притаманні високі показники вмісту фенольних сполук [125, 126, 127]. За рахунок присутності карбоксильних та гідроксильних груп, феноли можуть утворювати нестабільні комплекси (хелати) з іонами важких металів. Це дозволяє знизити токсичність цих металів та знизити ступінь окисних пошкоджень клітин шляхом зменшення концентрації активних форм кисню [128]. Отже, маючи дані щодо ролі терпеноїдів та фенольних сполук у захисті рослин від металів у іонній формі, доцільним було дослідити вміст даних сполук у плейстофітів за дії наночастинок. В усіх дослідних рослин було виявлено присутність фенолів та терпеноїдів, у кількостях, які мають аналітичне значення. Результати досліджень [129] представлено на рис. 4.16 - 4.17.

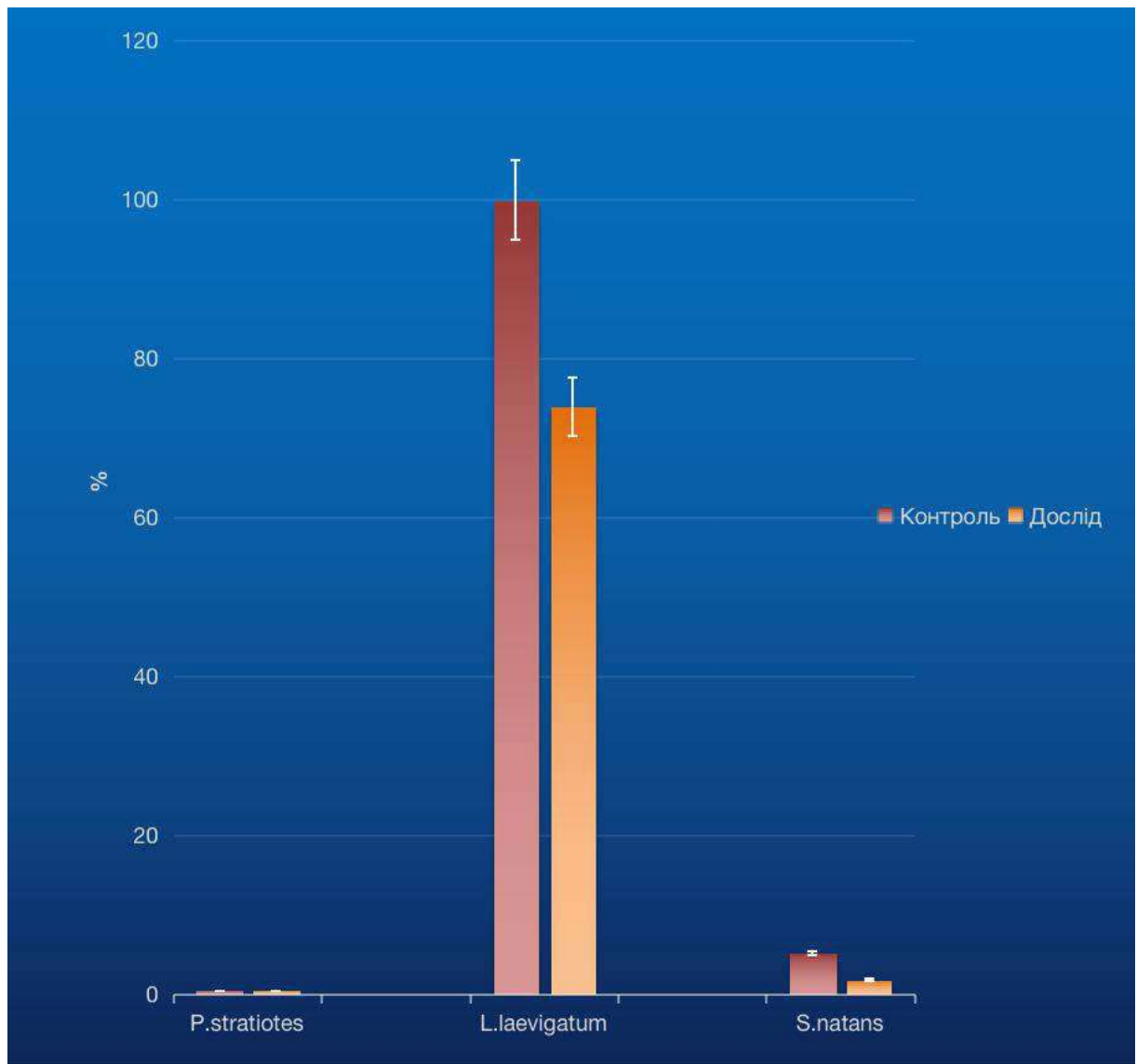


Рис. 4.16. Вміст фенольних сполук у плейстофітів за впливу суміші колоїдних наночастинок металів (Mn, Cu, Zn, Ag) на 14-ту добу

Результати аналізу свідчать, що серед трьох рослин, які були об'єктом дослідження, найвищі концентрації фенольних сполук і терпеноїдів були знайдені у контрольному зразку *L. laevigatum*.

Виявлені відмінності в накопиченні вторинних метаболітів між контрольними зразками та початковим вмістом у рослинах досліджуваних плейстофітів були значними і залежали від виду.

У контрольних зразках *P. stratiotes* і *S. natans* вміст фенольних сполук був значно нижчим у порівнянні з *L. laevigatum*. Вплив наночастинок металів не

призвів до змін у вмісті фенольних сполук у *P. stratiotes*, тоді як в інших видів спостерігалось зменшення цих метаболітів. У результаті впливу наночастинок металів вміст фенольних сполук залишався на рівні контролю у *P. stratiotes* та *S. natans*. Однак, в *L. laevigatum* спостерігалось зниження вмісту фенольних сполук на 26%.

Слід зауважити, що *P. stratiotes* та *S. natans* вважаються пріоритетними рослинами-ремедіантами порівняно з *L. laevigatum*. Це пов'язано з тим, що фенольні сполуки цих рослин впливають на різні процеси росту і розвитку рослин, проявляючи як стимулюючий, так і інгібуючий ефекти. Крім того, ці сполуки можуть індукувати апоптоз-подібні процеси, що додатково підсилює їхню позитивну дію [130, 131, 132].

Фенольні сполуки відіграють важливу роль у захисних реакціях рослин. При пошкодженні в рослинних клітинах відбувається активація таких ферментів, як фенілаланінаміак-ліаза, 4-гідроксилаза транс-коричної кислоти, пероксидаза та інші, що сприяють швидкому утворенню фенольних сполук. Ці сполуки взаємодіють з клітинними стінками, зокрема з целюлозами та геміцелюлозами, і сприяють їх зміцненню. Це забезпечує більшу стійкість клітин до проникнення чужорідних речовин, включаючи наночастинок металів, а також зменшує неконтрольовану втрату води. Збільшення процесів лігніфікації є однією зі стратегій, які рослина використовує для адаптації до стресових факторів. Крім того, фенольні сполуки входять до складу β -інгібіторного комплексу, який відповідає за фізіологічний спокій рослин, під час якого рослина стає більш стійкою до негативних впливів [133, 134].

Фенольні сполуки також відіграють важливе фотопротекторне значення, оскільки вони взаємодіють з активними формами кисню і здатні їх нейтралізувати, що зменшує шкідливі ефекти від фотоокиснення. Таким чином, фенольні сполуки допомагають захищати клітини від ушкоджень, які можуть виникнути в результаті фотоокисного стресу [133]. Також вони є компонентами електрон-транспортних ланцюгів дихання і фотосинтезу, тому відіграють важливу роль в окисно-відновних реакціях [131, 132, 134].

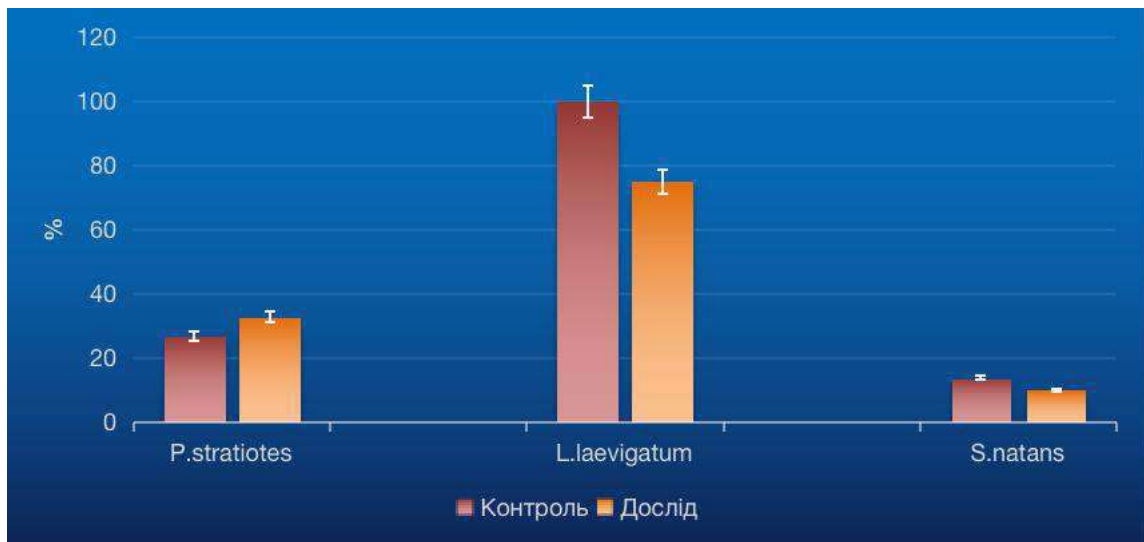


Рис. 4.17. Вміст терпеноїдів у плейстофітів за впливу суміші колоїдних наночастинок металів (Mn, Cu, Zn, Ag) на 14-ту добу

Виявлено, що контрольні зразки рослин мали різні рівні накопичення терпеноїдів. Найвищий вміст терпеноїдів був виявлений у *L. laevigatum*, що перевищував вміст терпеноїдів у *P. stratiotes* в 3,7 рази та у *S. natans* в 7 разів.

Значний початковий вміст терпеноїдів у *L. laevigatum* може свідчити про його потенційну стійкість до різних факторів навколишнього середовища, включаючи наночастинок металів. Це пов'язано з тим, що терпеноїди вважаються потужними антиоксидантами та стимуляторами захисних систем клітин та організму. Вони допомагають знижувати рівень активних форм кисню, зменшують ступіть пошкодження ДНК та білків у клітинах, а також можуть впливати на механізми, що сприяють відновленню подібних ушкоджень [121, 131, 134].

На 14-й день експерименту спостерігалися різні ефекти впливу наночастинок металів на вміст терпеноїдів у різних досліджуваних видів рослин. У *P. stratiotes* вміст терпеноїдів збільшився на 6%, що може свідчити про стимуляцію їх синтезу або збільшення накопичення. У *L. laevigatum* вміст терпеноїдів зменшився на 25%, що може вказувати на зниження їх синтезу або перетворення на інші сполуки. У *S. natans* вміст терпеноїдів залишився без змін, що свідчить про стабільний рівень їх накопичення. Отже, реакція різних видів

рослин на вплив наночасток металів виявилася різною і може бути пов'язана зі специфічними механізмами регуляції синтезу терпеноїдів у кожного виду.

Відомо, що терпеноїди відіграють важливу роль в процесах обміну рослин у багатьох біохімічних реакціях. Вони беруть участь у біосинтезі різних сполук, регулюють активність генів, забезпечують стабільність мембран і є ключовими проміжними продуктами для синтезу різних речовин, включаючи фітогормони, ферменти і вітаміни [135].

Тому зниження загального вмісту терпеноїдів у *L. laevigatum* на 25% може свідчити про значне пошкодження плейстофіта. Це означає, що рослина може бути менш стійкою до стресових факторів, включаючи наночастки металів. Таке зниження вмісту терпеноїдів може вказувати на те, що *L. laevigatum* як фіторемедіант, ймовірно, буде менш ефективним, порівняно з іншими видами рослин.

Отже, зважаючи на ці факти, використання *L. laevigatum* в якості фіторемедіанту для очищення води забрудненої наночастками металів може бути неефективним або менш ефективним, а більш придатними можуть бути альтернативні види водних рослин, такі як *P. stratiotes* та *S. natans*, у яких за впливу наночастинок металів вміст терпеноїдів залишився сталим.

Внаслідок впливу наночастинок металів протягом 14 днів виявлено такі зміни показників порівняно з контролем: вміст фенольних сполук у *L. laevigatum* зменшився на 26%, а в *P. stratiotes* та *S. natans* залишився незмінним; вміст терпеноїдів у *P. stratiotes* збільшився на 6%, у *L. laevigatum* зменшився на 25%, а в *S. natans* зменшився на 4,4%.

Аналіз результатів досліджень дозволив оцінити чутливість досліджуваних видів плейстофітів до наночастинок металів за кількісними змінами вмісту вторинних метаболітів, а саме терпеноїдів та фенольних сполук: найбільш чутливим виявився *L. laevigatum*, у якого вміст фенольних сполук знизився на 26%, а терпеноїдів – на 25%. Дещо іншою була реакція *S. natans*, у якої вміст фенольних сполук і терпеноїдів залишився на рівні контролю. На *P. stratiotes* за усіма досліджуваними показниками вплив наночастинок виявився найменшим.

Результати досліджень дозволили оцінити чутливість різних видів плейстофітів до наночастинок металів на основі змін у вмісті терпеноїдів та фенольних сполук. Найменш стійким виявився *L. laevigatum*, оскільки вміст фенольних сполук у нього зменшився на 26%, а терпеноїдів – на 25%. У *S. natans* вміст фенольних сполук та терпеноїдів залишився незмінним. *P. stratiotes* виявилась найбільш стійкою до наночастинок металів за всіма визначеними показниками.

РОЗДІЛ 5

ОЦІНКА РИЗИКУ ВИКОРИСТАННЯ ІНВАЗІЙНОГО ВИДУ *PISTIA STRATIOTES* ДЛЯ ОЧИСТКИ ТЕХНІЧНИХ ВОДОЙМ СТОСОВНО ПРИРОДНИХ ВИДІВ

5.1. Використання фотосинтетичних параметрів для прогнозування продуктивності фітоугруповань плейстофітів водойм України за впливу інвазійного виду *P. stratiotes*

Для вивчення впливу інвазійного виду *P. stratiotes* на інші плейстофіти, ми провели дослідження [136] змін вмісту фотосинтетичних пігментів у двох видів рослин - *L. laevigatum* та *S. natans*. Ці види також є плаваючими на поверхні, тому знаходяться поруч з *P. stratiotes* і конкурують за ресурси, зокрема елементи живлення. Експеримент проводився протягом 14 діб, під час яких рослини були експоновані разом з *P. stratiotes*. Одночасно було оцінено зміни параметрів води, таких як вміст кисню, мінералізація та рівень рН.

На 14-й день експозиції спостерігалися зміни у вмісті пігментів в досліджуваних рослинах. Візуально було помічено пожовтіння листків у *L. laevigatum*, і навпаки, навіть більш інтенсивне зелене забарвлення листків у *S. natans*, які були експоновані разом протягом 14 діб. Дані спостережень представлені на рисунку (Рис 5.1).



Рис 5.1. Морфологічні зміни плейстофітів (*S. natans*, *L. laevigatum* та *P. stratiotes*) після 14-ти діб спільного культивування в лабораторних умовах.

За результатами наших досліджень, на 14-й день експерименту вплив *P. stratiotes* призвів до зниження вмісту хлорофілу *a* та хлорофілу *b* у *L. laevigatum*. У варіанті з покриттям поверхні води *P. stratiotes* на 25% площі, вміст зменшився з 0,01 мг/г до 0,008 мг/г, а варіант з покриттям на 50% площі показав зниження з 0,01 мг/г до 0,009 мг/г. Вміст каротиноїдів залишався стабільним на рівні 0,004 мг/г під час всього періоду експозиції (рис. 5.2). Незважаючи на зниження вмісту, співвідношення хлорофілу *a* до хлорофілу *b* залишалося більше 2, що свідчить про нормальний стан пігментного апарату та оптимальну життєздатність водних рослин.

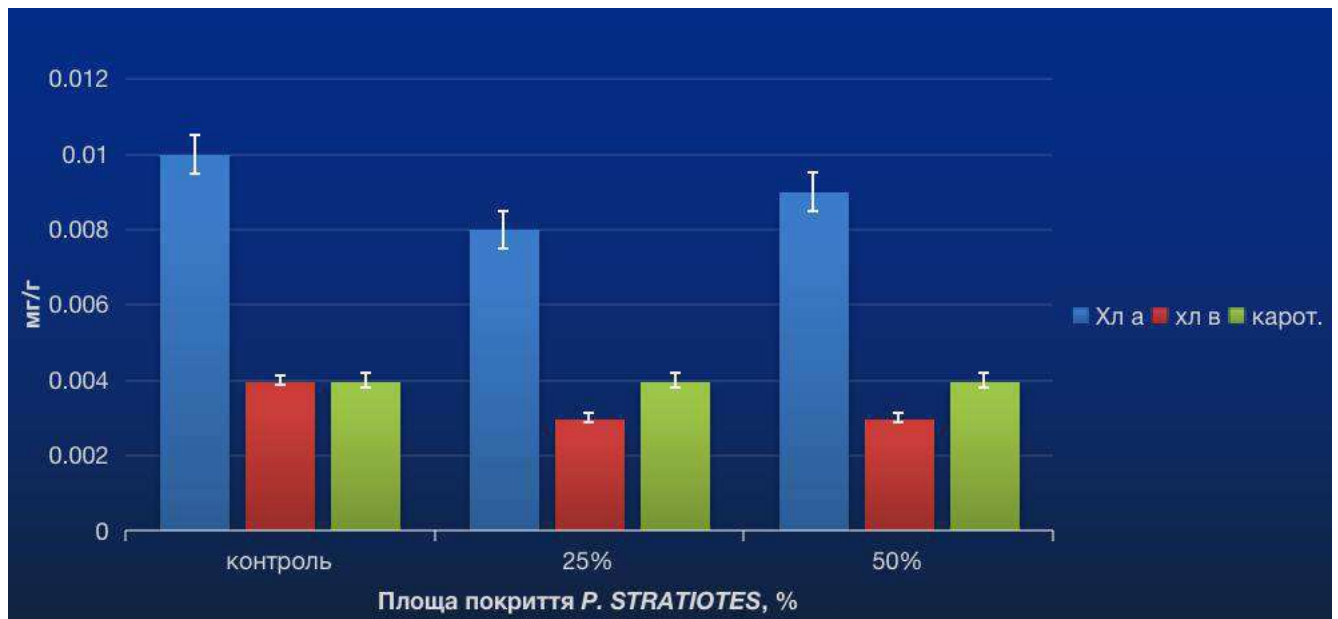


Рис. 5.2. Вміст пігментів у *L. laevigatum* за впливу *P. stratiotes* на 14-ту добу

За результатами наших досліджень, на 14-й день експерименту вплив *P. stratiotes* на вміст пігментів у *S. natans* призвів до неочікуваних змін. При покритті поверхні води *P. stratiotes* на 25% площі, вміст хлорофілу *a* збільшився вдвічі, а хлорофілу *b* зменшився вдвічі. При покритті на 50% площі, вміст хлорофілу *a* збільшився на 1,5 рази, а хлорофілу *b* вдвічі. Вміст каротиноїдів залишився незмінним при покритті на 25% площі, але збільшився в 1,5 рази при покритті на 50% площі *P. stratiotes* (Рис 5.3). Ці зміни свідчать про активацію захисних механізмів, пов'язаних з каротиноїдами, при збільшенні площі покриття води *P. stratiotes*. У випадку покриття на 25% площі, захисні механізми не були задіяні, ймовірно, через недостатній вплив *P. stratiotes* для активації репараційних механізмів. Тому цей вплив можна вважати незагрозливим для досліджуваного виду.

Зафіксоване збільшення загального вмісту хлорофілу у *S. natans* під впливом *P. stratiotes* свідчить про позитивну взаємодію між цими рослинами. Цей ефект був найвиразнішим при меншій кількості *P. stratiotes*, а зі збільшенням її біомаси він зменшувався, що підтверджується збільшенням вмісту каротиноїдів. *S. natans*, хоча не вимоглива до складу води, має високу вимогу до освітлення. Ймовірно, навіть незначне затінення цього виду

присутністю *P. stratiotes* призвело до значного збільшення вмісту основного фотосинтетичного пігменту - хлорофілу *a*. Цей цікавий ефект може бути також обумовлений змінами показників води, таких як вміст кисню, рівень рН та мінералізація.

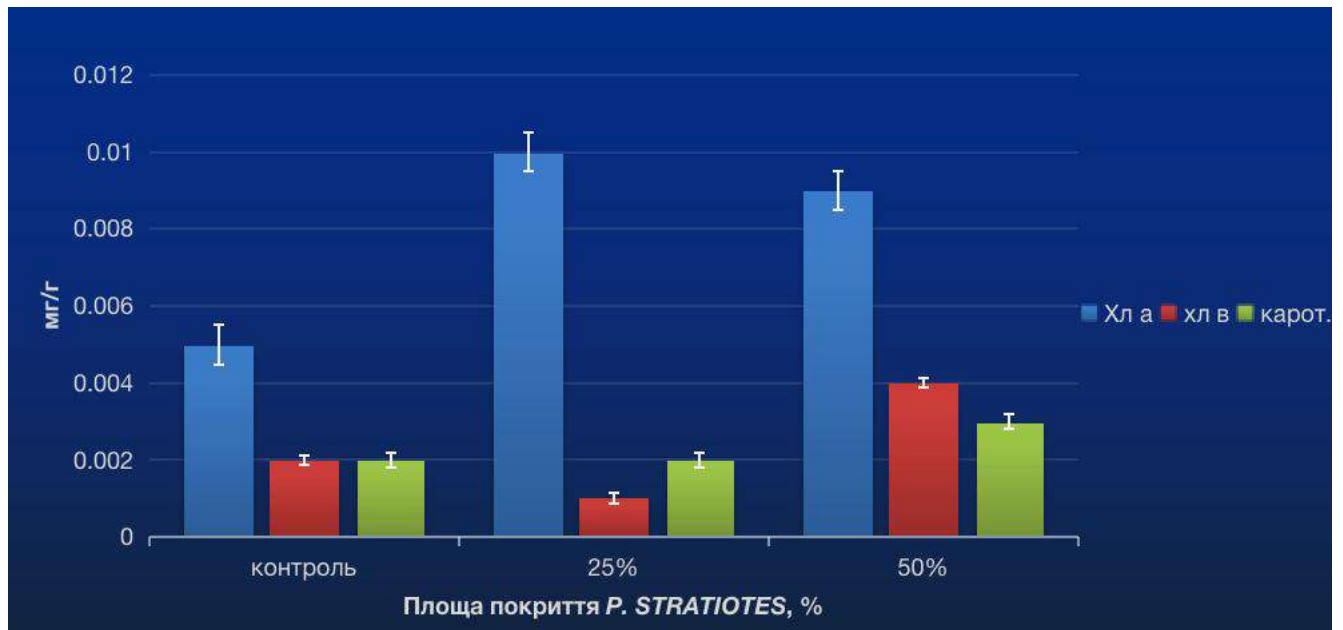


Рис. 5.3. Вміст пігментів у *S. natans* за впливу *P. stratiotes* на 14-ту добу

Отримані дані щодо кількісного вмісту пігментів свідчать про те, що *P. stratiotes* також зазнає змін під впливом *L laevigatum* і *S. natans* (рис. 5.4; 5.5). В *P. stratiotes* спостерігається зменшення загального вмісту хлорофілів, а також вмісту кожного окремо хлорофілу *a* і хлорофілу *b*, тоді як вміст каротиноїдів, навпаки, збільшується. При більшій кількості *P. stratiotes* вплив інших видів на неї стає сильнішим. Ймовірно, у даному випадку збільшення біомаси *P. stratiotes* призводить до конкуренції за ресурси живлення, що негативно впливає на даний плейстофіт.



Рис. 5.4. Вміст пігментів у *P. stratiotes* (25% площі покриття) за впливу *S. natans* та *L. laevigatum* на 14-ту добу.

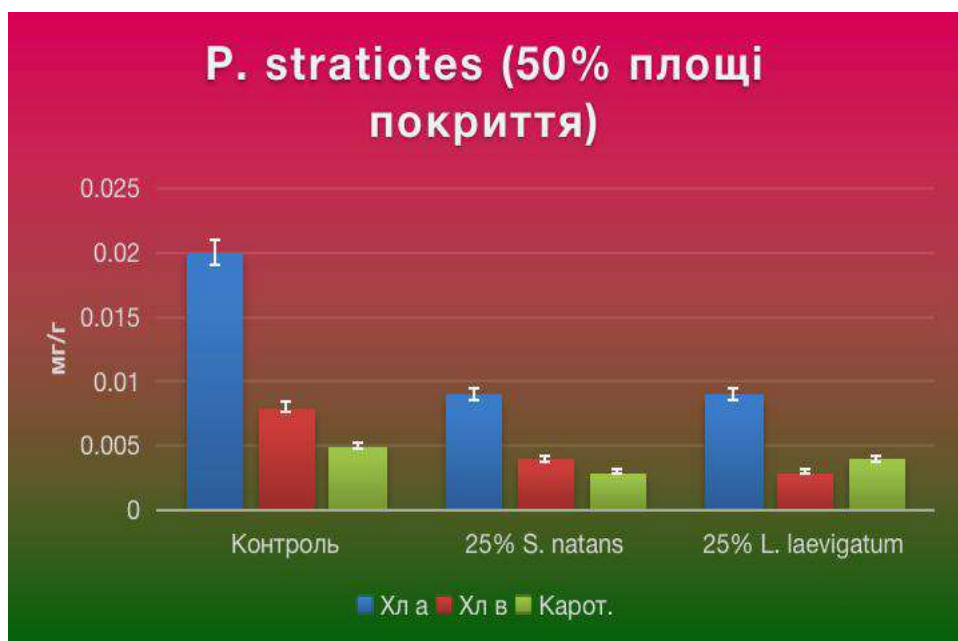


Рис. 5.5. Вміст пігментів у *P. stratiotes* (50% площі покриття) за впливу *S. natans* та *L. laevigatum* на 14-ту добу.

Враховуючи те, що *S. natans* є рідкісною рослиною в природних водоймах України і занесена до Червоної книги, її стійкість до впливу *P. stratiotes* та навіть збільшення продуктивності в присутності *P. stratiotes* є несподіваною. Результати наших досліджень підтверджують, що в умовах тривалої конкуренції

за ресурси живлення можлива зміна видового складу фітоценозу на користь *S. natans*. Це не можна вважати негативним наслідком впливу *P. stratiotes*, оскільки ця рідкісна для України рослина має важливе значення у збереженні біорізноманіття природних водних екосистем.

5.2. Оцінка змін гідрохімічних показників при сумісному зростанні інвазійного виду *P. stratiotes* з *L. laevigatum* та *S. natans*

Ми провели дослідження гідрохімічних показників, щоб зрозуміти, як *P. stratiotes* впливає на якість води і її придатність для росту і розвитку інших видів плейстофітів. Для цього ми виміряли рівень розчиненого кисню, визначили рН середовища та оцінили ступінь мінералізації води. Ці показники дозволяють оцінити, наскільки сприятливим є середовище для розвитку рослин, а також які зміни можуть відбуватися в екологічних системах за присутності *P. stratiotes*.

5.2.1. Зміни вмісту кисню у воді

Кисень, розчинений у воді, є необхідним компонентом для виживання більшості водних організмів, включаючи макрофіти. Концентрація кисню у воді впливає на життєздатність гідробіонтів і визначає спрямованість біохімічних та гідробіологічних процесів. Коли поверхня водойми вкрита рослинністю або хімічною плівкою, а водна маса має обмежену циркуляцію, відбувається стагнація, що призводить до зміни видів та спрощення видового різноманіття водойм.

Рослини, що плавають на поверхні водойми, відносно кількості світла, мають переваги порівняно з зануреними видами, оскільки вони знаходяться ближче до джерела світла і мають доступ до усього спектру фізіологічно активної радіації. Також ці рослини, які швидко розростаються і покривають велику площу водної поверхні, можуть перешкоджати доступу кисню з атмосфери та затінити не тільки занурені види, що ростуть під ними, але і ті, що знаходяться на поверхні водойми, поруч з цими видами. Це може знижувати

інтенсивність фотосинтезу і загальну продуктивність водойми. Покриття поверхні плейстофітами також призводить до дефіциту кисню у водоймі.

З іншого боку, плейстофіти активно фотосинтезують і, ймовірно, насичують воду киснем. Однак розташування продихів, через які відбувається виділення кисню, на верхній стороні листка, що має прямий контакт з атмосферою, а не з водою, уповільнює цей процес. В будь-якому випадку, збільшення або зменшення вмісту кисню у воді, що призводить до позитивного або негативного ефекту, порушує рівновагу водойми і може мати неочікувані наслідки.

Ми провели дослідження, щоб визначити, як зміниться режим кисню у воді, де ростуть плейстофіти за наявності нового інвазійного виду - *P. stratiotes*. Результати наших досліджень представлені в таблицях 5.1 та 5.2.

Таблиця 5.1.

Вміст кисню у воді при експозиції *S. natans* (25% площі покриття) за присутності *P. stratiotes*.

Доба експерименту	Вміст кисню, мг/л		
	Контроль	25% покриття площі поверхні <i>P. stratiotes</i>	50% покриття площі поверхні <i>P. stratiotes</i>
1-ша	6,24±0,01	6,24±0,01	6,24±0,02
7-ма	6,29±0,04	6,82±0,01	6,7±0,05
14-та	6,29±0,03	6,82±0,01	6,7 ±0,04

Вміст кисню у воді при експозиції *L. laevigatum* (25% площі покриття) за присутності *P. stratiotes*.

Доба експерименту	Вміст кисню, мг/л		
	Контроль	25% покриття площі поверхні <i>P. stratiotes</i>	50% покриття площі поверхні <i>P. stratiotes</i>
1-ша	6,24±0,01	6,24±0,01	6,24±0,02
7-ма	7,93±0,04	7,62±0,01	7,75±0,05
14-та	7,93±0,03	7,62±0,01	7,75 ±0,04

5.2.2. Зміни рівня рН води

Показник рН визначає рівень кислотності або лужності, що має важливе значення для розвитку водних організмів. Водний розчин може бути кислим, лужним або нейтральним в залежності від концентрації іонів водню (H⁺) і гідроксидних (OH⁻) у розчині [137]. У хімічно чистій воді, на кожні 10 000 000 молекул, припадає один іон H⁺ і один іон OH⁻, що забезпечує рівновагу концентрацій кислотних та лужних компонентів.

Вода в природних водоймах класифікується як кисла, нейтральна або лужна залежно від значень показника рН. Кислими вважаються води з рН від 3,4 до 6,95, нейтральними - з рН від 6,95 до 7,3, а лужними - з рН вище 7,3. У водоймах, протягом доби, рівень рН може змінюватися на 2 одиниці. Вночі вода підкислюється через виділення вуглекислого газу в процесі дихання, а вдень підвищується лужність, внаслідок поглинання CO₂ рослинами. Показник рН має важливе екологічне значення, оскільки він впливає на водно-сольовий обмін у

водних організмів. Концентрація водневих іонів визначає межі поширення водних організмів і впливає на їхню життєдіяльність [138].

Ми провели дослідження, щоб встановити зміни рН води при експозиції плейстофітів за присутності інвазійного для водойм України виду- *P. stratiotes*. Результати досліджень представлені в таблицях 5.3 та 5.4.

Таблиця 5.3.

рН води за експозиції *S. natans* (25% площі покриття) за присутності *P. stratiotes*.

Доба експерименту	рН		
	Контроль	25% покриття площі поверхні <i>P. stratiotes</i>	50% покриття площі поверхні <i>P. stratiotes</i>
1-ша	7,7±0,04	7,7±0,5	7,7±0,02
7-ма	8,6±0,01	8,4±0,03	8,6±0,01
14-та	8,7±0,01	8,4±0,02	8,3±0,02

Спостереження підтверджують, що за впливу процесів життєдіяльності рослин, зокрема фотосинтезу та дихання, рівень рН води змінювався з початкового значення 7,7 до діапазону 8,3-8,6 протягом тижня. Проте, не було виявлено значущої різниці впливу *P. stratiotes* окремо чи разом з *S. natans* на зміну рН середовища води. Можна зробити висновок, що *P. stratiotes* не має впливу на *S. natans* шляхом зміни рівня рН у воді.

Таблиця 5.4.

pH води при експозиції *L. laevigatum* (25% площі покриття) за присутності *P. stratiotes*.

Доба експерименту	pH		
	Контроль	25% покриття площі поверхні <i>P. stratiotes</i>	50% покриття площі поверхні <i>P. stratiotes</i>
1-ша	7,7±0,04	7,7±0,5	7,7±0,02
7-ма	8,4±0,01	8,3±0,03	8,3±0,01
14-та	8,2±0,01	8,4±0,02	8,2±0,02

Під час експозиції *L. laevigatum* також спостерігалися подібні процеси. Рівень pH у воді, яка використовувалася для вирощування рослин, змінювався з початкового значення 7,7 до діапазону 8,2-8,4 протягом 7 днів і залишався стабільним протягом наступного тижня. Це свідчить про те, що рослини, включаючи *L. laevigatum*, споживали CO₂ під час фотосинтезу і сприяли підлужнюванню водного середовища.

Не було виявлено суттєвої різниці між різними варіантами досліду, що означає, що *P. stratiotes* не впливає на зміни pH середовища незалежно від наявності *S. natans* або *L. laevigatum*.

5.2.3. Зміни показників мінералізації

Солі, розчинені у воді, відіграють важливу роль у житті гідробіонтів. Показники, такі як іонний склад води і солоність, мають значення для водних організмів. Основна частина мінерального складу природної води складається з

наступних іонів: HCO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ і K^+ [139]. Прісна та солоні води відрізняються у співвідношенні цих іонів. У прісних водах гідрокарбонати становлять приблизно 60% загальної кількості солей, а хлориди - менше 10%. Мінеральні іони мають різне значення у житті гідробіонтів. Рослини потребують біогенних елементів, таких як азот, фосфор, калій, кремній і залізо, які обмежують їх ріст і розвиток. Сумарна концентрація іонів впливає на тонічність оточуючого середовища та умови осморегуляції водних організмів. Рівень мінералізації води є важливим показником стану водних систем та можливості існування певних видів гідробіонтів в них. Зі збільшенням мінералізації води зростають її щільність та в'язкість, що впливає на плавучість гідробіонтів та умови їх руху.

Нами були визначені зміни рівня мінералізації води, коли досліджувані плейстофіти зростають разом. Результати наших досліджень наведені в таблицях 5.5 та 5.6.

Таблиця 5.5.

Мінералізація води при експозиції *S. natans* (25% площі покриття) за присутності *P. stratiotes*.

Доба експерименту	Мінералізація, мг/л		
	Контроль	25% покриття площі поверхні <i>P. stratiotes</i>	50% покриття площі поверхні <i>P. stratiotes</i>
1-ша	240±2,0	240±4,2	240±2,7
7-ма	271±6,1	254±7,8	260±5,3
14-та	313±7,5	232±3,1	227±4,1

У контрольному варіанті, де *S. natans* росте без *P. stratiotes*, спостерігався поступовий ріст мінералізації протягом двох тижнів. Початковий рівень мінералізації становив 240 мг/л, на 7-й день він збільшився до 270 мг/л, а на 14-й день досягнув значення 313 мг/л.

У дослідних варіантах, де була присутня *P. stratiotes* з покриттям 25% або 50% площі, спостерігалися інші зміни мінералізації. На 7-й день експозиції мінералізація збільшилася на 14 мг/л у випадку 25% покриття та на 20 мг/л у випадку 50% покриття. Проте, на 14-й день експозиції в обох дослідних варіантах спостерігалось різке зниження мінералізації. Значення зменшилося на 7 мг/л у випадку 25% покриття та на 13 мг/л у випадку 50% покриття, порівняно з початковим значенням 240 мг/л.

Таким чином, в результаті експерименту виявлено значне зниження мінералізації в дослідних варіантах залежно від рівня покриття поверхні води плейстофітом *P. stratiotes*. Це може свідчити про інтенсивне поглинання мінеральних елементів інвазивним видом та *S. natans*, який має високий ростовий потенціал

Таблиця 5.6.

Мінералізація води при експозиції *L. laevigatum* (25% площі покриття) за присутності *P. stratiotes*.

Доба експерименту	Мінералізація, мг/л		
	Контроль	25% покриття площі поверхні <i>P. stratiotes</i>	50% покриття площі поверхні <i>P. stratiotes</i>
1-ша	240±2,0	239±4,2	240±2,7
7-ма	268±6,1	234±7,8	236±5,3
14-та	239±7,5	233±3,1	221±4,1

Наші дослідження підтверджують, що рівень мінералізації води залежить від присутності різних видів рослин, зокрема *S. natans*, *L. laevigatum* та *P. stratiotes*. У випадку з *L. laevigatum*, спостерігалось збільшення рівня мінералізації на 7-й день на 18 мг/л, але до 14-го дня він повернувся до початкового значення (239 мг/л). За своєю чергою, *P. stratiotes* впливала на зниження рівня мінералізації, і чим більша була площа покриття *P. stratiotes*, тим сильніше було зниження. Наприклад, при 25% площі покриття *P. stratiotes*, рівень мінералізації зменшився на 6 мг/л, а при 50% площі покриття - на 19 мг/л. Загальною тенденцією було те, що контрольний варіант без *P. stratiotes* мав найвищий рівень мінералізації на 14-й день (239 мг/л), тоді як при 50% площі покриття *P. stratiotes* рівень мінералізації був найнижчим (221 мг/л).

Таким чином, результати наших досліджень підтверджують, що різні види рослин, такі як *S. natans*, *L. laevigatum* та *P. stratiotes*, можуть впливати на рівень мінералізації води. У випадку *S. natans* та *L. laevigatum* ми не зафіксували значних змін у рівні мінералізації, в той час як *P. stratiotes* призводила до зниження цього показника.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Оскільки перспективна для використання з метою фіторемедіації рослина повинна мати високий ступінь стрес-толерантності, значну поглинальну здатність, акумулювати великі кількості потенційно токсичних елементів та мати високу швидкість росту задля накопичення біомаси [140], ми провели визначення найважливіших фізіологічних показників та акумуляційну здатність трьох видів плейстофітів.

Вплив наночастинок металів на водні макрофіти спричинив різноманітні фізіологічні зміни. Такі види, як *P. stratiotes*, *S. natans* та *L. laevigatum*, реагували по-різному на присутність наночастинок металів.

У досліджуваних плейстофітів виявлено зміни вмісту фотосинтетичних пігментів, білка, амінокислот, ацилкарнітинів, фенольних сполук та терпеноїдів під впливом наночастинок металів. У чутливих видів спостерігалось зниження вмісту фотосинтетичних пігментів, білка та амінокислот, що свідчить про гальмування росту та погіршення продуктивності рослин, а отже погану стресостійкість. У стійких видів збільшувався синтез каротиноїдів та окремих амінокислот, що беруть участь в захисних реакціях. Отримані нами результати щодо збільшення окремих амінокислот узгоджуються з вже існуючими даними стосовно взаємодії рослин з металами в іонній формі. В обох випадках відбувається активний синтез певних амінокислот, необхідних для захисту від негативного впливу металів, який проявляється у підтримці гомеостазу та включенні механізму репарації рослинного організму з метою збереження його життєздатності. Зміни вмісту ацилкарнітинів опосередковано свідчать про зміни ліпідного метаболізму та характеризують стійкість видів за іншим механізмом, який відбувається на рівні жирних кислот. Рівень накопичення фенольних сполук та терпеноїдів залежав від виду рослини та впливу наночастинок металів. *P. stratiotes* та *S. natans* проявили більшу стійкість та здатність до поглинання наночастинок металів, зберігаючи вміст більшості досліджених сполук на стабільному рівні. У *L. laevigatum*, натомість, спостерігався негативний вплив наночастинок металів на метаболічні процеси. Відомо, що фенольні сполуки

відіграють важливу роль у захисних реакціях рослин, а при пошкодженні рослинних клітин відбувається активація ферментів (фенілаланінаміак-ліаза, 4-гідроксилаза транс-коричної кислоти, пероксидази, каталази тощо), крім того фенольні сполуки взаємодіють з целюлозами та геміцелюлозами клітинних стінок і сприяють їх зміцненню, що забезпечує більшу стійкість клітин до проникнення наночастинок металів, а також зменшує неконтрольовану втрату води. Вважають, що саме збільшення процесів лігніфікації є однією зі стратегій, які рослина використовує для адаптації до стресових факторів. Цікавим в плані стресостійкості є також β -інгібіторний комплекс, який відповідає за фізіологічний спокій рослин, під час якого рослина стає більш стійкою до негативних впливів.

Серед досліджених видів рослин за показниками, які вивчали на потенційних ремедіантах, *P. stratiotes* проявила себе найефективнішим фіторемедіантом по відношенню до наночасток металів, продемонструвавши хорошу здатність до вилучення, зберігаючи при цьому основні життєві показники первинного і вторинного метаболізму [102, 129, 141]. Результати наших досліджень добре узгоджуються з іншими даними, стосовно рекомендацій використовувати цю рослину для вилучення інших забруднень. [142, 143, 144, 145, 146, 147, 148]. Однак *P. stratiotes* належить до чужорідних не типових для водойм України видів рослин, її навіть вважають небезпечним інвазійним видом [149], тому *P. stratiotes* можна рекомендувати для фіторемедіації лише закритих технічних водойм.

Отримані нами дані [101] щодо придатності для фіторемедіації водойм, забруднених наночастинками металів, плейстофіта *S. natans*, узгоджуються з отриманими даними інших дослідників. Окрім акумулюючої здатності та високої стійкості, цей вид відповідає більшості критеріїв придатності для фіторемедіації: його легко ідентифікувати, він інтенсивно нарощує біомасу, за сприятливих умов швидко поширюється у водоймі і його легко збирати і вилучати із водойми [13, 150, 151].

Більше того, *S. natans* належить до аборигенних видів, та охороняється на національному та на міжнародному рівні, а отже не створює загрози для інших природних видів України. Даний плейстофіт включений в усі видання "Червоної книги України" (1980, 1996, 2009 рр.), до Додатку I Бернської конвенції, списку Міжнародного союзу охорони природи, а також Європейського червоного списку. Тому її можна рекомендувати для використання навіть у відкритих природних водоймах [152, 153].

ВИСНОВКИ

1. Встановлено високу здатність рослин з екологічної групи плейстофітів (*Pistia stratiotes*, *Limnobium laevigatum*, *Salvinia natans*) до фітореMediaції водойм забруднених наночастинками металів. Переваги по вилученню досліджуваних наночастинок металів мали *P. stratiotes* та *S. natans*. Вилучення наночастинок Mn найкраще відбувалося *P. stratiotes* (90%); Cu – *S. natans*. (60%); Zn – *P. stratiotes* (70%), Ag – *S. natans*. та *P. stratiotes* (на 76%).
2. Здійснено скринінг рослин-ремедіантів за фізіологічними маркерами стійкості. Високу стійкість мали *P. stratiotes* та *S. natans* і низьку *L. laevigatum*.
3. З'ясовано вплив наночастинок металів на морфо-фізіологічні параметри макрофітів. Вони спричинювали: зміни швидкості росту та активності ферменту каталази; зменшення вмісту хлорофілів і збільшення вмісту каротиноїдів; зменшення кількості білку; збільшення вмісту 9 з 17 амінокислот, причому 6 з них, а саме аланін, гліцин, гістидин, орнітин, пролін та фенілаланін є амінокислотами, які безпосередньо беруть участь в захисних реакціях рослини на стрес; зменшення вмісту 7-ми у *L. laevigatum* та 4-х у *S. natans* з 11 ацилкарнітинів; зменшення загального вмісту фенольних сполук та терпеноїдів.
4. Зміни фотосинтетичної продуктивності плейстофітів природних водойм України за присутності *P. stratiotes* мали негативні тенденції. У разі поширення *P. stratiotes* водоймами вона, завдяки високій конкурентоспроможності може витіснити корінні види і погіршити якість води (зменшити вміст кисню, змінити рН та мінералізацію води).
5. *P. stratiotes* є небезпечним інвазійним видом, вихід якого за межі очисних споруд до природних водойм є небажаним, тому її можна рекомендувати для фітореMediaції лише закритих технічних водойм.

6. Рекомендуємо *S. natans*, яка має високий ремедіаційний потенціал і є не агресивним для фітобіоти природних водойм України видом для впровадження у зелені технології очищення техногенно забруднених наночастинками металів природних вод.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Machlis G.E. and Hanson T. 2008. Warfare ecology. *BioScience*, 58: 729–736.
2. Warren S.D., Holbrook S.W., Dale D.A., Whelan N.L., Elyn M., Grimm W., and Jentsch A. 2007. Biodiversity and the heterogeneous disturbance regime on military training lands. *Restor. Ecol.* 15(4): 606–612.
3. Kulinowski, Kristen. (2004). Nanotechnology: From “Wow” to “Yuck”? *Bulletin of Science, Technology & Society*. 24. 13-20. 10.1177/0270467604263112.
4. Handy R.D. Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology / R.D. Handy, B.J. Shaw // *Health Risk*. – 2007. – №9. – P. 125-144.
5. Owen R. Formulating the problems for environmental risk assessment of nanomaterials / R. Owen, R.D. Handy // *Environ. Sci. Techol.* – 2007. – №41. – P. 582-588.
6. I. Papageorgiou, C. Brown, R. Schins, S. Singh, R. Newson, S. Davis, J. Fisher, E. Ingham, C.P. Case, The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt–chromium alloy on human fibroblasts in vitro, *Biomaterials*, Volume 28, Issue 19, 2007, Pages 2946-2958.
7. Jia-Ran Gurr, Alexander S.S. Wang, Chien-Hung Chen, Kun-Yan Jan, Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells, *Toxicology*, Volume 213, Issues 1–2, 2005, Pages 66-73, ISSN 0300-483X.
8. Eun-Jung Park, Jongheop Yi, Kyu-Hyuck Chung, Doug-Young Ryu, Jinhee Choi, Kwangsik Park, Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells, *Toxicology Letters*, Volume 180, Issue 3, 2008, Pages 222-229, ISSN 0378-4274.
9. Leblebici Z. Growth and lead accumulation capacity of *Lemna minor* and *Spirodela polyrhiza* (Lemnaceae): interactions with nutrient enrichment / Z. Leblebici, A. Aksoy // *Water Air Soil Pollut.* – 2011. – 214 – P. 175-184.

10. Rahman M.A. Aquatic arsenic: phytoremediation using floating macrophytes / M.A. Rahman, H. Hasegawa // *Chemosphere*. – 2011. – 83 – P. 633-646.
11. Sasmaza A. The accumulation of silver and gold in *Lemna gibba* exposed to secondary effluents / A. Sasmaza, E. Obek // *Chem Erde-Geochem*. – 2012. – 72 – P. 149-152.
12. Weis J.S. and Weis P., Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration, *Environment International* – 30. – 2004. – P. 685 – 700.
13. Dhir B., Srivastava S. Heavy metal removal from a multi-metal solution and wastewater by *Salvinia natans*. *Ecol. Eng.* 2011. Vol. 37. P. 893–896.
14. Espinoza-Quiñones F.R., Módenes A.N., Costa I.L. Jr, Palácio S.M., Daniela N.S., Trigueros E.G., Kroumov A.D., Silva E.A. Kinetics of lead bioaccumulation from a hydroponic medium by aquatic macrophytes *Pistia stratiotes*. *Water Air Soil Pollut.* 2009. Vol. 203. P. 29–37.
15. Lu Q., Zhenli L.H., Graetz D.A., Stoffella P.J., Yang X. Uptake and distribution of metals by water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2011. Vol.18. P. 978–986.
16. Lu X., Kruatrachue M., Pokethitiyook P., Homyok K. Removal of cadmium and zinc by water hyacinth, *Eichhornia crassipes*. *Sci. Asia*. 2004. Vol. 30. P. 93–103.
17. Taghi ganji M., Khosravi M., Rakhshae R. Phytoremediation potential of aquatic macrophyte *Azolla*. *Ambio*. 2012. Vol. 4. P. 122–137.
18. Singh N, Manshian B, Jenkins GJ, Griffiths SM, Williams PM, Maffei TG, Wright CJ, Doak SH. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*. 2009 Aug;30(23-24):3891-914. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.04.009. Epub 2009 May 8.
19. Ihtisham M, Noori A, Yadav S, Sarraf M, Kumari P, Brestic M, Imran M, Jiang F, Yan X, Rastogi A. Silver Nanoparticle's Toxicological Effects and Phytoremediation. *Nanomaterials (Basel)*. 2021 Aug 24;11(9):2164. doi: 10.3390/nano11092164. .

20. Крачок Л.І. НОВІТНІ ТЕХНОЛОГІЇ У СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВІ: ПРОБЛЕМИ І ПЕРСПЕКТИВИ ВПРОВАДЖЕННЯ СТАЛИЙ РОЗВИТОК ЕКОНОМІКИ Міжнародний науково-виробничий журнал 3’’2013[20] С-224.
21. Whitesides G.M. The “right” size in nanobiotechnology *Nature Biotechnology*. – 2003. – Vol.21. – P.1161-1165.
22. Ситар О.В., Новицька Н.В., Таран Н.Ю., Каленська С.М., Ганчурін В.В. *Фізика живого*, Т.18, № 3, 2010. С.113-116.
23. Courtois P., de Vaufleury A., Grosser A., Lors C., Vandebulcke F. Transfer of sulfidized silver from silver nanoparticles, in sewage sludge, to plants and primary consumers in agricultural soil environment. *Sci. Total Environ.* 2021;777:145900. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.145900.
24. Silva G.A. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine/ G.A. Silva // *Surg. Neurol.* — 2004. — Vol. 61.— P. 216 — 220.
25. Шуленбург М. Нанотехнологии. Новинки завтрашнего дня / М. Шуленбург. — Люксембург. Служба по официальным изданиям ЕС, 2006. _60с.
26. Perez-de-Luque A. Nanotechnology for parasitic plant control. / A. Perez-de-Luque, R. Diego // *Pest Manag. Sci.* – 2009. – №5. – P. 540-545.
27. Roco M.C. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine / M.C. Roco // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2003. – №14. – P. 337-346.
28. Saharan V. *Advances In Nanobiotechnology For Agriculture.* / V. Saharan // *Current Topics in Biotechnology & Microbiology.* – Dudweiler Landstr, Germany: Lap Lambert Academic Publishing Ag & Co. Kg, 2011. – P. 156-167.
29. Sengupta J, Ghosh S, Datta P, Gomes A, Gomes A (2014) Physiologically important metal nanoparticles and their toxicity. *J NanosciNanotechnol* 14: 990-1006.
30. Salonen E., Lin S., Reid M.L. et al. Real– Time Translocation of Fullerene Reveals Cell Contraction // *Small.* 2008.V.4, No.11.
31. Radomski A., Jurasz P. Alonso-Escolano D. et al. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis// *Br. J. Pharmacol.*, 2005. V.146. P.882-893.

32. AU - Maureen R. Gwin AU - Val Vallyathan Nanoparticles: Health Effects—Pros and Cons Journal Article- 2006 - Environmental Health Perspectives - 1818-1825 - 114 - 12.
33. Nel A, Xia T, Madler L, Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311(5761):622–627.
34. Hoet PH, Bruske-Hohlfeld I, Salata OV. 2004. Nanoparticles—known and unknown health risks. *J Nanobiotechnology*2(1):12.
35. Filyarovskaya, Viktoriya & Sitarska, Magdalena & Traczewska, Teodora & Wolf, Mirela. (2017). Microbiological stimulation of phytoremediation process using *Salvinia natans* to mercury contaminated water. *E3S Web of Conferences*. 22. 00047. 10.1051/e3sconf/20172200047.
36. Rezania S, Taib SM, Din MFM, Dahalan FA, Kamyab H (2016) Comprehensive review on phytotechnology: heavy metals removal by diverse plants species from wastewater. *J Hazard Mater* 318:587– 599
37. Sarwar, N.; Imran, M.; Shaheen, M.R.; Ishaque, W.; Kamran, M.A.; Matloob, A.; Hussain, S. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. *Chemosphere* 2017, 171, 710–721.
38. Erakhrumen, A.A. Phytoremediation: An environmentally sound technology for pollution prevention, control and remediation in developing countries. *Educ. Res. Rev.* 2017, 2, 151–156.
39. Chandra, R.; Kumar, V.; Tripathi, S.; Sharma, P. Heavy metal phytoextraction potential of native weeds and grasses from endocrine-disrupting chemicals rich complex distillery sludge and their histological observations during in-situ phytoremediation. *Ecol. Eng.* 2018, 111, 143–156.
40. Ali, H.; Khan, E.; Sajad, M.A. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere* 2013, 91, 869–881.
41. Koco ´n, A.; Jurga, B. The evaluation of growth and phytoextraction potential of *Miscanthus x giganteus* and *Sida hermaphrodita* on soil contaminated simultaneously with Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017, 24, 4990–5000.

42. Cundy, A.B.; Bardos, R.; Church, A.; Puschenreiter, M.; Friesl-Hanl, W.; Müller, I.; Vangronsveld, J. Developing principles of sustainability and stakeholder engagement for “gentle” remediation approaches: The European context. *J. Environ. Manag.* 2013, 129, 283–291.
43. Najeeb, U.; Ahmad, W.; Zia, M.H.; Zaffar, M.; Zhou, W. Enhancing the lead phytostabilization in wetland plant *Juncus effusus* L. through somaclonal manipulation and EDTA enrichment. *Arab. J. Chem.* 2017, 10, 3310–3317.
44. Abhilash, P.; Jamil, S.; Singh, N. Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. *Biotechnol. Adv.* 2009, 27, 474–488.
45. Benavides, L.C.L.; Pinilla, L.A.C.; Serrezuela, R.R.; Serrezuela, W.F.R. Extraction in Laboratory of Heavy Metals Through Rhizofiltration using the Plant *Zea Mays* (maize). *Int. J. Appl. Environ. Sci.* 2018, 13, 9–26.
46. Zhu, Y.; Zayed, A.; Qian, J.; De Souza, M.; Terry, N. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: II. Water hyacinth. *J. Environ. Qual.* 1999, 28, 339–344.
47. Kushwaha, A.; Hans, N.; Kumar, S.; Rani, R. A critical review on speciation, mobilization and toxicity of lead in soil-microbe-plant system and bioremediation strategies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018, 147, 1035–1045.
48. Raskin, I.; Ensley, B.D. *Phytoremediation of Toxic Metals*; John Wiley and Sons: Hoboken, NJ, USA, 2000.
49. Leguizamo, M.A.O.; Gómez, W.D.F.; Sarmiento, M.C.G. Native herbaceous plant species with potential use in phytoremediation of heavy metals, spotlight on wetlands—A review. *Chemosphere* 2017, 168, 1230–1247.
50. Ghosh, M.; Singh, S. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. *Asian J. Energy Environ.* 2005, 6, 18.
51. Murithi G. Kinetic and equilibrium study for the sorption of Pb(II) ions from aqueous phase by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) / G. Murithi, C.O. Onindo, G.K. Muthakia // *Bull. Chem. Soc. Ethiopia.* – 2012. – 26, №2. – P. 181-193.

52. Odjegba V.J. Effects of heavy metals on some proximate composition of *Eichhornia crassipes* / V.J. Odjegba, I.O. Fasidi // *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* – 2006. – 10, №1. – P. 83-87.
53. Parra L.M. Phytoremediation of low levels of heavy metals using duckweed (*Lemna minor*) / L.M. Parra, G. Torres, A.D. Arenas, E. Sánchez, K. Rodríguez // *Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability* / Eds. P. Ahmad, M.N.V. Prasad. – Springer, 2012. – P. 451-463.
54. Bennicelli R. The ability of *Azolla caroliniana* to remove heavy metals (Hg(II), Cr(III), Cr(VI)) from municipal waste water / R. Bennicelli, Z. Stezpniewska, A. Banach, K. Szajnocha, J. Ostrowski // *Chemosphere* 2004. – 55. – P. 141-146.
55. Smadar E. Removal of silver and lead Ions from water wastes using *Azolla filiculoides*, an aquatic plant, which adsorbs and reduces the ions into the corresponding metallic nanoparticles under microwave radiation in 5 min / E. Smadar, C. Benny, E. Tel-Or, V. Lorena, C. Antonio, G. Aharon // *Water Air Soil Pollut.* – 2011. – 218 – P. 365-370.
56. B. Dhir, *Phytoremediation: Role of Aquatic Plants in Environmental Clean-Up.* – Springer India, 2013 – 109 p.
57. Pratas, J.; Paulo, C.; Favas, P.J.; Venkatachalam, P. Potential of aquatic plants for phytofiltration of uranium-contaminated waters in laboratory conditions. *Ecol. Eng.* 2014, 69, 170–176.
58. Clemens S., Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants, *Biochimie.* 88 – 2006. – P. 1707–1719.
59. Birbaum K., Brogioli R., Schellenberg M., Martinoia E., Stark W. J., Gunther D. and Limbach L. K., No Evidence for Cerium Dioxide Nanoparticle Translocation in Maize Plants, *Environ. Sci. Technol.* – 2010. – 44. – P. 8718–8723.
60. Singh, D.; Gupta, R.; Tiwari, A. Potential of duckweed (*Lemna minor*) for removal of lead from wastewater by phytoremediation. *J. Pharm. Res.* 2012, 5, 1578–1582.

61. Verma, R.; Suthar, S. Lead and cadmium removal from water using duckweed–*Lemna gibba* L.: Impact of pH and initial metal load. *Alexander Eng. J.* 2015, 54, 1297–1304.
62. Tangahu, B.V.; Abdullah, S.R.S.; Basri, H.; Idris, M.; Anuar, N.; Mukhlisin, M. A Review on Heavy Metals (As, Pb, and Hg) Uptake by Plants through Phytoremediation. *Int. J. Chem. Eng.* 2011, 31, 939161.
63. Sasmaz, A.; Mete, I.; Sasmaz, D.M. Removal of Cr, Ni and Co in the water of chromium mining areas by using *Lemna gibba* L. and *Lemna minor* L. *Water Environ. J.* 2016, 30, 235–242.
64. Rai, U.N.; Sinha, S.; Tripathi, R.D.; Chandra, P. Wastewater treatability potential of some aquatic macrophytes: Removal of heavy metals. *Ecol. Eng.* 1995, 5, 5–12.
65. Sas-Nowosielska, A.; Galimska-Stypa, R.; Kucharski, R.; Zielonka, U.; Małkowski, E.; Gray, L. Remediation aspect of microbial changes of plant rhizosphere in mercury contaminated soil. *Environ. Monit. Assess.* 2008, 137, 101–109.
66. Gunathilakae, N.; Yapa, N.; Hettiarachchi, R. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the cadmium phytoremediation potential of *Eichhornia crassipes* (Mart.) solms. *Groundw. Sustain. Dev.* 2018.
67. Iha, D.S.; Bianchini, I., Jr. Phytoremediation of Cd, Ni, Pb and Zn by *Salvinia minima*. *Int. J. Phytoremediat.* 2015, 17, 929–935.
68. da-Silva, C.J.; Canatto, R.A.; Cardoso, A.A.; Ribeiro, C.; Oliveira, J.A. Arsenic-hyperaccumulation and antioxidant system in the aquatic macrophyte *Spirodela intermedia* W. Koch (Lemnaceae). *Theor. Exp. Plant Physiol.* 2017, 29, 203–213. [CrossRef].
69. Daud, M.; Ali, S.; Abbas, Z.; Zaheer, I.E.; Riaz, M.A.; Malik, A.; Zhu, S.J. Potential of Duckweed (*Lemna minor*) for the Phytoremediation of Landfill Leachate. *J. Chem.* 2018, 1–9.
70. Abbas, Z.; Arooj, F.; Ali, S.; Zaheer, I.E.; Rizwan, M.; Riaz, M.A. Phytoremediation of landfill leachate waste contaminants through floating bed

- technique using water hyacinth and water lettuce. *Int. J. Phytoremediat.* 2019, 21, 1356–1367.
71. Shi, J.; Xiang, Z.; Peng, T.; Li, H.; Huang, K.; Liu, D.; Huang, T. Effects of melatonin-treated *Nasturtium officinale* on the growth and cadmium accumulation of subsequently grown rice seedlings. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 2020.
 72. Muthusaravanan, S.; Sivarajasekar, N.; Vivek, J.; Paramasivan, T.; Naushad, M.; Prakashmaran, J.; Al-Duaij, O.K. Phytoremediation of heavy metals: Mechanisms, methods and enhancements. *Environ. Chem. Lett.* 2018, 16, 1339–1359.
 73. Maine, M.A.; Duarte, M.V.; Suñé, N.L. Cadmium uptake by floating macrophytes. *Water Res.* 2001, 35, 2629–2634.
 74. Olguín, E.; Hernández, E.; Ramos, I. The effect of both different light conditions and the pH value on the capacity of *Salvinia minima* Baker for removing cadmium, lead and chromium. *Acta Biotechnol.* 2002, 22, 121–131.
 75. Dhir B. Use of aquatic plants in removing heavy metals from wastewater. *Int. J. Environ. Eng.* 2010. Vol. 2. P. 185–20.
 76. Dhir B., Sharmila P., Saradhi P.P. Potential of aquatic macrophytes for removing contaminants from the environment. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2009. Vol. 39. P. 754–78.
 77. Klochenko P.D., Kharchenko G. V., Zubenko I. B., Shevchenko T. F. Some peculiarities of accumulation of heavy metals by macrophytes and epiphyton algae in water bodies of urban territories // *Hydrobiol. J.* 2007. Vol. 43, N 6. P. 46–57.
 78. Miretzky P., Saralegui A., Cirelli A.F. Aquatic macrophytes potential for simultaneous removal of heavy metals. *Chemosphere.* 2004. Vol. 57. P.997.
 79. Marchand L., Mench M, Jacob D.L. and Otte M.L., Corrigendum to “Metal and metalloid removal in constructed wetlands, with emphasis on the importance of plants and standardized measurements: A review”, *Environmental Pollution* 158 – 2010. – P. 3447-3461.
 80. Sabo-Attwood T., Unrine J. M., Stone J. W., Murphy C. J., GhoshRoy S., Blom D., Bertsch P. M. and Newwaan L. A., Uptake, distribution and toxicity of gold

- nanoparticles in tobacco (*Nicotiana xanthi*) seedlings, *Nanotoxicology* – 2011. – P. 1–8.
81. Weis J.S. and Weis P., Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration, *Environment International* – 30. – 2004. – P. 685 – 700.
 82. Olkhovych, O., Sviatlova, N., Konotop, Y. *et al.* Removal of Metal Nanoparticles Colloidal Solutions by Water Plants. *Nanoscale Res Lett* **11**, 518 (2016).
 83. Грудзинская И. А. Семейство аронниковые (Araceae)/ И. А. Грудзинская// Жизнь растений. В 6-ти т. Т. 6. Цветковые растения. Под. ред. Тахтаджяна А. Л. – М.: Просвещение, 1982.– С. 492 – 493.
 84. Barthlott W. The Salvinia paradox: superhydrophobic surfaces with hydrophilic pins for air retention under water / W. Barthlott, T. Schimmel, S. Wiersch, K. Koch, et al. // *Adv. Mater.* – 2010. – 22 – P. 2325-2328.
 85. Gałka A. Phenology of the aquatic fern *Salvinia natans* (L.) All. in the Vistula Delta in the context of climate warming / A. Gałka, J. Szmeja // *Limnologica.* – 2013. – 43 – P. 100-105.
 86. Haynes R.R. *Limnium* Richard / R.R. Haynes // *Flora of North America.* – 2000. – 22 – P. 28-29.
 87. Lopatko K.G., Aftandilyants E.H., Kalenska S.M., Tonkha O.L. Mother colloidal solution of metals. Vol J 13/00 Patent of Ukraine no. 3845912, 2009.
 88. Казарінова Г.О. Масовий розвиток *Pistia stratiotes* (Araceae) в р. Сіверський Донець (Харківська область)/ Г.О. Казарінова, Ю.Г. Гамуля, А.Б. Громакова // *Укр. ботан. журн.* – 2014. – Т. 71, № 1. – С. 17–21.
 89. Gornall A.G., Bardawill C. J., David M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction // *J. Biol. Chem.* – 1949. – 177, N 2. – P. 751–766.
 90. Mikhaylova S.V., Baydakova G.V., Boukina A.M., Boukina T.M., Shechter O.V., Ilina E.S., Zakharova E.Y. Combination of tandem mass spectrometry and lysosomal enzymes analysis-effective tool for selective screening for IEM in neurological clinic // *J. Inherit Metab. Dis.* – 2004. – **27**, N 1. – P.39.

91. Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical society transactions*. 1983. Vol.11, N 5. P. 591-592.
92. Pleshkov BP, Plant biochemistry practicum. Agropromizdat. 1985, 255.
93. O. Olkhovych, N.Svietlova, Y.Konotop, O.Karaushu, S. Hrechishkina Removal of metal nanoparticles colloidal solutions by water plants. *Nanoscale Research Letters*. (2016) 11:518.
94. Lu Q. Phytoremediation to remove nutrients and improve eutrophic stormwaters using water lettuce (*Pistia stratiotes* L.) / Q. Lu, Z.L. He, D.A. Graetz, P.J. Stoffella, X. Yang // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2010. – 17. – P. 84-96.
95. Prajapati S.K. Phytoremediation of chromium and cobalt using *Pistia stratiotes*: a sustainable approach / S.K. Prajapati, N. Meravi, S. Singh // *Proc Int Acad Ecol Environ Sci.* – 2012. – 2, №2. – P. 136-139.
96. Dhir B. Photosynthetic performance of *Salvinia natans* exposed to chromium and zinc rich wastewater / B. Dhir, P. Sharmila, P.P. Saradhi // *Braz. J. Plant. Physiol.* – 2008. – 20 – P. 61-70.
97. Buta E. The influence of heavy metals on growth and development of *Eichhornia crassipes* species, cultivated in contaminated water / E. Buta, L. Paulette, T. Mihaiescu, M. Buta, M. Cantor // *Horti Agrobot.* – 2011. – 39, №2. P. 135-141.
98. Hoffman T. Capacity of *Salvinia minima* Baker to tolerate and accumulate As and Pb / T. Hoffman, C. Kutter, J.M. Santamaria // *Eng. Life Sci.* – 2004. – 4. – P. 61-65.
99. Holtra A. Assessment of the phytoremediation efficacy of boron-contaminated waters by *Salvinia natans* / A. Holtra, T.M. Traczewska, M. Sitarska, M. Zamorska-Wojdyla // *Environ. Prot. Eng.* – 2010. – 36. – P. 87-94.
100. Wolff G. The use of *Salvinia auriculata* as a bioindicator in aquatic ecosystems: biomass and structure dependent on the cadmium concentration / G. Wolff, G.C. Pereira, E.M. Castro, J. Louzada, F.F. Coelho // *Braz. J. Biol.* – 2012. – 72.
101. S.V. Hrechyshkina, O. P. Olkhovych, M. M. Musienko, O. O. Panyuta, N. Yu. Taran. Evaluation of Physiological Parameters of Resistance and Perspectivity of

- Salvinia natans* Use for Extraction of Colloid Metal Nanoparticles. Hydrobiological Journal. Volume 58, Issue 3, 2022, pp. 46-53.
102. Olga Olkhovych, Nataliia Taran, Svitlana Hrechyshkina, Olena Voitsekhivska, Olga Panuta, Volodymyr Voitsekhivskyi Evaluation of Hyper-Tolerance of Aquatic Plants to Metal Nanoparticles. Journal of Ecological Engineering. 2022; 23(8):249-259.
103. Vitória AP, Lage-Pinto F, Campaneli da Silva LB, da Cunha M, de Oliveira JG, Rezende CE, Magalhães de Souza CM, Azevedo RA (2011) Structural and eco-physiological alterations of the water hyacinth [*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms] due to anthropo-genic stress in Brazilian Rivers. Braz Arch Biol Technol 54:1059–1068.
104. Salt D.E., Prince R.C., Baker A.J.M., Raskin I., Pickering I.J. Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy // Environmental Science and Technology. – 1999. – №33. – P. 713 – 717.
105. Kerkeb L., Krämer U. The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea* // Plant Physiology. – 2003. – №131. – P. 716 – 724.
106. Smirnoff N., Stewart G.R. Nitrogen assimilation and zinc toxicity to zinc-tolerant and non-tolerant clones of *Deschampsia cespitosa* L. // Beauv. New Phytologist. – 1987. – №107. – P. 671 – 680.
107. Sharma S.S., Dietz K.J. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress // Journal of Experimental Botany. – 2006. – №57. – P. 711 – 726.
108. Matysik J., Alia B., Mohanty P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants // Current Science. – 2002. – №82. – P. 525 – 532.
109. Ashraf M., Harris P.J.C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants // Plant Science. – 2004. – №166. – P. 3 – 16.

110. Aspinall D., Paleg L.G. Proline accumulation: physiological aspects // In: Paleg L.G., Aspinall D., eds. The physiology and biochemistry of drought resistance in plants. Australia: Academic Press. – 1981. – P. 205 – 240.
111. Naidu B.P., Paleg L.G., Aspinall D., Jennings A.C., Jones G.P. Amino acid and glycine-betaine accumulation in cold stressed seedlings // *Phytochemistry*. – 1991. – №30. – P. 407 – 409.
112. Miretzky P, Saralegui A, Cirelli AF (2006) Simultaneous heavy metal removal mechanism by dead macrophytes. *Chemosphere* 62:247–254.
113. Venkatrayulu C, Rani VK, Reddy DC, Ramamurthi R (2009) Bio-adsorption of copper (II) by aquatic weed plants *Hydrilla* and *Pistia*. *Asian J Animal Sci* 4:82–85.
114. Prajapati SK, Meravi N, Singh S (2012) Phytoremediation of chromium and cobalt using *Pistia stratiotes*: a sustainable approach. *Proc Int Acad Ecol Environ Sci* 2(2):136–139.
115. AbdElnaby AM, Egorov MA (2012) Efficiency of different particle sizes of dried *Salvinia natans* in the removing of Cu(II) and oil pollutions from water. *J Water Chem Technol* 34:143–146.
116. Li S, Gao D, Jiang Y. Function, Detection and Alteration of Acylcarnitine Metabolism in Hepatocellular Carcinoma. *Metabolites*. 2019 Feb 21;9(2):36. doi: 10.3390/metabo9020036. PMID: 30795537; PMCID: PMC6410233.
117. McGill M.R., Li F., Sharpe M.R., Williams C.D., Curry S.C., Ma X., Jaeschke H. Circulating acylcarnitines as biomarkers of mitochondrial dysfunction after acetaminophen overdose in mice and humans // *Arch Toxicol*. – 2013. – V. 88 (2). – P. 391 – 401.
118. Reuter S. E., Evans A. M. Carnitine and Acylcarnitines: Pharmacokinetic, Pharmacological and Clinical Aspects // – 2012. – V. 51 (9). – P. 553 – 572.
119. Mansour F. R., Wei W., Danielson N.D. Separation of carnitine and acylcarnitines in biological samples: a review // *Biomedical Chromatography*. – 2013. – V. 27 (10). – P. 1339 – 1353.

120. Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 2004, 55: 373-99.
121. Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis N.G. Natural products (secondary metabolites). In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan B., Gruissem W., Jones R., Eds.). *American Society of Plant Biologists.* Rockville. 2000. P. 1250–1268.
122. Gershenzon J. Plant Defenses: Surface Protectants and Secondary Metabolites. *Plant Physiology.* 2003. P. 347-376.
123. Mazid M., Khan T.A , Mohammad F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine.* 2011. Vol. 3, N.2. P. 232-249.
124. Matos Nunes J., Bertodo L.O.O., Da Rosa L.M.G., Von Poser G.L., Rech S.B. Stress induction of valuable secondary metabolites in *Hypericum polyanthemum* acclimatized plants. *South Afr J. Bot.* 2014. Vol.94 P.182–189.
125. Azqueta A., Shaposhnikov S., Collins A.R. DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutat. Res. Genet. Toxicol Environ. Mutagen.* 2009. Vol. 674. P. 101–108.
126. Parvaiz A., Maryam S., Satyawati S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *J. Plant Biol.* 2008. Vol. 5. P. 167–173.
127. Porter, J. W., Spurgeon, S. L. (eds.): *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds.* Wiley, New York .1981.
128. Feild T.C., Lee D.W., Holbrook N.M. Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. *Plant Physiol.* 2001. Vol. 127. P. 566–574.
129. O. O. Olkhovych, S. V. Hrechyshkina, O. O. Panyuta, Nataliya Yu. Taran, R. V. Ivannikov Secondary Metabolites of Pleustophytes as Markers of Resistance to Metal Nanoparticles. *Hydrobiological Journal.* Volume 58, Issue 2, 2022, pp. 44-50.
130. Cheynier V., Comte G., Davies K., Lattanzio V., Martens S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol. Biochem.* 2013. Vol. 72. P. 1– 20.

131. Mazid M., Khan T.A , Mohammad F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*. 2011. Vol. 3, N.2. P. 232-249.
132. Tasiu 9I. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biol.Res*. 2019. Vol. 52. N. 39.
133. Gershenzon J. Plant Defenses: Surface Protectants and Secondary Metabolites. *Plant Physiology*. 2003. P. 347-376.
134. Matos Nunes J., Bertodo L.O.O., Da Rosa L.M.G., Von Poser G.L., Rech S.B. Stress induction of valuable secondary metabolites in *Hypericum polyanthemum* acclimatized plants. *South Afr J. Bot*. 2014. Vol.94 P.182–189.
135. Porter, J. W., Spurgeon, S. L.: Biosynthesis of Isoprenoid Compounds. Wiley, New York .1981.
136. Olkhovych O., Taran N., Hrechyshkina S., Musienko M. Influence of alien species *Pistia Stratiotes* L., 1753 on representative species of genus *Salvinia* in Ukraine. *Transylvanian Review of Systematical and Ecological Research*. 22.1 (2020). ‘The Wetlands Diversity’ – P. 43-56.
137. Broecker, W.S., Peng, T.H., 1982. *Tracers in the Sea*. Eldigio Press, Palisades, New York. 690pp.
138. Karlina Soetaert, Andreas F. Hofmann, Jack J. Middelburg, Filip J.R. Meysman, Jim Greenwood, The effect of biogeochemical processes on pH Marine Chemistry 105 (2007) 30–51.
139. В.В.Яковлєв. ЗАКОНОМІРНІСТЬ ФОРМУВАННЯ СОЛЬОВОГО СКЛАДУ ПРИРОДНИХ ВОД ЗОНИ АКТИВНОГО ВОДООБМІНУ УКРАЇНИ. Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія «Геологія. Географія. Екологія», 2015, випуск 43, с. 94-100.
140. Goswami S, Das S (2015) A study on cadmium phytoremediation potential of Indian mustard, *Brassica juncea*. *Int J Phytoremediat* 17(1): 583–588.
141. O. P. Olkhovich, S. V. Grechyshkina, Nataliya Yu. Taran, L. M. Batsmanova, N. B. Svetlova Capability for Accumulating Metals and Remediation Potential of *Pistia stratiotes*. Volume 53, Issue 3, 2017, pp. 90-99.

142. Akinbile, C.; Yusoff, M.S. Assessing water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and lettuce (*Pistia stratiotes*) effectiveness in aquaculture wastewater treatment. *Int. J. Phytoremed.* 2012, 14, 201–211.
143. Sarwar, T.; Shahid, M.; Khalid, S.; Shah, A.H.; Ahmad, N.; Naeem, M.A.; Bakhat, H.F. Quantification and risk assessment of heavy metal build-up in soil–plant system after irrigation with untreated city wastewater in Vehari, Pakistan. *Environ. Geochem. Health* 2019, 1–17.
144. Polomski, R.F.; Taylor, M.D.; Bielenberg, D.G.; Bridges, W.C.; Klaine, S.J.; Whitwell, T. Nitrogen and phosphorus remediation by three floating aquatic macrophytes in greenhouse-based laboratory-scale subsurface constructed wetlands. *Water Air Soil Pollut.* 2009, 197, 223–232.
145. Skinner, K.; Wright, N.; Porter-Goff, E. Mercury uptake and accumulation by four species of aquatic plants. *Environ. Pollut.* 2007, 145, 234–237.;
146. Eloy, G.-G.; Marta, R.; Gertjan, M.; Miquel, C.; Rosina, G. Quantitative risk assessment of norovirus and adenovirus for the use of reclaimed water to irrigate lettuce in Catalonia. *Water Res.* 2019, 153, 91–99.
147. Mishra, V.K.; Tripathi, B. Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. *Bioresour. Technol.* 2008, 99, 7091–7097.
148. Rodrigues, A.C.D.; do Amaral Sobrinho, N.M.B.; dos Santos, F.S.; dos Santos, A.M.; Pereira, A.C.C.; Lima, E.S.A. Biosorption of toxic metals by water lettuce (*Pistia stratiotes*) biomass. *Water Air Soil Pollut.* 2017, 228, 156.
149. Camargo A.F.M. Crescimento e produção primária de macrófitas aquáticas em zonas litorâneas / A.F.M. Camargo, G.G. Henry-Silva, M.M. Pezzato // *Ecótonos nas interfaces dos ecossistemas aquáticos* / Ed. R. Henry. – Rima, São Carlos: Fundibio. – 2003. – P. 213- 232.
150. Szmeja J, Gałka A (2013) Survival and reproduction of the aquatic fern *Salvinia natans* (L.) All. during expansion in the Vistula Delta, south Baltic Sea coast. *J. Freshw. Ecol.* 28(1):113–123. <https://doi.org/10.1080/02705060.2012.716375>.

151. Polechońska, L., Klink, A. & Dambiec, M. Trace element accumulation in *Salvinia natans* from areas of various land use types. *Environ Sci Pollut Res* 26, 30242–30251 (2019).
152. Bezmertna O.O.1,2, Heluta V.P.3, Danylyk I.M.4, Orlov O.O.5, Kazarinova H.O.6, Janyuk M.A.1, Babytskiy A.I.7, Korotchenko I.A.3 2020. Distribution of *Salvinia natans* (Salviniaceae, Polypodiopsida), a fern listed in the Red Data Book of Ukraine, within the country. *Ukrainian Botanical Journal*, 77(3): 173–188.
153. Rokityanskiy, A & Gamulya, Yuriy. (2017). Rare and protected aquatic and coastal aquatic species in the Kharkiv region (Ukraine). *Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна Серія «Біологія», вип. 28, 2017р.* Series “Biology”, issue 28, 2017 *The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University*. 175-186.