

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра Екології та екоменеджменту

«До захисту в ЕК»
Директор інституту (декан факультету)

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри

Наталія ГРЕГІРЧАК
(ім'я та прізвище)
(підпис)
«09» грудня 2024 р.

Ігор ЯКИМЕНКО
(ім'я та прізвище)
(підпис)
«09» грудня 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 101 «Екологія»
(код і назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Екологія, екоменеджмент та екоаудит»

на тему: Вплив поліфенольних сполук на фотосинтетичну активність мікроводорості *Euglena gracilis* та накопичення полісахариду парамілону

Виконав: здобувач II курсу, групи ЕКА-1-3М

Федоришина Євгенія Олександрівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник Котинський Андрій Валерійович
(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент Наталія Топчій
(ім'я та прізвище)

(підпис)

Я як здобувачка Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавала і не одержувала недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач

(підпис)

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра Екології та екоменеджменту

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 101 «Екологія»
(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Екологія, екоменеджмент та екоаудит»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри Ігор ЯКИМЕНКО

« 30 » вересня 2024 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Федоришиної Євгенії Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Вплив поліфенольних сполук на фотосинтетичну активність мікроводорості *Euglena gracilis* та накопичення полісахариду парамілону

керівник роботи Котинський Андрій Валерійович, кандидат технічних наук, доцент

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від «07» жовтня 2024 року № 875кс

2. Строк подання здобувачем роботи 04 грудня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи: культура зеленої одноклітинної мікроводорості виду *Euglena gracilis*; концентрація спирту в культурі становила 0, 2 % (200 мкл етилового 96 % спирту); додана в культуру галова кислота була у широкому діапазоні концентрацій 30, 60, 120 та 240, 300, 450, 900 мкМ; обрана концентрація резорцину 300 мкМ.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Пояснювальна записка складається із 3 розділів, висновків проведених наукових досліджень та списку використаних джерел.

5. Перелік графічного матеріалу Презентація

АНОТАЦІЯ

Федоришина Є.О. Вплив поліфенольних сполук на фотосинтетичну активність мікроводорості *Euglena gracilis* та накопичення полісахариду парамілону. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеня магістра за спеціальністю 101 «Екологія» (ОПП «Екологія, екоменеджмент та екоаудит»). – Національний університет харчових технологій МОН України, Київ, 2024.

Дослідження проводилися з використанням культури *Euglena gracilis* – представника протистів, який має унікальну здатність до фотосинтезу, а також може живитися, поглинаючи органічні речовини з навколишнього середовища. Цей процес здійснюється як за наявності світла, так і в умовах повної темряви.

Цей одноклітинний організм належить до класу *Euglenophyceae* та має унікальні характеристики, які роблять його предметом інтенсивних наукових досліджень і застосування в різних галузях. Його зручно вирощувати в лабораторних умовах на мінімальному середовищі, тому успішно можна використовувати для промислового культивування.

В ході роботи були проведені посіви культур *Euglena gracilis* у поживне середовище з додаванням спирту, галової кислоти та резорцину. Це дозволило дослідити вплив добавок на розвиток та ріст культур, вміст у них хлорофілу та парамілону; проаналізувати їх вплив на фотосинтетичну активність. В результаті кожного дослідження було побудовано графіки для кожної серії вимірювань культури *E. gracilis* та сформульовані відповідні узагальнення.

Наукова новизна роботи: полягає у систематичному дослідженні впливу етанолу та поліфенольних сполук, зокрема галової кислоти та резорцину, на біологічні процеси зеленої мікроводорості *Euglena gracilis*. Вперше комплексно досліджено їх вплив на фотосинтетичну активність, процеси дихання, ріст, накопичення хлорофілу та синтез полісахариду парамілону.

Результати роботи розширюють розуміння механізмів впливу поліфенолів і спирту на біохімічні та фізіологічні процеси у *E. gracilis*. Це є важливим кроком у розробці екологічно безпечних біотехнологічних рішень.

Практичне значення наукової роботи: вивчення культури *Euglena gracilis* та впливу поліфенольних сполук на фотосинтетичну активність і дихання зеленої мікроводорості, її ріст, кількість хлорофілу та накопичення полісахариду парамілону, в ході систематичного дослідження є перспективним для створення екологічних біотехнологічних рішень, збагачення продуктів харчування, фармацевтичного виробництва, екологічного моніторингу та очищення забруднених стічних вод. Це також допомагає розробити нові підходи до оптимізації умов вирощування цієї мікроводорості для різних промислових застосувань та біоремедіації.

Ключові слова: EUGLENA GRACILIS, ЕТАНОЛ, ПОЛІФЕНОЛЬНІ СПОЛУКИ, ГАЛОВА КИСЛОТА, РЕЗОРЦИН, ФОТОСИНТЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ, ХЛОРОФІЛ, ПАРАМІЛОН.

Список публікацій здобувача:

Федоришина, Є.О.;Семенова, О.І.; Ecological aspects and potential of *Euglena gracilis* application in various fields of science and technology. *Матеріали VI International Conference on European Dimensions of Sustainable Development, May 15 – 17, 2024.* – Kyiv: NUFT, 2024. – 137 p.

ABSTRACT

Fedoryshyna E.O. The influence of polyphenolic compounds on the photosynthetic activity of the microalga *Euglena gracilis* and the accumulation of the polysaccharide paramylon. – Qualification scientific work in the form of a manuscript.

Qualification work for the degree of master in the specialty 101 «Ecology» (EPP «Ecology, eco – management and eco – audit»). – National University of Food Technologies of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2024.

The research was conducted using a culture of *Euglena gracilis*, a protist that has a unique ability to photosynthesize and can also feed by absorbing organic matter from the environment. This process occurs both in the presence of light and in complete darkness.

This unicellular organism belongs to the class *Euglenophyceae* and has unique characteristics that make it the subject of intensive scientific research and application in various fields. It is convenient to grow in laboratory conditions on minimal media, so it can be successfully used for industrial cultivation.

During the work, cultures of *Euglena gracilis* were sown in a nutrient medium with the addition of alcohol, gallic acid and resorcinol. This made it possible to study the effect of additives on the development and growth of cultures, their chlorophyll and paramylon content; to analyze their effect on photosynthetic activity. As a result of each study, graphs were constructed for each series of measurements of the *E. gracilis* culture and appropriate generalizations were formulated.

The scientific novelty of the work: consists in a systematic study of the effect of ethanol and polyphenolic compounds, in particular gallic acid and resorcinol, on the biological processes of the green microalga *Euglena gracilis*.

For the first time, their effect on photosynthetic activity, respiratory processes, growth, chlorophyll accumulation and synthesis of the polysaccharide paramylon was comprehensively studied.

The results of the work expand the understanding of the mechanisms of the influence of polyphenols and alcohol on biochemical and physiological processes in *E. gracilis*, which is an important step in the development of environmentally friendly biotechnological solutions.

Practical significance of the scientific work: the study of the culture of *Euglena gracilis* and the influence of polyphenolic compounds on the photosynthetic activity and respiration of the green microalgae, its growth, the amount of chlorophyll and the accumulation of the polysaccharide paramylon, in the course of a systematic study is promising for the creation of environmentally friendly biotechnological solutions, food fortification, pharmaceutical production, environmental monitoring and treatment of contaminated wastewater. It also helps to develop new approaches to optimizing the growing conditions of this microalgae for various industrial applications and bioremediation.

Keywords: **EUGLENA GRACILIS, ETHANOL, POLYPHENOLIC COMPOUNDS, GALLIC ACID, RESORCINOL, PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY, CHLOROPHYLL, PARAMYLON.**

List of publications of the applicant:

Fedorishyna, E.O.; Semenova, O.I.; Ecological aspects and potential of *Euglena gracilis* application in various fields of science and technology. *Proceedings of the VI International Conference on European Dimensions of Sustainable Development, May 15 – 17, 2024.* – Kyiv: NUFT, **2024.** – 137 p.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	12
ВСТУП	13
РОЗДІЛ 1	
ЗАГАЛЬНІ АСПЕКТИ ЩОДО МІКРОВОДОРОСТІ <i>EUGLENA GRACILIS</i> ТА ВПЛИВУ НА НЕЇ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК	16
1.1 Будова та характеристика <i>E. gracilis</i>	16
1.2 Багатофункціональне екологічне використання мікроводорості <i>Euglena gracilis</i>	18
1.2.1 Застосування <i>Euglena gracilis</i> у біопереробці та біоремедіації.....	18
1.2.2 Поглинання CO ₂ та вироблення O ₂ мікроводоростями	20
1.2.3 <i>Euglena gracilis</i> як інструмент для очищення стічних вод від фенолів та поліфенольних сполук	21
1.2.4 Утилізація промислових відходів пивоварного виробництва для культивування <i>Euglena gracilis</i>	24
1.2.5 Біопродукти з <i>Euglena gracilis</i>	25
1.2.6 Запасний полісахарид <i>E. gracilis</i> – парамілон та його використання	26
1.3 Функціональний стан фотосинтетичного апарату клітин при міксотрофному культивуванні при додаванні етанолу.....	27
1.4 Дослідження впливу спиртів на дихання і фотосинтез <i>E. gracilis</i>	30
1.4.1 Вплив етанолу на дихання і фотосинтез <i>E. gracilis</i>	30
1.4.2 Вплив двох лігноцелюлозних цукрових спиртів на ріст і біосинтез метаболітів <i>Euglena gracilis</i>	32
1.5 Вплив поліфенольних сполук та ріст, метаболічну активність та фотосинтетичний апарат прісноводної мікроводорості <i>Euglena gracilis</i>	32
1.5.1 Вплив протокатехевої та ферулової кислоти	32
1.5.2 Вплив фенольних сполук з основних структур лігніну	34
1.5.3 Вплив ферулової кислоти з рисових висівків	35

1.5.4 Вплив біологічно активних речовин фенольної природи (кавова кислота, бензойна та галова).....	35
1.5.5 Вплив фітохімічної ванільної кислоти	36
1.5.6 Вплив фенольних елісаторів, пов'язаних з лігніном	36
(сирингова і кумарова кислота).....	36
1.6 Вплив поліфенольних сполук на інші водорості та рослини	37
1.6.1 Вплив фенольних сполук (пірокатехін, фенол і галова кислота) на міководорість <i>Sp. platensis</i> та <i>C. vulgaris</i>	37
1.6.2 Вплив галової кислоти на <i>Microcystis flos – aquae</i>	38
1.6.3 Вплив галової кислоти на рослини – регенерани <i>Corylus avellana</i> (L.) <i>H. Karst. i Salix alba</i> L. in vitro.....	39
1.6.4 Вплив аскорбінової та галової кислот на вігню (<i>Vigna unguiculata</i> L.	40
1.6.5 Вплив резорцину на <i>Chlorella vulgaris</i>	41
1.6.6 Вплив резорцину та біовугілля на томати (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill).....	41
1.6.7 Вплив резорцину на сою	42

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	43
2.1 Об'єкт і предмет дослідження, реактиви та матеріали	43
2.2 Характеристика обладнання та устаткування для проведення експериментальних досліджень.....	46
2.3 Методи досліджень	51
2.3.1 рН – метрія.....	52
2.3.2 Приготування поживного середовища, посів (мікробіологічний метод) та метод світлової мікроскопії	52
2.3.3 РСV метод.....	54
2.3.4 Вимірювання хлорофілу за допомогою методу спектрофотометрії ..	56
2.3.5 Спектрофотометричний метод (за глюкозою визначаємо парамілон	57
2.3.6 Приготування розчину добавок.....	58
2.3.7 Метод центрифугування	59

2.3.8 Амперметричний метод визначення вмісту O_2 за допомогою кисневого електроду	59
2.3.9 Метод флуориметрії (визначення флуоресценції хлорофілу).....	62
2.4 Статистична обробка результатів досліджень	66
2.4.1 Ріст клітин у фототрофних та міксотрофних умовах.....	67
2.4.2 Визначення концентрації хлорофілу в клітинах мікроводорості при різних типах живлення та впливу поліфенольних сполук	68
2.4.3 Визначення вмісту парамілону в культурі <i>Euglena gracilis</i> під впливом різних фенольних сполук за фототрофних та міксотрофних умо	71
2.4.4 Визначення інтенсивності фотосинтезу <i>Euglena gracilis</i> під впливом різних фенольних сполук при різних типах живлення	72
2.4.5 Визначення флуорисценції (qP) <i>Euglena gracilis</i> у фототрофних та міксотрофних умовах	73

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	76
3.1. Визначення впливу поліфенольних сполук на ріст клітин <i>Euglena gracilis</i> у автотрофних та міксотрофних умовах.....	76
3.1.1 Вплив галової кислоти	77
3.1.2 Вплив резорцину	81
3.2 Визначення впливу поліфенольних сполук на вміст хлорофілу в клітинах автотрофних та міксотрофних культур	84
3.2.1 Вплив галової кислоти	84
3.2.2 Вплив резорцину	87
3.3 Вплив галової кислоти та резорцину на визначення концентрації глюкози та парамілону в культурі <i>Euglena gracilis</i>	90
3.4 Вплив галової кислоти та резорцину на визначення середньої швидкості поглинання та виділення O_2 <i>Euglena gracilis</i>	94
3.5 Вплив галової кислоти та резорцину на вимірювання індукції флуоресценції хлорофілу в клітинах <i>Euglena gracilis</i>	97
3.6 Загальні висновки та обговорення	99

3.6.1 Ріст клітин <i>Euglena gracilis</i> у міксотрофних та фототрофних умовах з галовою кислотою та резорцином.....	99
3.6.2 Вплив галової кислоти та резорцину на накопичення хлорофілу	101
3.6.3 Визначення впливу поліфенольних сполук на концентрацію парамілону	104
3.6.4 Визначення O_2	105
3.6.5 Визначення флуоресценції.....	108
ВИСНОВКИ	109
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	111

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ,
СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

АТФ	Аденозинтрифосфат
АФК	Активна форма кисню
БАД	Біологічно активна добавка
БАР	Біологічно активна речовина
ВУАН	Всеукраїнська академія наук
ГК	Галова кислота
ДНК	Дезоксирибонуклеїнова кислота
КоА	Кофермент А
МСОП	Міжнародний союз охорони природи
НАДН	Нікотинамідаденіндинуклеотид
НАН	Національна академія наук
ПГ	Парникові гази
ПХП	Пластохіноновий пул
РНК	Рибонуклеїнова кислота
ФСІ, ІІ	Фотосистема один, два
НВА	4 – Гідроксибензальдегід
НМА	Гідрокси – 3 – метоксикорична кислота
PCV	Packed Cell Volume (ущільнен. об'єм клітин)
РНА	Полігідроксикислоти
p – CA	p – Кумарова кислота
SA	Сирингова кислота
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (дод. сульфат натрію)
SRA	4 – Гідрокси – 3,5 – диметоксибензальдегід
TCA	Цикл трикарбонових кислот (цикл Кребса)

ВСТУП

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України є визнаним на міжнародному рівні науковим центром із вивчення ботаніки, який володіє значним дослідницьким потенціалом. Він займає провідне місце в Україні та є одним із ключових європейських закладів, що досліджують біорізноманіття на різних рівнях організації, охоплюючи судинні та спорові рослини, а також гриби. Як наукова база, інститут виконує важливу функцію у підтримці та проведенні досліджень.¹

Дослідження проводилися з використанням культури *Euglena gracilis* – одноклітинного організму з класу *Euglenophyceae*, який належить до протистів і володіє унікальними властивостями. Цей організм здатний до фотосинтезу та гетеротрофного живлення через поглинання органічних речовин із середовища. Важливо, що така здатність реалізується як у світлових умовах, так і в темряві, що робить його об'єктом активних наукових досліджень і перспективним для застосування у різних сферах.^{2,3}

Актуальність наукових досліджень: полягає в тому, що результати цієї роботи сприяють поглибленню розуміння механізмів впливу поліфенолів на біохімічні та фізіологічні процеси зеленої мікроводорості *Euglena gracilis* за різних типів живлення. Це є важливим кроком у розробці інноваційних, екологічно – біотехнологічних рішень, корисних для різних галузей промисловості та довкіллі вцілому.

Мета: дослідження впливу поліфенольних сполук на фотосинтетичну активність мікроводорості *Euglena gracilis* та накопичення полісахариду парамілону.

Завдання: провести посів культур *Euglena gracilis* з додаванням і без додавання фенольних сполук (галова кислота, резорцин) за фототрофних та міксотрофних умов, вивчити їх вплив на фізіологічні та біохімічні характеристики *E. gracilis* для того, щоб визначити оптимальні умови для підвищення її росту, продуктивності, фотосинтетичної активності, інтенсивності дихання, концентрації хлорофілу в клітинах та накопичення полісахариду парамілону.

Методи досліджень: емпіричні (спостереження, аналіз, порівняння, вимірювання, експеримент), біохімічні (рН – метрія, спектрофотометрія, центрифугування, флуоресцентний метод), фізіологічні (амперметричний, світлова мікроскопія, PCV), мікробіологічний, статистичні методи обробки даних.

Об'єктом є: культура *Euglena gracilis*.

Предметом є: приріст біомаси, вміст хлорофілу, фотосинтетична активність мікроводорості *Euglena gracilis* та її здатність до накопичення полісахариду парамілону під впливом фенольних сполук таких як галова кислота та резорцин.

Наукова новизна роботи: полягає у систематичному дослідженні впливу етанолу та поліфенольних сполук, зокрема галової кислоти та резорцину, на біологічні процеси зеленої мікроводорості *Euglena gracilis*. Вперше комплексно досліджено їх вплив на фотосинтетичну активність, процеси дихання, ріст, накопичення хлорофілу та синтез полісахариду парамілону.

Результати роботи розширюють розуміння механізмів впливу поліфенолів і спирту на біохімічні та фізіологічні процеси у *E. gracilis*. Це є важливим кроком у розробці екологічно безпечних біотехнологічних рішень.

Практичне значення наукової роботи: вивчення культури *Euglena gracilis* та впливу поліфенольних сполук на фотосинтетичну активність і дихання зеленої мікроводорості, її ріст, кількість хлорофілу та накопичення полісахариду парамілону, в ході систематичного дослідження є перспективним для створення екологічних біотехнологічних рішень, збагачення продуктів харчування, фармацевтичного виробництва, екологічного моніторингу та очищення забруднених стічних вод. Це також допомагає розробити нові підходи до оптимізації умов вирощування цієї мікроводорості для різних промислових застосувань та біоремедіації.

Особистий внесок здобувача: здобувачка, під керівництвом канд. біол. наук., Степанова С.С, провела підготовку та виконала експериментальну роботу, оволоділа прийомами виготовлення живильного середовища і стерильного посіву культури зеленої мікроводорості *Euglena gracilis*.

Було проведено порівняльне дослідження кривих росту *E. gracilis*; визначено кількість та об'єм клітин, концентрацію хлорофілу (а і б) в клітинах, вміст парамілону з оцінкою показників мікрородості, вирощеної за різних типів живлення та впливу поліфенолів.

Разом із доцентом, кандидатом технічних наук Котинським А. В., було проведено пошук, опрацювання та аналіз зарубіжної та вітчизняної літератури, яка стосується культивування клітин мікрородості *E. gracilis*, сформульовано тему кваліфікаційної магістерської роботи.

Спільно з д.б.н., проф. Золотарьовою О. К. були визначені мета та основні завдання, обрано об'єкт досліджень, обґрунтовані отримані результати.

Всі експерименти та дослідження були проведені разом з керівником практики, науковим співробітником відділу мембранології та фітохімії Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного, канд. біол. наук., Степановим С.С.

Структура і обсяг кваліфікаційної роботи: магістерська робота складається із вступу, 3 розділів, висновків, списку використаних джерел. Кваліфікаційна робота викладена на 116 сторінках, містить 8 таблиць та 36 рисунків, використано 60 літературних джерел.

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНІ АСПЕКТИ ЩОДО МІКРОВОДОРОСТІ *EUGLENA GRACILIS* ТА ВПЛИВУ НА НЕЇ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК

1.1 Будова та характеристика *E. gracilis*

Мікроводорість *E. gracilis*, одноклітинна джгутикова, має багато спільних фізіологічних та метаболічних характеристик з тваринами, рослинами та грибами.

E. gracilis може бути автотрофною, використовуючи CO₂ і світло як єдине джерело вуглецю та енергії, міксотрофною, коли присутнє органічне джерело вуглецю і світло, або гетеротрофною, коли органічне джерело вуглецю присутнє в темряві.

Її клітини мають веретеноподібну форму, 50 мкм завдовжки і 10 мкм завширшки, а клітинна структура цього організму характеризується пелікулою – гнучкою білковою мембраною, а не жорсткою полісахаридною клітинною стінкою, як у водоростей і рослин.¹⁸

Пелікула складається з переплетених білкових ланцюгів, які лежать під плазматичною мембраною клітини і утворюють гребінцеподібні або борозенчасті складки. Вона допомагає регулювати доступ фотонів, дозволяючи організму здійснювати метаболічні рухи та змінювати форму.

Попереднім продуктом *E. gracilis* є парамілон – залишок глюкози, пов'язаний зв'язком β – 1:3.

Парамілон зберігається в цитоплазмі, а не в хлоропластах клітини. Світлочутливе вічко знаходиться в цитоплазмі, а фоторецепторний пігмент – у кристалічному тілі біля основи довгого джгутика.¹⁸

Euglena gracilis є об'єктом з цікавими та унікальними фізіологічними властивостями, включаючи його різноманітні метаболічні можливості (Ogawa et al., 2015) .

Види евглени мають пляму червоного ока для фототаксису, а їх клітинна мембрана оточена структурою на основі білка, що називається плівкою, яка поводить себе подібно до клітинної стінки, але є більш гнучкою (O'Neill та ін., 2017, Ебенезер та ін., 2019), дозволяючи здатності набувати різноманітних форм (Лонерган, 1985).¹⁸

Плівка може генерувати перистальтичні деформації тіла, схожі на «швидке повзання», що пропонує альтернативний і більш незвичний метод пересування, відомий як евгленоїдний рух (Häder et al., 2022). Зовнішня оболонка евглени складається з глікопротеїнів і полісахаридів (O'Neill et al., 2015 a).¹⁸

Евглена має два джгутики, що виходять з переднього резервуара, один короткий і один довгий. Короткий джгутик не виступає з клітини та не бере участі в пересуванні (Häder et al., 2022), тоді як довгий джгутик рухає клітину спіральним рухом (Rossi et al., 2017).¹⁸

Будучи як автотрофом, так і гетеротрофом, евглена може синтезувати енергію з неорганічного вуглекислого газу та фотонів сонця, а також може отримувати вуглець з багатьох органічних джерел. Ці джерела включають, але не обмежуються ними, глюкозу, лактат, піруват і етанол (Rodríguez-Zavala et al., 2006), що дозволяє видам процвітати в темних умовах, де відсутність світла ускладнює ріст суто автотрофних організмів (Rodríguez-Zavala та ін., 2007).¹⁸

Встановлено, що евглена живе в прісній природній воді, але її легко вирощувати в культурах або навіть в умовах, які вважаються невідповідними для інших організмів. Ця толерантність завдяки унікальному метаболізму, коли види евглени можуть протистояти екстремальним середовищам, що містять забруднюючі речовини, такі як важкі метали, посилюючи свій метаболізм для виробництва ферментів, які зменшують токсичність (Khatiwada та ін., 2020).¹⁸

Ці якості можуть надихнути продукти біоремедіації перетворювати токсини, такі як кадмій, ртуть і свинець, у менш шкідливі форми (Winters et al., 2021).

Ці клітини також можуть витримувати кислі умови з рН 2,5 (Rodriguez – Zavala та ін., 2010), хоча діапазон закінчується біля рН 7, тому лужні умови часто не переносяться (Olaveson та ін., 2000).¹⁸

E. gracilis також демонструє значну стійкість до радіації, більшу, ніж більшість бактерій (Furuta et al., 2003), а також певну стійкість до антибіотиків (Shao et al., 2018). Має природну здатність переносити ряд зовнішніх стресів, включаючи кислотні умови росту та іонізуюче випромінювання.¹⁸

1.2 Багатофункціональне екологічне використання мікроводорості *Euglena gracilis*

1.2.1 Застосування *Euglena gracilis* у біопереробці та біоремедіації

Біоремедіація, тобто використання живих організмів для видалення або нейтралізації забруднюючих речовин з навколишнього середовища, стала перспективним і стійким підходом до боротьби з різними забруднювачами.¹⁹

Euglena gracilis привертає увагу як перспективний організм для біоремедіації середовищ, забруднених важкими металами, завдяки своїй здатності ефективно накопичувати та нейтралізувати ці речовини.¹⁹

Анаміка Сінгх, Абхілаша Шурі, Саміна Мазхар (2022) досліджували цю тему. Було обґрунтовано, що біоремедіація стічних вод за допомогою мікроводоростей є недорогою, енергоефективною та ефективною у зменшенні забруднювачів у порівнянні з традиційними технологіями очищення стоків.²⁰

Стічні води є величезним ресурсом мінералів, поживних речовин, біоенергії та цінних органічних сполук і можуть бути використані для культивування мікроводоростей.

Біомаса мікроводоростей може бути ще застосована як сировина для біопереробних заводів для виробництва біопалива та комерційно важливих високоцінних продуктів.²⁰

Потенціал мікроводоростей для біоремедіації та застосування на біопереробних заводах відкриває шляхи для інтеграції двох процесів для підтримки циркулярної біоекономіки та сталого розвитку.²⁰

Лучія Барра та Сільвестро Греко (2023) досліджували *Euglena gracilis* та її здатність переносити та видаляти кадмій (Cd), свинець (Pb) та ртуть (Hg) із забруднених вод та стічних вод, а також спроможність гіпернакопичувати ці метали.²¹

Мікроводорості продемонстрували надзвичайний потенціал як агенти біоремедіації завдяки своїм різноманітним механізмам та унікальним можливостям.²¹

За словами, Лучія Барра та Сільвестро Греко, завдяки своїй фотосинтетичній активності мікроводорості можуть метаболізувати та розщеплювати НМ та РНА, ефективно видаляючи їх із навколишнього середовища.

Здатність ефективно поглинати та засвоювати поживні речовини допомагає їм пом'якшити евтрофікацію та контролювати шкідливе цвітіння водоростей.²¹

Крім того, мікроводорості виявляють здатність до біосорбції та біоаккумуляції, що дозволяє їм поглинати важкі метали, органічні забруднювачі та навіть радіоактивні речовини.

Їх здатність до ферментативної деградації додатково сприяє розщепленню та детоксикації складних забруднювачів. Також мікроводорості відіграють вирішальну роль у регулюванні рН та виробництві кисню, створюючи сприятливі умови для інших мікроорганізмів, які залучені до процесів біоремедіації, таких як бактерії або гриби.²¹

Використання цих механізмів забезпечує сталий та екологічний підхід до вирішення різних екологічних проблем.

Концепція поєднання відновлення навколишнього середовища з генеруванням сталих ресурсів додає економічний вимір фікорімедіації, роблячи її привабливим варіантом для відновлення навколишнього середовища та відновлення ресурсів.²¹

Diana Lihanová , Alexandra Lukáčová et al. (2023) теж вважають що *E. gracilis* є відповідною моделлю для вивчення біологічних ефектів багатьох органічних забруднювачів. Завдяки своїй здатності поглинати важкі метали, і його можна використовувати для біоремедіації.²²

Тому, *E. gracilis* є підходящим модельним мікроорганізмом для моніторингу біологічних ефектів різних забруднювачів навколишнього середовища та оцінки екотоксикологічного ризику, а також для біоремедіації забрудненої води.²³

1.2.2 Поглинання CO₂ та вироблення O₂ мікроводоростями

Збільшення викидів вуглекислого газу (CO₂) вже стало страшною загрозою для людства та екології Землі. Мікроводорості рекомендовано використовувати як фіксатори CO₂ на біопереробних заводах, які відіграють вирішальну роль у реагуванні на зміни клімату та прискоренні переходу до сталого майбутнього.²⁴

Вуглекислий газ (CO₂), відомий представник ПГ, демонструє значно зростаючі рівні викидів з 1750 – х років. Його питома швидкість зростання продовжує зростати протягом століть і зрештою стала однією з найсерйозніших екологічних проблем. Це явище значною мірою пов'язане з діяльністю людини, пов'язаною з інтуїтивними або базовими викидами CO₂, такими як індустріалізація, урбанізація, сільське господарство та використання енергії (Ma et al., 2022a).²⁴

Мікроводорості є одними із найважливішими фотосинтетичними фіксаторами CO₂ (Tsai et al., 2017). Найбільш помітною перевагою мікроводоростей є їх чудова ефективність поглинання вуглецю та накопичення біомаси. Теоретично виробництво 100 тонн біомаси водоростей може фіксувати 183 тонни CO₂ (Chisti, 2007).

Ефективність фіксації CO₂ мікроводоростями перевищує ефективність наземних рослин на 10 – 50 %, і мікроводорості можуть поглинати CO₂ зі швидкістю 440 – 550 г/м²·день (або 1800 т/га·рік).

Це в 60 разів швидше, ніж темпи поглинання вуглецю в лісі (Anand та ін., 2020; Сю та ін., 2019). Більше того, мікроводорості демонструють суттєві переваги, включаючи хорошу сумісність з навколишнім середовищем, замкнуті цикли переробки азоту/фосфору, а також широке поширення та різноманітність видів, не вимагаючи орної землі та не становлячи небезпеки для екосистеми.²⁴

Під час біоочищення мікроводорості демонструють високі темпи росту та фотосинтезу, високу толерантність до високих концентрацій CO₂ (димових газів), потребу в низькій інтенсивності освітлення, чудову регенерацію поживних речовин, низькі експлуатаційні та монтажні витрати та високу контрольованість процесу (Zhu et al., 2017). Оптимізація процесу біоочищення, включаючи дешеве середовище, достатню кількість світла та розчиненого CO₂, а також спеціальні компоненти середовища, може ще більше підвищити ефективність біоочищення мікроводоростей.²⁴

У довгостроковій перспективі біопереробка мікроводоростей є здійсненним і прибутковим рішенням проблеми викидів парникових газів і екологічної кризи, і її комерційне застосування також привернуло велику увагу не тільки екологів, а й економістів.²⁴

За даними Яна Ціхонського та Гжегожа Хшановського (2022) мікроводорості фіксують 1,83 кг атмосферного вуглекислого газу на 1 кг біомаси водоростей і перетворюють його на корисні продукти на основі вуглецю, що робить водорості не тільки ефективними виробниками, але й зменшувачами парникових газів, що може бути потенційним рішенням глобального потепління. Вони виробляють майже половину кисню на Землі і можуть фіксувати 100 млн т вуглекислого газу на добу.²⁵

1.2.3 *Euglena gracilis* як інструмент для очищення стічних вод від фенолів та поліфенольних сполук

Одна з найбільших екологічних проблем, що суттєво впливає на прогрес людства, полягає у забрудненні водних ресурсів.

Фенольні сполуки токсичні, небезпечні і канцерогенні для людини і тварин навіть в низьких концентраціях. Таким чином, обов'язковим є видалення сполук із забруднених стічних вод перед скиданням в екосистему.²⁶

Негативний вплив високої концентрації фенолів та їх похідних сполук у стічних водах на водні організми є серйозною екологічною проблемою. Останніми роками увагу привертає очищення стічних вод за допомогою штамів мікробіодоростей.

Інтерес до них значно зріс через те, що вони можуть швидко видаляти біогенні елементи, які сприяють евтрофікації водойм. Також цей спосіб є економічним, ефективним та екологічним.

Тому тут ми розглядаємо вплив різних добавок на ріст, вміст хлорофілу і продуктивність культури *Euglena gracilis* для подальшого очищення стічних вод промислових підприємств від фенольних сполук та запобігання евтрофікації водойм.

Ми обговорюємо використання водоростей для очищення стічних вод від фенолів та фенольних похідних, а також вплив надлишку фенолів на клітини водоростей.

Фенол – один із поширених органічних забруднювачів, що викидаються нафтопереробною, пластиковою, паперово – целюлозною, фармацевтичною, вуглепереробною та іншими галузями промисловості. Фенол і всі метильні похідні фенолу (ізомери крезолу) були занесені до списку стабільних, пріоритетних хімічних забруднювачів Агентством з охорони навколишнього середовища США (Mishra, 2017). Нерозбірливе скидання стічних вод у водне середовище є основною причиною високої концентрації фенолу у водній системі. Прямий вплив фенолу смертельно небезпечний для людини, оскільки може призвести до пошкодження нервової системи, серця, нирок і печінки.²⁷

Інші токсичні проблеми, пов'язані з фенольними похідними, включають дисфункцію біохімічних систем і порушення репродуктивної функції у домашньої худоби. Тому вкрай важливо розробити більш економічну, екологічну та стійку технологію очищення промислових стічних вод.

Упродовж останніх років було розроблено чимало інноваційних методів очищення стічних вод для видалення фенолу та фенольних похідних із промислових стічних вод. Для цього перед скиданням у навколишнє середовище стоки піддаються фізичній або хімічній обробці, такої як адсорбція, екстракція за допомогою мікрохвиль, озонування, мембранні технології, електрохімічна обробка, але ці методи складні й дорогі, частина з них продукують шкідливі побічні продукти, тому поступово знаходить широке застосування біологічна обробка.

Ідея використання мікробіодоростей у процесі біодеградації була вперше запропонована Освальдом і Готаасом (Parazi et al. 2012). Однак останнім часом інтерес до неї в науковій спільноті зростає.²⁸

Процес біовидалення з використанням мікробіодоростей має безліч переваг, таких як: низька вартість виробництва та обслуговування, використання дешевої та енергії за рахунок фотосинтезу, виробництво високоцінних продуктів, ріст із використанням неорганічного азоту та фосфору, використання біомаси водоростей для відтворення біопалива (Parazi et al. 2019; Voloshin et al. 2016).²⁹

Джентілі та Фік (2017) виявили, що мікробіодорості можуть видаляти небезпечні сполуки у стічних водах, оскільки вони продукують кисень, необхідний для деградації забруднювальних речовин, таких як фенол, поліциклічні ароматичні вуглеводні, гормони, антибіотики, фармацевтичні препарати та органічні розчинники.³⁰

Серед різноманітних біологічних представників ціанобактерії та мікробіодорості володіють високим ступенем адаптації, що триває вже багато століть і дає змогу повною мірою використовувати поновлювані джерела енергії (сонячну енергію) та адаптуватися до автотрофних, гетеротрофних або міксотрофних умов культивування.

Деградація фенольних речовин водоростями широко вивчалася. Враховуючи чинники, що впливають на деградацію, було з'ясовано механізм деградації та зміни клітин, спричинені надлишком фенолу (Lukáčová et al. 2023).³¹

Останні досягнення в галузі видалення фенольних речовин водоростями, створюють основу для подальшого розвитку. Показано, що деякі фенольні сполуки можуть стимулювати ріст мікродоростей завдяки їх антибактеріальній дії.

Посилене виробництво біомаси після впливу різних фенольних сполук було зареєстровано для кількох видів водоростей, включаючи *Chlorella vulgaris* та *Ankistrodesmus braunii*, а також *Euglena gracilis* (Курейшевич та ін, 2016; Чжу та ін., 2018; Тан та ін., 2021).^{32,33,34}

Euglena gracilis протягом 7 діб здатна майже повністю видалити з стічних вод фосфати на 96 – 100 % та амонійний азот до 63 % (Nezbrytska et al. 2022).³

1.2.4 Утилізація промислових відходів пивоварного виробництва для культивування *Euglena gracilis*

Відходи промисловості крафтових пивоварень можуть використовуватися для вирощування мікроорганізмів завдяки високому вмісту корисних компонентів.

Їх повторне використання та зменшення неправильної утилізації є чудовими економічними та екологічними стратегіями. Таким чином, мета полягала в культивуванні *Euglena gracilis* у настільних фотобіореакторах. Чисті промислові залишки, зібрані з крафтових пивоварень, дають можливість для культивування мікродоростей *Euglena*. Цей потенціал не лише вирішує питання управління відходами, але й сприяє економічній та екологічній стійкості за рахунок зменшення неналежної утилізації.³⁵

Жизель Алвес, Тіеле Медіанейра Ріцеттіта інші (2024) розглянули вплив суміші відходів пивоварні на підвищення потенціалу росту *Euglena gracilis*. Наступний етап їх дослідження передбачав масштабування процесу до фотобіореактора об'ємом 30 дм³. Протягом їх дослідження вони аналізували такі параметри, як вуглеводи, ліпіди, білки та антиоксидантний потенціал у цих умовах з мінеральним середовищем та відходами пивоварні.³⁵

1.2.5 Біопродукти з *Euglena gracilis*

За останнє десятиліття автотрофний і гетеротрофний протист *Euglena gracilis* набув популярності серед наукових досліджень навколишнього середовища, експериментів з біосинтезу та харчових заміників.¹⁸

Унікальна фізіологія та різноманітний метаболізм у сферах біосинтезу природних продуктів, є перспективним джерелом комерційно важливих метаболітів, таких як вітаміни, ефіри воску, парамілон та амінокислоти.¹⁸

Мікроводорості, такі як *E. gracilis*, останнім часом привертають увагу, оскільки вони можуть виступати в якості фабрик клітин для багатьох природних продуктів.³²

Архетиповий представник *Euglenophyta*, має високу харчову цінність у вигляді амінокислот, каротину, вітамінів та поліненасичених жирних кислот омега – 3.

Він складається з усіх 20 амінокислот, 9 типів мінералів, 14 різновидів вітамінів, хлорофілу для фотосинтезу (Vuetow, 1989).³²

Також протиста накопичує велику кількість парамілону, виняткового лише для еугленоїдів, – типу високомолекулярного полісахариду, складеного в потрібну спіраль, що складається з β – 1,3 зв'язків і в природному стані проявляє високий ступінь кристалічності (близько 90 %).³²

Тому, останніми роками універсальний фототрофний протист *Euglena gracilis* став цікавим кандидатом для досліджень і комерціалізації.

У всьому світі зараз зростає попит на дієтичний білок з високою харчовою цінністю через збільшення людської популяції відповідно до соціально – економічних змін (Henchion et al., 2017).³⁷

Мікроводорості якраз можуть накопичувати велику кількість білків внутрішньоклітинно і тому є привабливою альтернативою більш традиційним джерелам харчового білка, таким як м'ясо та риба (Henchion et al., 2017; Ritala та ін., 2017).³⁷

В останні роки більше уваги приділяють м'ясним аналогам. Сучасні аналоги м'яса, як правило, готуються з рослинних білків.

Однак вихід і вміст білка в цих джерелах не може задовольнити величезний ринковий попит на м'ясні аналоги.³⁷

Yunlei Fu , Tianpeng Chen et al. (2021) досліджували цю тему і дійшли висновку, що мікроводорості є багатообіцяючим білковим ресурсом і роками вивчалися як харчові інгредієнти. Останнім часом мікроводорості розглядаються як нове джерело білка для м'ясних аналогів.³⁷

Незалежно від способу культивування, висушена клітинна маса *E. gracilis* буде конкурентоспроможною за вмістом білка зі свіжими високобілковими продуктами тваринного походження. Також використання як поживне цільноклітинне борошно, корм худобі, нутрицевтичний парамілон і косметика.³⁸

Високе виробництво жирних кислот робить цей організм життєздатним кандидатом на використання біопалива (Ebenezer et al., 2019). Але наразі виробництво біопалива з клітинної маси *E. gracilis*, поки що не неможливе та не повністю досліджено.³⁸

1.2.6 Запасний полісахарид *E. gracilis* – парамілон та його використання

Парамілон – це β -1,3-глюкан – запасний полісахарид *E. gracilis*. Парамілон має висококристалічну та фібрилярну структуру. Рівень кристалізації гранул парамілону досягає 90 %, що відрізняє цей полісахарид від інших продуктів зберігання рослин і водорості.

Є нерозчинним у воді запасним полісахаридом *E. gracilis*, який складається з β – 1,3 пов'язаних субодиниць глюкози і має розрахункову молекулярну масу від 100 до 500 кДа.(Miyatake and Kitaoka, 1983; Koizumi та ін., 1993; Barsanti та ін., 2011).

Молекули парамілона розташовані у вигляді міжмолекулярної потрійної спіралі, що утворює мікрофібрили, з яких утворюються волокна.³⁸

Парамілон унікально продукується евгленоїдами, відкладається у вигляді гранул в цитозолі і легко розкладається і утилізується як джерело вуглецю в умовах вуглецевого голодування (Malkoff and Buetow, 1964; Kiss і співавт., 1986; Barsanti та ін., 2001; Monfils та ін., 2011). Представляє значний інтерес через їхню зареєстровану імуностимулюючу та антимікробну біоактивність (Kiss et al., 1986; Barsanti та ін., 2001; Руссо та ін., 2017; Gissibl та ін., 2018).³⁸

Парамілон має багатообіцяючі перспективи і надзвичайно багатий спектр переваг для здоров'я. Особливо важливе застосування – проти 2 найпоширеніших причин смерті в індустріально розвинених країнах, тобто серцево – судинні захворювання (сприяють здоровому рівню холестерину та глюкози в крові) і рак (зміцнюють імунну систему).³⁹

Також застосовується в медицині та ветеринарії. Лікувальні властивості парамілона включають його здатність до стимуляції імунної системи та захисту від інфекцій, протипухлинної та радіопротекторної дії.³⁹

Слід також зазначити, що цей полісахарид сприяє зниженню холестерину та регулює глікометаболізм.³⁹ *E. gracilis* може накопичувати велику кількість парамілону в діапазоні 20 – 75 % сухої ваги при культивуванні в присутності відповідних джерел вуглецю (Muchut et al., 2018).⁴⁰

1.3 Функціональний стан фотосинтетичного апарату клітин при міксотрофному культивуванні при додаванні етанолу

Мікроводорості *Euglena gracilis* можуть використовувати різні сполуки, включаючи етанол, як органічне джерело енергії та вуглецю. Для більшості інших мікроорганізмів етанол є токсичним, але клітини цієї водорості здатні метаболізувати його у відносно високих концентраціях до 1 %, що сприяє активації росту культури.⁴¹

Катаболізм етанолу в клітинах *E. gracilis* здійснюється за допомогою алкоголь– та альдегіддегідрогеназ, які розподілені між мітохондріями та цитоплазмою.

В результаті розщеплення молекули етилового спирту утворюються 2 молекули НАДН та ацетат, який є попередником для утворення ацетил – КоА.⁴¹

Етанол має низку фізіологічних ефектів в умовах темряви. Зокрема, він стимулює клітинне дихання, запобігає втраті мітохондріальних ферментів при переведенні клітин *E. gracilis* на освітлені умови та гальмує синтез хлоропластних ферментів, зокрема білків світлозбирального комплексу фотосистеми 2, індукованих світлом.⁴¹

Дослідження в цій галузі показують, що фотосинтетичний апарат зеленої мікроводорості має високу пластичність, що дозволяє йому адаптуватися до різних метаболічних стратегій живлення.⁴¹

Фотосинтетична система Евглени має специфічні структурні та фізіологічні особливості, що відрізняють її від більшості вищих рослин і мікроводоростей. Хлоропласти цієї організми мають хлорофітну структуру та оточені трьома захисними оболонками.⁴¹

Етиловий спирт активує прискорений синтез імуностимулюючого полісахариду парамілону та тирозину, що є попередником для утворення вітамінів групи Е, а також сприяє накопиченню повноцінних білків. Окрім того, він значно стимулює ріст культури *E. gracilis*, особливо коли комбінується з малатом і глутаматом.⁴¹

Згідно з дослідженнями Мокросноп, В.М.; Поліщук, О.В.; Золотарьова, О.К. (2015): «Міксотрофне культивування покращує ефективність транспорту електронів в процесі фотосинтезу Після інкубації *E. gracilis* на світлі з певними субстратами активується процес темного відновлення ПХП».⁴¹

Етанол піддається окисленню до ацетальдегіду алкогольдегідрогеназою і до ацетату альдегіддегідрогеназою, реакції яких протікають в мітохондріях або цитозолі.⁴²

Надалі ацетат перетворюється в ацетил – коензим А за допомогою ацетил–КоА–синтетази і вступає в цикл трикарбонових кислот або гліоксилатний цикл. Ацетил – КоА використовується для виробництва НАДН в циклі ТСА або перетворюється в сукцинат і малат за допомогою ізоцитрат – ліази і малатсинтази в гліоксилатному циклі.⁴²

Етанол може служити джерелом вуглецю для культивування штамів мікроводоростей, зокрема протистів, таких як *Euglena*, здатних до фотосинтезу. Вона є багатим джерелом α – токоферолу, який синтезується і накопичується в мітохондріях і хлоропластах і служить антиоксидантом.⁴²

(Krystian Miazek, Lukas Kratky, et al, 2017) у ході своїх досліджень теж дійшли до висновку, що етанол позитивно впливає на ріст міксотрофно культивованої *Euglena gracilis*, з у 3 рази більшою кількістю клітин, ніж при фотоавтотрофному контролі.⁴²

Також спирт сильно впливав на накопичення метаболітів у клітинах *Euglena*, з 2 – кратним збільшенням вмісту β – каротину та загального хлорофілу, 2 – кратним зниженням співвідношення *a/b* хлорофілу та 7 – кратним зниженням α – токоферолу порівняно з контролем.⁴²

Було доведено, що етанол у присутності світла значно покращує ріст та накопичення α – токоферолу в клітинах двох штамів *Euglena gracilis* (дикого штаму та штаму з дефіцитом хлоропластів), при цьому покращення росту та накопичення токоферолу були вищими для штаму з дефіцитом хлоропластів, але загальна біомаса та виробництво метаболітів вищими для дикого штаму.⁴²

Клітини *Euglena gracilis*, культивовані в присутності етанолу (10 г/дм³), виробляють вдвічі більше вітамінів групи А і групи Е, ніж клітини *Евглени*, культивовані на глюкозі (10 г/дм³).⁴²

Однак кількість клітин показала протилежну тенденцію: під час росту на основі глюкози кількість клітин *Euglena* вдвічі вища, ніж у культурі, доповненій етанолом.⁴²

Якщо порівняти *Евглену* з іншими мікроводоростями виходить, що міксотрофне культивування *Arthrospira platensis* та *Scenedesmus obliquus* з етанолом як джерелом вуглецю призвело до більшого виробництва біомаси, ніж при фотоавтотрофному контролі. Крім того, щоденне вживання етанолу ще більше покращило виробництво біомаси *Arthrospira* та *Scenedesmus*.⁴²

В інших дослідженнях культивування *Scenedesmus sp.* з вмістом етанолу 1,42 г/дм³ збільшувалося з 50 % до багаторазової концентрації біомаси, якщо порівнювати з контролем.⁴²

1.4 Дослідження впливу спиртів на дихання і фотосинтез *E. gracilis*

1.4.1 Вплив етанолу на дихання і фотосинтез *E. gracilis*

E. gracilis може рости автотрофно за рахунок фотосинтезу, з використанням CO₂ як єдиного джерела вуглецю. В темряві стимуляція росту мікроводорості забезпечується використанням різноманітних органічних речовин, зокрема етанолу, який нею швидко утилізується. Здатність цієї мікроводорості інтенсивно рости у присутності етанолу відрізняє її від інших фотосинтезувальних мікроорганізмів.⁴³

Основними метаболічними ефектами етанолу є підвищення рівня дихання, інгібування гліколітичного розщеплення глюкози, стимуляція глюконеогенезу та синтез парамілону.⁴³

В.М. Мокросноп, О.В. Поліщук, О.К. Золотарьова детально дослідили цю тему (2014), і дійшли висновку, що додавання етанолу до суспензії клітин *E. gracilis*, фотосинтетичний апарат яких сформований у присутності світла, дійсно призводить до стимуляції росту культури і накопичення біологічно активних речовин.⁴³

За наявності в культуральному середовищі, адаптованої до темряви *E. gracilis*, екзогенних джерел вуглецю, таких як наприклад етанол, світлозалежний розвиток хлоропластів, синтез хлорофілу і ліпідів гальмується. Це явище відоме як катаболітна репресія біогенезу фотосинтетичного апарату. Чи викликає додавання етанолу до автотрофної культури пригнічення фотосинтезу і активацію дихання, до теперішнього часу не визначено.⁴³

Таким чином, *E. gracilis*, яка культивується на світлі, ефективно використовує етиловий спирт як джерело вуглецю та енергії, що супроводжується активацією фотосинтезу та прискорює накопичення біомаси культури.⁴³

Додавання етанолу до автотрофної культури *E. gracilis* значно стимулює її ріст.

Добова інкубація у присутності 100 мМ етилового спирту на світлі призводить до підвищення інтенсивності темного дихання в 3 рази та двократної активації фотосинтезу. При цьому вміст кисню суттєво знижується і згодом досягає мінімального значення, що зумовлює перехід культури до анаеробного існування.⁴³

Активация фотосинтезу у *Eвглени* за присутності етанолу може бути викликана підвищеною внутрішньоклітинною концентрацією CO₂ внаслідок значної інтенсифікації дихання.⁴³

Результати досліджень Мокросноп та Золотарьової показали, що у варіантах із внесенням 50, 75 та 100 мкМ етанолу в живильне середовище після досягнення експоненційної фази зростання культур спостерігається зниження рН до 2.8, при цьому концентрація клітин та вміст фотосинтетичних пігментів у них приблизно однакова. рН культуральної рідини варіанта, де вносили 25 мкМ етанолу, знизилася лише до 5.5 від початкової (6.8), а концентрація клітин була на ~25% нижче порівняно з іншими варіантами.⁴³

У лаг фазі зростання концентрація парамілону в культурі з вмістом екзогенного спирту 100 мкМ була найбільшою серед усіх варіантів. Таким чином, Мокросноп та Золотарьовою було доведено, що для стимуляції зростання культури *E. gracilis* достатньо 50 мкМ етанолу, але для отримання парамілону сприятлива концентрація 100 мкМ.⁴³

Метаболічна гнучкість дає змогу мікробам використовувати різні органічні субстрати для живлення та адаптуватися до існування в широкому діапазоні умов середовища. *E. gracilis* може використовувати етанол як органічний субстрат, незважаючи на той факт, що він токсичний для більшості мікроорганізмів. Додавання етанолу в культуру середовища впливає на біохімічний склад і фізіолог. параметри клітин, через використання етанолу як субстрату.³⁹

Фізіологічний вплив етанолу на клітини *E. gracilis* є стимуляція клітинного дихання, запобігання втратам мітохондріальних ферментів після переходу гетеротрофних клітин на фотоавтотрофне культивування.

Також це і пригнічення індукованого світлом синтезу ферментів хлоропластів і світлозбирального хлорофілу фотосистеми II. Біотехнічне значення культивування *E. gracilis* в присутності етанолу полягає в збільшенні в біомаси, стимуляція накопичення білка, α -токоферолу та парамілону в клітини.³⁹

Дослідження впливу етанолу на метаболізм гетеротрофно культивованих клітин *E. gracilis* Макросноп (2016) показало, що цей спирт швидко окислюється в клітинах до ацетату, 50 % якого входить до парамілону. Тому, є докази того, що етанол як субстрат пригнічує гліколітичне перетворення глюкози в піруват і включення цих молекул у ліпіди та білки, тоді як більший відсоток глюкози входить у парамілон.³⁹

1.4.2 Вплив двох лігноцелюлозних цукрових спиртів на ріст і біосинтез метаболітів *Euglena gracilis*

Jiangyu Zhu, Minato Wakisaka (2020) теж досліджували вплив спиртів на Евглену, але вже не етанолу як минулі дослідники, а маніту і ксиліту. У її дослідженні було продемонстровано позитивний вплив на ріст і біосинтез метаболітів *E. gracilis* за допомогою лігноцелюлозних цукрових спиртів. Як результат було отримано, що при оптимальному дозуванні $4 \text{ г} \cdot \text{дм}^{-3}$ маніт і ксиліт збільшували вихід біомаси клітин водоростей до 4,64 і 3,18 разів. Збільшення розміру клітини спостерігалось лише з манітом, що вказує на те, що мікроводорість мала різні фізіологічні реакції на ці спирти. Також відбувалось і накопичення ліпідів у культурі.⁴⁴

1.5 Вплив поліфенольних сполук та ріст, метаболічну активність та фотосинтетичний апарат прісноводної мікроводорості *Euglena gracilis*

1.5.1 Вплив протокатехевої та ферулової кислоти

Розробка ефективних, екологічно чистих, недорогих підходів, що використовуються для стимулювання росту мікроводоростей, терміново необхідна для задоволення зростаючих потреб людства.⁴⁵

Наприклад, у харчових добавках, косметиці та біопаливі.

Xiaomiao Tan, Jianguy Zhu та Minato Wakisaka (2020) досліджували дану тему і підтвердили ефекти стимуляції для росту з додаванням протокатехової кислоти у прісноводної мікроводорості *Euglena gracilis*. PCA – це проста фенольна сполука, отримана з природних рослин і має низку біологічних функцій. Найвищий вихід біомаси, у 3,1 раза вищий, ніж у контрольної групи, використовується при $1,3 \text{ г} \cdot \text{дм}^{-3}$, було отримано при дозі $800 \text{ мг} \cdot \text{дм}^{-3}$.⁴⁵

Вихід метаболітів хлорофілу а, каротиноїдів і парамілілону в присутності PCA були в 3,1, 3,3 і 1,7 раза вище, ніж у контрольній групі відповідно.⁴⁵

Тому, ріст і біосинтез метаболітів, стимульованих фітохімічними речовинами, такими як PCA, може бути ефективною та економічно вигідною стратегією для підвищення продуктивності мікроводоростей у великомасштабних культурах.⁴⁵

Деякі фенольні сполуки використовувалися як стимулятори росту для мікроводоростей завдяки їх широкому поширенню та антибактеріальній дії. Ферулова кислота позитивно впливала на ріст *E. gracilis*, збільшуючи її ріст у 2,5 рази порівняно з контрольною групою при надходженні в дозі $500 \text{ мг} \cdot \text{дм}^{-3}$.⁴⁵

Протокатехова кислота, (3, 4 – дігідроксібензойна кислота) була виявлена в метаболічному шляху ферулової кислоти у деяких мікроорганізмів, включаючи *Margarinomyces heteromorpha*, *Margarinomyces mutabilis* і *Pullularia pullulans*.⁴⁵

Саме тому Xiaomiao Tan, Jianguy Zhu та Minato Wakisaka (2020) запідозрили, що PCA також може брати участь у метаболізмі ферулової кислоти *E. gracilis*, що, можливо, призводить до стимулювання росту.⁴⁵

Сприяння зростанню *E. gracilis* за допомогою PCA може бути пов'язане з використанням PCA як джерела вуглецю. І тому завдяки цим науковцям вперше було підтверджено ефект стимуляції росту фенольної сполуки PCA на *E. gracilis*.⁴⁵

Найвищий вихід біомаси, в 3,1 раза більший, ніж у контрольної групи, був отриманий при концентрації PCA $800 \text{ мг} \cdot \text{дм}^{-3}$.

Вихід метаболітів, таких як хлорофіл а, каротиноїди та парамілон при 800 мг· дм⁻³ РСА були збільшені в 3,3, 2,1 та 1,7 раза по відношенню до контрольної групи відповідно.⁴⁵

Найсильніший вплив на ріст на одиницю парамілона був отриманий при застосуванні 100 мг дм⁻³ РСА, що, таким чином, є оптимальним дозуванням для економічного виробництва парамілілону.⁴⁵

1.5.2 Вплив фенольних сполука з основних структур лігніну

Введення добавок, отриманих з біомаси, у культивування мікродоростей для збільшення їх урожаю вважається більш економічно ефективним і безпечним для навколишнього середовища методом порівняно з редагуванням генів і додаванням поживних речовин.

Тому, дослідженням цієї теми почали займатися (Jiangyu Zhu, Xiaomiao Tan, 2021).⁴⁶

Результати їх роботи показали, що НМА, НВА і SRA можуть сприяти росту мікродоростей у ролі фітогормонів, і найвищий ефект стимулювання був досягнутий при додаванні НМА.⁴⁶

Ця кислота при 0,5 г· дм⁻³ збільшила вихід клітинної біомаси в 2,30 рази, тоді як НВА і SRA в концентрації 0,1 г· дм⁻³ збільшили вихід в 1,30 і 1,21 рази відповідно.⁴⁶

Крім того, при обробці фенольними сполуками також спостерігалось посилення каротиноїдів і біосинтезу ліпідів, що сприяло виробництву біопалива з мікродоростей, оскільки ріст і накопичення ліпідів *E. gracilis* були одночасно посилені.⁴⁶

Як висновок можна сказати, що додавання цих фенольних сполук мали стимулюючий ефект на ріст і накопичення ліпідів *E. gracilis* .

Також спостерігалися морфологічні зміни культури, такі як подовження та збільшення клітин, що супроводжувалося збільшенням вмісту фотосинтетичних пігментів.⁴⁶

1.5.3 Вплив ферулової кислоти з рисових висівок

Jiangyu Zhu & Minato Wakisaka (2018) досліджували як впливає ферулова кислота з рисових висівок на мікрородорість *Euglena gracilis*. У результаті проведення дослідів та експериментів було виявлено значне стимулювання росту Евглени, ще і без зменшення накопичення цінних продуктів, таких як парамілон.⁴⁷

Це дуже екологічне впровадження регулятора росту, отриманого з сільськогосподарських відходів. Воно вважається дешевшою та безпечнішою стратегією для підвищення продуктивності біомаси порівняно з іншими альтернативами, такими як впровадження генної інженерії або додавання поживних речовин та рослинних гормонів як стимулятора росту.⁴⁷

Також було виявлено, що щільність клітин була в 2,5 рази більшою, ніж у контрольній групі, і в 3,6 рази більшою, ніж у негативній контрольній групі при додаванні 500 мг/дм³ ферулової кислоти.⁴⁷

Крім того, вміст фотосинтетичного пігменту, особливо хлорофілу а, теж збільшувався зі збільшенням концентрації ферулової кислоти.⁴⁷

Загальне вироблення парамілону також буде посилено феруловою кислотою, оскільки кількість клітин збільшується без зменшення його клітинного вмісту.⁴⁷

Що ж стосується особливого механізму, то, з одного боку, ферулова кислота і продукти її окислення можуть служити екзогенним джерелом органічного вуглецю для росту *E. gracilis*. З іншого боку, ферулова кислота може відігравати фітогормоноподібну регуляторну роль у рості клітин.⁴⁷

1.5.4 Вплив біологічно активних речовин фенольної природи (кавова кислота, бензойна та галова)

Вплив біологічно активних речовин фенольної природи на Евглену досліджували (Kureyshevich, Medved' et al, 2021).

Вони вносили фенольні сполуки в таких концентраціях: кавова кислота – 1 мг/дм³, бензойна – 3 мг/дм³ та галова – 5 мг/дм³, враховуючи їх різну активність по відношенню до мікроводоростей. У ході роботи вони з'ясували, що *Euglena gracilis* виявилася толерантною до впливу концентрацій фенолкарбонових кислот, у тому числі галової, кавової та бензойної кислот, пригнічуючи ростові процеси у представників *Cyanoprokaryota*. Ці концентрації фенолкарбонових кислот навіть стимулювали ріст водорості, культивованої як на мінеральному, так і на органічному культуральному середовищі (з додаванням глюкози).⁴⁸

1.5.5 Вплив фітохімічної ванільної кислоти

Xiaomiao Tan, Jianguy Zhu & Minato Wakisaka (2021) обґрунтували підхід проти низького виходу біомаси мікроводоростей, який передбачає використання стимулятора для росту мікроводоростей. В якості стимулятора вони використали ванільну кислоту, яка присутня в гідролізаті сільськогосподарських відходів, для культивування одноклітинної мікроводорості *Euglena gracilis*. При оптимальному дозуванні 800 мг дм⁻³ ванільної кислоти вихід біомаси при обробці збільшувався в 2,08 раза. Відповідно, вміст хлорофілу а та каротиноїдів був у 3,48 та 2,69 раза вищим, ніж у контрольному ґрунті відповідно.⁴⁹

Також Xiaomiao Tan, Jianguy Zhu & Minato Wakisaka проаналізували відносний вміст ліпідів і вуглеводів, результат якого показав, що ванільна кислота збільшує вміст ліпідів у клітинах водоростей без шкоди для біомаси, що було б перспективним способом для майбутнього виробництва біопалива.

1.5.6 Вплив фенольних елісаторів, пов'язаних з лігніном (сирингова і кумарова кислота)

SA і p-SA є двома основними гідролізатами лігніну, широко розповсюдженими у стічних водах промислових підприємств, які займаються виробництвом лігніну.⁵⁰

(Jiangyu Zhu, Xiaomiao Tan, et al, 2023) досліджували їх вплив та потенціал у регулюванні росту та біосинтезу цінних метаболітів мікроводоростей *Euglena gracilis*. Як результат досліджень, було отримано, що ріст клітин збільшився в 1,63 і 1,93 рази при оптимальному дозуванні 0,5 г·дм⁻³ SA і 0,3 г·дм⁻³ p – SA відповідно.

Морфологія клітин також змінювалася під час двох обробок, що відображає зміни у фізіологічному стані клітин.⁵⁰

Додавання фенольних еліситорів одночасно підвищувало біомасу та виробництво ліпідів *E. gracilis*. При оптимальному екзогенному надходженні 0,5 г·дм⁻³ SA і 0,3 г·дм⁻³ p – SA підвищили вихід ліпідів на 91,30 % і 90,88 % відповідно, уникаючи при цьому негативного впливу накопичення продукту з високою доданою вартістю на ріст водоростей.

Під час обробки мікроводорості також спостерігалось збільшення виходу фотосинтетичних пігментів, що також мало позитивний ефект експериментів.⁵⁰

1.6 Вплив поліфенольних сполук на інші водорості та рослини

У минулих підпунктах було розглянуто дослідження впливу різних поліфенольних сполук на мікроводорість *E. gracilis*, а тепер проаналізуємо їх вплив на інші водорості та рослини.

1.6.1 Вплив фенольних сполук (пірокатехін, фенол і галова кислота) на мікроводорість *Sp. platensis* та *C. vulgaris*

А. В. Котинський, Г. С. Батіщева, О. В. Поліщук у 2014 році досліджували цю тему і ними було показано, що нітрофенольні сполуки не мають чітко вираженого інгібуючого ефекту на процес фотосинтезу даної мікроводорості. Водночас фенол, галова кислота та пірокатехін в концентр. 0,25, 0,05 та 0,02 %, сильно знижують ріст та розвиток *Sp. platensis*. Найбільш чутливою вона виявилась до пірокатехіну.⁵¹

Також у ході досліджень *C. vulgaris* було отримано, що застосування фенольних сполук в різних концентраціях призводить до зниження інтенсивності фотосинтезу мікродорості. Найбільше пригнічення спостерігається при впливі нітрофенолів, тоді як пірокатехін виявляє менший ефект, проявляючи свою активність лише при концентрації 0,1 %.⁵¹

Як висновок можна сказати, що варіації в чутливості цих двох мікродоростей до фенольних сполук, ймовірно, обумовлені різними механізмами їхнього зв'язування та детоксифікації в цих організмах. Це дає можливість рекомендувати метод індукції флуоресценції хлорофілу для вивчених організмів як ефективний підхід для створення швидкого методу виявлення цих сполук у водних середовищах та природних водоймах.⁵¹

1.6.2 Вплив галової кислоти на *Microcystis flos – aquae*

Peiyong Guo, Yang Liu, & Cong Liu (2015) вивчали вплив галової кислоти на *Microcystis flos – aquae* і визначили, що при додаванні 30 мг/дм³ галової кислоти, органи фотосинтезу в клітинах водоростей були серйозно пошкоджені під впливом високих концентрацій галової кислоти, викликаючи блокування фотосинтетичного транспорту електронів і призводячи до нездатності відновити нормальну фотосинтетичну діяльність.⁵²

Вони припускають, що це було тому, що стрес, викликаний високою концентрацією галової кислоти, серйозно пошкоджує фотосинтетичні органи в цих клітинах водоростей, викликаючи блокування фотосинтетичних електронів транспорту та призводить до неможливості відновлення нормальної фотосинтетичної активності.

Експериментальні результати також показали, що галова кислота в група високої концентрації індукувала підвищену активність антиоксидантних ферментів у клітинах *M. flos – aquae*.⁵²

Лауе та ін. (2014) досліджуючи дану тему, довели, що дубильні і галові кислоти знижують швидкість росту, максимальну фотосистему II, квантовий вихід, хлорофіл (a).⁵²

Клітини водоростей видаляють надлишки H_2O_2 шляхом підвищення активності їх антиоксидантного ферменту системи, таким чином захищаючи клітини від окисного пошкодження.⁵²

Під впливом високої концентрації галової кислоти, якщо виробництво та елімінація вільних радикалів у клітинах водоростей не збалансовані, це призведе до надмірного накопичення вільних радикалів.

Коли концентрація H_2O_2 перевищує певний поріг, клітини не можуть розкласти його досить швидко, що призводить до клітин пошкодження та уповільнене відновлення клітин, а також зменшення спричинення активність ферментів.⁵²

Отримані дані свідчать про те, що реакція ФСII центр був частково закритий або інактивований, і надлишок енергії міг розсіюватися лише через нефотохімічне гасіння (Ван та ін. 2010).⁵²

Дослідження підтвердили, що існує лінійна залежність між швидкістю вивільнення кисню при фотосинтезі, і швидкістю фіксації CO_2 до насичення світлом (Geel та ін., 1997; Genty та ін., 1989; Gilbert та ін., 2000; Фігероа та ін. 2003).⁵²

Тому, як висновок, можна сказати, що галова кислота певною мірою вплинула на фотосинтетичну активність цієї водорості, але фотосинтетична активність відновилася на більш пізніх стадіях. Чим нижчий вміст галової кислоти, тим краще відновлення фотосинтетичної активності водорості.⁵²

1.6.3 Вплив галової кислоти на рослини – регенерани *Corylus avellana* (L.) H. Karst. i *Salix alba* L. in vitro

Дослідженням впливу галової кислоти на рослини – регенерани займалися наші вітчизняні науковці: Ліханов, Ключаденко та інші (2022) Галова кислота міститься в рослинних тканинах у вільному вигляді, а також у складі складних ефірів і гідролізовані дубильні речовини.

Ці фенольні сполуки мають значну антиоксидантну активність і захищають клітини рослин від пошкодження вільними радикалами.

Тому вони вирішили додати галову кислоту в мілімолярних концентраціях до живильного середовища, щоб знизити ризик аутоінтоксикації тканин вторинними продуктами метаболізму.

В результаті їх досліджень було встановлено, що галова кислота в концентрації $1 \text{ ммоль} \cdot \text{дм}^{-3}$ в склад живильного середовища викликала пробудження сплячих бруньок, стимулювала ріст пагонів, сприяла розгалуженню стебел, розвитку та росту бічних коренів. А також було виявлено, що галова кислота пригнічувала синтез фенолів у деяких рослинах, одночасно сприяючи збільшенню вмісту фенольних сполук в листі сортів «Tonda Di Giffoni», «Mortarella» і «Epsilon». ⁵³

Тому екзогенна галова кислота в концентрації $1 \text{ ммоль} \cdot \text{дм}^{-3}$ має властивості неспецифічної регулятор синтезу фенолу в рослинах – регенерантах ліщини (*Corylus avellana*), що актуально для рослини з високим вмістом фенолів, особливо на етапі введення її у культуру *in vitro*. ⁵³

Підсумовуючи сказане, екзогенна галова кислота у концентрації 10^{-6} моль у складі живильного середовища (рН 6,0) сприяла розгалуженню стебла, розвиток і ріст бічних коренів рослин *Salix alba L.* У *Corylus avellana* рослин–регенерантів, галова кислота викликала підвищення у загальній кількості та видовженні міжвузлів. ⁵³

1.6.4 Вплив аскорбінової та галової кислот на вігну (*Vigna unguiculata L.*)

Фатма Абд Ель Латіф Гаріб, Ібрагім Мохамед Зейд та інші (2018) у своїх наукових працях досліджували Вігну (*Vigna unguiculata L.*). ⁵⁴

Вона є економічно важливою культурою стародавніх харчових бобових в Африці. У наш час ця рослина вже широко адаптована і її вирощують у всьому світі.

Вігна є універсальна культура, вирощувана як зернобобове переважно для отримання сухих бобів і зелених стручків і також як корм, зелень, покривна культура та для удобрення ґрунту. ⁵⁴

Тому було проаналізовано та доведено, що ці кислоти можна легко застосовувати як позакореневе підживлення застосування для рослин вігні, вирощених у горщиках. Застосування галової та аскорбінової кислоти, особливо при 100 ppm, призвело до значного збільшення морфологічних ознак та біохімічної активності. Однак, у ході досліджень було отримано, що застосування галової кислоти на рослину було більш ефективним, ніж застосування аскорбінової.⁵⁴

1.6.5 Вплив резорцину на *Chlorella vulgaris*

Вплив резорцину на *Chlorella vulgaris* було досліджено (Xiurong Chen, Tianjun Zhou, et al, 2018) , присутнього в екстракті токсичного мулу зі стічних вод, багатих на резорцин, для одночасного визначення виробництва біомаси та видалення токсичності. В результаті досліджень, порівняння холостого зразка та екстракту токсичного мулу отримано, що токсичність мулу, яка виникає внаслідок розкладання резорцину, сильно корелює з масовою часткою при 5000 – 10000 Да ($R = 0,987, P = 0,013$). Також це призводить до зниження біомаси (від 1,49 г/дм³ до 1,36 г/ дм³ за 30 днів) разом зі зниженим коефіцієнт використання органіки мулової витяжки, особливо на ранній стадії (0 – 5 діб) культивування.⁵⁵

Тому, токсичність мулу безпосередньо спричинила зниження виробництва біомаси *C. vulgaris* внаслідок зниження регуляції метаболізму *C.* Однак стимулювання біомаси для гетеротрофізму було більш значущим, ніж інгібуючий ефект в екстракті токсичного мулу порівняно із середовищем.⁵⁵

1.6.6 Вплив резорцину та біовугілля на томати (*Lycopersicon esculentum* Mill)

(Sakina Bibi, Rehman Ullah, et al, 2023) проводили дослідження, які мали на меті оцінити вплив різних концентрацій резорцину та біовугілля на ріст томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.), первинні та вторинні метаболіти та рівні вмісту антиоксидантних ферментів.⁵⁶

В результаті роботи було встановлено, що як резорцин у концентрації 0,1 мкМ/дм³, так і біовугілля у концентрації 30 мг/дм³ значно покращили проростання насіння томатів і ріст рослин, сприяючи збільшенню довжини пагонів/коренів і свіжої/сухої маси рослин томатів порівняно з контролем. Ця добавка також збільшує вміст хлорофілу в помідорах, метаболіти росту та активність антиоксидантних ферментів, сприяючи міцному розвитку рослин. Резорцин у концентрації 0,1 мкМ/ дм³ значно підвищував загальний білок (79,9 мкг/г), загальний фенол (58,8 мкг/г), загальний пролін (0,03 мкг/г), загальний ліпід (3,8 мкг/г), загальний розчинний цукор (42,5 мкг/г) та флавоноїдів (0,09 мкг/г) порівняно з контролем.⁵⁶

Ці дослідження показали, що позакореневе внесення цих специфічних концентрацій резорцину та біовугілля має здатність покращувати ріст рослин томатів, осмоліти та антиоксидантну активність.⁵⁶

1.6.7 Вплив резорцину на сою

Джагетія та Каур (2006) досліджували вплив резорцину на сою. Ними було виявлено, що вміст хлорофілу та утворення сухої речовини коренів пагонів зменшуються на всіх стадіях росту, тоді як розмір і вага стручка на 100 насінин і розмір стручка максимально збільшуються на стадії R₂ із застосуванням 1000 ppm резорцину.⁵⁷ Більш високі концентрації резорцину на стадії R₂ також були шкідливими.⁵⁷

На стадії R₂ листя мають максимальну асиміляцію, а позакореневе внесення резорцину меншої концентрації сприяє ремобілізації асимілятів з вегетативної частини в репродуктивну, що призводить до підвищення врожайності.⁵⁷

Тому, можна зробити висновок, що резорцин можна використовувати як розподільний агент для підвищення продуктивності, якщо він використовується на відповідній стадії росту з його оптимальною концентрацією. При додаванні резорцину в сою, розмір і вага стручка максимально збільшуються на стадії R₂ із застосуванням 1000 ppm резорцину. Більш високі концентрації резорцину на стадії R₂ вже були шкідливими.⁵⁷

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Об'єкт і предмет дослідження, реактиви та матеріали

Об'єктом наукових досліджень є культура *Euglena gracilis*, яка належить до протист і здатна здійснювати фотосинтез, а також використовувати органічні субстрати з навколишнього середовища для живлення, що можливо як при освітленні, так і в умовах темряви.



Рисунок 2.1 – Культура *Euglena gracilis* під світловим мікроскопом при збільшенні × 20

Це одноклітинний організм, який належить до класу *Euglenophyceae* і має унікальні характеристики, які роблять його предметом інтенсивних наукових досліджень і застосування в різних галузях. За наявності в середовищі органічних субстратів надлишок вуглецю та енергії в клітинах зберігається у вигляді полісахариду парамілону. Його лікувальні властивості включають його здатність стимулювати імунну систему організму, захищати від інфекцій, мати протипухлинну та радіозахисну дію.²

Тому застосування парамілону в медицині та ветеринарії надзвичайно перспективно. Цей полісахарид також використовують для підгодівлі тварин, оскільки він активує імунітет та стимулює їх ріст, також сприяє зниженню рівня холестерину в крові, регулюючи глікометаболізм.

Його можна використовувати для профілактики і лікування серцево – судинної системи і раку – найпоширеніших захворювань у промислово розвинених країнах.

Евглена накопичує біомасу в побутових стоках із підвищеним рівнем поживних речовин, а саме N_2 і P, знижуючи їх концентрацію на 98 % і 85 %, що робить їх успішними біоагентами для очищення стічних вод.

Її зручно вирощувати в лабораторних умовах на мінімальному середовищі, тому успішно можна використовувати для промислового культивування.

Мікрододорість також визнана перспективним виробником вітамінів групи А, групи Е, С, повноцінного білка, містить 59 видів поживних речовин, парамілон, віск і поліненасичені жирні кислоти, тому використовується в харчовій промисловості та на корм худобі.

Мікрододорість накопичує до 97 % α – токоферолу та β – каротину в своїх клітинах і має здатність абсорбувати значну кількість вуглекислого газу. Ще існують можливості її використання у виробництві біополімерів і біоактивних речовин, для створення біорозкладної упаковки та посуду.

Евглена корисна і для біотехнологічного застосування, оскільки продукує низку унікальних метаболітів, накопичує одночасно амінокислоти, вітаміни і жирні кислоти. Здатність до поглинання важких металів і висока толерантність до них, демонструють теж велику користь їх використання та дослідження.

В Японії вже почали курсувати автобуси, що працюють на біопаливі з цієї водорості.

Жири, що виробляються евгленою в організмі під час метаболізму, мають такий склад, що робить їх придатними для використання як паливо для реактивних літаків.



Рисунок 2.2 – Зберігання культури *Euglena gracilis*

Предметом є: приріст біомаси, вміст хлорофілу, фотосинтетична активність мікроводорості *Euglena gracilis* та її здатність до накопичення полісахариду парамілону під впливом фенольних сполук таких як галова кислота та резорцин.

Реактиви: дистильована вода; гідрофосфат амонію – $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; дигідрофосфат калію – KH_2PO_4 ; сульфат магнію (магній сірчаноокислий (семиводний) – $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; хлорид кальцію – CaCl_2 ; цитрат натрію – $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$; вітаміни B_1 , B_{12} ; мікроелементи: сульфат заліза (III) – $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times (\text{H}_2\text{O})$, тетрагідрат хлориду марганцю – $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, гептагідрат сульфата кобальта (II) – $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; гептагідрат сульфата цинка $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, молібдат натрію – Na_2MoO_4 , сульфат міді (II) – $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, борна кислота – H_3BO_3 ; спирт етиловий 96 %; галова кислота – $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$; резорцин – $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$; 1 % розчин SDS (додецилсульфат натрію) – $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4\text{Na}$; натрій гідроксид – NaOH ; фенол – $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$; сірчана кислота – H_2SO_4 .

Матеріали, обладнання та устаткування: терези технічні, портативні кишенькові ваги, шпатель, мірний стакан, циліндр, колби, одноразові піпетки, предметне та покривне скельце, пробірки, штатив для пробірок, промивалка, термостат, рН – метри (портативні та електронні з електродом), автоклав, мікропробірки (Eppendorf), кварцеві кювети, самплер, ламінарний мікробіологічний бокс, електронні ваги, водяна та ультразвукова баня, оптичний (світловий) мікроскоп з камерою Горяєва, центрифуги, спектрофотометр, гематокритні капіляри та спеціальний ротор для них, пластилін, шприц з трубкою, кисневий електрод для вимірювання вмісту O_2 , флуориметр.

2.2 Характеристика обладнання та устаткування для проведення експериментальних досліджень

Створені центри спільного використання наукового обладнання, за рішенням Президії НАН України в межах Інституту ботаніки, мають на меті забезпечити доступ до унікального обладнання для проведення наукових досліджень та експериментальних розробок. Це дає можливість вченим використовувати сучасні технології для розширення наукових досліджень у галузі ботаніки, сприяючи розвитку наукової спільноти.⁴

Для проведення експериментальних досліджень під час переддипломної практики було використано таке основне обладнання та устаткування: терези технічні, ваги електронні лабораторні, кишенькові ваги, різні види центрифуг (міні, середні, великі, з різними роторами), ламінарний мікробіологічний бокс, оптичний (світловий) мікроскоп з камерою Горяєва, спектрофотометр, електрична нагрівна плітка, баня комбінована лабораторна, ультразвукова баня, термостат і т.д.

Терези технічні – використовуються для точного визначення маси різних об'єктів і матеріалів. Є важливим інструментом у наукових дослідженнях та експериментах, де необхідна висока точність вимірювань.⁶

Портативні кишенькові ваги – мають зручний і простий у використанні дизайн, поєднуючи компактність і функціональність. Вони дозволяють точно визначати масу від 1 мг до 500 г. Прилад живиться від батарейок, це робить зручним для використання в різних умовах.⁷

Також для проведення досліджень було використано: хімічний посуд, склянки, колби, стакани, мензурки, промивалки, піпетки, груша для піпеток, циліндри, лійки, воронки, пробірки та штатив для них, чашка Петрі, ексікатор, чаша випарювальна, ступка з товкачиком, крапельниця Шустера, шпатель порцеляновий, піпетка – дозатор, мікропробірки (Eppendorf), дозаторні автоматичні піпетки та наконечники для них, гематокритні капіляри, фільтрувальний папір, предметні та покривні скельця, кварцеві кювети тощо.

Під час виконання індивідуального завдання та дослідів з культурою *Euglena gracilis* було використано різноманітний хімічний посуд, який зображений на рисунку 2.3.



Рисунок 2.3 – Хімічний посуд та обладнання для досліджень

Електронні ваги у лабораторії – це вимірювальні прилади, які призначені для точної оцінки маси різних зразків та речовин. Вони є критично важливими для багатьох лабораторних операцій і досліджень, забезпечуючи точність і надійність результатів. Тому є незамінними інструментами в лабораторіях, прості у використанні, забезпечують високоточні вимірювання дуже швидко, з мінімальними похибками, необхідні для проведення наукових досліджень, аналізів та контролю якості.

Автоматичний піпеточний дозатор, самплер – це прилад поршневого типу, який використовується для взяття та внесення певних доз (дозування) біологічних рідин та реактивів при проведенні біохімічних досліджень. Працює за принципом піпетки.

Центрифуга – це прилад, призначений для розділення компонентів рідких сумішей за допомогою відцентрової сили. Класифікуються вони за різними параметрами, такими як швидкість обертання, обсяг та місткість барабана, розміри пристрою, а також наявність додаткових функцій, що дозволяють адаптувати їх до специфічних вимог досліджень.⁸

Вони працюють шляхом обертання зразків на високій швидкості, створюючи відцентрову силу, яка змушує частинки з більшою густиною переміщуватися до дна пробірок, тоді як частинки з меншою густиною залишаються ближче до верху.

Типи центрифуг:

- мікроцентрифуги – призначені для роботи з невеликими об'ємами зразків (до 2 мл). Застосовуються в молекулярній біології, біохімії та клінічних дослідженнях;

- настільні центрифуги – використовуються для середніх об'ємів зразків (до кількох сотень мілілітрів);

- ультрацентрифуги – працюють на дуже високих швидкостях і використовуються для розділення частинок за дуже малими відмінностями в густині, наприклад, для виділення вірусів, органел та макромолекул.

Ламінарний бокс – це лабораторний пристрій, що представляє собою спеціальну шафу для виконання робіт з хімічними або біологічними матеріалами в умовах стерильності. Його основна мета – запобігти забрудненню зразків, матеріалів або об'єктів, які чутливі до мікрочастинок, забезпечуючи чистоту та безпеку в процесі досліджень.⁹

Оптичний світловий мікроскоп з камерою Горяєва – є важливим інструментом в лабораторних дослідженнях, особливо в клінічній лабораторній діагностиці, забезпечуючи високу точність і ефективність. Він поєднує в собі можливості традиційного оптичного мікроскопа з можливістю кількісного підрахунку клітин за допомогою спеціальної камери. Мікроскоп використовується для візуалізації дрібних об'єктів, таких як клітини, мікроорганізми і тонкі зрізи тканин.

Камера Горяєва – це спеціальна скляна пластина з сіткою, що використовується для підрахунку клітин у рідких зразках. Після проведення мікроскопіювання, мікроскоп налаштовується для отримання чіткого зображення сітки і клітин у зразку. Клітини підраховуються в декількох полях зору за допомогою мікроскопа. Кількість клітин на одиницю об'єму розраховується за відомою площею і глибиною сітки камери Горяєва.

Мікропробірки – це маленькі пластикові контейнери, які використовуються для зберігання і проведення лабораторних аналізів з рідинами, що вимагають особливої обробки. Вони забезпечують зручність у роботі з малими об'ємами рідин в дослідницьких процедурах.¹⁰

Спектрофотометр – це прилад, який вимірює поглинання або пропускання світла в різних діапазонах довжин хвиль. В лабораторії його використовують для аналізу концентрації розчинених речовин в зразках на основі того, скільки світла поглинає розчин. Зазвичай діапазон вимірювання охоплює область видимого світла $\lambda = 380 - 780$ нм та область ультрафіолетового світла $\lambda = 200 - 380$ нм.¹¹

Спектрофотометр використовує джерело світла, яке генерує його з визначеною довжиною хвилі за допомогою спектроскопічних пристроїв. Коли світло проходить через зразок, частина його поглинається, і на основі цього обчислюється поглинання, яке залежить від концентрації речовини. Оптична щільність зразка пропорційна концентрації речовини в ньому.¹²

Автоклав – це найефективніший метод стерилізації, особливо для інструментів, лабораторних приладів та зразків, оскільки вони забезпечують гарантоване знищення всіх живих організмів. Це – герметичний пристрій, який використовується для проведення різних процесів під підвищеним тиском і високою температурою. Він забезпечує безпечне очищення інструментів, матеріалів та обладнання від мікроорганізмів, зокрема бактерій, вірусів та спор грибків, використовуючи поєднання високої температури і тиску. Процес стерилізації полягає в тому, що предмети розміщуються всередині камери автоклава, яка потім герметично закривається.

Вода в автоклаві нагрівається до температури близько 121 – 134°C під тиском (зазвичай від 1 до 2 атмосфер вище атмосферного). Це дозволяє парі проникати у всі поверхні інструментів або матеріалів.

Пар під тиском знищує мікроорганізми і їх спори, що забезпечує повну стерильність. Час стерилізації зазвичай становить від 15 до 60 хвилин, залежно від типу автоклава і об'єму матеріалу, який стерилізується.

Після завершення циклу стерилізації, камера повільно охолоджується, і тиск нормалізується перед відкриттям.

Термостат – це пристрій, який підтримує задану температуру шляхом автоматичного регулювання нагрівання або охолодження. Він використовується для контролю температури.

Лабораторний рН – метр – електронний пристрій, призначений для вимірювання концентрації іонів водню, що визначає рівень лужності та кислотності води і розчинів, забезпечує високу точність результатів. Розрахунок значення рН розчину здійснюється шляхом обчислення величини електричного потенціалу.

Прилад зазвичай складається з вольтметра, підключеного до електрода, чутливого до рН, та еталонного електрода для порівняння. Електрод, що реагує на рН, зазвичай виготовляється зі скла, а еталонним служить срібно – хлористий електрод, хоча іноді використовується електрод з хлоридом ртуті. Коли обидва електроди занурюються в розчин, вони функціонують як джерело електричної енергії.

Скляний електрод генерує електричний потенціал, який залежить від кількості іонів водню в розчині, в той час як вольтметр вимірює різницю потенціалів між ним і еталонним електродом.¹³

Гемакритичні капіляри – це тонкі скляні або пластикові трубки, які використовуються для вимірювання гематокриту, тобто відсотка об'єму еритроцитів (червоних кров'яних клітин) у загальному об'ємі крові.

Вони є важливим інструментом у діагностичних лабораторіях та медичних закладах; їх можна використовувати також і для тих же цілей, але вже з іншими зразками для вимірювання об'єму клітин.

Принцип роботи: капіляр заповнюється досліджуваним зразком до певної позначки, потім один кінець капіляра закривається спеціальною масою (гемастатом, пластиліном і тд.) для запобігання витікання.

Далі капіляр поміщають у спеціальну центрифугу і обертають на обраній швидкості. Це розділяє зразок на компоненти і утворює осад.

Після центрифугування вимірюють висоту шару осаду скупчених клітин і висоту всього стовпчика зразку у капілярі і розраховується як відношення висоти шару осаду до висоти всього стовпчика зразку і виражається у відсотках.

Кисневий електрод для вимірювання O_2 , електрод Кларка – використовується для вимірювання концентрації розчиненого кисню у рідинах.

Він складається з аноду (зазвичай з срібла) та катоду (платиновий або золотий), розділених електролітом і покритих киснепроникною мембраною.

Принцип роботи кисневого електрода: під дією електричного потенціалу кисень, що дифундує через мембрану, відновлюється на катоді, утворюючи воду. Ця реакція генерує електричний струм, пропорційний концентрації кисню. Сила струму, що виникає під час реакції відновлення кисню, вимірюється і перетворюється на значення концентрації кисню.

Флуориметр – це прилад, який використовується для вимірювання флуоресценції, тобто світлового випромінювання, що виникає в речовині під впливом ультрафіолетового (або іноді видимого) світла.

Коли певні молекули поглинають світло, вони можуть перейти у збуджений стан, а потім повертатися до основного стану, випромінюючи світло на іншій довжині хвилі. Це випромінювання реєструється флуориметром, що дозволяє оцінити властивості речовини, наприклад, її концентрацію або структуру.

Флуориметри можуть мати різні конфігурації, але в загальному принцип їх роботи полягає в опроміненні зразка світлом певної довжини хвилі та вимірюванні випромінюваного світла іншої довжини хвилі.

Водяна баня – це лабораторне обладнання, яке підтримує певну постійну температуру рідини (зазвичай води).

Застосовується для нагрівання зразків у контрольованих умовах. Ультразвукова баня генерує ультразвукові хвилі у рідині, що створює процес кавітації (утворення мікропухирців, які швидко лопаються) та для кращого перемішування осаду та зразків.

2.3 Методи досліджень

Методи досліджень: емпіричні (спостереження, аналіз, порівняння, вимірювання, експеримент), біохімічні (рН – метрія, спектрофотометрія, центрифугування, флуоресцентний метод), фізіологічні (амперметричний, світлова мікроскопія, PCV), мікробіологічний, статистичні методи обробки даних.

2.3.1 рН – метрія

Електродний метод є одним із найбільш використовуваних способів вимірювання. Для цього використовують рН – електрод, який оснащений датчиком, що створює електричний сигнал, прямо пропорційний рівню іонів водню в розчині.

Для забезпечення точної роботи сучасних рН – метрів необхідно регулярно очищати електрод та проводити калібрування приладу за допомогою стандартних буферних розчинів.

Перед кожним використанням рН – електрод потребує калібрування, а після кожного застосування – ретельного промивання. Для очищення електроду можна використовувати дистильовану воду або спеціальні чистячі розчини.¹³

За допомогою методу рН – метрії було визначено рН середовища культивування. Середовище культивування *E. gracilis* у випадку використання в якості субстрату етанолу у концентрації 2 % при рН середовища 2,8, дозволяє знизити ймовірність контамінації культури іншими мікроорганізмами.¹⁴

2.3.2 Приготування поживного середовища, посів (мікробіологічний метод) та метод світлової мікроскопії

Приготування поживного середовища, посів і світлова мікроскопія – це комплекс методів, які використовуються для вивчення мікроорганізмів.

Ці методи є основою для ідентифікації, кількісного визначення та дослідження морфологічних характеристик мікроорганізмів. Розглянемо хід роботи з використанням даного методу.

1. Приготування поживного середовища Cramer and Myers для посіву культур *Euglena gracilis*. Для цього треба шпателем перенести у мірний стакан потрібну кількість реагентів і зважити їх по черзі на електронних вагах.

Потім додати і розчинити у 1 дм³ дистильованої води: 1 г гідрофосфату амонія – (NH₄)₂HPO₄, 1 г дигідрофосфату калія – KH₂PO₄, 0,2 г магнію сірчаноокислого (семиводного) – MgSO₄×7H₂O, 0,02 г хлориду кальція – CaCl₂, 0,8 г цитрата натрію – Na₃C₆H₅O₇×2H₂O, суміш мікроелементів та вітамінів. Все ретельно перемішати, розлити по 10 колбам по 100 мл та залишити на один день при кімнатній температурі.

2. Проведення посіву культури зеленої мікроводрості, вирощеної за фототрофних та мікотрофних умов, з додаванням та без фенольних сполук. Посів треба проводити у стерильних умовах в ламінарному мікробіологічному боксі.

Для цього слід відібрати 8 колб з поживним середовищем: 4 колби – середовище без етанолу, в інші 4 – додати 200 мкл етилового 96 % спирту). Далі за допомогою піпетки перенести 10 мл культури у кожену колбу, ретельно перемішуючи.

Потім щільно закрити пробкою та поставити у холодильник на 5 днів для того, щоб культура розрослася. В культуру *Euglena gracilis*, вирощену при різних типах живлення, додаємо галову кислоту – C₇H₆O₅ та резорцин – C₆H₆O₂ у колби в різних концентраціях.

3. Мікроскопіювання культури. Для цього треба відібрати з колб по 5 мл проби *Euglena gracilis*, перенести їх у пробірки та пронумерувати.

Далі нанести декілька крапель на предметне скло, накрити покривним скельцем і розглядати культуру у мікроскоп при збільшенні × 20.

За допомогою сітки камери Горяєва треба підрахувати кількість Евглен у кожному великому квадраті, обчислити їх середнє значення і підставити його у формулу 2.1.

$$N = A \times 25 \times 10^5 \quad (2.1)$$

де N – кількість млн. клітин у 1 мл проби;

A – середнє арифметичне порохованих клітин у великому квадраті;

Зображена під мікроскопом культура *Euglena gracilis* при фототрофному та міксотрофному вирощуванні без та з додаванням поліфенольних сполук на 5, 10 та 14 день дослідження, наведено на рис. 2.4.

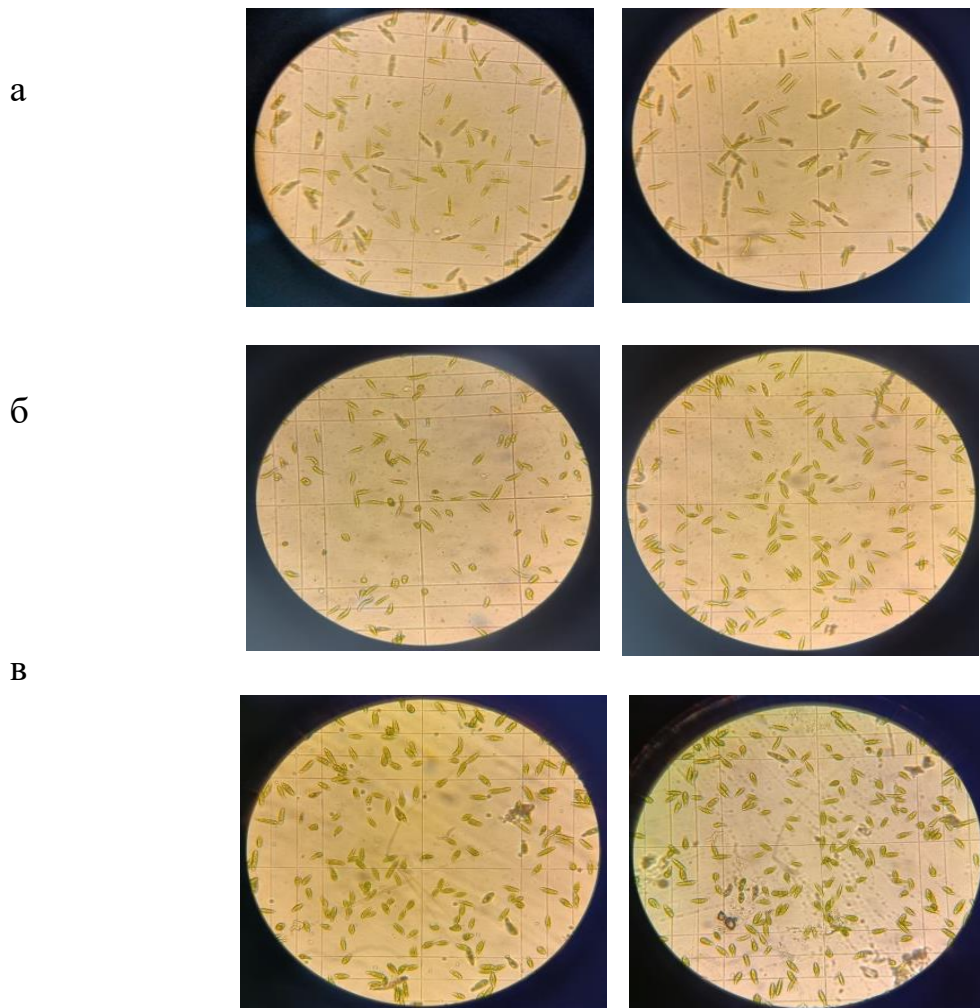


Рисунок 2.4 – *Euglena gracilis*. Зліва – фототрофне вирощування, справа – міксотрофне вирощування (а – на 5, б – на 10, в – на 14 день)

2.3.3 PCV метод

Для порівняння кількості клітин, додатково можна використати PCV метод, щоб виміряти об'єм ущільнених клітин за допомогою гематокритних капілярів. Для початку потрібно наповнити гематокритні капіляри культурою мікроводорості за допомогою шприця з трубкою.

Кінець капіляра треба закоркувати пластиліном і покласти їх у спеціальний ротор. так зробити з всіма 10 пробами культури *Euglena gracilis*.

Потім розмістити ротор з наповненими капілярами у центрифугу на 5 хвилин на 9000 обертів.

Після центрифугування, за допомогою капілярів, треба розраховувати співвідношення висоти шару осаду до висоти всього стовпчика зразку в капілярі (у відсотках). Провести підрахунок результатів за формулою 2.2.

$$R = (h_{\text{осад}} / h_{\text{загальн.}}) \times 100 \% \quad (2.2)$$

де R – співвідношення висоти шару осаду до загальної висоти, у відсотках (об'єм ущільнених клітин);

$h_{\text{осад}}$ – висота шару осаду (мм);

$h_{\text{загальн.}}$ – загальна висота стовпчика зразка в капілярі (мм).

Метод PCV є більш точним для вимірювання об'єму та кількості клітин в порівнянні з підрахунком клітин за допомогою методу світлової мікроскопії в камері Горяєва.

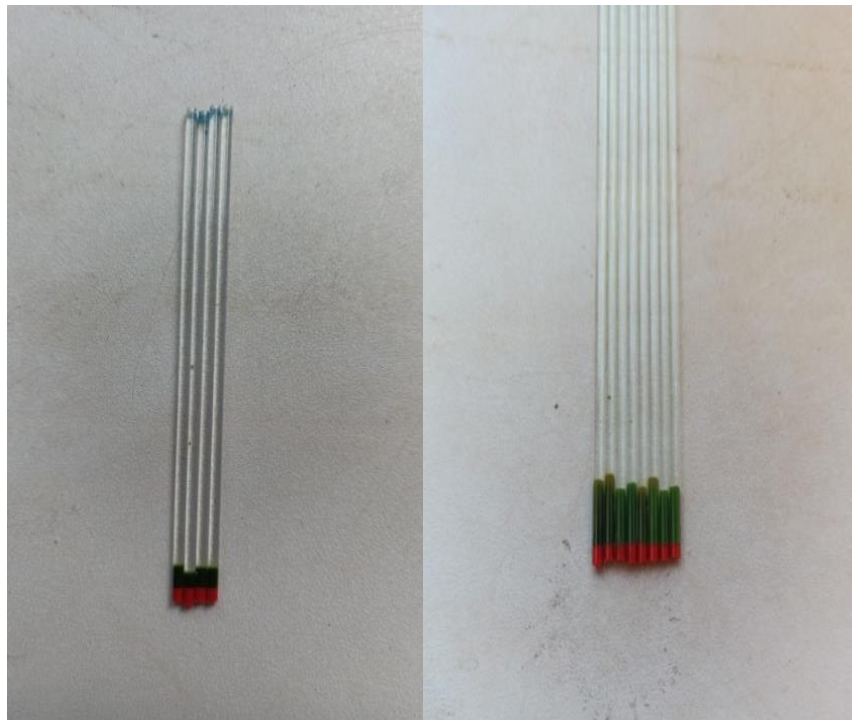


Рисунок 2.5 – PCV метод (визначення об'єму ущільнених клітин за допомогою капілярів)

2.3.4 Вимірювання хлорофілу за допомогою методу спектрофотометрії

Вимірювання хлорофілу методом спектрофотометрії – це лабораторний метод, що дозволяє визначити концентрацію хлорофілу (а саме, хлорофілу а, b та загального хлорофілу) у зразках рослин, водоростей або води. Це важливий показник, який використовується в біологічних, екологічних та аграрних дослідженнях для оцінки фотосинтетичної активності, стану рослинного покриву, продуктивності водних екосистем та якості води.

Спектрофотометрія базується на властивості хлорофілу поглинати світло певних довжин хвиль. Хлорофіл поглинає світло в червоній і синій частинах спектра, тому його кількість у зразку можна визначити, вимірюючи інтенсивність поглинання світла при певних довжинах хвиль.

Поглинання світла – різні типи хлорофілу (наприклад, а і b) поглинають світло на різних довжинах хвиль. Хлорофіл (а) максимально поглинає світло на довжині хвилі приблизно 665 нм, а хлорофіл (b) – на 649 нм.

Хід роботи:

Спочатку треба підготувати проби Евглени для подальшого визначення хлорофілу. Для цього треба відібрати по 2 мл проби культури мікроводорості, вирощеної при фототрофних та мікотрофних умовах.

Поставити їх в центрифугу для осадження клітин, осад промити дистильованою водою, додати до осаду 0,5 мл спирту для екстрагування хлорофілів. Перенести в мікропробірки і заморозити, потім виміряти хлорофіл. Це початкова точка росту культури, і більш концентрованіший розчин, ніж у наступних експериментах.

Відбирають 160 мкл зразку та 2,0 мл спирту для проведення спектрофотометрії при довжині хвилі 649 та 665 нм. Після проведення спектрофотометрії, отримані значення оптичної густини, треба підставити у формулу та розрахувати концентрацію хлорофілу (а) та (б) у клітинах зеленої мікроводорості та обрахувати його кількість у серії зразків за формулами 2.3 – 2.4.

Хлорофіл (а), мкг/мл, розраховують за формулою 2.3.

$$C = (13,7 \times A_{665}) - (5,76 \times A_{649}) \quad (2.3)$$

Хлорофіл (б), мкг/мл, розраховують за формулою 2.4.

$$C = (25,8 \times A_{649}) - (7,6 \times A_{665}) \quad (2.4)$$

де С – результат обчислення (концентрація хлорофілу);

A_{649} – значення оптичної густини проби при довжині хвилі 649 нм;

A_{665} – значення оптичної густини проби при довжині хвилі 665 нм.

Потім треба побудувати графіки і провести порівняльне дослідження накопичення хлорофілу в клітинах Евглени за фототрофного та міксотрофного живлення, оцінити вплив різних фенольних сполук на його кількість.

2.3.5 Спектрофотометричний метод (за глюкозою визначаємо парамілон)

Хід роботи: Для початку треба відібрати культуру *Euglena gracilis*, у різні колби додати фенольні сполуки (галова кислота та резорцин).

Звідти з кожної колби взяти 6 мл мікрowodорості, центрифугувати 2 хв, додати дистиллят і перемішати. Промити дистиллятом, щоб видалити солі. Ще раз про центрифугувати, злити супернатант, окрім осаду.

Додати 0,5 мл спирту, щоб виділити з клітин хлорофіл. В результаті має бути безбарвний осад. Якщо він не безбарвний, треба ще раз процентрифугувати, і промити спиртом 2 рази. Потім воду злити, і знову додати спирт, перемішати і перенести в епіндорфи.

Ставити центрифугуватись треба на 10 000 обертів на 2 хвилини. Промити дистиллятом, перемішати і ще раз процентрифугувати.

Далі приготувати 1 % розчин SDS. Для цього треба відібрати 5 мл дистилляту і додати 50 мг SDS, перемішати, і почекати поки розчиниться осад.

Потім додати у кожную пробу 0,5 мл SDS.

Проби Евглени перенести треба у пробірки і поставити на ультразвукову баню, щоб розчинився та перемішався осад, а потім на водяну баню на 30 хв. Чекаєти поки проби охолонуть і знову центрифугувати та осаджувати осад 5 хв. Супернатант (рідина над осадом) треба злити і додати розчин NaOH. Щоб його приготувати треба розчинити у 5 мл дистилляту 0,2 г NaOH. Потім відібрати 0,5 мл NaOH, перемішати, щоб осад розчинився, процентрифугувати і проба буде вже готова.

Щоб визначити глюкозу та парамілон цим методом спочатку треба підготувати пробу, а потім вже зробити за методикою із сірчаною кислотою та фенолом. Для цього треба взяти 200 мікролітрів проби і додати 200 мікролітрів фенолу та 1,5 мл конц. сульфатної кислоти (H₂SO₄). Ретельно перемішати та поставити зразки на 10 хв в термостат при температурі 30 °C. В результаті відбудеться зміна кольору проб на жовтуватий колір.

Наступним етапом є спектрофотометрія при довжині хвилі 490 нм, результати обчислюють за формулою 2.5.

$$C_{\text{глюкоза}} = 432,9 \times A - 19,439 \quad (2.5).$$

де: $C_{\text{глюкоза}}$ – вміст глюкози (мкг/мл),

A – значення оптичної густини зразка при довжині хвилі 490 нм.

В результаті отримаємо вміст глюкози (мкг/мл). Отриману концентрацію глюкози можна прирівняти пропорційно до концентрації парамілону.

2.3.6 Приготування розчину добавок

Для того, щоб зробити розчин резорцину треба взяти його 1 г і розчинити у 0,1 л дистилляту, а вже потім робити його розведення. Для цього слід відібрати 1 мл з розчину резорцина, перенести у пробірку і додати 9 мл дистилляту.

Потім до кожної проби культури мікроводорості додати 400 мікролітрів резорцину. Так само готуємо розчин галової кислоти, яка додається до проб у колби. 1 мл галової кислоти + 9 мл дистилляту. Робимо розведення концентрованої галової кислоти. 3 пробірки відібрати 2 рази по 200 мікролітрів, щоб було по 400 мікролітрів у кожній серії зразків Евглени.

2.3.7 Метод центрифугування

Метод центрифугування – це лабораторний метод розділення компонентів зразка на основі їх щільності під впливом відцентрової сили. Метод широко застосовується в наукових галузях для розділення клітин, органел, білків, нуклеїнових кислот, рідин і твердих речовин. При центрифугуванні зразок обертається на високій швидкості в центрифусі. Відцентрова сила, яка виникає при обертанні, примушує більш щільні компоненти осідати на дно пробірки, а менш щільні залишаються зверху.

Тому, центрифугування є невід'ємною частиною багатьох лабораторних процедур. Завдяки йому можна швидко виділяти та концентрувати клітинні компоненти, збагачувати певні речовини для подальших досліджень та очищати зразки.

2.3.8 Амперметричний метод визначення вмісту O_2 за допомогою кисневого електроду

Амперметричний метод визначення вмісту O_2 за допомогою кисневого електроду є одним із найбільш точних і поширених способів вимірювання концентрації кисню в рідких або газових середовищах.

Принцип методу: реєстрація виділення кисню за допомогою кисневого платинового електроду. Він заснований на вимірюванні електричного струму, що генерується в результаті електрохімічної реакції кисню на поверхні електрода.

Кисневий електрод (також відомий як O_2 – електрод або кисневий датчик) використовує електрохімічний принцип для визначення концентрації кисню.

В електроді використовується катодна реакція, де кисень відновлюється до води, і анодна реакція, де відбувається окиснення.

Катодна реакція (на електроді): $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$. На катоді кисень приймає електрони і відновлюється до води. На аноді відбувається окиснення. Згідно з принципом роботи, коли кисень дифундує до електрода і вступає в реакцію, на електроді виникає струм, пропорційний кількості молекул кисню, що проходять через електрод. Чим вища концентрація кисню, тим більший струм вимірюється амперметром.

Визначення концентрації O_2 здійснювали амперметрично за допомогою комп'ютеризованого полярографа, оснащеного платиновим електродом Кларка в скляній комірці об'ємом 3 мл (Зеленский, 1986). Вимірювання O_2 проводили при постійному перемішуванні культури мікрободорості на магнітному змішувачі при температурі 22°C.

Кроки вимірювання: встановлення кисневого електрода: електрод поміщається в середовище, в якому потрібно виміряти концентрацію кисню (культуральне середовище); електрохімічні реакції: кисень, що міститься в середовищі, відновлюється на катоді, створюючи електричний струм; вимірювання струму: амперметр реєструє цей струм, і на основі його величини можна виміряти рівень кисню у зразку; підрахунок концентрації: оскільки струм пропорційний концентрації кисню, це дозволяє перевести значення струму в концентрацію кисню.

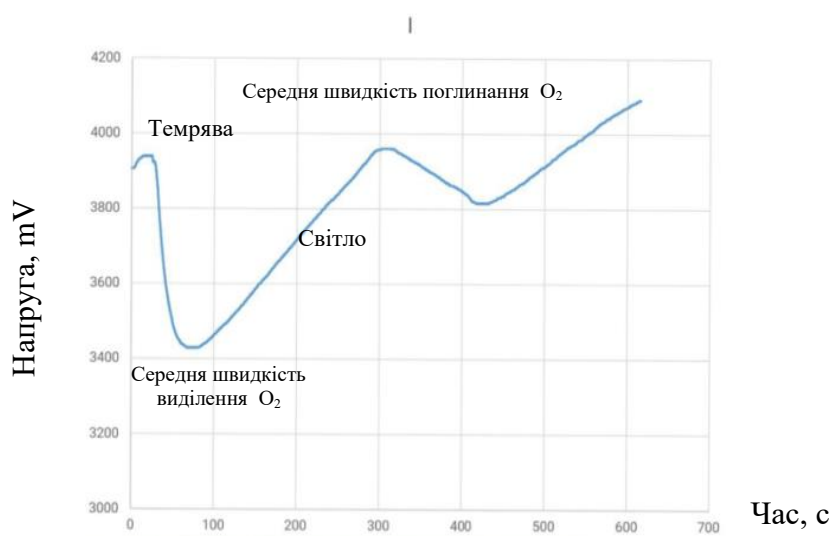


Рисунок 2.6 – Графік середньої поглинання і виділення кисню культурою *Euglena gracilis*

Особисту авторську програму для вимірювання поглинання і виділення кисню – амперметричний метод визначення та обрахунку вмісту O_2 за допомогою кисневого електроду, розробив старший кандидат біолог. наук, наук. співробітник Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного – Поліщук Олександр Васильович. Приклад вимірювання у цій програмі наведено на рис. 2.7.



Рисунок 2.7 – Авторська програма Поліщука О. В. для визначення та обрахунку вмісту O_2 за допомогою кисневого електроду

Хід роботи:

Перед початком роботи треба підготувати зразки Евглени. Для цього треба відібрати по 10 мл кожної проби (у подальших дослідженнях коли культура розростеться брати 12 мл), процентифугувати, вилити культуру, залишаючи при цьому тільки 3 мл.

Далі в скляну комірку поміщається зразок культури *Euglena gracilis* об'ємом 0,003 л. Вимірювання проводяться при температурі 22 °C з постійним перемішуванням за допомогою магнітної мішалки. Для забезпечення освітлення використовується світлодіодна лампа білого світла.¹⁵

Для визначення фотосинтетичного виділення кисню та поглинання кисню клітинами культури в процесі дихання зразок спочатку адаптували до світла протягом 3 – 5 хвилин.

Потім підвищували інтенсивність освітлення та протягом 4 хв вимірювали швидкість виділення кисню клітинами. Для оцінки швидкості дихання світло вимикали, та протягом 2 хв визначали швидкість поглинання O_2 .

Процедуру вимірювання повторювали тричі і знаходили середнє значення швидкості виділення і поглинання O_2 .¹⁵

Визначення параметрів газообміну кисню проводили по закінченні 1 та 5 доби інкубації клітин міководорості у середовищі з органічними субстратами.

За швидкістю виділення кисню за насичуючої інтенсивності світла з поправкою на темнове дихання визначали інтенсивності фотосинтезу. Швидкість обраховували в $\mu\text{моль } O_2 \text{ год}^{-1} \times 10^{-6}$ клітин.¹⁵

2.3.9 Метод флуориметрії (визначення флуоресценції хлорофілу)

Флуориметрія – метод, який використовується для вимірювання інтенсивності флуоресценції речовин, що поглинають світло та випромінюють його з більшою довжиною хвилі, використовується для оцінки стану фотосинтетичної активності рослин.

Флуоресценція хлорофілу – це випромінювання світла хлорофілом після поглинання світлової енергії. Коли хлорофіл у клітинах рослин поглинає світло, частина цієї енергії перетворюється на хімічну енергію для фотосинтезу, а інша частина – випромінюється як флуоресценція.

Отже, метод флуоресценції хлорофілу є важливим інструментом флуориметрії для вивчення і моніторингу фотосинтетичної активності рослин.

Флуоресценцію хлорофілу визначали за загальноприйнятою методикою на флуориметрі ХЕ – РАМ (Walz, Німеччина).^{15,16}

Інтенсивність діючого світла відповідала інтенсивності освітлення при культивуванні водоростей ($100 \mu\text{моль/м}^2 \cdot \text{с}$). Дослідження проводили при кімнатній температурі ($22 \text{ }^\circ\text{C}$).^{15,16}

Запис даних у форматі файлів Excel проводили за допомогою мультимера UT – 60E (Тайвань), з'єданого з комп'ютером.¹⁶

Дослідження включало вимірювання показників флуоресценції хлорофілу (qP , F_0 , F_t , F_m), що супроводжувалося вивченням впливу поліфенольних сполук на ефективність перетворення енергії світла в хімічну енергію в клітинах *E. gracilis* за умов фототрофного та міксотрофного харчування.

Гасіння флуоресценції хлорофілу (qP) відображає кількість реакційних центрів ФСII, які знаходяться у відкритому стані і здатні до збудження.

Значення qP корелює з активністю процесів, що підтримують електронний транспорт, головним чином, фіксацією вуглекислого газу. Таким чином, додавання етанолу позитивно вплинуло на процес фіксації вуглецю у клітинах *E. gracilis*, а значить, і ефективність фотосинтезу.¹⁷

Як працює флуориметрія флуоресценції хлорофілу:

- збудження хлорофілу: флуориметр опромінює зразок світлом певної довжини хвилі, збуджуючи молекули хлорофілу.
- вимірювання флуоресценції: хлорофіл у відповідь випромінює світло з більшою довжиною хвилі. Флуориметр фіксує інтенсивність цього випромінювання.

Як проводиться вимірювання

- темнова адаптація: об'єкт адаптують до темряви, щоб всі реакційні центри ФСII були відкриті;
- збудження світлом: зразок опромінюється збуджувальним світлом, яке поглинається хлорофілом;
- реєстрація флуоресценції: флуориметр фіксує інтенсивність випромінювання (флуоресценції) хлорофілу;
- аналіз показників: отримані значення (наприклад, F_0 , F_t , F_m) використовуються для обчислення показників фотохімічної активності, qP (фотохімічне гасіння) тощо.

Програму для дослідження явища флуоресценції представлено на рис. 2.8.

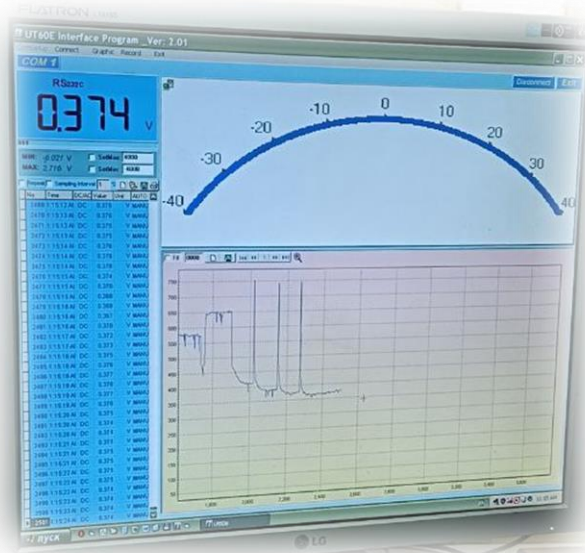


Рисунок 2.8 – Програма для дослідження флуоресценції

Хід роботи:

Для початку треба завантажити у кювету з магнітною мішалкою зелені мікроводорості об'ємом 2 мл. Але перед цим адаптувати клітини *Euglena gracilis* до темряви протягом 5 хв для окиснення первинного хінонового акцептора комплексів ФС II.

Потім включити спочатку вимірюючи світло, потім через декілька секунд – насичуюче світло. Вимірююче світло (2 Гц) має низьку інтенсивність ($\sim 0,1 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$) і тому не викликає збудження реакційних центрів ФС II, відповідно, вони залишаються у окисненому (відкритому) стані. Насичуючий спалах тривалістю 1 с та інтенсивністю $3000 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ збуджує максимально можливу кількість ФС II, в результаті чого інтенсивність флуоресценції досягала максимального значення F_m^0 . Другий акцептор електронів у фотосинтетичному електрон – транспортному ланцюзі, Q_A та реакційні центри ФС II переходили у відновлений (закритий) стан. ¹⁵

Далі виключити актинічне, почекати поки значення графіку вийде на плато і вже тільки тоді виключити вимірююче світло. Зберегти файл з даними і зробити ці операції з серією зразків культури Евглени. Проаналізувати графік та отримати значення F_m , F_t , F_0 , які допоможуть обрахувати qP .

Показник qP (коефіцієнт фотохімічного гасіння флуоресценції хлорофілу) широко використовується в дослідженнях фотосинтезу для оцінки ефективності фотохімічних реакцій у хлоропластах.

Він відображає здатність рослини використовувати енергію світла для фотохімічних процесів, зокрема у фотосистемі II, і є важливим індикатором загального стану фотосинтетичного апарату. qP показує, яка частина енергії світла, що поглинається хлорофілом, використовується для фотохімічних процесів, а не розсіюється у вигляді тепла або флуоресценції.

Високий qP свідчить про активне використання поглиненої енергії для фотохімії, що є ознакою здорового, ефективного фотосинтезу. Зниження qP зазвичай означає, що реакційні центри залишаються закритими, тобто їхнє використання для фотохімічних реакцій знижується.

Тому, дослідження qP дають уявлення про те, як об'єкт адаптується до змін освітлення і як ефективно вона використовує поглинуте світло в різних умовах.

Розрахувати показник qP можна за формулою 2.6:

$$qP = (F_m - F_t) / (F_m - F_0) \quad (2.6)$$

де F_m (верхня точка піку) – це позначення для максимальної флуоресценції хлорофілу в стані, коли всі реакційні центри фотосистеми II повністю закриті. Вона вимірюється у рослин при насиченні освітленням після попередньої темної адаптації (коли реакційні центри повертаються до відкритого стану).

Отримується під час насичуючого світлового імпульсу, коли всі реакційні центри фотосистеми II тимчасово закриті, і тому електрони не можуть бути передані далі по ланцюгу переносу електронів. У цьому стані хлорофіл відбиває максимальну кількість флуоресценції, що можна виміряти.

F_t – це позначення для моментальної (або «теперішньої») флуоресценції хлорофілу, яка вимірюється в будь-який обраний момент під час освітлення зразка.

Вона показує поточний рівень флуоресценції при певному освітленні і відповідає рівню флуоресценції, коли реакційні центри фотосистеми II знаходяться в змішаному стані (деякі відкриті, а деякі закриті).

F_0 (мінімальна флуоресценція, плато перед піком) – це базовий показник флуоресценції хлорофілу, що вимірюється в темновому стані, коли всі реакційні центри ФСII повністю відкриті. Параметр F_0 показує рівень флуоресценції, який виникає через «основну» енергію збудження, що не використовується в фотохімічних реакціях.

Спостерігається коли немає фотохімічної активності, і вся поглинута енергія або розсіюється, або випромінюється як флуоресценція. Це найнижчий рівень флуоресценції,

Тому, флуориметрія флуоресценції хлорофілу є потужним і швидким інструментом для оцінки ефективності фотосинтетичних процесів у рослинах, виявлення стресових факторів і дослідження адаптаційних реакцій.

Проте її обмеження, такі як чутливість до зовнішніх умов та необхідність у додаткових методах для повної оцінки стану рослин, слід враховувати при плануванні досліджень.

2.4 Статистична обробка результатів досліджень

Експерименти виконувались з кількома повтореннями, при цьому кількість аналітичних повторів становила не менше 3 – 5. Результати, наведені в таблицях, представлені як середнє арифметичне значення з урахуванням стандартної похибки. Обробка даних, а також побудова таблиць і графіків здійснювались за допомогою програми Microsoft Excel.

Під час дослідження для статистичної обробки даних використовувались такі методи:

- аналіз розподілу на нормальність – застосовувався для перевірки, чи відповідають дані нормальному розподілу. Це необхідно для визначення коректності використання параметричних статистичних тестів.

- T – тест – використовувався для оцінки значущості відмінностей між середніми значеннями двох груп. Це дозволяє перевірити гіпотезу про те, чи є різниця між групами статистично значущою.

- тест Пірсона – застосовувався для аналізу зв'язків між категорійними змінними. Цей тест дозволяє визначити, чи є залежність між змінними випадковою або статистично значущою.

- кореляційний аналіз – застосовувався для оцінки сили та напрямку зв'язку між двома кількісними змінними. Залежно від розподілу даних використовувалися параметричний (кореляція Пірсона).

- тест Вілкоксона – застосовувався для оцінки відмінностей між двома залежними групами в разі, якщо дані не відповідають нормальному розподілу. Цей тест є непараметричним аналогом парного t-тесту.

- дисперсійний аналіз (ANOVA) – застосовувався для перевірки значущості відмінностей між середніми значеннями трьох або більше груп.

Ці методи забезпечили точність і достовірність висновків, зроблених у рамках дослідження.

2.4.1 Ріст клітин у фототрофних та міксотрофних умовах

Результати щодо росту клітин *Euglena gracilis* були статистично оброблені і перевірені на нормальність розподілу, які наведено на рис. 2.9.

Descriptive Statistics

	kontrol	ethanol
Valid	25	25
Missing	0	0
Mean	72.000	145.200
Std. Deviation	32.951	92.331
Shapiro-Wilk	0.932	0.926
P-value of Shapiro-Wilk	0.096	0.068
Minimum	24.000	24.000
Maximum	123.000	297.000

Рисунок 2.9 – Перевірка на нормальність розподілу росту клітин *Euglena gracilis* у фототрофних та міксотрофних умовах

Критерії Shapiro – Wilk у фототрофних умовах = 0,932 та в міксотрофних = 0,926. Це показник того, наскільки розподіл даних близький до нормального. Значення близькі до 1, що вказує на те, що дані досить близькі до нормального розподілу.

Ці значення означають, що дані можуть бути наближені, щоб бути нормально розподіленими. Розподіл даних, ймовірно, є нормальним і немає достатніх доказів для відхилення гіпотези про нормальність в межах статистичної значущості.

Для повного розуміння потрібно враховувати також і показник p – value (рівень значущості) of Shapiro – Wilk. Вони становлять 0,096 та 0,068. Тому, що якщо p – value більше 0,05, це вказує на те, що дані не мають статистично значущих відхилень від нормального розподілу, і припущення про нормальність розподілу не відхиляється.

Таким чином, у цьому випадку обидва значення p – value (0,096 і 0,068) свідчать про те, що розподіл даних може вважатися нормальним. Так як розподіл даних нормальний рекомендовано застосовувати параметричний тест – T– тест. Результати наведені на рисунку 2.10.

Paired Samples T-Test

Measure 1	Measure 2	t	df	p
kontrol	- ethanol	-5.527	24	< .001

Note. Student's t-test.

Рисунок 2.10 – Результати T– тесту

Показник $t = -5,527$. Це показує, що різниця між двома порівнюваними групами ріст при фототрофному та мікотрофному типі живлення є дуже великою, середні значення двох груп сильно відрізняються. $p < 0.05$, тому можна стверджувати, що різниця між групами статистично значуща.

2.4.2 Визначення концентрації хлорофілу в клітинах мікроводорості при різних типах живлення та впливу поліфенольних сполук

Хлорофіл (а)

Згідно результатів отриманих під час досліджень на хлорофіл (а), дані мають нормальний розподіл. p – value більше 0,05, що вказує на те, що дані не мають статистично значущих відхилень від нормального розподілу.

Тому рекомендовано застосувати Т–тест. Результати наведені на рис. 2.11.

Paired Samples T-Test

Measure 1		Measure 2	t	df	p
k	-	kg	1.893	3	0.155
k	-	e	0.600	3	0.591
k	-	cg	0.938	3	0.417
kg	-	cg	-0.268	3	0.806

Note. Student's t-test.

Рисунок 2.11 – Результати Т– тесту на хлорофіл (а)

Отримані значення $p = 0,155; 0,591; 0,417; 0,806 > 0,05$, це вказує на відсутність наявності статистично значущої різниці між пробами. Жодна з порівнюваних пар зразків з додаванням ГК не демонструє статистично значущої різниці. Тому немає доказів того, що середні значення пар суттєво відрізняються від контролю.

Хлорофіл (б)

Згідно результатів описової статистики, які наведені на рис. 2.12, доведено, що дані мають не нормальний розподіл за допомогою критерія Shapiro – Wilk та $p - value$.

Якщо значення $p - value \leq 0,05$, розподіл значно відрізняється від нормального.

Для змінних «к» (фототрофні умови), «кг» – фототрофні умови з додаванням фенольної сполуки – резорцину, і «сг» – міксотрофні умови з резорцином, значення $p - value$ менше 0,05, тому їх розподіл відрізняється від нормального.

Для змінної «е» з додаванням етанолу в поживне середовище, значення $p - value$ більше 0,05 ($p = 0,292$), тому її розподіл може вважатися нормальним. Розкид значень між змінними помірний, без значних відхилень у варіативності.

	k	kr	e	cr
Valid	11	11	11	11
Missing	0	0	0	0
Mean	13.599	13.021	12.871	14.634
Std. Deviation	9.828	9.513	9.407	10.196
Shapiro-Wilk	0.850	0.841	0.917	0.838
P-value of Shapiro-Wilk	0.042	0.032	0.292	0.030
Minimum	2.490	2.470	2.470	2.410
Maximum	28.040	24.930	29.800	27.070

Рисунок 2.12 – Результати описової статистики даних щодо концентрації хлорофілу (б) в клітинах Евглени

Так як більшість даних має не нормальний розподіл, було рекомендовано застосувати для подальших досліджень тест Вілкоксона (Wilcoxon Signed – Rank Test). Його результати наведені на рис. 2.13.

Paired Samples T-Test

Measure 1	Measure 2	Test	Statistic	z	df	p	
k	-	kr	Student	0.608		10	0.557
			Wilcoxon	34.000			0.089
k	-	e	Student	0.393		10	0.703
			Wilcoxon	35.000			0.178
k	-	cr	Student	-1.366		10	0.202
			Wilcoxon	19.000			-1.245
kr	-	e	Student	0.088		10	0.931
			Wilcoxon	21.500			-0.118
kr	-	cr	Student	-2.859		10	0.017
			Wilcoxon	1.000			-2.845

Рисунок 2.13 – Результати Wilcoxon Signed – Rank Test

У чотирьох парах (k і kr – фототрофні умови без та з додаванням фенольної сполуки – резорцину, k і e – фототрофні та міксотрофні умови, k і cr – фототрофні умови та міксотрофні умови з додаванням резорцину, kr і e – фототрофні умови з додаванням резорцину та міксотрофні умови) не виявлено статистично значущих відмінностей (усі значення $p > 0,05$).

У парі «kr та cr» виявлено статистично значущу різницю (Wilcoxon test: $p = 0,002$). Це свідчить про те, що значення змінних суттєво відрізняються. Зважаючи на результати тесту Вілкоксона, непараметричний підхід підтверджує результати параметричного тесту для проби контроль + резорцин та спирт + резорцин, що є надійним свідченням відмінностей.

2.4.3 Визначення вмісту парамілону в культурі *Euglena gracilis* під впливом різних фенольних сполук за фототрофних та міксотрофних умов

Результати щодо вмісту парамілону у пробах культури *Euglena gracilis* були статистично оброблені і перевірені на нормальність розподілу за допомогою описової статистики та критерія Shapiro – Wilk, які наведено на рис. 2.14.

Descriptive Statistics

	Column 7	Column 11	Column 10	Column 9	Column 8
Valid	3	3	3	3	3
Missing	3	3	3	3	3
Mean	2.667	152.267	175.933	51.133	63.833
Std. Deviation	2.082	80.964	28.897	22.961	58.675
Shapiro-Wilk	0.923	0.793	0.993	0.999	0.836
P-value of Shapiro-Wilk	0.463	0.098	0.843	0.940	0.204
Minimum	1.000	58.900	148.500	28.600	23.900
Maximum	5.000	203.100	206.100	74.500	131.200

Рисунок 2.14 – Результати перевірки на нормальність даних щодо вмісту парамілону в клітинах *E. gracilis* за різних типів живлення

Критерії Shapiro – Wilk в серії зразків = 0,923; 0,793; 0,993; 0,999; та 0,836. Це показник того, наскільки розподіл даних близький до нормального. Значення~ близькі до 1, що вказує на те, що дані досить близькі до нормального розподілу.

Ці значення означають, що дані можуть бути наближені, щоб бути нормально розподіленими. Розподіл даних, ймовірно, є нормальним і немає достатніх доказів для відхилення гіпотези про нормальність в межах статистичної значущості.

Для повного розуміння потрібно враховувати також і показник p – value (рівень значущості) of Shapiro – Wilk. Всі p – value більше 0,05, це вказує на те, що дані не мають статистично значущих відхилень від нормального розподілу, і припущення про нормальність розподілу не відхиляється. Так як розподіл даних нормальний рекомендовано застосовувати параметричний тест – T– тест.

Результати наведені на рисунку 2.15.

Paired Samples T-Test

Measure 1		Measure 2	t	df	p
Column 8	-	Column 9	0.573	2	0.624
Column 9	-	Column 10	-4.874	2	0.040
Column 10	-	Column 11	0.498	2	0.668

Note. Student's t-test.

Рисунок 2.15 – Результати Т– тесту на вміст парамілоу в клітинах

Отримані значення $p = 0,624; 0,040; 0,668 > 0,05$, крім другої проби з додаванням резорцину та без нього у автотрофних умовах. Тому статистично значуща велика різниця між пробами відсутня. Жодна з порівнюваних пар не демонструє статистично значущої різниці, немає доказів того, що середні значення пар суттєво відрізняються.

2.4.4 Визначення інтенсивності фотосинтезу *Euglena gracilis* під впливом різних фенольних сполук при різних типах живлення

Згідно результатів отриманих у ході експериментів на поглинання та виділення O_2 зеленою мікроводоростю *Euglena gracilis*, дані мають нормальний розподіл. p – value більше 0,05, що вказує на те, що дані не мають статистично значущих відхилень від нормального розподілу. Тому рекомендовано застосувати Т– тест. Результати наведені на рис. 2.16.

Paired Samples T-Test

Measure 1		Measure 2	t	df	p
V2	-	V3	0.442	1	0.735
V3	-	V4	-1.348	1	0.406
V4	-	V5	-1.030	1	0.491
V5	-	V6	33.371	1	0.019
V6	-	V7	-1.000	1	0.500
V8	-	V9	0.912	1	0.529
V9	-	V10	1.674	1	0.343

Note. Student's t-test.

Рисунок 2.16 – Результати Т– тесту щодо визначення інтенсивності фотосинтезу *Euglena gracilis* під впливом різних фенольних сполук за різних типів живлення

Якщо $p < 0,05$, то різниця між парою змінних є статистично значущою.

При порівнянні всіх проб немає особливо статистично значущої різниці, крім пари: фототрофні умови без та з додаванням ГК ($p = 0,019$). Лише пара V5 – V6 (К – К+Г) має статистично значущу різницю. Для всіх інших пар змінних немає підстав, щоб анулювати нульову гіпотезу про рівність середніх значень.

2.4.5 Визначення флуорисценції (qP) *Euglena gracilis* у фототрофних та міксотрофних умовах

Результати щодо флуоресценції прісноводної джгутикової зеленої мікроводорості були статистично оброблені і перевірені на нормальність розподілу за допомогою описової статистики та критерія Shapiro – Wilk, які вказано на рис. 2.17.

Descriptive Statistics

	fm	ft	f0	qp
Valid	16	16	16	16
Missing	0	0	0	0
Mean	0.902	0.738	0.437	0.353
Std. Deviation	0.270	0.217	0.115	0.038
Shapiro-Wilk	0.911	0.915	0.954	0.986
P-value of Shapiro-Wilk	0.122	0.138	0.547	0.993
Minimum	0.513	0.431	0.263	0.282
Maximum	1.296	1.054	0.627	0.430

Рисунок 2.17 – Результати перевірки на нормальність розподілу даних щодо визначення флуорисценції *Euglena gracilis*

Для всіх змінних тест показує значення, близькі до 1, що показує нормальність розподілу.

Усі p – значення більші за 0,05, що підтверджує нормальність розподілу для кожної з змінних. F_m має найбільшу варіативність, а qP – найменшу. Так як розподіл відповідає нормальному, рекомендовано застосовувати методи статистики, які вимагають нормальності (наприклад кореляційний аналіз та ANOVA).

Результати тесту ANOVA щодо визначення флуорисценції *Euglena gracilis* наведені на рисунку 2.18.

Repeated Measures ANOVA

Within Subjects Effects

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
RM Factor 1	2.410	1	2.410	310.232	< .001
RM Factor 1 * Category	0.473	3	0.158	20.301	< .001
Residuals	0.093	12	0.008		

Note. Type III Sum of Squares

Between Subjects Effects

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Category	0.491	3	0.164	35.641	< .001
Residuals	0.055	12	0.005		

Note. Type III Sum of Squares

Рисунок 2.18 – Результати тесту ANOVA щодо флуорисенції культури мікрободорості *E. gracilis*

ANOVA дозволяє порівнювати середні значення однієї групи по кількох умовах або точках вимірювання. Існує дуже значущий ефект RM Factor 1 на залежну змінну, оскільки p – значення менше 0.001, що демонструє статистичну значущість. Взаємодія між RM Factor 1 і Category є статистично значущими, оскільки присутній значний вплив цих факторів на результат. Група також має значущий вплив на залежну змінну. Тест ANOVA підтверджує важливість факторів і категорій для пояснення варіацій у даних.

Результати кореляційного тесту Пірсона наведено на рисунку 2.19.

Correlation

Pearson's Partial Correlations

Variable		qp	f0	fm	ft
1. qp	Pearson's r	—			
	p-value	—			
2. f0	Pearson's r	-0.104	—		
	p-value	0.713	—		
3. fm	Pearson's r	-0.259	0.900	—	
	p-value	0.352	< .001	—	
4. ft	Pearson's r	-0.364	0.904	0.991	—
	p-value	0.182	< .001	< .001	—

Note. Conditioned on variables: Category.

Рисунок 2.19 – Результати кореляційного тесту

Кореляція Пірсона – це статистичний метод, який дає змогу оцінити ступінь лінійної залежності між двома змінними, при цьому враховуючи вплив можливих сторонніх змінних. На рис. 2.19 наведено коефіцієнти кореляції Пірсона (r) і відповідні p – значення для чотирьох змінних: qP , f_0 , f_m та f_t .

- Між qP та f_0 спостерігається дуже слабка негативна кореляція, і p – значення не є значущим (більше 0,05), що свідчить про відсутність залежності.

- Негативна кореляція між f_0 та f_m є слабкою, а p – значення не є значущим (більше 0,05), що вказує на відсутність значущої лінійної залежності.

- Існує помірна негативна кореляція між f_m та f_t , і p – значення є дуже малим, що вказує на високу статистичну значущість цієї залежності.

- Існує помірна негативна кореляція між qP та f_t , і p – значення є дуже малим, що вказує на статистично значущу залежність.

Результати вказують на те, що f_m і f_t тісно пов'язані між собою, а qP і f_t мають помітну залежність.

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Визначення впливу поліфенольних сполук на ріст клітин *Euglena gracilis* у автотрофних та міксотрофних умовах

Мікрowodорослі, у тому числі Евглена – жителі природних водойм, чутливо реагують на забруднення. Фенольні сполуки – широко поширені токсиканти антропогенного та природного походження. У зв'язку з цим вивчення реакції мікрowodоростей на перевищення концентрації цих сполук є необхідним етапом при розробці методів біоіндикації фенольного забруднення водойм за допомогою мікрowodоростей.

Стічні води багатьох галузей промисловості забруднені фенолами та поліфенольними сполуками, які є токсичними для екосистем і складними для очищення. Найбільше цих речовин містять стоки хімічної промисловості, яка використовує феноли у виробництві пластмас, фарб, клеїв і синтетичних матеріалів. Значний обсяг фенольних сполук виділяється нафтохімічними підприємствами, де ці речовини є побічним продуктом переробки нафти, газу та вугілля.

Целюлозно – паперова промисловість також генерує стоки з великою кількістю фенолів, що утворюються під час обробки деревини та розпаду лігніну. Фармацевтична промисловість додає до стічних вод поліфеноли через використання цих сполук у синтезі лікарських засобів. Виробництво пестицидів і агрохімікатів є ще одним значним джерелом фенолів, оскільки ці речовини входять до складу гербіцидів і фунгіцидів. Харчова промисловість, особливо виробництво олії, вина, чаю та кави, сприяє потраплянню поліфенольних сполук у воду через обробку рослинної сировини. Текстильна промисловість також виділяє феноли через використання хімікатів у процесах фарбування тканин.

Ці галузі залишають серйозний екологічний слід, тому очищення їхніх стоків є пріоритетним завданням для збереження водних ресурсів і відновлення екологічної рівноваги.

Для вивчення впливу поліфенольних сполук на *Euglena gracilis* було обрано галову кислоту та резорцин, оскільки їхній вплив на фізіологічні процеси мікрободоростей, включаючи фотосинтез, ріст, вміст хлорофілу та парамілону досі недостатньо вивчений. Незважаючи на відомі антиоксидантні властивості цих сполук, їхній потенціал у регуляції метаболізму мікрободоростей, зокрема *Euglena gracilis*, залишається малодослідженим. Вибір цих поліфенолів дозволяє розширити наукове розуміння їхнього впливу та оцінити можливості практичного застосування у сфері екології та біотехнологій.

3.1.1 Вплив галової кислоти

Галова кислота, 3,4,5 – тригідроксибензойна кислота, (рис.3.1), належить до класу фенолкарбонових кислот є тригідроксибензойною кислотою з формулою $C_6H_2(OH)_3CO_2H$.

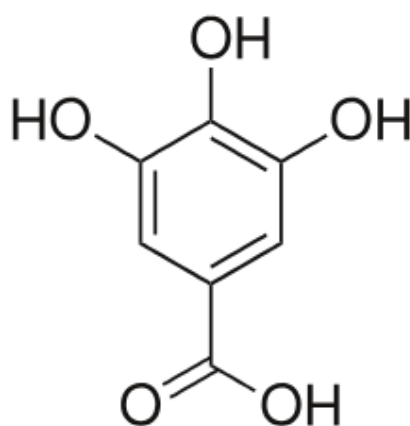


Рисунок 3.1 – Хімічна структура галової кислоти

Фенолкарбонові кислоти є біологічно – активними сполуками з різноманітними фізіологічними ефектами. Одним з завдань роботи було вивчення впливу галової кислоти на мікрободорість *Euglena gracilis*.

Культуру *E. gracilis* вирощували на середовищі Крамера – Майерса у фототрофних або міксотрофних умовах. За міксотрофного вирощування концентрація спирту в культурі становила 0, 2 % (200 мкл етилового 96 % спирту).

Ріст культури *Euglena gracilis* оцінювали, визначаючи об'єм ущільнених клітин (PSV). В попередніх тестових експериментах визначали можливий ефект 300 мкМ галової кислоти на ріст культури як в автотрофних, так і в міксотрофних (з додаванням етанолу) умовах. Результати наведено у табл. 3.1.

Таблиця 3.1 – Оцінка росту автотрофної і міксотрофної культур *Euglena gracilis* з галовою кислотою методом визначення об'єму ущільнених клітин (PSV), μm^3

Дні	К	К+Г	С	С+Г
1	68,5	68,5	108	106,5
5	118	128	171,5	143

Примітка. К – контроль (фототрофні умови вирощування), К+Г – фототрофні умови вирощування з додаванням ГК), С – зі спиртом (міксотрофні умови), С+Г – міксотрофні умови вирощування з додаванням ГК).

Результати тестових експериментів, наведених у таблиці 3.1, показали, що ГК стимулює ріст автотрофної і пригнічує ріст міксотрофної культури.

В подальших експериментах було вивчено вплив галової кислоти в більш широкому діапазоні концентрацій (300, 400, 900 мкМ) на ріст мікроводорості, яку визначали за кількістю клітин в одиниці об'єму культури. Кількість клітин рахували під мікроскопом у камері Горяєва при збільшенні $\times 20$ у кожному великому квадраті сітки. Дані з динаміки росту наведено на рис. 3.2.

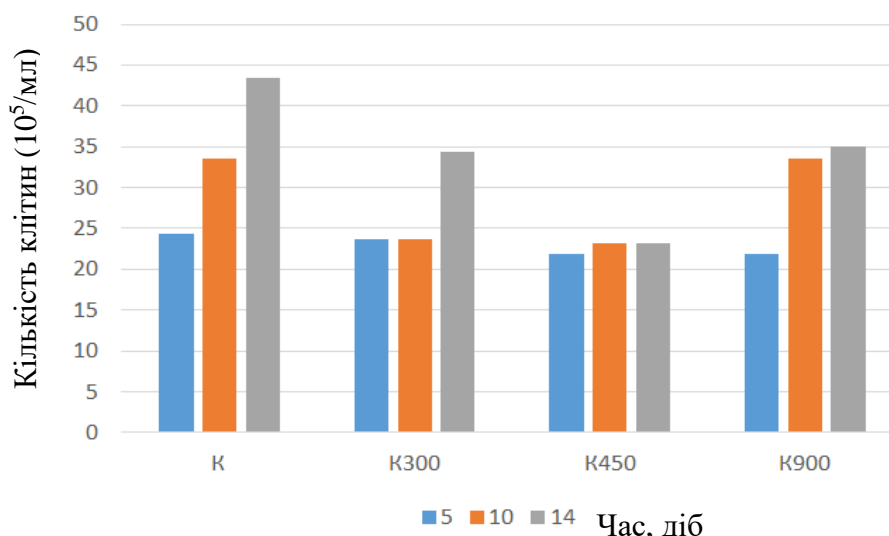


Рисунок 3.2 – Ріст клітин *Euglena gracilis* у пробах у фототрофних умовах за додавання галової кислоти

Примітка. К – контроль (фототрофні умови вирощування з різними концентраціями ГК – 300, 400, 900 мкМ).

Протягом 5 – 14 діб вирощування, галова кислота майже не впливала на ріст порівняно з контролем, що може свідчити про адаптацію клітин до наявності даній фенолкарбонової кислоти у середовищі. У всіх варіантах дослідів найвищий приріст біомаси був зафіксований на 14 добу. Вплив екзогенного етанолу як джерела вуглецевого живлення вивчався у серії дослідів, результати яких наведено на рис. 3.3 і рис. 3.4.

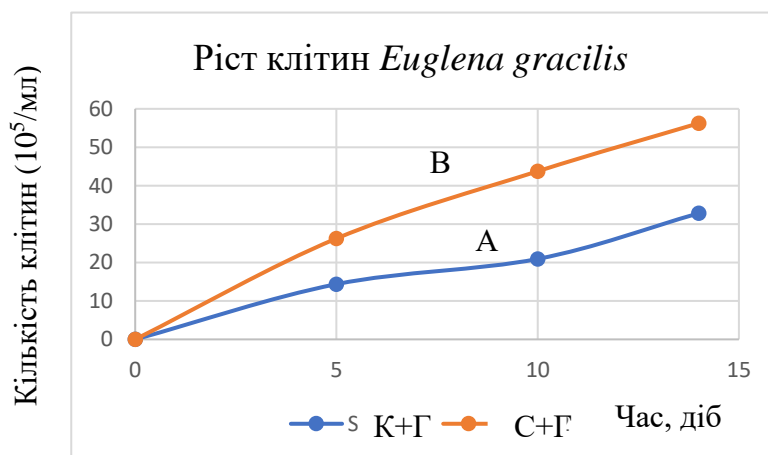


Рисунок 3.3 – Ріст клітин *E. gracilis* у фототрофних (А) та міксотрофних (В) умовах

З даних рис. 3.3 видно, що додавання етанолу в концентрації 0,2 % значно стимулювало ріст культури. Це пов'язано із здатністю *Euglena gracilis* засвоювати екзогенні органічні сполуки, у тому числі і етанол на світлі (міксотрофний ріст). Вплив галової кислоти на ріст *Euglena gracilis* вивчався також за умов міксотрофного росту.

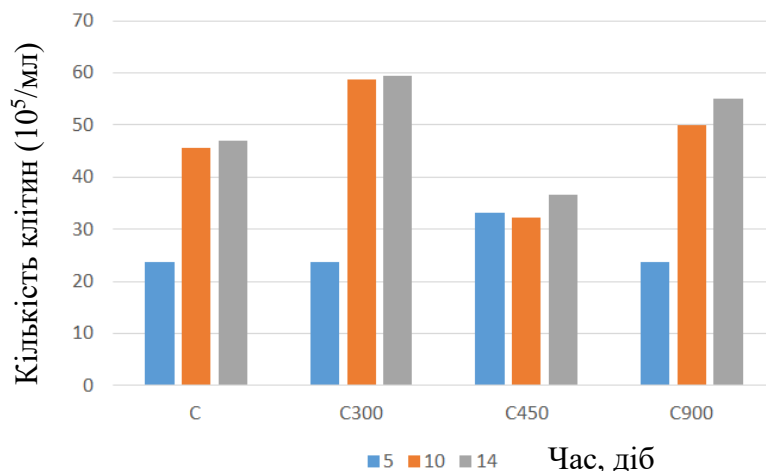


Рисунок 3.4 – Ріст клітин *Euglena gracilis* у міксотрофних умовах за додавання галової кислоти

Наведені у рис 3.4. результати показують, що за присутності етанолу у середовищі вирощування ріст культури стимулюється при всіх доданих концентраціях галової кислоти, особливо при додаванні 300 та 900 мкМ ГК.

У наступному досліді виявилось, що кількість клітин у міксотрофній культурі *Euglena gracilis* збільшувалася також і при додаванні менших (30, 60, 120 та 240 мкМ) концентрацій ГК.

Результати щодо росту клітин *Euglena gracilis* у фототрофній (А) та міксотрофній (В) культурі *Euglena gracilis* за додавання різних концентрацій галової кислоти наведено на рис. 3.5.

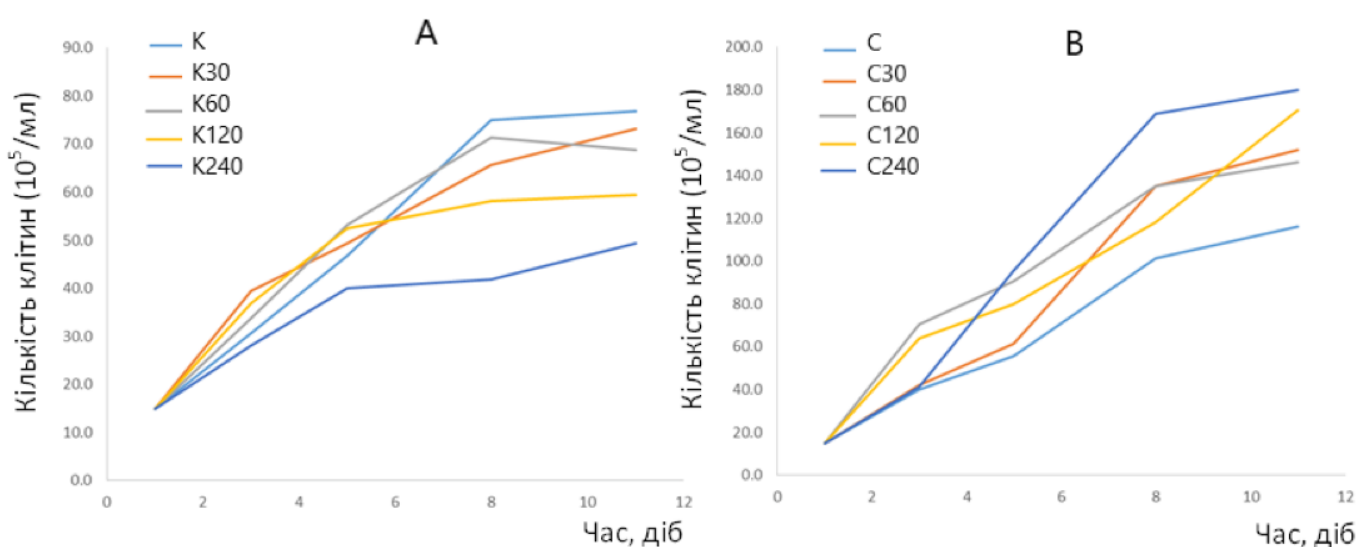


Рисунок 3.5 – Ріст клітин *Euglena gracilis* у фототрофній (А) та міксотрофній (В) культурі *Euglena gracilis* за додавання 30, 60, 120 та 240 мкМ галової кислоти

З рис.3.5 видно, що характер впливу галової кислоти на ріст *Euglena gracilis* критично залежить від типу живлення. При автотрофному режимі вирощування ріст культури інгібувався за додавання галової кислоти у всіх концентраціях, що досліджені. Найбільший ефект – пригнічення росту на 33 % спостерігалось при внесенні 240 мкМ галової кислоти. У міксотрофній культурі, навпаки, за додавання ГК ріст стимулювався, а за додавання 240 мкМ галової кислоти ріст збільшувався на 55 %.

Динаміку росту культури при автотрофному і міксотрофному вирощуванні оцінювали також PSV методом, визначаючи об'єм ущільнених клітин. Оцінка динаміки росту культури наведено у табл.3.2.

Таблиця 3.2 – Оцінка динаміки росту фототрофної та міксотрофної культури *Euglena gracilis* методом визначення об'єму ущільнених клітин (PSV метод) з галовою кислотою, μm^3

Доба	К	К30	К60	К120	К240	С	С30	С60	С120	С240
3	220	208	184	180	200	250	248	252	316	288
5	235	220	190	200	200	470	450	570	600	520
8	275	250	245	250	275	550	550	600	650	550
11	385	360	330	350	340	600	635	650	670	690

Примітка. К – контроль (фототрофні умови вирощування), С – зі спиртом (міксотрофні умови), 30, 60, 120 та 240 мкМ – концентрація доданої ГК

Результати табл. 3.2 свідчать про стимуляцію росту культури за наявності ГК при міксотрофному вирощуванні і пригнічення росту при автотрофному культивуванні порівняно з контролем.

Якісно ці результати узгоджуються з даними, отриманими при підрахунку кількості клітин у камері Горяєва, хоча ефект був менш вираженим.

Таким чином, галова кислота по різному впливала на ріст культури *E. gracilis* залежно від типу живлення. Якщо за фототрофних умов ця сполука здебільш пригнічувала ріст, то за міксотрофного існування спостерігалася значна стимуляція росту. Це дозволяє припускати, що дана мікробна культура здатна поглинати деякі фенольні сполуки з забруднених водойм без пошкодження життєздатності.

3.1.2 Вплив резорцину

У наступному підрозділі наведені дані, отримані при визначенні впливу резорцину на ріст культури *Euglena gracilis*.

Резорцин – двохатомний фенол (рис. 3.6), який широко використовується у промисловості і медицині у складі антисептичних і протимікробних препаратів, менш токсичний за фенол.

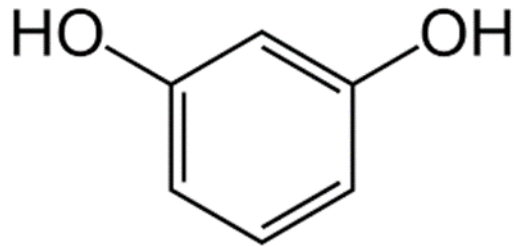


Рисунок 3.6 – Структурна формула резорцину

Тестова оцінка росту клітин *Euglena gracilis* протягом 5 діб у автотрофних та міксотрофних умовах без та з додаванням резорцину наведена у таблиці 3.3. Динаміку росту культури під впливом резорцину оцінювали методом визначення об'єму ущільнених клітин (PSV методом). Концентрація резорцину у культурі становила 300 мкМ, етанолу – 0,2 %.

Таблиця 3.3 – Оцінка динаміки росту фототрофної та міксотрофної культури *Euglena gracilis* методом визначення об'єму ущільнених клітин (PSV метод) з резорцином, μm^3

Доба	К	К+Р	С	С+Р
1	51	48,5	72,5	78,5
5	93	105,5	111	124

Примітка. К – контроль (фототрофні умови вирощування), С – зі спиртом (міксотрофні умови), Р – резорцин у концентрації 300 мкМ.

Результати тестових досліджень, надані в таблиці 3.3 вказують на стимулюючий ефект резорцину на ріст культури на 5 добу при автотрофному та міксотрофному типах живлення. В подальших експериментах було вивчено вплив резорцину в концентрації 300 мкМ на кількість клітин при 7 добовому дослідженні. Дані наведено на рис. 3.7.

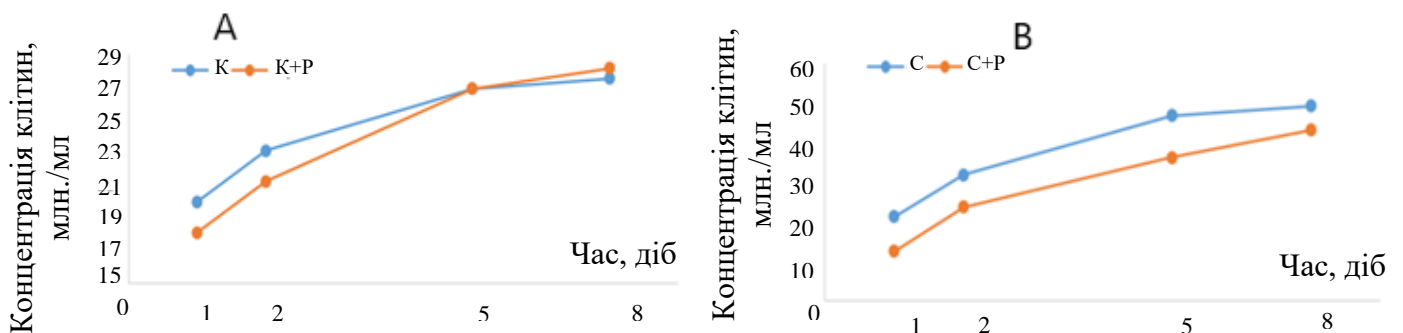


Рисунок 3.7 – Оцінка росту клітин *Euglena gracilis* у автотрофних (А) та міксотрофних (В) умовах з резорцином

Таким чином визначення динаміки росту методом підрахунку кількості клітин не підтвердило стимулюючий ефект резорцину. Цей фенол майже не впливав на ріст автотрофної культури і пригнічував ріст міксотрофної культури протягом всього періоду 7 добового вирощування. Відставання швидкості росту від контролю складала приблизно 12 – 17 %.

Загалом можна сказати, що додавання поліфенольних сполук у забруднені середовища може впливати на життєдіяльність Евглени, підвищуючи їхню стійкість до токсичних речовин та посилюючи здатність до поглинання важких металів і органічних забруднювачів.

Завдяки своїй здатності нейтралізувати активні форми кисню, поліфеноли можуть знижувати рівень оксидативного стресу, який виникає у мікроводоростей під впливом токсичних речовин у воді. Це дозволяє *Euglena gracilis* більш ефективно виконувати свою екологічну функцію, зокрема зменшувати рівень забруднень у водоймах, покращуючи їх екологічний стан.

Евглена має здатність поглинати токсичні речовини (наприклад, важкі метали або органічні забруднювачі).

Результати досліджень показують, що певні хімічні речовини (етанол, галова кислота) можуть стимулювати ріст клітин культури, що дозволяє їх ефективніше використовувати для очищення водойм. Їх можна використовувати наприклад у біофільтрах або аеротенках для очищення промислових стічних вод.

Також мікроводорість може використовуватися і як добриво для рослин у сільському господарстві. Її стимульований ріст під дією поліфенолів, що знаходяться у стічних вод підприємств, дозволяє створювати більші обсяги біомаси для компостів та добрив.

Euglena gracilis є чутливим біоіндикатором, здатним виявляти зміни у складі водного середовища. Додавання певних речовин може допомогти створити більш ефективні методи моніторингу забруднень.

Наприклад, використання спирту або кислоти для стимуляції росту мікроводоростей у пробах забрудненої води також дозволяє швидше отримувати дані про токсичність середовища.

3.2 Визначення впливу поліфенольних сполук на вміст хлорофілу в клітинах автотрофних та міксотрофних культур

Хлорофіл є центральним компонентом фотосинтетичного апарату, що дозволяє клітинам поглинати світло і перетворювати його на енергію. Він відіграє ключову роль у фотосинтезі, який забезпечує ріст і накопичення біомаси, зокрема ліпідів і вуглеводів. Саме ці сполуки є основними субстратами для виробництва біопалива. Високий рівень хлорофілу свідчить про активний фотосинтез, що сприяє швидкому накопиченню біомаси. Чим більше біомаси продукує *Euglena gracilis*, тим більше вихідної сировини доступно для отримання біопалива.

У сприятливих умовах зелена мікроводорість може синтезувати значну кількість ліпідів і полісахаридів (зокрема, парамілону). Ліпіди є основою для отримання біодизеля, тоді як вуглеводи можна використовувати для виробництва біоетанолу. Активний фотосинтез, опосередкований хлорофілом, стимулює ці процеси, збільшуючи продуктивність клітин. Також кількість хлорофілу є показником фізіологічного стану клітин і їхньої здатності до адаптації.

Дослідження, спрямовані на підвищення вмісту хлорофілу (наприклад, шляхом зміни умов вирощування або додавання стимуляторів, таких як поліфеноли), можуть сприяти максимальному накопиченню біомаси. Це є важливим параметром, що опосередковує ефективність отримання біопалива, оскільки вона впливає на фотосинтез, ріст клітин і синтез ліпідів та вуглеводів – основних компонентів для виробництва біопалива. Тому Евглену можна застосувати у виробництві відновлюваної енергії з мінімальним впливом на навколишнє середовище.

3.2.1 Вплив галової кислоти

Концентрацію хлорофілів (мкг /мл /10⁵ клітин) визначали за методом Арнона, вимірюючи оптичне поглинання світла з довжиною хвилі 649 та 665 нм.

Дані щодо впливу зростаючих концентрацій ГК на концентрацію хлорофілу (а) в автотрофній і міксотрофній культурах на різних етапах культивування наведено на рис. 3.8.

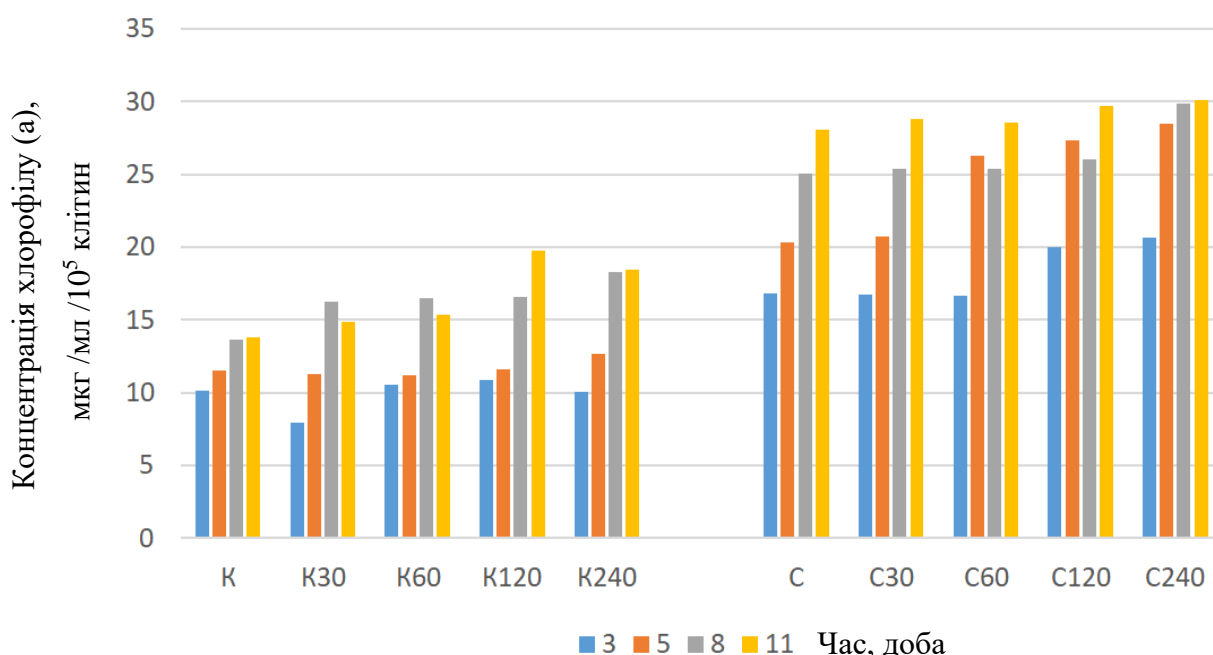


Рисунок 3.8 – Вплив зростаючих концентрацій ГК на концентрацію хлорофілу (а) в автотрофній і міксотрофній культурах на 3, 5, 8 та 11 добу

Примітка. К – контроль (фототрофні умови вирощування), С – (міксотрофні умови), різні концентрації доданої ГК – 30, 60, 120, 240 мкМ).

З рис. 3.8 видно, що на початкових етапах вирощування (3 – 5 день) додана ГК у фототрофних умовах майже не впливала на накопичення хлорофілу, незначно пригнічуючи його синтез (3 – 5 день).

На 8 – 11 добу проявляється стрімке зростання кількості хлорофілу в культурі *Euglena gracilis*. Найбільший ефект накопичення хлорофілу (а) спостерігається на 11 добу при концентрації 120 мкМ.

Таким чином, при вирощуванні мікроводорості у міксотрофних умовах, ГК у концентраціях 30 – 240 мкМ стимулювала накопичення хлорофілу (а) протягом 11 добового вирощування.

Дані щодо динаміки накопичення хлорофілу (б) представлено на рис.3.9.

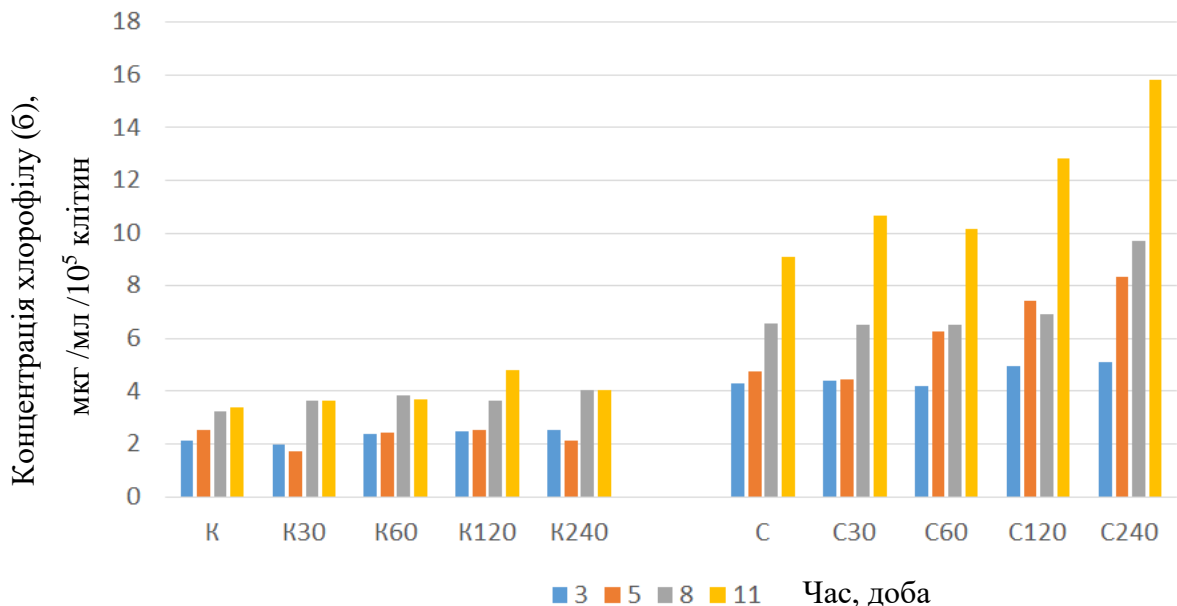


Рисунок 3.9 – Вплив зростаючих концентрацій ГК на концентрацію хлорофілу (б) в автотрофній і міксотрофній культурах на 3, 5, 8 та 11 добу

Примітка. К – контроль (фототрофні умови вирощування), С – (міксотрофні умови), різні концентрації доданої ГК – 30, 60, 120, 240 мкМ).

Як видно з рис. 3.9 найбільш ефективно накопичення хлорофілу (б) відбувається у фототрофних умовах при додаванні ГК при концентрації 120 мкМ на 11 добу. При всіх інших концентраціях вона майже не впливала на вміст цього пігменту протягом всього експерименту.

Отже, найбільший ефект ГК на накопичення хлорофілу (б) при міксотрофному вирощуванні має при всіх обраних концентраціях спостерігався на 11 добу при концентрації ГК – 240 мкМ.

Як висновок, можемо сказати, що у міксотрофних умовах за додавання ГК приріст накопичення хлорофілу (б) складав в 7 мкг/мл/10⁵ клітин порівняно з контролем. У фототрофних умовах цей показник дорівнював 1,5 мкг/мл/10⁵ клітин.

Тобто, за додавання ГК в міксотрофних умовах хлорофіл (б) накопичувався в 4,67 разів більше, ніж у контрольних зразках.

При додаванні більших концентрацій ГК вміст хлорофілів (а) і (б) знижувався в автотрофній культурі знижувався порівняно з контрольними пробами (табл. 3.4).

Таблиця 3.4 – Вплив різних концентрацій ГК на динаміку накопичення хлорофілу (а) та (б) в автотрофній культурі на 5, 10 та 14 добу, мкг/мл/10⁵ клітин

	Доба	К1	К300	К450	К900
хл. (а)	5	1,03171	0,95636	0,92896	0,90078
	10	1,74933	1,68698	1,6026	1,63358
	14	2,60676	2,48548	2,3298	1,96628
хл. (б)	5	0,1332	0,125	0,1402	0,12
	10	0,1485	0,2396	0,2412	0,1562
	14	0,9048	0,5878	0,855	0,7628

Таким чином, ГК у концентраціях 300, 450 та 900 має інгібуючий ефект на накопичення хлорофілу (а) і (б) в *Euglena gracilis* при вирощуванні у фототрофних умовах протягом всього 14 – добового вирощування.

На відміну від результатів, отриманих при автотрофному вирощуванні, вміст хлорофілів в міксотрофній культурі зростає при додаванні ГК (табл. 3.5).

Таблиця 3.5 – Вплив різних варіацій концентрацій галової кислоти на динаміку накопичення хлорофілу (а) та (б) в міксотрофній культурі на 5, 10 та 14 добу, мкг/мл/10⁵ клітин

	Доба	С1	С300	С450	С900
хл. (а)	5	1,46495	1,5163	1,49938	1,49798
	10	2,19242	2,08394	2,7625	2,33758
	14	2,92406	3,165	3,8	3,57526
хл. (б)	5	0,1768	0,2336	0,058	0,1184
	10	0,3513	0,236	0,3802	0,4438
	14	0,6836	0,959	1,0026	0,7066

Результати табл. 3.5 свідчать що при міксотрофному живленні культури найбільший позитивний ефект на накопичення хлорофілу (а) та (б) спостерігався при ГК 450 мкМ.

3.2.2 Вплив резорцину

Концентрацію хлорофілів (мкг /мл /10⁵ клітин) визначали за методом Арнона, вимірюючи оптичне поглинання світла з довжиною хвилі 649 та 665 нм. Дані щодо впливу зростаючих концентрацій резорцину на концентрацію хлорофілу (а) в автотрофній і міксотрофній культурах на 1 та 5 добу культивування наведено на рис. 3.10.

За міксотрофного вирощування концентрація спирту в культурі складала 0, 2 % (200 мкл етилового 96 % спирту), резорцин додавався у концентрації 300 мкМ.

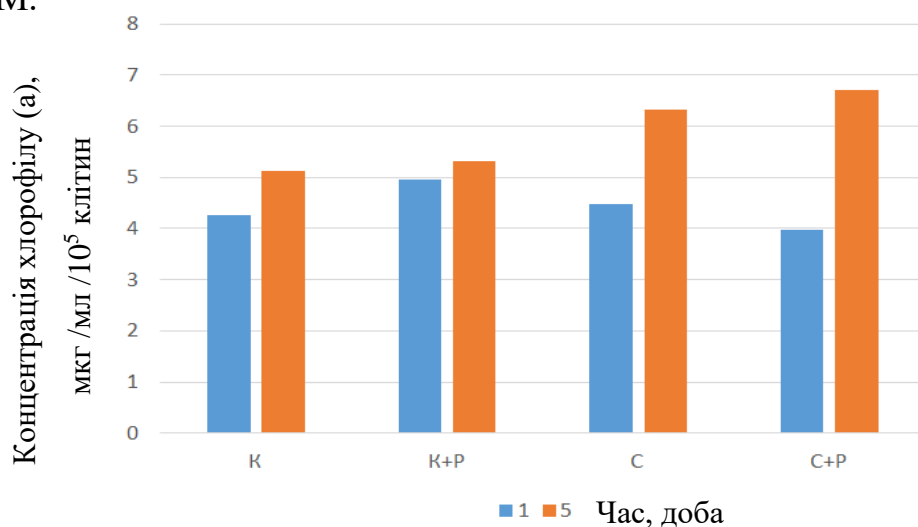


Рисунок 3.10 – Вплив резорцину на концентрацію хлорофілу (а) в автотрофній і міксотрофній культурах на 1 та 5 добу

Примітка. К – контроль (фототрофні умови вирощування), С – зі спиртом (міксотрофні умови), Р – резорцин у концентрації 300 мкМ.

В попередніх експериментах було виявлено, що резорцин мав при фототрофному вирощуванні стимулював накопичення кількість хлорофілу (а) протягом 5 добового вирощування. У міксотрофних умовах на 1 добу простежується інгібуючий ефект резорцину, а на 5 добу – навпаки накопичення хлорофілу (а) в культурі стимулювалося. Результати щодо впливу резорцину на накопичення хлорофілу (б) представлено на рис. 3.11.

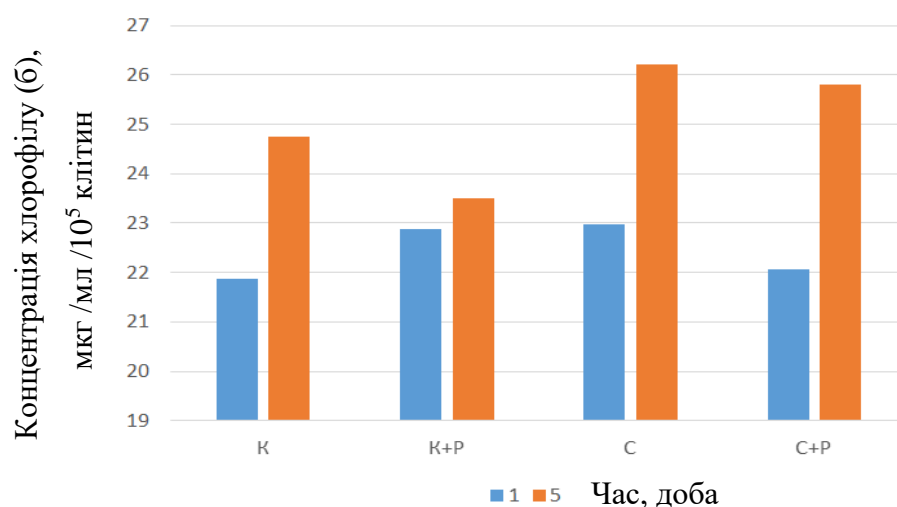


Рисунок 3.11 – Вплив резорцину на концентрацію хлорофілу (б) в автотрофній і міксотрофній культурах на 1 та 5 добу

Примітка. К – контроль (фототрофні умови вирощування), С – зі спиртом (міксотрофні умови), Р – резорцин у концентрації 300 мкМ.

Як видно рис. 3.11, резорцин стимулював накопичення хлорофілу (б) у фототрофних умовах на 1 добу має ефект, на 5 добу – навпаки пригнічував. У міксотрофних умовах протягом всього 5 добового вирощування культури спостерігалось інгібування накопичення хлорофілу (б).

Результати дослідження можуть відрізнятися через недостатню кількість статистичних даних та обмежений час проведення дослідження. Такі фактори можуть вплинути на точність та репрезентативність отриманих результатів. Оскільки обмежена вибірка та короткий період спостереження не дозволяють повністю врахувати всі можливі варіації та зміни, що можуть виникати в більш довгостроковому або більш масштабному аналізі.

Інгібування росту та інших фізіологічних характеристик культури під впливом забруднювача може бути використана в біоіндикації наявності та рівня токсичних сполук в середовищі. А якщо є стимуляція росту при додаванні поліфенольних сполук, то це свідчить про важливість їх засвоєння без пошкодження життєдіяльності в використанні таким чином для видалення шкідливих фенольних сполук з середовища, що є важливим при очищенні води.

Також можливе виробництво біопалива з *Euglena gracilis*. Процес включає кілька етапів, які спрямовані на отримання ліпідів та інших сполук, придатних для синтезу біопалива:

- при вирощуванні мікроводоростей для максимального накопичення ліпідів використовуються спеціальні середовища, які стимулюють виробництво воскових ефірів – ключового компонента для біодизеля;
- в процесі культивування клітини накопичують біомасу, багату ліпідами, парамілоном та восковими ефірами;
- після збору біомаси ліпіди екстрагуються за допомогою розчинників, таких як диметиловий ефір, що дозволяє ефективно отримувати сировину з мінімальними енергозатратами;

- екстраговані ліпіди перетворюються на біодизель або біореактивне паливо за допомогою процесу естерифікації або гідрообробки.

Наприклад, японська компанія «Euglena Co» використовує технологію Biofuels ISOCONVERSION для синтезу відновлюваного дизельного палива та авіаційного біопалива. Вони виготовили відновлюване реактивне паливо, використовуючи суміш «евглени» (ліпіди, отримані з мікроводоростей) і використаної кулінарної олії на демонстраційному заводі в Йокогамі, Японія. Він є першим в Японії заводом з виробництва реактивних літаків і дизеля з відновлюваними джерелами енергії.⁵⁸

Біопаливо, отримане з *Euglena gracilis*, відповідає міжнародним стандартам, як, наприклад, японський стандарт дизельного палива JIS K2204. Таке паливо має знижений вуглецевий слід і може замінити традиційні нафтові палива. Також екологічне авіаційне паливо з *Euglena gracilis* може сприяти зменшенню викидів парникових газів порівняно зі звичайним паливом. Мікроводорості є найбільш придатною сировиною для виробництва реактивного біопалива, ніж інші ресурси, через їх продуктивність і здатність вловлювати вуглекислий газ.⁵⁹

3.3 Вплив галової кислоти та резорцину на визначення концентрації глюкози та парамілону в культурі *Euglena gracilis*

Кінцевий продукт фотосинтетичної фіксації вуглецю утворює сховище полісахариду в клітинах мікроводоростей і виконує різні екологічні функції. Надлишок вуглецю та енергії накопичується в клітинах *Euglena gracilis* у вигляді парамілону, що утворюється в присутності органічних субстратів у навколишньому середовищі. Цей глюкан вперше був виявлений у клітинах саме цих зелених мікроводоростей. Локалізований у цитоплазмі та оточений мономембраною, він відкладається у вигляді висококристалізованих гранул та комплексів волокнистої структури.

Рівень кристалізації гранул становить 90 %, що відрізняє його від інших резервних культур рослин і водоростей, що робить його унікальним. Тому, цей полісахарид є важливим замінним продуктом метаболізму Евглени.⁶⁰

Парамілон є полімерною сполукою, що складається з залишків глюкози. Концентрацію парамілону визначали за кількістю глюкози, яка утворювалася при повному гідролізі полісахариду. Кількість глюкози прямо пропорційна кількості парамілону в культурі *Euglena gracilis*, тому вимірявши глюкозу, ми отримали і кількість парамілону. Концентрацію глюкози визначали спектрофотометричним методом.

У таблиці 3.6 наведено дані для побудови калібрувальної кривої для визначення вмісту глюкози. Калібрувальний графік глюкози наведено на рис. 3.12.

Таблиця 3.6 – Дані для побудови калібрувальної кривої для глюкози

Концентрація	0,276	0,8	1,2
Густина	100	327	500

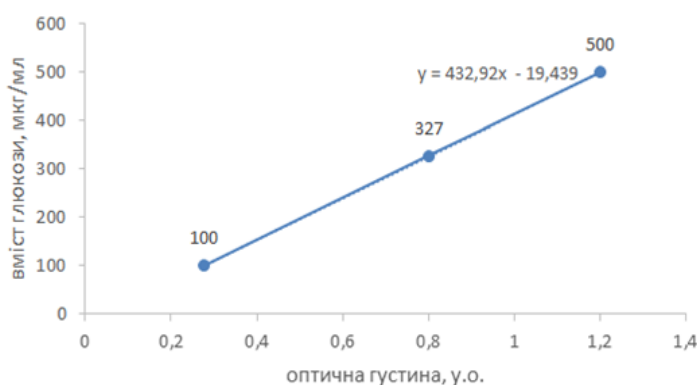


Рисунок 3.12 – Калібрувальний графік для визначення глюкози

Результати щодо впливу галової кислоти на накопичення полісахариду парамілону в культурі мікроводорості показано на рис. 3.13.

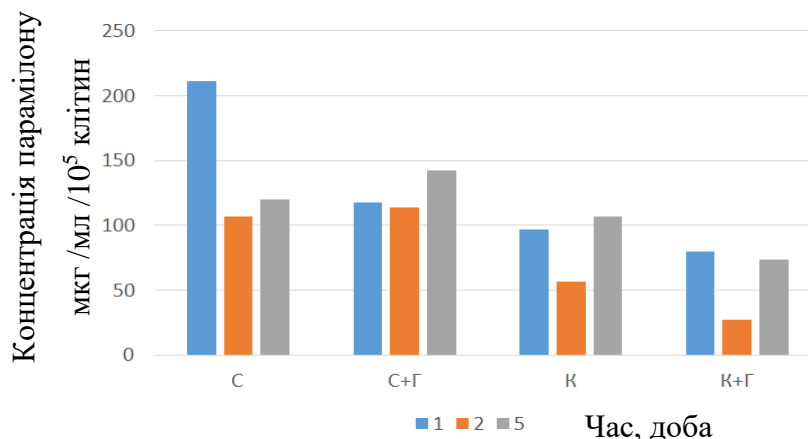


Рисунок 3.13 – Вплив ГК на концентрацію парамілону в автотрофній і міксотрофній культурах на 1, 2 та 5 добу

Примітка. К – контроль (фототрофні умови вирощування), С – зі спиртом (міксотрофні умови), Г – галова кислота у концентрації 300 мкМ.

Як видно з рис. 3.13, у міксотрофних умовах ГК мала на перших етапах експерименту (1 – 2 доба) майже не впливала на культуру мікрободорості, тільки на 5 добу відбувся стимулюючий ефект. У автотрофних умовах ГК мала протягом всього культивування інгібуючий ефект.

Далі досліджувався вплив іншої поліфенольної сполуки – резорцину на концентрацію парамілону в автотрофній і міксотрофній культурах на 1, 2 та 5 добу культивування. За міксотрофного вирощування концентрація спирту в культурі складала 0, 2 % (200 мкл етилового 96 % спирту), резорцин додавався у концентрації 300 мкМ.

Результати щодо впливу резорцину на вміст парамілону представлено у табл. 3.7 та графічно на рис. 3.14.

Таблиця 3.7 – Вміст парамілону, мкг /мл / 10⁵ клітин у зразках Евглени з добавками на 1, 2, 5 день

Дні	К	К+Р	С	С+Р
1	23,9	28,6	173,2	58,9
2	36,4	50,3	206,1	203,1
5	131,2	74,5	148,5	194,8

Примітка. К – контроль (фототрофні умови вирощування), С – зі спиртом (міксотрофні умови), Р – резорцин у концентрації 300 мкМ.

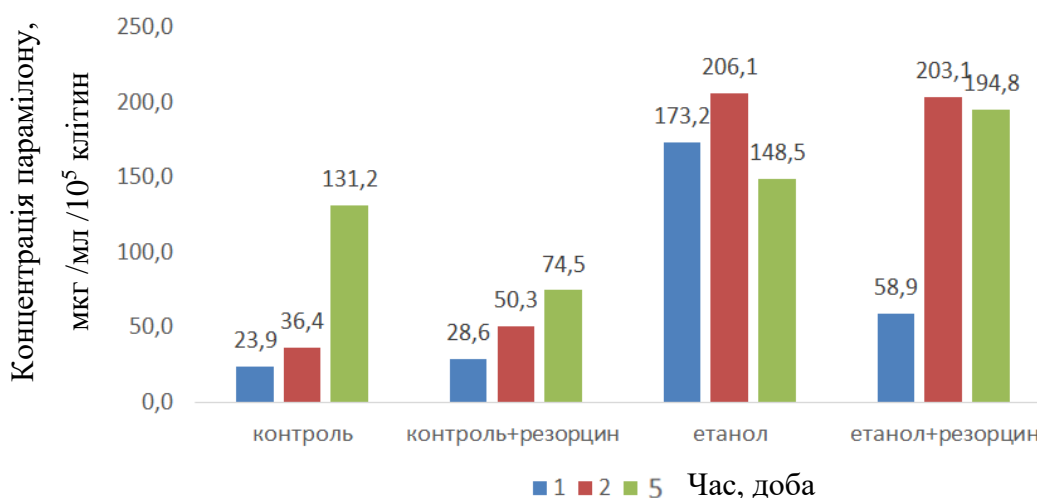


Рисунок 3.14 – Вплив резорцину на концентрацію парамілону в автотрофній (контроль) і міксотрофній (з етанолом) культурах на 1, 2 та 5 добу

Парамілон – запасний полісахарид. При додаванні спирту частина екзогенного вуглецю спрямовується на депонування і тому синтез парамілону стимулюється. В автотрофних умовах феноли можуть пошкоджувати метаболічні процеси, залучені в біосинтезі парамілону.

Автотрофне вирощування *Euglena gracilis* не розглядають при створенні оптимальних умов для накопичення парамілону, оскільки цей спосіб не забезпечує накопичення ні великих кількостей біомаси, ні полісахариду в клітинах. Лише невелика частина надлишкової енергії зберігається у вигляді полісахариду, а рівень синтезу парамілону зростає зі збільшенням інтенсивності світла в оптимальних межах.⁶⁰

Як результат, можна зробити висновок, що резорцин пригнічував автотрофний ріст і міксотрофний ріст на початковому етапі (на першу добу). Під час наступного збільшення на 5 – й день резорцин посилював ріст культури.

Результати досліджень можуть відрізнятися через недостатню кількість статистичних даних та обмежений час проведення дослідження. Такі фактори можуть вплинути на точність та репрезентативність отриманих результатів, оскільки обмежена вибірка та короткий період спостереження не дозволяють повністю врахувати всі можливі варіації та зміни, що можуть виникати в більш довгостроковому або більш масштабному аналізі.

Дослідження показали, що поліфеноли впливають на біосинтез парамілону. При додаванні деяких поліфенольних сполук реєструється підвищення концентрації парамілону, що пов'язано з поліпшенням енергетичного балансу клітин і активацією метаболічних шляхів, відповідальних за накопичення резервних речовин.

Однак варто зазначити, що надмірна кількість поліфенолів, особливо при тривалому впливі, може спричинити зворотний ефект через реакцію клітин на стрес. У цих умовах мікрowodорість може змінювати метаболічний аспект і зменшувати синтез парамілону для підтримки адаптивних механізмів.

Отримані результати важливі для екологічного виробництва біополімерів та антиоксидантів, а також для промислового застосування в медицині та ветеринарії.

3.4 Вплив галової кислоти та резорцину на визначення середньої швидкості поглинання та виділення O_2 *Euglena gracilis*

Поліфенольні сполуки можуть відігравати важливу роль у вирішенні екологічних проблем завдяки їх здатності впливати на фотосинтетичну активність і зменшувати оксидативний стрес у мікроорганізмів, таких як *Euglena gracilis*. Їх застосування перспективне в різних екологічних напрямках.

Одним із прикладів є використання поліфенолів для ремедіації забруднених водойм. Завдяки здатності нейтралізувати АФК, поліфеноли можуть стимулювати життєдіяльність мікрободоростей, які ефективно засвоюють токсини та продукують кисень. Наприклад, у водоймах, забруднених важкими металами, підвищення стійкості мікрободоростей до стресових умов за допомогою поліфенолів може сприяти природному очищенню екосистеми.

Також, завдяки покращенню фотосинтезу, поліфенольні сполуки можуть використовуватися для посилення ролі водоростей у боротьбі зі змінами клімату. Підвищена продуктивність *Euglena gracilis* забезпечує ефективніше поглинання вуглекислого газу, що може бути застосоване в біореакторах для створення штучних систем поглинання парникових газів. Наприклад, такі системи можуть використовуватися в промислових регіонах із високим рівнем CO_2 у повітрі.

Ще один перспективний напрямок – запобігання евтрофікації водойм. Завдяки здатності поліфенолів регулювати фізіологічні процеси у водоростях, можна контролювати їхнє розмноження.

Це актуально для водойм, де через надмірне використання добрив відбувається масове цвітіння води, яке знижує рівень кисню й призводить до загибелі водних організмів.

Наприклад, культивування мікрободоростей у спеціальних умовах із додаванням низьких концентрацій поліфенолів дозволяє отримати біомасу високої якості. Це сприяє зменшенню залежності від викопних енергоресурсів, водночас знижуючи вплив на довкілля.

Таким чином, поліфенольні сполуки здатні підтримувати стійкість екосистем до негативних впливів, зменшувати забруднення і допомагати в боротьбі зі змінами клімату. Однак важливим аспектом є точне визначення їх дозувань, щоб уникнути токсичних ефектів, які можуть негативно вплинути на ті ж екосистеми, які ми прагнемо захистити.

Результати досліджень щодо швидкості поглинання та виділення O_2 мікроводоростю *E. gracilis* з галовою кислотою на 1 та 6 добу у фототрофних та мікотрофних умовах, графічно представлено на рис. 3.15. За міксотрофного вирощування концентрація спирту в культурі становить 0, 2 % (200 мкл етилового 96 % спирту), галову кислоту та резорцин обрано у концентрації 300 мкМ.

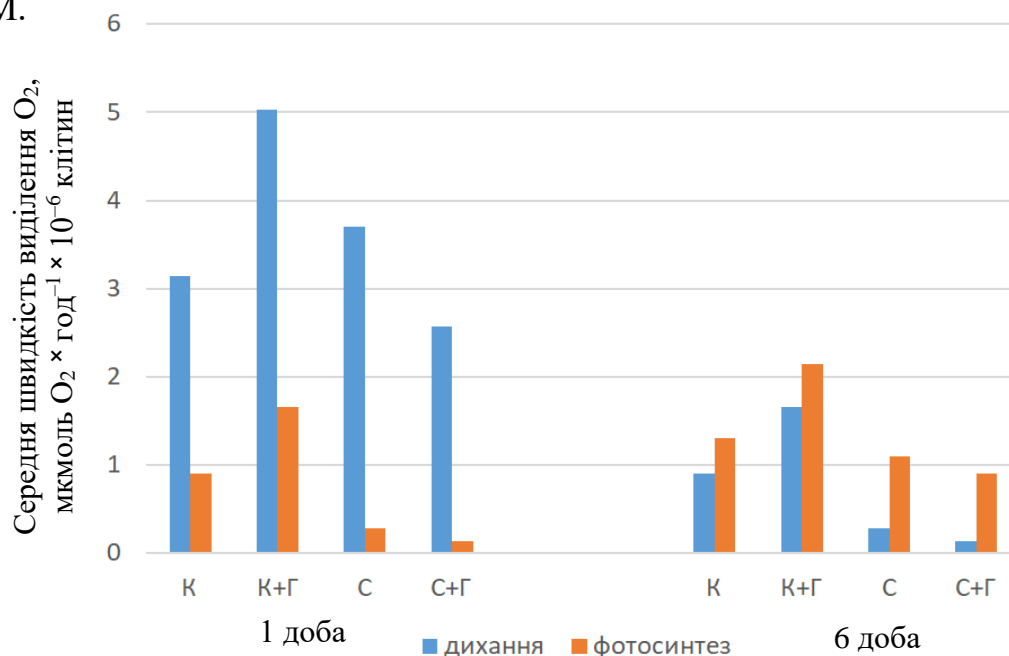


Рисунок 3.15 – Середня швидкість поглинання та виділення O_2 *Euglena gracilis* з галовою кислотою на 1 та 6 добу у фототрофних та міксотрофних умовах, мкмоль $O_2 \times год^{-1} \times 10^{-6}$ клітин

Примітка. К – контроль (фототрофні умови вирощування), С – зі спиртом (міксотрофні умови), К+Г, С+Г – фототрофні та міксотрофі умови вирощування з додаванням ГК.

Проаналізувавши отримані результати можна зазначити, що на 1 добу у фототрофних умовах, галова кислота має стимулюючий ефект на клітинне дихання, підвищуючи рівень дихання, порівнюючи з контрольним зразком. Однак на 6 добу цей ефект зберігається, але знижується порівняно з 1 днем.

У міксотрофних умовах галова кислота на дихання має пригнічуючий ефект протягом всього часу вирощування культури, особливо на 6 – й день, коли рівень дихання значно знижується.

Тому комбінація спирту і галової кислоти викликає сильне пригнічення дихання на 1– й день та зберігає цей ефект на 6 – й день, що свідчить про синергічний ефект та пригнічувальний вплив цих двох речовин на клітинне дихання.

На фотосинтез ГК при автотрофному типі живлення мала позитивний стимулюючий ефект протягом всього 6 – добового вирощування, при міксотрофних умовах навпаки мала інгібуючий вплив.

В подальших експериментах було вивчено вплив резорцину на швидкість поглинання та виділення O_2 *Euglena gracilis* на 1 та 6 добу у фототрофних та міксотрофних умовах. Результати досліджень представлено на рис. 3.16.

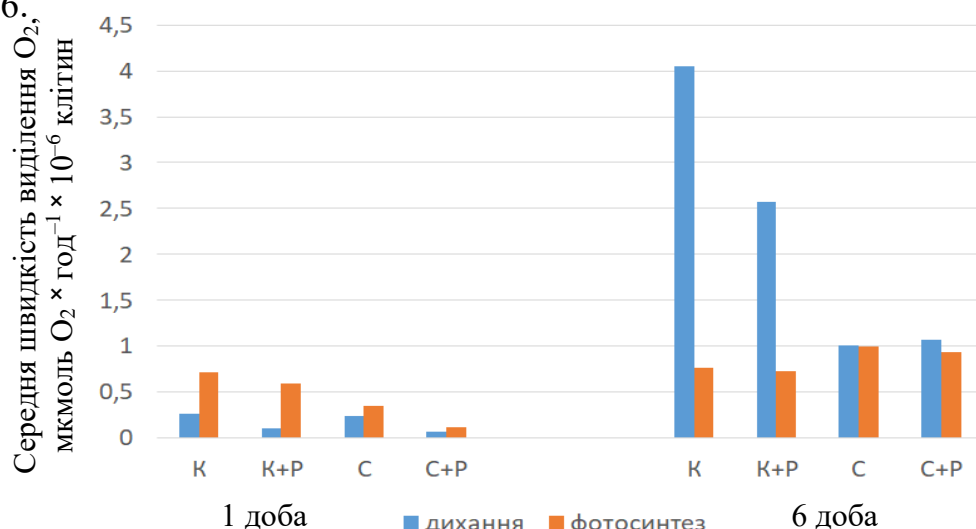


Рисунок 3.16 – Середня швидкість поглинання та виділення O_2 *Euglena gracilis* з резорцином на 1 та 6 добу у фототрофних та міксотрофних умовах, мкмоль $O_2 \times \text{год}^{-1} \times 10^{-6}$ клітин

Примітка. К – контроль (фототрофні умови вирощування), С – зі спиртом (міксотрофні умови), К+Р, С+Р – фототрофні та міксотрофі умови вирощування з додаванням резорцину.

З рис. 3.16 видно, що протягом всього часу резорцин має інгібуючий ефект на дихання культури зеленої мікроводорості при обох типах живлення. Є незначне стимулювання порівняно з контролем на 6 добу в міксотрофних умовах, але майже не має значного ефекту.

Стосовно фотосинтезу можна сказати, що резорцин погіршує та пригнічує процес фотосинтезу порівняно з контролем, що на 1, що на 6 добу. На 6 – й день його вплив зменшується, причому дихання та фотосинтез стають близькими до контролю, але все ж таки залишаються зниженими.

Результати досліджень показали, що поліфенольні сполуки здатні модулювати фотосинтетичну активність *Euglena gracilis*.

Встановлено, що галова кислота при автотрофному типі живлення мала позитивний стимулюючий ефект протягом всього 6 – добового вирощування і сприяла покращенню фотосинтезу завдяки зменшенню оксидативного стресу, який часто виникає під впливом несприятливих умов середовища. Це, ймовірно, пов'язано зі здатністю поліфенолів нейтралізувати АФК, захищаючи хлоропласти від ушкоджень.

З іншого боку, резорцин може викликати токсичний ефект, пригнічуючи активність фотосинтетичних систем і викликаючи пошкодження мембранних структур. Це підтверджує необхідність визначення оптимальних концентрацій поліфенольних сполук для досягнення позитивного ефекту.

3.5 Вплив галової кислоти та резорцину на вимірювання індукції флуоресценції хлорофілу в клітинах *Euglena gracilis*

Дослідження впливу галової кислоти та резорцину на індукцію флуоресценції хлорофілу в клітинах *Euglena gracilis* має значний потенціал для застосування в екології, оскільки дає змогу детальніше вивчити механізми регуляції фотосинтетичної активності цих мікрободоростей.

Ці відомості можуть бути корисними для вирішення ряду екологічних проблем, зокрема для боротьби зі змінами клімату, очищення забруднених вод і оптимізації природних процесів у водних екосистемах.

Мікрободорості, включаючи *Euglena gracilis*, є важливими учасниками глобального вуглецевого циклу, оскільки вони здатні поглинати вуглекислий газ (CO₂) у процесі фотосинтезу.

Застосування поліфенолів для регуляції їхньої фотосинтетичної активності може підвищити ефективність поглинання CO₂, сприяючи зменшенню концентрації цього парникового газу в атмосфері. Це робить *Euglena gracilis* перспективним інструментом для боротьби зі зміною клімату, особливо в умовах інтенсивного антропогенного впливу.

Фотохімічне гасіння флуоресценції хлорофілу (qP), відображає ступінь окисненості пулу Q_A та квантовий вихід електронного транспорту у ФС II і характеризує швидкість електронного транспорту між фотосистемами, а отже, і ефективність фотосинтезу.

За міксотрофного вирощування концентрація спирту в культурі становила 0,2 % (200 мкл етилового 96 % спирту), галову кислоту та резорцин обрано у концентрації 300 мкМ.

Отримані показники флуоресценції зеленої мікроводорості *Euglena gracilis*, вирощеної у автотрофних та міксотрофних умовах з додаванням поліфенольних сполук, наведено у табл. 3.8 та графічно представлено на рис. 3.17.

Як видно, з табл. 3.8 та рис. 3.17, галова кислота та резорцин мають інгібуючий ефект на фотохімічне гасіння флуоресценції хлорофілу.

Таблиця 3.8 – Показники флуоресценції культури *Euglena gracilis* вирощеної у автотрофних та міксотрофних умовах з додаванням поліфенольних сполук

	f_m	f_t	f₀	qP
К	0,89275	0,7215	0,44625	0,38112125
К+Г	0,9335	0,761	0,4545	0,3564245
К+Р	0,8315	0,6695	0,4045	0,372808
С	0,92475	0,76	0,42875	0,333898
С+Г	0,904	0,7455	0,4225	0,3310765
С+Р	0,912	0,768	0,461	0,335032

Примітка. К – контроль (фототрофні умови вирощування), С – зі спиртом (міксотрофні умови), К+Г, С+Г – фототрофні та міксотрофі умови вирощування з додаванням ГК, К+Р, С+Р – фототрофні та міксотрофі умови вирощування з додаванням резорцину.

Значення qP корелює з активністю процесів, що підтримують електронний транспорт, головним чином, фіксацією вуглекислого газу.

Таким чином, додавання етанолу негативно вплинуло на процес фіксації вуглецю у клітинах *E. gracilis*, а значить, і ефективність фотосинтезу. Тому, можна припустити, що при міксотрофних умовах, знижується фотосинтетична активність культури через присутність альтернативних джерел вуглецю, необхідних для життєдіяльності.

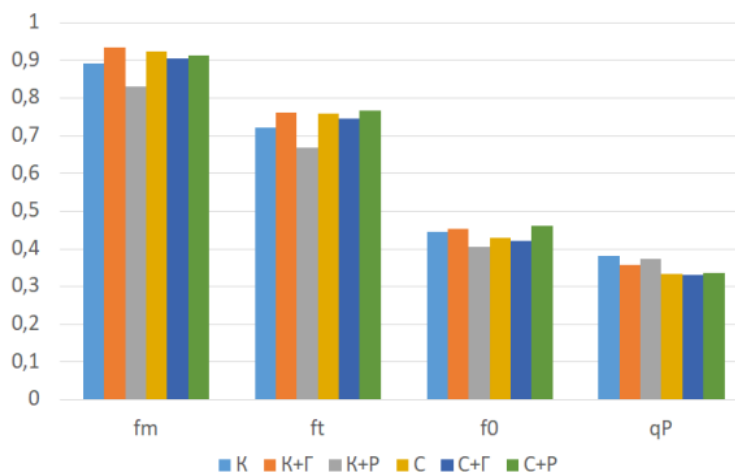


Рисунок 3.17 – Графічне представлення флуоресценції культури *Euglena gracilis* за у автотрофних та міксотрофних умовах без та з поліфенольними сполуками

Отримані результати потребують подальших досліджень для більш детального вивчення та підтвердження отриманих висновків. Для цього необхідно розширити вибірку, збільшити період спостереження та врахувати додаткові змінні, які можуть впливати на результат. Тільки за допомогою більш масштабного та тривалого дослідження можна отримати точніші та надійніші дані, що дозволять зробити більш обґрунтовані висновки.

3.6 Загальні висновки та обговорення

3.6.1 Ріст клітин *Euglena gracilis* у міксотрофних та фототрофних умовах з галовою кислотою та резорцином

Результати наукових досліджень показали на взаємодію різних факторів у стимуляції росту клітин *Euglena gracilis* та впливу на їх структурні параметри.

В ході проведення експериментів було встановлено, що етанол є ключовим стимулюючим фактором, значно підсилюючи ріст клітин *Euglena gracilis* та їх структурні зміни.

При мікотрофному типі живлення мікроводорості ріст клітин продовжується до 11 дня з високою інтенсивністю, у той час як у автотрофному спостерігається уповільнення після 8 дня. Це вказує на здатність етанолу стабілізувати метаболічні процеси культури *E. gracilis*, що, можливо, пов'язано з його впливом на енергетичний обмін або регуляцію стресових реакцій клітин.

Прямий зв'язок між концентрацією етанолу та кількістю клітин чітко простежується: більша концентрація забезпечує більший приріст біомаси клітин культури.

Отримані результати підтверджують, що міксотрофні умови мають стимулюючий ефект на ріст культури *Euglena gracilis*. Ці висновки узгоджуються з даними, отриманими В.М. Мокроснопом, О.В. Поліщуком та О.К. Золотарьовою (2014), які вказують на стимуляцію росту культури та накопичення біологічно активних речовин за рахунок додавання етанолу.

Етанол, ймовірно, виконує кілька функцій у процесі стимуляції росту культури. Він може виступати додатковим джерелом вуглецю, стимулювати синтез енергетичних молекул АТФ, а також виконувати роль хімічного сигналу, активуючи певні метаболічні шляхи.

Він легко метаболізується клітинами *Euglena gracilis*, забезпечуючи їх енергією та субстратами для біосинтезу. Це стимулює процеси поділу клітин і загальне збільшення їхньої кількості. Також спирт активує ферменти, які беруть участь у циклі Кребса, а також підвищує синтез АТФ, що є основним джерелом енергії для клітинного росту.

Вищі концентрації етанолу забезпечують більшу кількість субстрату, доступного для метаболізму, що призводить до більш інтенсивного росту.

Результати тестових експериментів, щодо впливу ГК показали, що вона стимулює ріст автотрофної і пригнічує ріст міксотрофної культури.

Додавання етанолу в концентрації 0,2 % значно стимулювало ріст культури. Це пов'язано із здатністю *Euglena gracilis* засвоювати екзогенні органічні сполуки, у тому числі і етиловий спирт на світлі (міксотрофний ріст). За присутності етанолу у середовищі вирощування ріст культури стимулюється при всіх доданих концентраціях галової кислоти.

Як висновок можна сказати, що характер впливу галової кислоти на ріст *Euglena gracilis* критично залежить від типу живлення. При автотрофному режимі вирощування ріст культури інгібувався за додавання галової кислоти у всіх концентраціях, що досліджені. Найбільший ефект – пригнічення росту на 33 % спостерігалось при внесенні 240 мкМ галової кислоти. У міксотрофній культурі, навпаки, за додавання ГК ріст стимулювався, а за додавання 240 мкМ галової кислоти ріст збільшувався на 55 %.

Загалом, результати досліджень свідчать про стимуляцію росту культури за наявності ГК при міксотрофному вирощуванні і пригнічення росту при автотрофному культивуванні порівняно з контролем. Таким чином, галова кислота по різному впливала на ріст культури *E. gracilis* залежно від типу живлення. Якщо за фототрофних умов ця сполука здебільш пригнічувала ріст, то за міксотрофного існування спостерігалася значна стимуляція росту. Це дозволяє припускати, що дана мікроводорість здатна поглинати деякі фенольні сполуки з забруднених водойм без пошкодження життєздатності.

Також було вивчено вплив резорцину в концентрації 300 мкМ. Визначення динаміки росту методом підрахунку кількості клітин не підтвердило стимулюючий ефект резорцину. Цей фенол майже не впливав на ріст автотрофної культури і пригнічував ріст міксотрофної культури протягом всього періоду 7 добового вирощування. Відставання швидкості росту від контролю складала приблизно 12 – 17 %.

3.6.2 Вплив галової кислоти та резорцину на накопичення хлорофілу

Хлорофіли – це природні рослинні пігменти, які можуть поглинати сонячне світло і використовувати свою енергію для виробництва вуглеводів з вуглекислого газу та води за допомогою процесу, який називається фотосинтезом.

Хлорофіл міститься в органелах рослин, які називаються хлоропластами. Хлоропласти містять різні типи хлорофілу, які по-різному сприяють процесу фотосинтезу.

Це типи хлорофілу:

- хлорофіл (а): міститься у всіх вищих рослинах, водоростях і ціанобактеріях. Іншими словами, він міститься у всіх зелених рослинах, крім бактерій. Це найпоширеніший різновид хлорофілу, який найбільш ефективно поглинає промені з довжиною хвилі 429 нм і 659 нм;

- хлорофіл (б): це тип пігменту, який відповідає за передачу світлової енергії хлорофілу (а). Він міститься в рослинах і зелених водоростях (мохах). Він поглинає промені з довжиною хвилі 455 нм і 642 нм.

І хлорофіл (а), і хлорофіл (б) відіграють обов'язкову роль у фотосинтезі рослин. Основним пігментом, відповідальним за фотосинтез, є хлорофіл (а). Хлорофіл (б) поглинає сонячне світло, щоб передати його хлорофілу (а). Хлорофіл (а) відображає синьо – зелене світло, а хлорофіл (б) – оранжево – червоне світло.

Хлорофіл (а) поглинає більшу частину червоної хвилі, тоді як хлорофіл (б) поглинає фіолетово – синє світло.

Хлорофіл виконує функцію перетворення світлової енергії на хімічну, виступаючи в ролі сенсibilізатора. Він легко збуджується під впливом світла та здатний передавати отриману енергію іншим молекулам, що виступають акцепторами. У збудженому стані молекула хлорофілу бере участь в окисно – відновних реакціях, проявляючи здатність до передачі та прийому електронів.

Отже, хлорофіл (а) є головним пігментом, який задіяний у трансформації світлової енергії на хімічну (у фотосистемах I та II). Його кількість прямо пропорційна фотосинтетичній активності. Хлорофіл (б) є допоміжним пігментом, який розширює спектр світла, що поглинається, і передає енергію до хлорофілу (а).

Вміст хлорофілу (б) свідчить про ефективність роботи допоміжних механізмів фотосинтезу.

В результаті проведення досліджень впливу поліфенольних сполук на культуру зеленої мікроводорості, вирощеної у автотрофних умовах, можна сказати, що на 8 – 11 добу проявляється стрімке зростання кількості хлорофілу в культурі *Euglena gracilis*. Найбільший ефект накопичення хлорофілу (а) спостерігається на 11 добу при концентрації 120 мкМ. Таким чином, при вирощуванні мікроводорості у міксотрофних умовах, галова кислота у концентраціях 30 – 240 мкМ стимулювала

Як висновок, можемо сказати, що у міксотрофних умовах за додавання ГК приріст накопичення хлорофілу (б) складав в $7 \text{ мкг/мл}/10^5$ клітин порівняно з контролем і накопичувався в 4,67 разів більше.

На відміну від отриманих даних при автотрофному вирощуванні, вміст хлорофілів в міксотрофній культурі зростав при додаванні ГК. Результати свідчать, що при міксотрофному живленні культури найбільший позитивний ефект на накопичення хлорофілу (а) та (б) спостерігався при ГК 450 мкМ.

В тестових експериментах було виявлено, що резорцин мав при фототрофному вирощуванні стимулював накопичення кількість хлорофілу (а) протягом 5 добового вирощування. У міксотрофних умовах на 1 добу простежується інгібуючий ефект резорцину, а на 5 добу – навпаки накопичення хлорофілу (а) в культурі стимулювалося.

В подальших експериментах вже було виявлено, що резорцин стимулював накопичення хлорофілу (б) у фототрофних умовах на 1 добу має ефект, на 5 добу – навпаки пригнічував. У міксотрофних умовах протягом всього 5 добового вирощування культури спостерігалось інгібування накопичення хлорофілу (б).

Інгібування росту та інших фізіологічних характеристик культури під впливом забруднювача може бути використана в біоіндикації наявності та рівня токсичних сполук в середовищі. А якщо є стимуляція росту при додаванні поліфенольних сполук, то це свідчить про важливість їх засвоєння без пошкодження життєдіяльності і використання для усунення шкідливих фенольних сполук з середовища, що є важливим при очищенні води.

Оскільки кількість статистичних даних та обмежений час проведення дослідження не дозволяють повністю врахувати всі можливі варіації та зміни, що можуть виникати в більш довгостроковому або більш масштабному аналізі, рекомендовано продовжити.

3.6.3 Визначення впливу поліфенольних сполук на концентрацію парамілону

Парамілон – це резервний полісахарид, що синтезується та накопичується в клітинах *Euglena gracilis*.

Його структура подібна до β – 1,3 – глюканів, і він виконує роль запасного джерела енергії та вуглецю. Вимірювання парамілону є важливим у екологічних та біотехнологічних дослідженнях. Його унікальні властивості та роль в обміні речовин роблять його корисним для вирішення екологічних проблем і збереження довкілля.

При додаванні спирту частина екзогенного вуглецю спрямовується на депонування і тому синтез парамілону стимулюється. В автотрофних умовах феноли можуть пошкоджувати метаболічні процеси, залучені в біосинтезі парамілону.

У міксотрофних умовах ГК мала на перших етапах експерименту (1 – 2 доба) майже не впливала на культуру мікроводорості, тільки на 5 добу відбувся стимулюючий ефект. У автотрофних умовах ГК мала протягом всього культивування інгібуючий ефект.

Резорцин в свою чергу, пригнічував автотрофний ріст і міксотрофний ріст на початковому етапі (на першу добу). При подальшому зростанні на 5 – й день резорцин посилював ріст культури.

Ці результати потребують додаткового дослідження для точності та репрезентативності отриманих результатів, оскільки обмежена вибірка та короткий період спостереження не дозволяють повністю врахувати всі можливі варіації та зміни, що можуть виникати в більш довгостроковому або більш масштабному аналізі.

3.6.4 Визначення O₂

Кисень (O₂) відіграє ключову роль у метаболізмі клітин, забезпечуючи життєдіяльність організмів. Для *Euglena gracilis* вимірювання швидкості поглинання та виділення кисню дозволяє оцінити інтенсивність метаболічних процесів, зокрема дихання та фотосинтезу. Ці процеси відображають здатність клітин адаптуватися до змін середовища та ефективність використання ресурсів.

Швидкість поглинання кисню характеризує рівень клітинного дихання, яке є основним джерелом енергії для життєдіяльності. Виділення кисню під час фотосинтезу свідчить про активність фотосинтетичного апарату, що визначає продуктивність біомаси.

Проаналізувавши отримані результати можна припустити, що на 1 добу у фототрофних умовах, галова кислота має стимулюючий ефект на клітинне дихання, підвищуючи рівень дихання у порівнянні з контролем. Однак на 6 добу цей ефект зберігається, але знижується порівняно з першим днем. У міксотрофних умовах галова кислота на дихання має пригнічуючий ефект протягом всього часу вирощування культури, особливо на 6 – й день, коли рівень дихання значно знижується.

Тому комбінація спирту і галової кислоти викликає сильне пригнічення дихання на 1– й день та зберігає цей ефект на 6 – й день, що вказує на синергічний пригнічувальний вплив цих двох речовин на клітинне дихання.

На фотосинтез ГК при автотрофному типі живлення мала позитивний стимулюючий ефект протягом всього 6 – добового вирощування, при міксотрофних умовах навпаки мала інгібуючий вплив.

Обговорення представлених даних дозволяє зробити важливий висновок: вплив фенольних сполук, таких як галова кислота, на мікроводорості та рослини активно досліджувався багатьма науковцями, але ці дослідження стосувалися інших видів, зокрема *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* та *Microcystis flos – aquae*.

Наприклад, роботи Котинського, Батіщевої та Поліщук (2014) вказують на різну чутливість мікроводоростей до цих речовин, тоді як Guo та співавтори (2015) та Лауе і колеги (2014) детально розглянули вплив галової кислоти на фотосинтетичну активність *Microcystis flos – aquae*.

У даній роботі також досліджувався і вплив іншої поліфенольної сполуки – резорцину.

В результаті проведених експериментів протягом всього часу він мав інгібуючий ефект на дихання культури зеленої мікроводорості при обох типах живлення. Було незначне стимулювання порівняно з контролем на 6 добу в міксотрофних умовах, але майже не має значного ефекту.

Стосовно фотосинтезу можна сказати, що резорцин погіршує та пригнічує процес фотосинтезу порівняно з контролем, що на 1, що на 6 добу. На 6 – й день його вплив зменшується, причому дихання та фотосинтез стають близькими до контролю, але все ж таки залишаються зниженими.

Обговорення впливу резорцину на мікроводорості демонструє схожі механізми токсичності, але відмінності в реакціях між дослідженими видами (*Chlorella vulgaris* у роботі Xiurong Chen, Tianjun Zhou та ін., 2018) та *Euglena gracilis* у даному випадку відображають специфіку метаболізму цих організмів.

У даному дослідженні резорцин на ранніх етапах демонструє стимулюючий ефект, який може бути зумовлений активацією метаболічних процесів, зокрема дихання, через підвищення активності ферментів або вивільнення додаткових енергетичних ресурсів.

Подібний ефект спостерігався і в роботі Xiurong Chen та ін., де гетеротрофні механізми *Chlorella vulgaris* дозволяли частково компенсувати токсичність резорцину за рахунок стимулювання біомаси.

Згідно з результатами даної магістерської роботи, до 6–го дня відбувається пригнічення дихання та фотосинтезу через накопичення токсичних метаболітів і порушення транспорту електронів у дихальних і фотосинтетичних системах.

У роботі Chen та ін., токсичність резорцину також знижувала біомасу *Chlorella vulgaris* (з 1,49 г/дм³ до 1,36 г/ дм³), особливо помітно на ранніх стадіях культивування (0 – 5 діб), що узгоджується із порушеннями метаболізму. Однак у випадку *Chlorella vulgaris*, гетеротрофні механізми частково пом'якшували цей негативний ефект. *Euglena gracilis* показує більшу чутливість до тривалого впливу резорцину, що може пояснюватися відмінностями у механізмах регуляції метаболізму.

У дослідженні *Chlorella vulgaris*, токсичність мулу, спричинена резорцином, мала більш виражений негативний ефект на біомасу саме на початкових стадіях (0 – 5 діб). У нашому ж випадку спостерігається пригнічення дихання і фотосинтезу до 6 – го дня, що свідчить про інші адаптивні стратегії *Euglena gracilis*. Можливі причини відмінностей: *Euglena gracilis* має здатність до міксотрофного живлення, яке може реагувати на резорцин інакше, ніж гетеротрофне або автотрофне живлення *Chlorella vulgaris*. Як висновок можна сказати, що результати демонструють, що *Euglena gracilis* реагує на вплив резорцину з негативною динамікою: відбувається пригнічення дихальних і фотосинтетичних процесів.

У порівнянні з *Chlorella vulgaris*, дослідженою Xiurong Chen та ін., спостерігається більша чутливість до тривалого впливу резорцину, що підкреслює необхідність подальших досліджень механізмів адаптації різних водоростей до нього.

Загалом феноли – це активні речовини діють як відновники біохімічних процесів, тому можуть переходити у вільнорадикальні перетворення і пошкоджувати мікродорість та її клітинну стінку. Дослідження впливу зазначених поліфенольних сполук на *Euglena gracilis* залишалося до теперішнього часу була недостатньо вивчена науковцями. Дослідження є першими, які аналізують дію цих речовин саме на *Euglena gracilis*. Це відкриває нові можливості для розуміння специфіки її чутливості до фенольних сполук та порівняння її реакцій із реакціями інших видів.

Тому, результати даних досліджень роблять вагомий внесок у початок вивчення екотоксикології та адаптивних механізмів мікродорості *Euglena gracilis* у відповідь на дію фенольних сполук.

3.6.5 Визначення флуоресценції

Флуоресценція є ключовим методом дослідження стану клітин *Euglena gracilis*, оскільки ці мікроорганізми мають фотосинтетичний апарат, що включає хлорофіли (а) і (б). Вимірювання флуоресценції дозволяє оцінити функціонування фотосинтетичних систем, метаболічну активність і реакцію клітин на зовнішні фактори. Флуоресценція – це випромінювання світла клітинами після поглинання світлової енергії. У випадку *Euglena gracilis* це здебільшого випромінювання, пов'язане з хлорофілами, які поглинають світло для фотосинтезу. Клітини випромінюють світло іншої довжини хвилі, що дозволяє оцінити стан фотосистеми.

Флуоресценція хлорофілів дозволяє визначити ефективність використання світлової енергії під час фотосинтезу. Це допомагає оцінити загальний стан фотосистеми I та II, яка забезпечує утворення енергії та органічних речовин у клітинах. Вивчення змін флуоресценції допомагає зрозуміти, як *Euglena gracilis* адаптується до впливу різних речовин (етанолу, галової кислоти, резорцину).

Вимірювання флуоресценції – це ефективний метод дослідження, який розширює розуміння фундаментальних біологічних процесів і має практичне значення для екологічного моніторингу та біотехнологій.

Значення qP корелює з активністю процесів, що підтримують електронний транспорт, головним чином, фіксацією вуглекислого газу. Додавання етанолу негативно вплинуло на процес фіксації вуглецю у клітинах *E. gracilis*, а значить, і ефективність фотосинтезу. Тому, можна припустити, що при міксотрофних умовах, знижується фотосинтетична активність культури через присутність альтернативних джерел вуглецю, необхідних для життєдіяльності. Ці отримані результати також потребують подальших досліджень для більш детального вивчення та підтвердження отриманих висновків.

Для отримання цілісної картини та аргументації впливу даних сполук на культуру *Euglena gracilis*, необхідно розширити вибірку та збільшити період спостереження дослідження, щоб отримати точніші та надійніші дані, що дозволять зробити більш обґрунтовані висновки.

ВИСНОВКИ

У даній магістерській роботі було проведено посів культур *Euglena gracilis* у автотрофних та міксотрофних умовах з додаванням і без додавання поліфенольних сполук, таких як галова кислота та резорцин. Було вивчено їх вплив на фізіологічні та біохімічні характеристики зеленої мікроводорості з метою визначення оптимальних умов для підвищення її росту, продуктивності, фотосинтетичної активності, інтенсивності дихання, вмісту хлорофілу та накопичення полісахариду парамілону. Проведена наукова робота дозволила зробити наступні висновки:

1. Експерименти показали, що етанол є потужним стимулятором росту клітин *Euglena gracilis*, забезпечуючи значне збільшення кількості клітин у порівнянні з контрольними пробами, особливо на 11 – й день. Вищі концентрації етанолу збільшують приріст біомаси клітин. У автотрофних умовах ріст клітин уповільнюється після 8 дня.

- Галова кислота має стимулюючий ефект на ріст клітин у міксотрофних умовах, збільшуючи їх кількість на 55 % при концентрації 240 мкМ, проте в автотрофних умовах її дія виявляється інгібуючою (до 33 % зниження росту при такій самій концентрації).

Резорцин не стимулює ріст *Euglena gracilis*, а в міксотрофних умовах навіть пригнічує його на 12 – 17 % протягом 7 днів

2. Щодо накопичення хлорофілу, то ГК стимулює його накопичення в міксотрофних умовах, найбільший ефект спостерігається при концентрації 450 мкМ. Резорцин стимулює накопичення хлорофілу (а) в фототрофних умовах, але інгібує накопичення хлорофілу (б) в обох умовах.

3. Синтез парамілону стимулюється ГК в міксотрофних умовах, починаючи з 5 – го дня, в той час як резорцин спочатку пригнічує синтез парамілону, але на 5 – й день цей ефект значно зменшується.

4. Клітинне дихання за умов автотрофного живлення стимулюється ГК на 1 – й день, але на 6 – й день спостерігається пригнічення цього процесу в міксотрофних умовах.

Резорцин постійно пригнічує клітинне дихання в обох типах живлення, особливо на початкових етапах.

5. Фотосинтетична активність в міксотрофних умовах знижується через присутність етанолу та фенольних сполук, що свідчить про гальмування фотосинтетичних процесів в цих умовах.

6. Аналіз даних був статистично оброблений і проведений з використанням програми JASP. Він підтвердив наявність значущих змін та різниці у фізіологічних і біохімічних показниках, що були асоційовані з впливом поліфенольних сполук на ріст і метаболічні процеси *Euglena gracilis*. Результати дослідження свідчать про складний та умовний вплив поліфенольних сполук на ростові та метаболічні процеси *E. gracilis*, залежно від умов живлення та концентрацій сполук і потребують подальших досліджень для точності та репрезентативності отриманих результатів.

7. Дослідження даної мікроводорості та впливу на неї поліфенольних сполук (галова кислота, резорцин) має значний екологічний потенціал завдяки здатності мікроводорості до біоремедіації, використанню як біоіндикатора якості води та сприянню стабілізації екосистем.

Поліфенольні сполуки мають вирішальне значення в регуляції фізіологічних процесів у *Euglena*, таких як фотосинтез, ріст і метаболізм, що дозволяє підвищити її ефективність у відновленні забруднених екосистем. Завдяки цьому мікроводорість може очищати водні середовища, стимулювати продуктивність первинних продуцентів, а також сприяти виробництву біопалива та біодобрив.

Крім того, її здатність поглинати CO₂ у поєднанні з впливом поліфенолів робить її важливим інструментом у боротьбі зі змінами клімату. Це підкреслює значення впливу поліфенольних сполук і *Euglena gracilis* для сталого розвитку та вирішення низки екологічних проблем.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

¹ Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного. Про інститут. <https://www.botany.kiev.ua/> (дата звернення Вер 2, 2024).

² Rodríguez – Zavala, J. S.; Ortiz – Cruz, M. A.; Mendoza – Hernández, G.; Moreno – Sánchez, R. Increased Synthesis of α – Tocopherol, Paramylon and Tyrosine by *Euglena Gracilis* Under Conditions of High Biomass Production. *Journal of applied microbiology*. [Online]; **2010**, V. 109, pp 2160 – 2172. DOI:10.1111/j.1365-2672.2010.04848.x (дата звернення Вер 3, 2024).

³ Nezbyrka, I.; Shamanskyi, S.; Pavliukh, L.; & Gorbunova, Z. Application of *Euglena Gracilis* in Wastewater Treatment Processes. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*. [Online]; **2022**, V 103(4), pp. 323 – 330. DOI: 10.5114/bta.2022.120702 (дата звернення Вер 4, 2024).

⁴ Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного. Статут Інституту ботаніки ім. М.Г.Холодного Національної академії наук України (нова редакція) 2022 рік. https://www.botany.kiev.ua/doc/statut_IB_2022.pdf (дата звернення Вер 5, 2024).

⁵ Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного. Відділи. <https://www.botany.kiev.ua/department.htm> (дата звернення Вер 5, 2024).

⁶ NSTA. Терези технічні важільні (тарирні) з набором ваги. <https://nsta.com.ua/catalog/terezy-tehnichni-vazhilni-taryrni/> (дата звернення Вер 6, 2024).

⁷ DUDA. Кишенькові ваги. <https://duda.com.ua/ua/vybyrayemo-kyshenkovi-vahy/> (дата звернення Вер 6, 2024).

⁸ Alt Ukraine. Лабораторна центрифуга – важливий атрибут кожної лабораторії. <https://alt.ua/blog/laboratorna-tsentrifuga-vazhliivij-atribut-kozhnoyi-laboratoriyi> (дата звернення Вер 6, 2024).

⁹ Хімтест Україна. Ламінарні бокси (ламінарні шафи). https://chemtest.com.ua/ua/laminarnye_shkafy_boksi (дата звернення Вер 7, 2024).

¹⁰ Starlab. Мікропробірки. <http://surl.li/nmuyer> (дата звернення Вер 8, 2024).

¹¹ Libretexts. Спектрофотометрія. <http://surl.li/jfefdo> (дата звернення Вер 9, 2024).

¹² Led – diode. Спектрофотометрія. <http://m.ua.led-diode.com/info/working-principle-and-characteristics-of-spect-79970260.html> (дата звернення Вер 9, 2024).

¹³ Міралаб. Вимірювання рН. <https://miralab.in.ua/vumiryuvannya-rn>(дата звернення Вер 15, 2024).

¹⁴ Schwarz, T.; Bartholmes, P.; Kaufmann, M. Large – Scale Production of Algal Biomass for Protein Purification – Tryptophan Synthase from *Euglena gracilis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1995**, 22 (2), pp 179 – 190.

¹⁵ Мокросноп, В. М. Фізіологічні Процеси та Біохімічний Склад Клітин *Euglena Gracilis* за Умов Міксотрофного Культивування. Дисертація канд.біолог.наук, Інститут Ботаніки ім. М. Г. Холодного, Київ, 2017.

¹⁶ Степанов, С. С.; Поліщук, О. В.; Золотарьова, О. К. Використання Метанолу та Ізоаскорбату для Підвищення Фотопродукування Водню *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Вісник Харківського Національного Аграрного Університету. Серія Біологія*. [Онлайн]; **2021**, 3 (54), с. 49 – 55. DOI: <https://doi.org/10.35550/vbio2021.03.049> (дата звернення Жовт 03, 2024).

¹⁷ Maxwell, K.; Johnson, G. N. Chlorophyll Fluorescence – a Practical Guide. *Journal of Experimental Botany*, **1999**, 51 (345), pp 659– 668.

¹⁸ Bedard, S.; Roxborough, E.; O'Neill, E.; Mangal, V. The Biomolecules of *Euglena Gracilis*: Harnessing Biology for Natural Solutions to Future Problems. *Protist*. [Online]; **2024**, 175 (4). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.protis.2024.126044> (дата звернення Жовт 03, 2024).

¹⁹ Nezbyrtytska, I.; Shamanskyi, S.; Pavliukh, L.; Gorbunova, Z. Application of *Euglena Gracilis* in Wastewater Treatment Processes. *BioTechnologia*. [Online]; **2022**, 103 (4), pp 323 – 330. DOI: 10.5114/bta.2022.120702 (дата звернення Жовт 03, 2024).

²⁰ Singh, A.; Shourie, A.; Mazahar, S. Integration of Microalgae – Based Wastewater Bioremediation – Biorefinery Process to Promote Circular Bioeconomy and Sustainability: A Review. *Clean: Soil, Air, Water*. [Online]; **2022**. DOI: [10.1002/clen.202100407](https://doi.org/10.1002/clen.202100407) (дата звернення Жовт 04, 2024).

²¹ Barra, L.; Greco, S. The Potential of Microalgae in Phycoremediation. *Microalgae – Current and Potential Applications*. [Online]; **2023**. DOI: 10.5772/intechopen.1003212 (дата звернення Жовт 04, 2024).

²² Lihanová, D.; Lukáčová, A.; Beck, T.; Jedlička, A.; Vešelényiová, D.; Krajčovič, J.; Vesteg, M. Versatile Biotechnological Applications of *Euglena gracilis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2023**, 39 (5), pp 133. DOI: 10.1007/s11274-023-03585-5 (дата звернення Жовт 05, 2024).

²³ Lukáčová, A.; Lihanová, D.; Beck, T.; Alberty, R.; Vešelényiová, D.; Krajčovič, J.; Vesteg, M. The Influence of Phenol on the Growth, Morphology and Cell Division of *Euglena gracilis*. *Life*, **2023**, 13 (8). DOI: [10.3390/life13081734](https://doi.org/10.3390/life13081734) (дата звернення Жовт 05, 2024).

²⁴ Wang, Y.; Yang, S.; Liu, J.; Wang, J.; Xiao, M.; Liang, Q.; Ren, X.; Wang, Y.; Mou, H.; Sun, H. Realization Process of Microalgal Biorefinery: The Optional Approach Toward Carbon Net-Zero Emission. *Science of The Total Environment*, **2023**, 901. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2023.165546](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165546) (дата звернення Жовт 06, 2024).

²⁵ Cichoński, J.; Chrzanowski, G. Microalgae as a Source of Valuable Phenolic Compounds and Carotenoids. *Molecules*, **2022**, 27 (24). DOI: [10.3390/molecules27248852](https://doi.org/10.3390/molecules27248852) (дата звернення Жовт 06, 2024).

²⁶ Radziff, S. B. M.; Ahmad, S. A.; Shaharuddin, N. A.; Merican, F.; Kok, Y. Y.; Zulkharnain, A.; Gomez – Fuentes, C.; Wong, C. Y. Potential Application of Algae in Biodegradation of Phenol: A Review and Bibliometric Study. *Plants*, **2021**, 10 (12). DOI: [10.3390/plants10122677](https://doi.org/10.3390/plants10122677) (дата звернення Жовт 07, 2024).

²⁷ Mishra, V. K.; & Kumar, N. Microbial Degradation of Phenol: a Review. *Journal of Water Pollution & Purification Research*. [Online]; **2017**, V. 4, Issue 1, pp 17 – 22. DOI: <https://doi.org/10.37591/jowppr.v4i1.465> (дата звернення дата звернення Жовт 07, 2024).

²⁸ Zhang, C.; Wang, X.; Ma, Z.; Luan, Z.; Wang, Y.; Wang, Z.; & Wang, L. Removal of Phenolic Substances from Wastewater by Algae. A Review. *Journal Environmental Chemistry Letters*. [Online]; **2020**, Vol. 18, Issue 2, pp. 377– 392. DOI:10.1007/s10311-019-00953-2 (дата звернення Жовт 08, 2024).

²⁹ Papazi, A.; Karamanli, M.; Kotzabasis, K. Comparative Biodegradation of All Chlorinated Phenols by The Microalga *Scenedesmus Obliquus* – The Biodegradation Strategy of Microalgae. *Journal of Biotechnology*. [Online]; **2019**, V. 296, pp 61 – 68. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2019.03.010 (дата звернення Жовт 08, 2024).

³⁰ Gentili, F.G.; Fick, J. Algal Cultivation in Urban Wastewater: an Efficient Way to Reduce Pharmaceutical Pollutants. *Journal of Applied Phycology*. [Online]; **2017**, V. 29, pp 255 – 262. DOI: 10.1007/s10811-016-0950-0 (дата звернення Жовт 09, 2024).

³¹ Lukáčová, A.; Lihanová, D.; Beck, T.; Alberty, R.; Vešelényiová, D.; Krajčovič, J.; & Vesteg, M. The Influence of Phenol on the Growth, Morphology and Cell Division of *Euglena Gracilis*. *Journal Life*. [Online]; **2023**, V. 13(8), pp 1734 – 1735. DOI: 10.3390/life13081734 (дата звернення Жовт 10, 2024).

³² Курейшевич, А.; Ведмідь, А.; Потрохів, О.; Зіньківський, О.; Незбрицька, І.; & Горбунова, З. Функціонування *Euglena Gracilis* за Умов Впливу Біологічно Активних Речовин Фенольної Природи. *Гідробіологічний журнал*. [Online]; **2016**, 52 (2), 71с. http://nbuv.gov.ua/UJRN/gbj_2016_52_2_9 (дата звернення Жовт 10, 2024).

³³ Zhu, J.; & Wakisaka, M. Growth Promotion of *Euglena Gracilis* by Ferulic Acid From Rice Bran. *Journal AMB Express*. [Online]; **2018**, V. 8, pp 1 – 7. DOI:10.1186/s13568-018-0547-x (дата звернення Жовт 11, 2024).

³⁴ Tan, X.; Zhu, J.; & Wakisaka, M. Effect of Protocatechuic Acid on *Euglena Gracilis* Growth and Accumulation of Metabolites. *Journal Sustainability*. [Online]; **2020**, V. 12 (21), pp 9158 – 9159. DOI:10.3390/su12219158 (дата звернення Жовт 11, 2024).

³⁵ Alves, G.; Rizzetti, T. M.; Linton, M. A. O.; Hoeltz, M.; Dupont, A.; Rocha, V. C.; Ritzel, L.; Schneider, R. de C. S. Biomass of *Euglena gracilis* Produced in Mineral Medium Supplemented with Craft Brewery Residue. *Waste and Biomass Valorization*. [Online]; **2024**, 15, pp 4175 – 4189. [Biomass of Euglena gracilis Produced in Mineral Medium Supplemented with Craft Brewery Residue | Waste and Biomass Valorization \(springer.com\)](https://doi.org/10.1007/s11340-024-01076-0) (дата звернення Жовт 12, 2024).

³⁶ Мокросноп, В. М. Вплив Інтенсивності Освітлення на Ріст Міксотрофних Культур *Euglena Gracilis* та Накопичення Фотосинтетичних Пігментів у їх Клітинах. *Фізіологія рослин і генетика*. [Online]; **2019**, Т. 51, № 1, с 76 – 83. DOI: <https://doi.org/10.15407/frg2019.01.076> (дата звернення Жовт 13, 2024).

³⁷ Fu, Y.; Chen, T.; Chen, S. H. Y.; Liu, B.; Sun, P.; Sun, H.; Chen, F. The Potentials and Challenges of Using Microalgae as an Ingredient to Produce Meat Analogues. *Trends in Food Science & Technology*. [Online]; **2021**, 112, с 188–200. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.050> (дата звернення Жовт 14, 2024).

³⁸ Gissibl, A.; Sun, A.; Care, A.; Nevalainen, H.; Sunna, A. Bioproducts from *Euglena Gracilis*: Synthesis and Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* [Online]; **2019**, 7, 108. DOI: [10.3389/fbioe.2019.00108](https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00108) (дата звернення Жовт 15, 2024).

³⁹ Mokrosnop, V. M. Dynamics of Chlorophyll and Paramylon Accumulation in *Euglena Gracilis* Cells at Mixotrophic Cultivation. *Studia Biologica*. [Online]; 2016, 10 (2), 141–148. DOI: 10.30970/sbi.1002.483 (дата звернення Жовт 16, 2024).

⁴⁰ Bhattad, T.; Koradiya, A.; Prakash, G. Prebiotic Activity of Paramylon Isolated from Heterotrophically Grown *Euglena gracilis*. *Heliyon*. [Online]; **2021**, 7 (9). DOI: [10.3389/fbioe.2019.00108](https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00108) (дата звернення Жовт 17, 2024).

⁴¹ Mokrosnop, V. M.; Polishchuk, O. V.; Zolotarova, O. K. The Functional State of the Photosynthetic Apparatus of *Euglena Gracilis* Cells at the Mixotrophic Cultivation. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine*. [Online]; **2015**. <http://jnas.nbu.gov.ua/article/UJRN-0000461231> (дата звернення Жовт 18, 2024).

⁴² Miazek, K.; Kratky, L.; Sulc, R.; Jirout, T.; Aguedo, M.; Richel, A.; Goffin, D. Effect of Organic Solvents on Microalgae Growth, Metabolism and Industrial Bioproduct Extraction: A Review. *Int. J. Mol. Sci.*. [Online]; **2017**, 18 (7). <https://doi.org/10.3390/ijms18071429> (дата звернення Жовт 20, 2024).

⁴³ Мокросноп, В. М.; Поліщук, О. В.; Золотарьова, О. К. Вплив Етанолу на Дихання і Фотосинтез *Euglena gracilis*. *Мікробіологія і біотехнологія*. [Онлайн]; **2014**, №3, с. 49 – 56. DOI: [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2014.3\(27\).48291](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2014.3(27).48291) (дата звернення: Жовт 21, 2024).

⁴⁴ Zhu, J.; Wakisaka, M. Effect of Two Lignocellulose Related Sugar Alcohols on the Growth and Metabolites Biosynthesis of *Euglena gracilis*. *Bioresource Technology*. [Онлайн]; **2020**, 303. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122950> (дата звернення: Жовт 22, 2024).

⁴⁵ Tan, X.; Zhu, J., Wakisaka, M. Effect of Protocatechuic Acid on *Euglena gracilis* Growth and Accumulation of Metabolites. *Sustainability*. [Онлайн]; **2020**, 12 (21). <https://doi.org/10.3390/su12219158> (дата звернення: Жовт 23, 2024).

⁴⁶ Zhu, J.; Tan, X.; Hafid, H. S.; Wakisaka, M. Enhancement of Biomass Yield and Lipid Accumulation of Freshwater Microalga *Euglena Gracilis* by Phenolic Compounds From Basic Structures of Lignin. *Bioresource Technology*. [Онлайн]; **2021**, 321. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124441> (дата звернення: Жовт 24, 2024).

⁴⁷ Zhu, J.; Wakisaka, M. Growth Promotion of *Euglena Gracilis* by Ferulic Acid from Rice Bran. *AMB Express* [Онлайн]; **2018**, 8, article 16. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0602-3> (дата звернення: Жовт 25, 2024).

⁴⁸ Kureyshevich, A. V.; Medved', V. A.; Potrokhov, A. S.; Zin'kovskiy, O. G.; Nezbyrskaya, I. N.; Gorbunova, Z. N. Functioning of *Euglena Gracilis* Under the Influence of Biologically Active Substances of Phenol Nature. *Hydrobiological Journal*. [Онлайн]; **2016**, 52 (4), с. 63–73. <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v52.i4.70> (дата звернення: Жовт 26, 2024).

⁴⁹ Tan, X.; Zhu, J.; Wakisaka, M. Effect of Phytochemical Vanillic Acid on the Growth and Lipid Accumulation of Freshwater Microalga *Euglena gracilis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [Онлайн]; **2021**, 37, 217. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03158-0> (дата звернення: Жовт 26, 2024).

⁵⁰ Zhu, J.; Tan, X.; Hafid, H. S.; Wakisaka, M. A Novel Strategy to Promote Microalgal Growth and Lipid Productivity by Supplementation of Lignin Related Phenolic Elicitors. *Fuel*. [Онлайн]; **2023**, 334, Part 2. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.126775> (дата звернення: Жовт 27, 2024).

⁵¹ Котинський, А. В.; Батіщева, Г. С.; Поліщук, О. В. Вплив Фенольних Сполук на Фотосинтетичний Апарат Мікрводоростей. *Нові ідеї в харчовій науці – нові продукти харчовій промисловості: міжнародна наукова конференція, присвячена 130 – річчю Національного університету харчових технологій*, Жовтень 13 – 17, 2014 р; НУХТ: Київ, 2014; с 704.

⁵² Guo, P.; Liu, Y.; Liu, C. Effects of Chitosan, Gallic Acid, and Algicide on the Physiological and Biochemical Properties of *Microcystis Flos – Aquae*. *Environ Sci Pollut Res Int*. [Онлайн]; **2015** Sep; 22 (17). DOI: 10.1007/s11356-015-4500-0 (дата звернення: Лист 03, 2024).

⁵³ Likhanov, A.; Kliuvadenko, A.; Subin, O.; Shevchuk, M.; Dubchak, M. Gallic Acid as a Non – Specific Regulator of Phenol Synthesis and Growth of Regenerate Plants of *Corylus avellana* (L.) H. Karst. and *Salix alba* L. in vitro. *Forest*. [Онлайн]; **2022** Dec; *13* (4), pp 52 – 63. DOI: 10.31548/forest.13(4).2022.52-63 (дата звернення: Лист 06, 2024).

⁵⁴ Gharib, F. A. E. L.; Zeid, I. M.; Ghazi, S. M.; Ahmed, E. Z. Physiological Effects of Ascorbic and Gallic Acids on Growth and Metabolic Activities of Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) plants. *J Plant Physiol Pathol*. [Онлайн]; **2018** Aug; *6* (4), pp 1–7. DOI: 10.4172/2329-955X.1000183 (дата звернення: Лист 07, 2024).

⁵⁵ Chen, X.; Zhou, T.; Wang, X.; Xu, P.; Yang, C.; Sun, X.; Lu, Q.; Wang, S. Cultivation of *Chlorella Vulgaris* in Sludge Extract from Resorcinol–Rich Wastewater: the Removal and Inhibitory Effect of Sludge Toxicity. *J Chem Technol Biotechnol*. [Онлайн]; **2018** Nov 15; *94* (4), pp 1240 – 1248. DOI: [10.1002/jctb.5876](https://doi.org/10.1002/jctb.5876) (дата звернення: Лист 07, 2024).

⁵⁶ Bibi, S.; Ullah, R.; Burni, T.; Ullah, Z.; Kazi, M. Impact of Resorcinol and Biochar Application on the Growth Attributes, Metabolite Contents, and Antioxidant Systems of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. *ACS Omega* [Онлайн]; **2023** Nov 19; *8* (48). <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c06233> (дата звернення: Лист 10, 2024).

⁵⁷ Jagetiya, B.; Kaur, M. Effect of Foliar Application of Resorcinol on Certain Biochemical Parameters and Yield of Soybean. *Asian Journal of Biological Sciences. Agricultural and Food Sciences*. [Онлайн]; **2006**. <http://surl.li/lpgqgn> (дата звернення: Лист 11, 2024).

⁵⁸ ARA. Euglena Co., CLG і ARA Оголошують про Успішне Виробництво Відновлюваного Реактивного Палива на Основі Евглени. <http://surl.li/cgbkls> (дата звернення Лист 25, 2024).

⁵⁹ Kim, S.; Im, H.; Yu, J.; Kim, K.; Kim, M.; Lee, T. Biofuel Production from *Euglena*: Current Status and Techno – Economic Perspectives. *Bioresource Technology*. Review. [Онлайн]; **2023**, Volume 371. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128582> (дата звернення: Лист 11, 2024).

⁶⁰ Степанов, С.С.; Мокросноп, В.М. *Метаболічні Процеси та Цінні Речовини Водоростей*; Наукова Думка НАН України, Київ, 2021; 245 с.