

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

МОКРОСНОП ВІКТОРІЯ МИХАЙЛІВНА

УДК 577.161: 57.017. 83:593.161.3

**ВПЛИВ ЕТАНОЛУ НА КЛІТИНИ *EUGLENA GRACILIS* ЗА УМОВ
МІКСОТРОФНОГО КУЛЬТИВУВАННЯ**

03.00.12 – фізіологія рослин

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис
Роботу виконано у відділі мембранології та фітохімії Інституту ботаніки ім.
М.Г. Холодного НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Золотарьова Олена Костянтинівна,
Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України,
завідуюча відділом мембранології та фітохімії

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Божков Анатолій Іванович,
Харківський національний університет імені
Василя Каразіна МОН України,
директор Науково-дослідного центру біології,
завідувач кафедри молекулярної біології та
біотехнології

кандидат біологічних наук, доцент
Ольхович Ольга Петрівна
Київський національний університет імені
Тараса Шевченка МОН України,
Навчально-науковий центр
«Інститут біології та медицини»,
доцент кафедри біології рослин.

Захист відбудеться 19 грудня 2017 року о 14.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.14 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13.

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 58, зала 12

Автореферат розісланий «___»_____2017 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.14

Джаган В. В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Еукаріотична мікроводорість *Euglena gracilis* належить до протист і має здатність як до фотосинтезу, так і до живлення за рахунок поглинання органічних субстратів із середовища існування, що є можливим як на світлі, так і в темряві [Cook, 1968]. Органічним джерелом енергії та вуглецю для цього організму можуть бути різноманітні сполуки, включаючи етанол, який для більшості інших мікроорганізмів є токсичним. Метаболізм етанолу у клітинах *E. gracilis* здійснюється за рахунок НАД⁺-залежних алкогольдегідрогеназ та високоактивних альдегіддегідрогеназ, а також ферментів гліюксилатного циклу, ізоцитратліази та малатсинтази [Yoval-Sanchez, 2011; Collins, 1975; Notum, 1981]. Окиснення етанолу алкоголь- та альдегіддегідрогеназами веде до генерації енергії у клітинах та утворення ацетил-КоА. Вплив етанолу на метаболічні процеси клітин *E. gracilis* проявляється у збільшенні інтенсивності дихання клітин, інгібуванні гліюлітичного розщеплення глюкози та активації гліюконеогенезу, а також накопиченні у клітинах парамілоу та ліпідів [Garlaschi, 1974; Coleman, 1988]. Етанол як легкозасвоюване джерело вуглецю для *E. gracilis* специфічно інгібує біогенез хлоропластів клітин на світлі [Monroy, 1984]. Світлозалежний синтез основних компонентів фотосинтетичного апарату тилакоїдних мембран, зокрема СЗК ФСII, інгібується у клітинах *E. gracilis*, які культивувались гетеротрофно за наявності етанолу, що може бути опосередковано впливом етанолу на синтез хлорофілів [Rikin, 1989].

E. gracilis - один з небагатьох мікроорганізмів, здатних накопичувати такі вітаміни-антиоксиданти, як L-аскорбінова кислота, ліпофільні β-каротин і α-токоферол, які використовуються в клінічній практиці, а також для профілактики багатьох захворювань [Takeyama, 1997]. Підвищення вмісту α-токоферолу та його попередника тирозину у клітинах раніше було зафіксовано при вирощуванні мікроводорості за наявності етанолу, що може бути наслідком появи помірного оксидативного стресу, викликаного субстратом [Rodriguez-Zavala, 2010; Ogbonna, 1998].

Ефекти етанолу на ріст і метаболізм *E. gracilis* вивчалися переважно при культивуванні клітин у темряві, тоді як за міксотрофних умов клітини можуть мати інші характеристики дихання та акумуляції цінних метаболітів порівняно з гетеротрофними культурами. Вплив екзогенного етанолу на фотосинтетичні процеси у культурі *E. gracilis*, яка має сформований фотосинтетичний апарат, представляє особливий інтерес. Наявність етанолу як субстрату може відобразитися на динаміці накопичення фотосинтетичних пігментів, парамілоу та α-токоферолу як індикатора оксидативного стресу клітин *E. gracilis*. Ефект етанолу може залежати від доступності джерела азоту у поживному середовищі. Таким чином, дана робота присвячена встановленню шляхів впливу етанолу як субстрату на метаболізм клітин *E. gracilis*, які культивуються на світлі.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась у відповідності з планами фундаментальних робіт відділу мембранології та фітохімії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного

НАН України: «Вивчення і використання генетичного потенціалу мікроводоростей України для створення екологічно безпечних біотехнологій» (2007-2011 р.р.; № д/р 0107U000086), «Клітинні та молекулярні механізми адаптації рослин до несприятливих змін екологічних чинників (посуха, затоплення) в природі та експерименті» (2012-2016 р.р.; № д/р 0112U000059), «Особливості енергетичного обміну в рослинних клітинах за різних рівнів вуглецевого забезпечення» (2012-2016 р.р.; № д/р 0112U002315).

Мета і завдання дослідження. Мета даної роботи – визначення впливу етанолу як органічного джерела вуглецю при міксотрофному культивуванні *E. gracilis* на фотосинтетичну активність та вміст запасного полісахариду і жиророзчинних антиоксидантів у клітинах культури.

Відповідно до зазначеної мети було поставлено наступні завдання:

1. Дослідити вплив етанолу та суміші етанолу з глутаматом натрію на ріст міксотрофної культури *E. gracilis*.
2. Визначити зміну концентрації етанолу та рН поживного середовища у міксотрофних культурах *E. gracilis* в процесі культивування.
3. Дослідити вплив етанолу на поглинання кисню в процесі дихання та його фотосинтетичне виділення на світлі у клітинах міксотрофних культур *E. gracilis*.
4. З'ясувати ефект присутності етанолу у поживному середовищі культур на окисно-відновний стан пластохінонового пулу та ефективність фотосинтезу клітин *E. gracilis*.
5. Дослідити зміну накопичення фотосинтетичних пігментів клітинами *E. gracilis* в процесі міксотрофного культивування.
6. Оцінити вплив міксотрофного культивування клітин *E. gracilis* за наявності етанолу на акумуляцію жиророзчинних антиоксидантів – токоферолів і β -каротину.
7. Дослідити зміну вмісту запасного полісахариду парамілону у клітинах *E. gracilis* при міксотрофному культивуванні за наявності етанолу.

Об'єкт дослідження: метаболізм клітин мікроводоростей за умов міксотрофного культивування.

Предмет дослідження: вплив етанолу на фотосинтетичну активність та біохімічний склад мікроводорості *E. gracilis*.

Методи дослідження: біохімічні (спектрофотометричний, метод тонкошарової хроматографії, метод газової хроматографії), біофізичні (амперометричний, флуоресцентний метод), цитологічні (світлової мікроскопії), статистичні методи обробки даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Встановлено, що додавання етанолу до автотрофної культури *E. gracilis* за першу добу міксотрофного культивування підвищує швидкість електронного транспорту у хлоропластах клітин на 48% та світлозалежне виділення кисню на 37%, а отже, підвищує ефективність фотосинтезу. Після першої доби культивування за наявності етанолу концентрація хлорофілів у клітинах міксотрофних культур суттєво знижувалася, що може бути наслідком інгібування наявністю органічного

субстрату ресинтезу структурних компонентів фотосистем. Відновлення синтезу хлорофілів відбувалося після 3-ої доби культивування і продовжувалось навіть у стаціонарній фазі росту. При культивуванні міксотрофних культур на світлі низької інтенсивності подібних змін концентрації хлорофілів у клітинах не спостерігається. Таким чином, було вперше показано, що культивування *E. gracilis* протягом 5-15 діб за наявності етанолу сприяє накопиченню фотосинтетичних пігментів у клітинах, включаючи β -каротин, що сприяє збільшенню фотосинтетичного потенціалу клітин. У роботі було вперше показано, що початкова концентрація етанолу (100 мМ) на момент входу культури в стаціонарну фазу росту зменшена на 43%. Вперше встановлено стимулюючий вплив етанолу на мітохондріальне дихання клітин міксотрофної культури *E. gracilis*. Встановлено негативний редокс стан клітин, культивованих у присутності етанолу, як наслідок накопичення в них відновних еквівалентів. За наявності етанолу вміст токоферолів знижується порівняно з автотрофним контролем. На першу добу культивування на світлі спостерігається максимальне накопичення запасного полісахариду парамілону, зафіксоване у дослідженні, що свідчить про ефективність асиміляції етанолу клітинами *E. gracilis*.

Практичне значення одержаних результатів. *E. gracilis* одночасно продукує високі кількості білків, полісахариду, антиоксидантних вітамінів і поліненасичених жирних кислот. В роботі визначені умови, які стимулюють ріст і сприяють накопиченню жиророзчинних вітамінів і запасного полісахариду парамілону в біомасі *E. gracilis*. Показано, що швидкість поділу клітин культур з етанолом та глутаматом натрію в експоненційній фазі росту є на 20 % вищою, ніж із одним етанолом. Визначено фази росту міксотрофних культур *E. gracilis*, в яких було зафіксовано в процесі досліджень максимальний вміст у клітинах парамілону та жиророзчинних антиоксидантів, тобто сполук, які мають практичну цінність та застосовуються у медицині та ветеринарії. Отримані дані можуть бути використаними при підборі режиму культивування *E. gracilis*, адаптованого для накопичення у клітинах тієї чи іншої сполуки. Етанол позитивно впливає на синтез та акумуляцію у клітинах фотосинтетичних пігментів, підвищує життєздатність клітин та пластичний потенціал в умовах освітлення, що дозволяє рекомендувати даний субстрат для використання у тристадійній техніці вирощування *E. gracilis* для отримання парамілону та токоферолів. На першій стадії культивування стимулюють накопичення біомаси культурою, а на другій – жиророзчинних антиоксидантів, шляхом переведення клітин в умови стресу. Остання стадія характеризується синтезом парамілону у клітинах, стимульованим внесенням етанолу.

Особистий внесок здобувача. Дисертант самостійно провела пошук та опрацювання зарубіжної та вітчизняної літератури, яка стосується культивування клітин мікродорості *E. gracilis* з використанням органічних субстратів. Спільно з науковим керівником д.б.н., проф. Золотарьовою О. К. були визначені мета та основні завдання досліджень дисертаційної роботи, обрано об'єкт досліджень. Самостійно було налагоджено міксотрофне культивування мікродорості *E. gracilis* зі зниженою вірогідністю мікотичної контамінації культури. Здобувач самостійно проводила підготовку та виконувала

експериментальну роботу, застосовуючи методи світлової мікроскопії, спектрофотометрії, флуоресценції, амперометрії, тонкошарової хроматографії, за допомогою яких визначала вплив етанолу на фізіологічний стан та біохімічний склад клітин *E. gracilis*. В постановці методики визначення темного відновлення пластохінонового пулу клітин та обговоренні отриманих експериментальних даних брав участь співробітник відділу мембранології та фітохімії Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного – к.б.н., н.с. Поліщук О. О.

Апробація результатів дисертації. Результати експериментальної роботи, узагальнення та висновки доповідались на: Науково-практичній конференції «Біологічно активні речовини: фундаментальні та прикладні питання отримання і застосування» (Новий Світ, Крим, 2011), VIII Міжнародній науковій конференції «Молодь та поступ біології» (Львів, 2012), Міжнародній конференції «Фізіологія і біотехнологія мікроводоростей», присвяченій 80-літтю проф. В. Е. Семененко (Москва, 2012), Міжнародній конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології» (Щолкіне, 2013), VI Міжнародному конгресі з фотосинтезу (Сент-Луїс, США, 2013), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології» (Дніпропетровськ, 2013), Міжнародній конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології» (Умань, 2014), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014), Науковій конференції та школі молодих вчених «Фундаментальні та прикладні проблеми сучасної експериментальної біології рослин» присвяченої 125-літтю Інституту фізіології рослин ім. К. А. Тімірязєва РАН (Москва, 2015), XXI Пущинських читаннях по фотосинтезу та Всеросійській конференції «Фотосинтез і фотобіотехнологія. Фундаментальні і прикладні аспекти» (Пушино, 2015), V з'їзді Українського товариства фізіологів рослин «Фізіологія рослин: досягнення та нові напрямки розвитку» (Київ, 2017).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 17 наукових робіт, що відображають основний зміст дисертаційної роботи: 7 статей у фахових наукових виданнях, рекомендованих ДАК України (з яких 6 включені до міжнародних наукометричних баз) та 10 тез у матеріалах вітчизняних та міжнародних конференцій і з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів роботи та їх обговорення, аналізу й узагальнення результатів, висновків та списку використаних джерел, який складається з 191 найменування. Робота викладена на 128 сторінках, ілюстрована 33 рисунками та 7 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Умови, матеріали та методи досліджень

Дослідження проведені на одноклітинній джгутиковій протисті *E. gracilis* var. *IBCE E-5 bacillaris* Earth, яка була отримана із колекції культур Інституту біофізики та клітинної інженерії НАН Білорусі. Періодичне культивування

організму проводили стерильно у рідкому поживному середовищі Крамера-Маєрса [Cramer, 1952], у конічних колбах об'ємом 250 мл, заповнених на 200 мл культуральною рідиною, без перемішування та аерації при температурі 25-28 °С. Освітлення забезпечувалось білими флуоресцентними лампами зі щільністю потоку фотонів на поверхні колб 100 мкмоль фотонів · м⁻²·с⁻¹. Для міксотрофного культивування у середовище додавали етанол до концентрації 100 мМ та глютамат натрію до 40 мМ.

Концентрацію клітин у культурі визначали за допомогою камери Горяєва при 150-разовому збільшенні світлового мікроскопа. Для цього у 25 великих квадратах підраховували кількість клітин, з урахуванням правила Єгорова, та визначали середню кількість клітин на великий квадрат ($K_{в.к.}$). Концентрацію клітин у мл культури вираховували за формулою: $K_{кл/мл} = K_{в.к.} \times 2,5 \times 10^5$. Швидкість росту культури (r) визначали за формулою [Levasseur, 1993] :

$$r = \frac{\ln(N_t/N_0)}{\Delta t}$$
, де N_0 – початкова кількість клітин в одиниці об'єму; N_t – кількість клітин через проміжок часу Δt .

Визначення вмісту етанолу у поживному середовищі міксотрофних культур *E. gracilis* було проведено на базі Інституту мікробіології та вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України співробітником центру колективного користування приладами. Дослідження проводилось методом газової хроматографії на хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973inert (Agilent Technologies, США). В якості проб для аналізу використовували супернатант із культуральної рідини, яку центрифугували при 1000 g протягом 5 хв. В якості контролю використовували 96% етанол.

Концентрацію кисню у культурі клітин визначали за допомогою комп'ютеризованого полярографа, оснащеного платиновим електродом Кларка та термостатованим водяним кожухом. У скляну комірку полярографа поміщали зразок культури об'ємом 4 мл та проводили вимірювання при кімнатній температурі та постійному перемішуванні зразка магнітною мішалкою. Для освітлення використовували світлодіодну лампу білого світла 5 Вт (світлова температура 4100 K).

Для побудови кривої індукції флуоресценції хлорофілу *a* використовували флуорометр ХЕ-РАМ (Walz, Німеччина). Оцінювали такі параметри флуоресценції хлорофілу *a* як максимальний квантовий вихід фотосистеми II (ФС II) (F_v/F_m), фотохімічне гасіння флуоресценції хлорофілу (qP) та ефективний квантовий вихід ФС II (Φ_{PSII}). За зміною рівня F_0 , який корелює з відновленістю первинного хінонового акцептора Q_A , визначали темнове відновлення пластохінонового пулу (ПХП). Дослідження флуоресценції хлорофілу проводили за кімнатної температури у зразку культури об'ємом 2 мл. Для створення анаеробіозу та його підтримання у дослідному зразку використовували повітряний потік азоту.

Для визначення вмісту хлорофілу відбирали об'єм суспензії культури, що містив 10⁷ клітин. Клітини осаджували центрифугуванням 1000 g. протягом 3 хв. Супернатант зливали, а до осаду клітин додавали 5 мл дистильованої води та знову центрифугували. Промивання клітин дистильованою водою проводили

двічі. Потім до осаду додавали 2 мл 80 % ацетону та центрифугували при 1000 g протягом 5 хв. Супернатант зливали в окрему пробірку, а до осаду додавали ще 2 мл 80 % ацетону та знов центрифугували, таким чином, отримували знебарвлений осад клітин. Об'єднаний екстракт клітин використовували для визначення оптичної густини при 663, 646 та 470 нм на спектрофотометрі СФ-46. Концентрацію хлорофілу вираховували за формулами Ліхтенталера [Lichtenthaler, 1987].

Екстракцію токоферолів та β -каротину із клітин проводили 96 % етанолом. У 5 мл спиртового екстракту вносили 0.28 М аскорбінову кислоту та продували азотом протягом 10 хв. Для видалення неомілюваних сполук до отриманого розчину додавали 0.5 мл 9 М КОН і кип'ятили на водяній бані протягом 10 хв. Після охолодження розчину, вносили по 20 мл дистильованої води та діетилового ефіру і переносили суміш у розподільчу воронку. Ефірну витяжку промивали дистильованою водою до зникнення забарвлення фенолфталеїна у промивних водах, а потім упарювали у вакуумі до об'єму 0.5 мл і наносили на хроматографічну пластину «Силуфол» («Macherey-Nagel», Німеччина). Контролем слугував α -токоферол (Sigma). В якості рухомої фази використовували суміш рівних об'ємів діетилового ефіру та гексану. Після хроматографії положення токоферолу визначали обробкою контролю на пластині спочатку 0,25% спиртовим розчином хлориду тривалентного заліза, а потім 0,1% спиртовим розчином α -дипіридилу. Із дослідної зони токоферолу вимивали етанолом, після перенесення силікагелю на фільтрувальний папір. Аліквоту фільтрату відбирали для приготування проби для спектрофотометрії, яка містила 0,6 мл фільтрату, 2,4 мл 96% етанолу, 1 мл розчину хлорного заліза (III) та 1 мл розчину α -дипіридилу. Після інкубації у темряві, що тривала 10 хв, оптичне поглинання проб вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 520 нм. У контрольній пробі замість фільтрату був етанол. Отриманий результат співвідносили зі значеннями калібрувальної кривої (0,1-0,4 мг/мл зразка).

Для визначення кількості β -каротину, силікагель із зони хроматограми з цією сполукою переносили на фільтрувальний папір та промивали ацетоном. Концентрацію розчиненого в ацетоні β -каротину визначали спектрофотометрично за довжини хвилі 454 нм та розраховували з урахуванням коефіцієнту екстинкції β -каротину у ацетоні ($E = 2500$ при $\lambda = 454$ нм).

Для визначення парамілону аліквоту культури центрифугували при 1000 g протягом 5 хв. Пігменти екстрагували 96% етанолом до отримання білого осаду клітин. Для видалення білка із клітин до осаду додавали 2 мл 1% додецил сульфату натрію, перемішували, та витримували на киплячій водяній бані протягом 10 хв. Далі парамілон осаджували на 10 000 g протягом 10 хв. Супернатант зливали та повторювали ще раз процедуру видалення білка. Після центрифугування осад парамілону розчиняли у 0.5 мл 1 М NaOH. Концентрацію глюкози у зразку визначали спектрофотометрично. Для цього до 100 мкл зразка додавали 1 мл 5% фенолу та 1.6 мл концентрованої H_2SO_4 . Після змішування реагентів зразки поміщали у термостат (27-30°C) на 10 хв, після чого на спектрофотометрі СФ-46 вимірювали їх поглинання при довжині хвилі 490 нм.

Калібрувальний графік будували з використанням D-глюкози у концентраційних межах 50-400 мкг сполуки у зразку.

Експериментальні дані, що наведені в таблицях і на графіках, представлені у вигляді середнього арифметичного (M), стандартну помилку (m) якого визначено з урахуванням усіх повторів (не менше 3 біологічних повторів; у межах одного біологічного повтору не менше 3 аналітичних повторів).

Результати досліджень та їх обговорення

Вплив міксотрофного культивування за наявності етанолу на ріст культури мікроводорості *E. gracilis*. Міксотрофне культивування клітин *E. gracilis* за наявності етанолу сприяє інтенсивному росту культури, порівняно з автотрофним вирощуванням (рис. 1). Концентрації клітин у культурах з етанолом та етанолом і гутаматом натрію в стаціонарній фазі росту культур (20 доба) відносяться до контролю як 2,9 і 5,2 до 1. Фази росту різних дослідних культур збігались за часовим проміжком. Лаг-фаза тривала перші ~ 2 дні, після чого культури вступали в експоненційну фазу росту. Експоненційний ріст культур завершувався між 10-15 добами культивування, на цей же період припадає і перехідна фаза росту. Стаціонарна фаза росту встановлюється на 15-20 доби культивування.

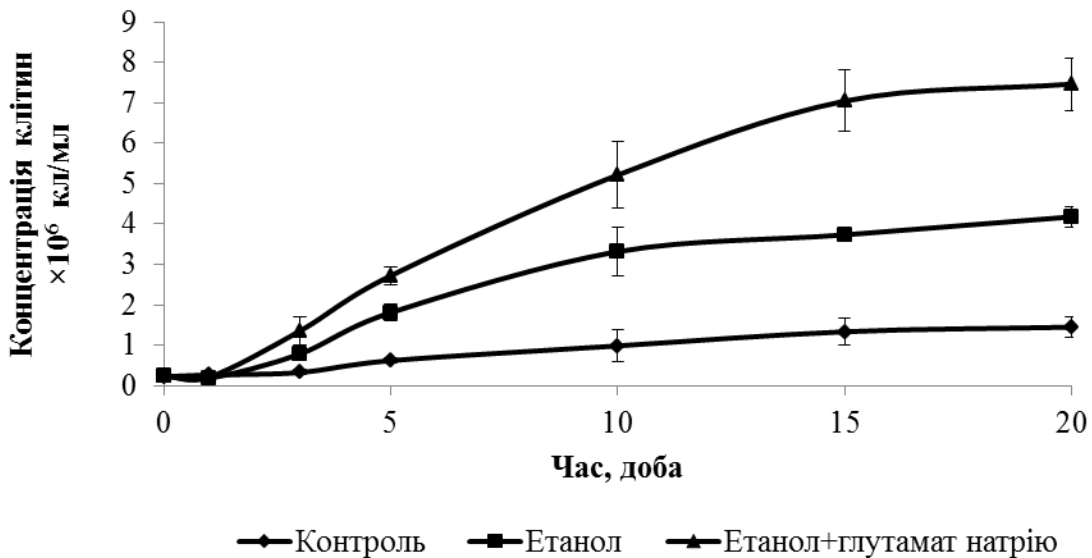


Рис. 1. Криві росту періодичних культур мікроводорості *E. gracilis*, які культивувались на світлі $100 \text{ мкмоль фотонів} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ за наявності етанолу (100 мМ) та етанолу (100 мМ) з глутаматом натрію (40 мМ) ($M \pm m$; $n=20$)

На початку експоненційної фази росту культур найвища швидкість розмноження клітин була зафіксована у культурі з етанолом та глутаматом натрію, вона була в 2,7 рази вищою, ніж в контролі, а в культурі з одним етанолом перевищувала контрольний показник в 2,3 рази (табл. 1). У період 5-10 діб культивування швидкість росту культур знизилась більш ніж в 4 рази.

Швидкості росту (млн клітин/добу) культур *E. gracilis* у присутності 100 мМ етанолу та етанолу з 40 мМ глутамату натрію за інтервали часу культивування у 5 діб

Культура	Тривалість культивування			
	1-5 доби	5-10доби	10-15 доби	15-20 доби
Контроль	0,22±0,02	0,09±0,04	0,06±0,03	0,02±0,03
Етанол	0,5±0,03*	0,12±0,01	0,02±0,02	0,01±0,02
Етанол + глутамат натрію	0,6±0,03*	0,13±0,01	0,06±0,02	0,01±0,02

*- достовірність різниці з контролем при $p \leq 0,05$; ($M \pm m$, $n=8$)

Таким чином, етанол у концентрації 100 мМ сприяє накопиченню біомаси культурою *E. gracilis*, особливо у присутності джерела азоту у вигляді глутамату натрію.

Зміна вмісту етанолу у поживному середовищі міксотрофних культур *E. gracilis* в процесі культивування. Етанол повністю не вичерпується із поживного середовища культур і на межі переходу з експоненційної фази росту культур в стаціонарну складає 57% від початкового рівня (рис. 2). Отже, перехід міксотрофних культур у стаціонарну фазу росту не є наслідком лімітованого доступу поживного субстрату.

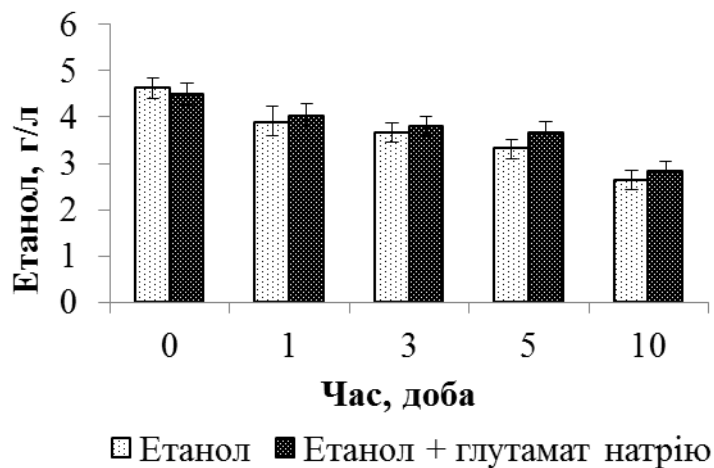


Рис. 2. Концентрація етанолу (г/л) у поживному середовищі міксотрофних культур *E. gracilis* ($M \pm m$; $n=3$)

За першу добу культивування, тобто за лаг-фазу росту міксотрофних культур, концентрація етанолу у поживному середовищі знизилась на 16 та 11 %, порівняно з вихідним рівнем. В період активного експоненційного росту, тобто в період 1-5 доби культивування, вміст етанолу знизився лише на 14 і 9 %, а з 5-10 доби на 21 та 23 % для варіантів з етанолом та етанолом і глутаматом натрію, відповідно. Таким чином, активний приріст клітин міксотрофних культур в експоненційній фазі росту зумовлений переважно використанням ендогенних

резервів вуглецю та енергії, збільшенню вмісту яких послугувала наявність екзогенного етанолу.

Зміна рН середовища культивування міксотрофних культур *E. gracilis*. Вирощування мікродорості *E. gracilis* у присутності етанолу призводить до закислення поживного середовища (рис. 3). У випадку, коли швидкість утворення ацетату в процесі метаболізму етанолу у клітинах вища, ніж швидкість його утилізації, надлишок цієї сполуки виділяється у поживне середовище і зумовлює зниження рН. Вже на 5-ту добу культивування у культурі, що росла за наявності етанолу у середовищі, зафіксовано рН 3,3. Мінімальне значення рН у даній культурі було досягнуто на 15-ту добу вирощування і складало 2,5.

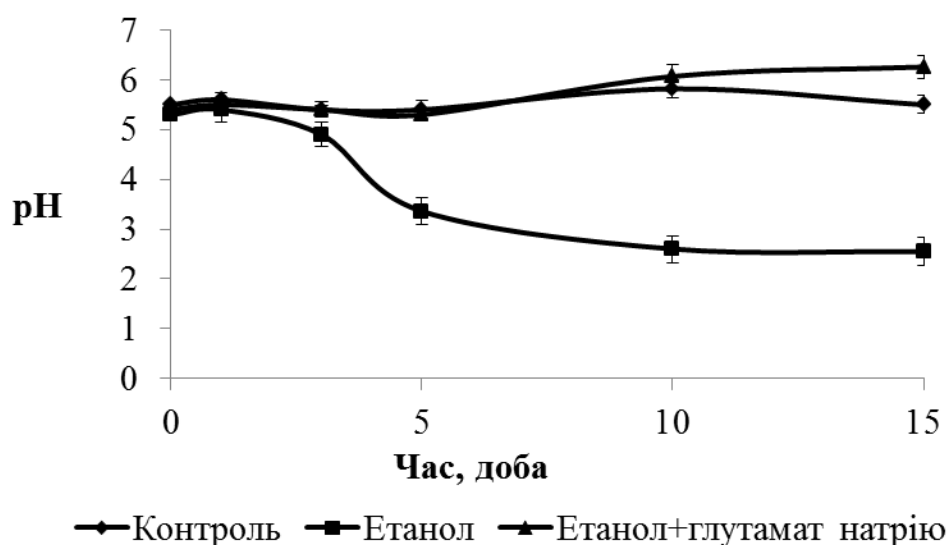


Рис. 3. Криві зміни рН поживного середовища міксотрофних культур *E. gracilis* ($M \pm m$; $n=5$)

Вплив етанолу на поглинання O_2 клітинами в процесі темного дихання та його фотосинтетичне виділення. Вплив етанолу на процеси темного поглинання та виділення кисню клітинами *E. gracilis* на світлі було оцінено через добу, після висіву клітин у поживні середовища. У експериментах було використано варіант культури з метанолом (100 мМ) в якості субстрату для порівняння ефектів досліджуваних спиртів. Результати вимірювань показали, що у клітин міксотрофних культур, що росли за наявності етанолу у поживному середовищі, збільшується темнове поглинання кисню в ~ 4 рази (рис. 4). У клітинах варіанту з метанолом дихання залишалось на рівні контрольного значення, так як і світлозалежне виділення кисню. Виділення кисню на світлі міксотрофними культурами *E. gracilis* було вищим, ніж в контролі, що може свідчити про більш високий рівень інтенсивності фотосинтезу у клітинах цих культур.

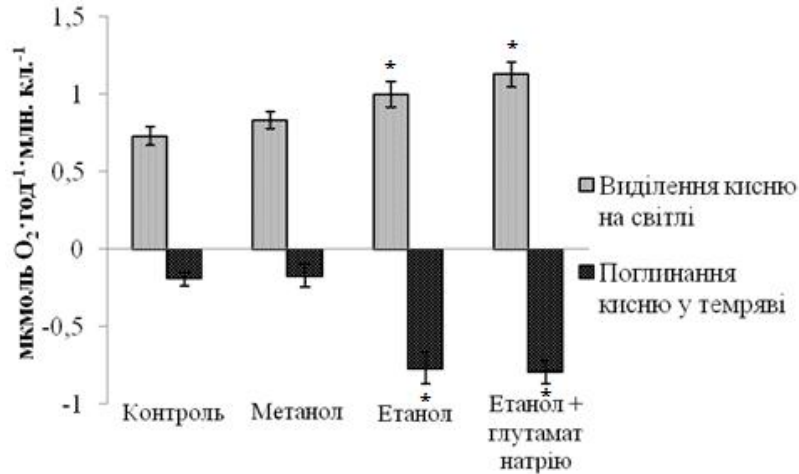


Рис. 4. Поглинання кисню клітинами міксотрофних культур *E. gracilis* у темряві та його світлозалежне виділення з поправкою на дихання; (*-достовірність різниці з контролем при $p \leq 0,05$; $n=5$)

Рівноважна концентрація кисню у культурі (рис. 5) з етанолом виявилась меншою, ніж в культурі з метанолом та контролі на ~40%.

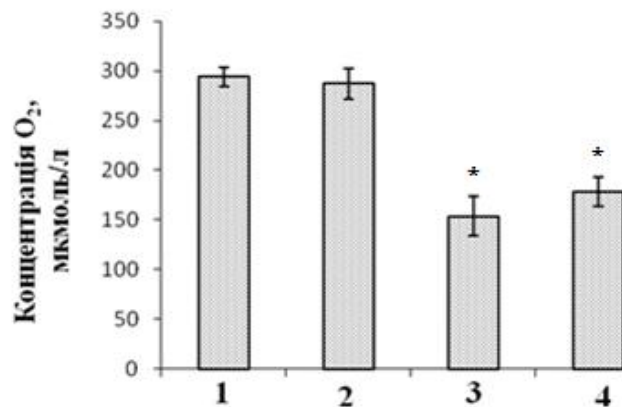


Рис. 5. Рівноважна концентрація кисню у міксотрофних культурах *E. gracilis* (1 - контроль, 2 - метанол, 3 - етанол, 4 - етанол + глутамат натрію); (*-достовірність різниці з контролем при $p \leq 0,05$; $n=5$)

Інтенсивність темного поглинання O₂ та його знижений рівень у культурах з етанолом свідчать про активне залучення цього спирту у метаболічні процеси клітин *E. gracilis*, порівняно з метанолом. Відомо, що етанол окислюється за участі алкоголь- та альдегіддегідрогеназ мітохондріону та цитозолу клітин *E. gracilis*, а утворений ацетил-КоА входить в цикл трикарбонних кислот та гліоксилатний цикл. В процесі розщеплення етанолу відновлюється НАД⁺, що може стимулювати поглинання O₂ клітинами, необхідного для його окиснення. Крім того, відомо, що етанол стимулює сукцинатоксидазну активність клітин *E. gracilis*. Збільшенню інтенсивності

виділення O_2 , утвореного в результаті фотосинтезу, може сприяти збільшення внутрішньоклітинного рівня CO_2 - одного з основних субстратів фотосинтезу.

Показники флуоресценції хлорофілу *a* та темнове відновлення пластохінонового пулу у клітинах міксотрофних культур *E. gracilis*. Вплив етанолу на значення основних показників флуоресценції хлорофілу *a* оцінювався через добу, після висіву клітин у поживні середовища. Результати дослідження показали, що у клітинах міксотрофних культур зростає значення показника qP , яке характеризує швидкість електронного транспорту у тилакоїдних мембранах хлоропластів, а значить, і ефективність фотосинтезу (табл. 2). Значення qP у культурах з етанолом та етанолом і глутаматом натрію мало більше значення порівняно з контролем на 48% і 72%, відповідно.

Таблиця 2.

Показники флуоресценції хлорофілу *a* культур *E. gracilis* в контролі та в присутності етанолу (100 мМ) та етанолу з глутаматом натрію (40 мМ)

Показник флуоресценції	24 години		
	Контроль	Етанол	Етанол + глутамат натрію
Φ_{PSII}	0.19±0.04	0.27±0.05	0.3±0.06
qP	0.37±0.03	0.55±0.03*	0.64±0.04*
F_v/F_m	0.51±0.01	0.49±0.01	0.46±0.02

*- достовірність різниці з контролем при $p \leq 0,05$; ($M \pm m$, $n=10$)

В процесі досліджень було встановлено, що на значення показника F_v/F_m у клітинах міксотрофних культур впливає підвищення мінімального рівня флуоресценції (F_0) у темновий інкубаційний період. Рівень F_0 корелює з відновленням пластохінонового пулу (ПХП), яке може бути зумовлено у міксотрофних культурах, по-перше, збільшенням кількості відновних еквівалентів у клітині, внаслідок катаболізму етанолу, по-друге, зниженням рівня O_2 у культурі, необхідним для функціонування термінальної хлоропластної оксидоредуктази, що окислює ПХП.

Дослідження темного відновлення ПХП показали, що після періоду освітлення зразків протягом 10 хв, у міксотрофних культурах в перші кілька хвилин спостерігається підвищення рівня відновлення ПХП, після чого він поступово знижується внаслідок окиснення оксидоредуктазою (рис. 6, А). Збільшений рівень відновлення ПХП у міксотрофних культурах, порівняно з автотрофною, імовірно, також свідчить про інтенсивніше формування НАД(Ф)Н у процесі фотосинтезу у клітинах цих культур. При запобіганні окиснення ПХП шляхом встановлення анаеробних умов у зразку, можна спостерігати безперервне збільшення рівня відновленості ПХП протягом дослідного часу у міксотрофних культурах, який свідчить про негативний редокс стан міксотрофно культивованих клітин *E. gracilis* (рис. 6, Б).

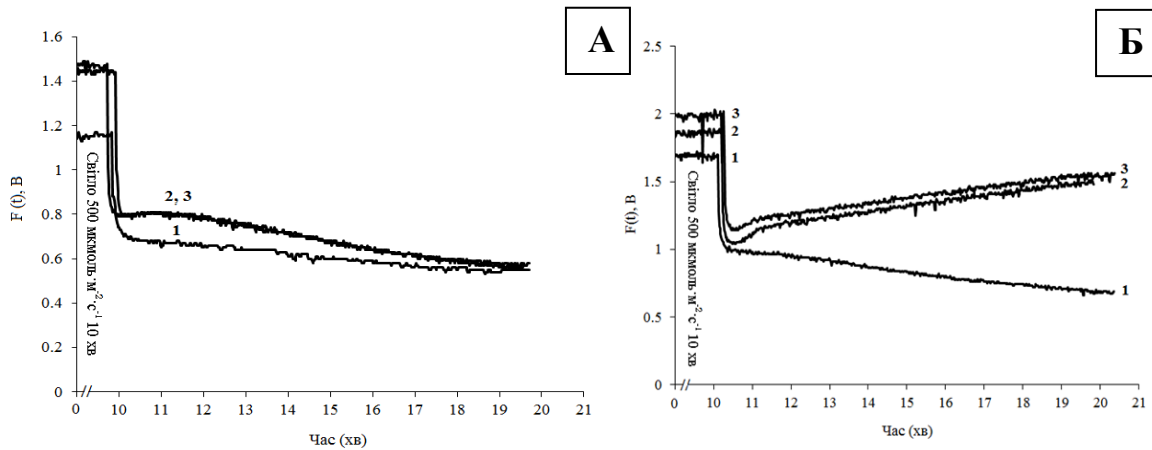


Рис. 6. Зміна показника F'_0 клітин *E. gracilis*, інкубованих добу в присутності етанолу та етанолу з глутаматом натрію після вимкнення діючого світла інтенсивністю $500 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ в аеробних умовах (А) та анаеробних умовах (Б). (1 - контроль, 2 - етанол, 3 - етанол + глутамат натрію).

Таким чином, за результатами дослідження флуоресценції хлорофілу міксотрофних культур *E. gracilis* було зроблено висновок, що культивування клітин у присутності етанолу та етанолу з глутаматом натрію протягом доби підвищує інтенсивність фотосинтезу клітин та збільшує в них рівень відновлених еквівалентів.

Динаміка накопичення фотосинтетичних пігментів у клітинах міксотрофних культур *E. gracilis*. Накопичення хлорофілів клітинами *E. gracilis*, які культивуються міксотрофно за наявності етанолу, має змінний характер. Через добу культивування у клітинах незначно зростає кількість хлорофілів, а потім, на 3 добу, зменшується на 39% і 49% у культурах з етанолом та етанолом і глутаматом натрію, відповідно, порівняно із контролем (рис. 7). На 5 добу культивування зафіксовано зростання кількості хлорофілів у клітинах міксотрофних культур, яке тривало до останньої, 20 доби вимірювання і врешті перевищувало контрольний показник на 67% і 31% для культур з етанолом та етанолом і глутаматом натрію, відповідно. Динаміка вмісту каротиноїдів мала подібний характер (дані не представлено).

Спад концентрації хлорофілів, зафіксований по закінченні лаг-фази і в ранній експоненційній фазі росту, вірогідно, є наслідком впливу органічного субстрату поживного середовища, оскільки індукція на світлі синтезу компонентів пігмент-білкових комплексів світлозбирального комплексу є катаболіт-чутливою. Monroy A. F. (1984) зі співавторами відмічають, що вплив етанолу на синтез компонентів пігмент-білкових комплексів хлоропластів є специфічним. Зростання вмісту хлорофілів у міксотрофних культурах вже на 5 добу культивування може свідчити про активацію розвитку фотосинтетичного апарату клітин.

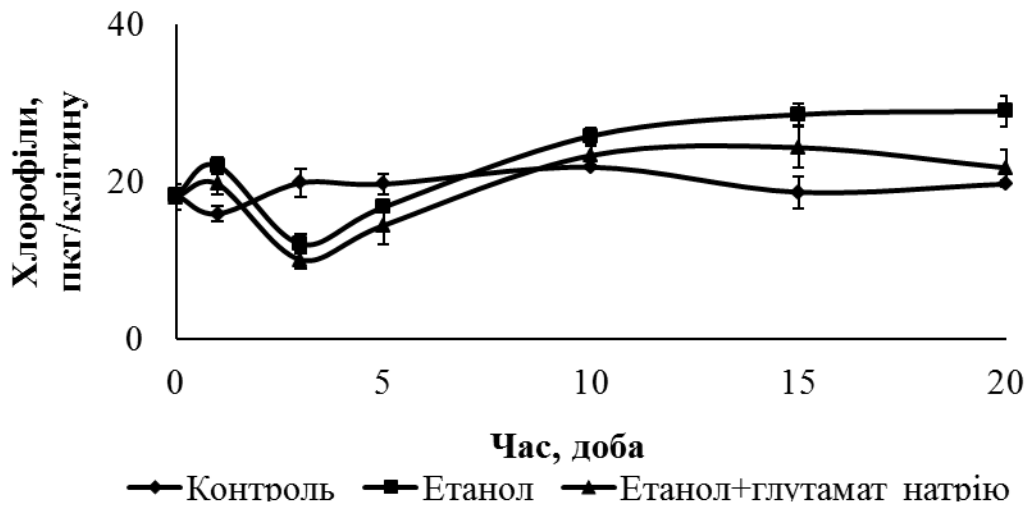


Рис. 7. Динаміка накопичення хлорофілів у клітинах культур *E. gracilis*, які культивувались на світлі $100 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ за наявності етанолу та етанолу з глутаматом натрію ($M \pm m$; $n=5$)

Вплив міксотрофного культивування *E. gracilis* за наявності етанолу на акумуляцію β -каротину і токоферолів у клітинах. Вміст β -каротину у клітинах міксотрофних культур з часом культивування зростає і досягає максимального значення у стаціонарній фазі росту. При цьому культура, що росла за наявності етанолу з глутаматом натрію мала майже втричі більше β -каротину, ніж контрольний варіант, а варіант з одним етанолом лише вдвічі (рис.8).

На 5 добу культивування вміст β -каротину в усіх варіантах культур був на рівні $\sim 0,3$ пкг/кл і в контролі він практично не змінився до стаціонарної фази росту. Збільшення вмісту β -каротину у міксотрофних культурах з часом культивування може підтверджувати отримані раніше результати про розвиток фотосинтетичного апарату клітин, у складі якого β -каротин локалізується та функціонує.

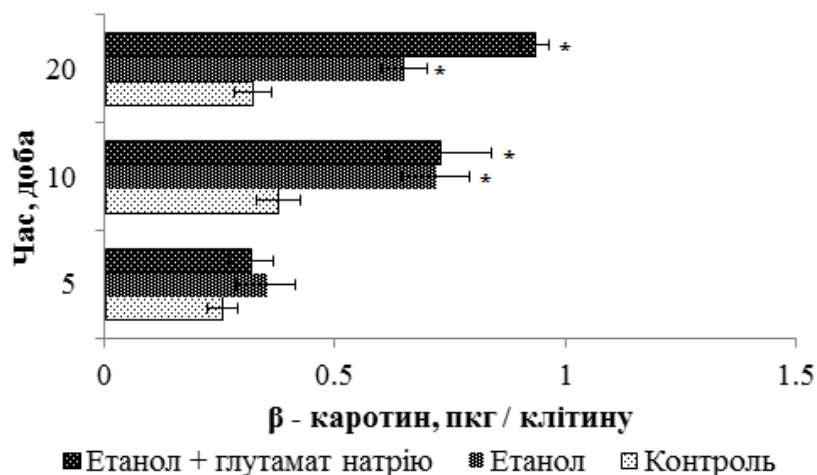


Рис. 8. Вміст β -каротину в клітинах міксотрофних культур *E. gracilis* (*-достовірність різниці з контролем при $p \leq 0,05$; $n=5$)

Вміст токоферолів у клітинах міксотрофних культур на 5 добу культивування не відрізнявся достовірно від контролю, а у стаціонарній фазі виявився значно меншим за контрольний показник (рис. 9).

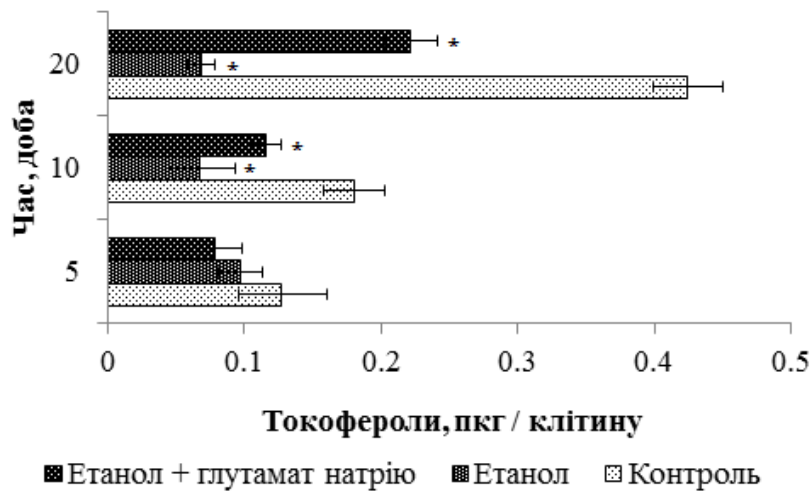


Рис. 9. Вміст токоферолів в клітинах міксотрофних культур *E. gracilis* (*-достовірність різниці з контролем при $p \leq 0,05$; $n=5$)

Найменша кількість токоферолу була виявлена у культурі з етанолом і складала 0,07-0,09 пкг/кл протягом всього часу культивування. У варіанті з етанолом та глутаматом натрію концентрація токоферолів поступово зростала і на 20-ту добу культивування складала 0,22 пкг/кл. На противагу міксотрофним культурам, у контрольному варіанті спостерігали набагато більший вміст токоферолів по досягненні культурою стаціонарної фази росту, який складав 0,42 пкг/кл. Вірогідно, що автотрофна культура піддається окисативному стресу в набагато більшій мірі ніж міксотрофні, що і стимулювало синтез цих антиоксидантів.

Отже, у вибраному діапазоні часу культивування, в клітинах, що росли у присутності етанолу, не відбувається накопичення токоферолів з часом, на відміну від варіанту з етанолом та глутаматом натрію. У останньому варіанті спостерігалось збільшення концентрації токоферолів у стаціонарній фазі росту культури. Таким чином, для отримання високого виходу токоферолів та β -каротину із культури *E. gracilis* найкраще вирощування проводити у присутності етанолу з глутаматом натрію, оскільки вихід даних сполук із одиниці об'єму такої культури є вищим, ніж у варіанті із одним етанолом в 3 і в 6 разів, відповідно (рис. 10).

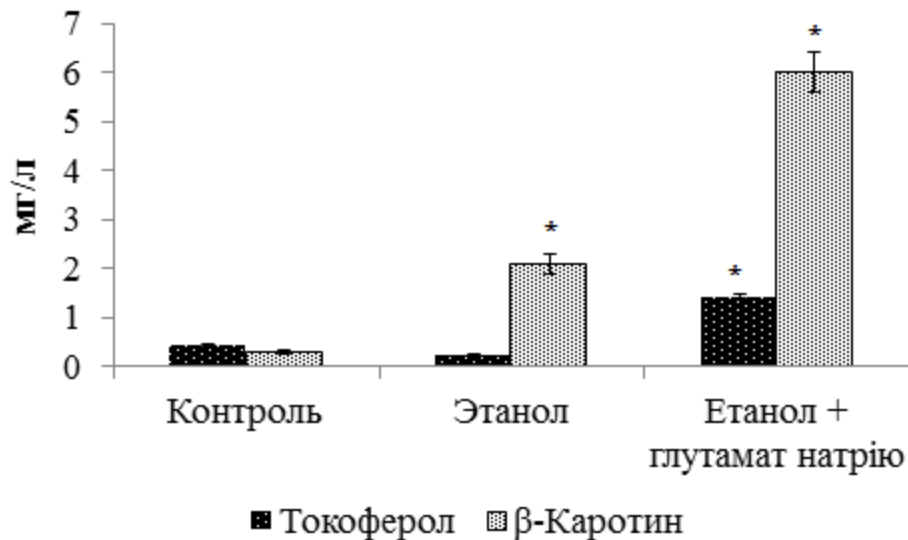


Рис. 10. Концентрація токоферолів та β-каротину в одиниці об'єму міксотрофних культур *E. gracilis* (*- достовірність різниці з контролем при $p \leq 0,05$; $n=5$)

Динаміка накопичення парамілону у клітинах міксотрофних культур *E. gracilis* за наявності етанолу. Вміст парамілону у культурах з етанолом варіював в процесі їх росту, на відміну від контрольного варіанту (рис. 11). На першу добу культивування було зафіксовано стрімке збільшення вмісту запасного полісахариду від 20 пкг/кл на момент висіву клітин у поживні середовища, до ~50 пкг/кл у культури, що росла лише з етанолом, та до 60 пкг/кл у культури з етанолом і глутаматом натрію. До 5 доби спостерігали поступове зниження концентрації парамілону у клітинах міксотрофних культур, яке все ж не досягало контрольного рівня. У клітинах контрольного варіанту змін рівня парамілону не відбувалося, а його концентрація залишалась ~20 пкг/кл протягом всього дослідного періоду.

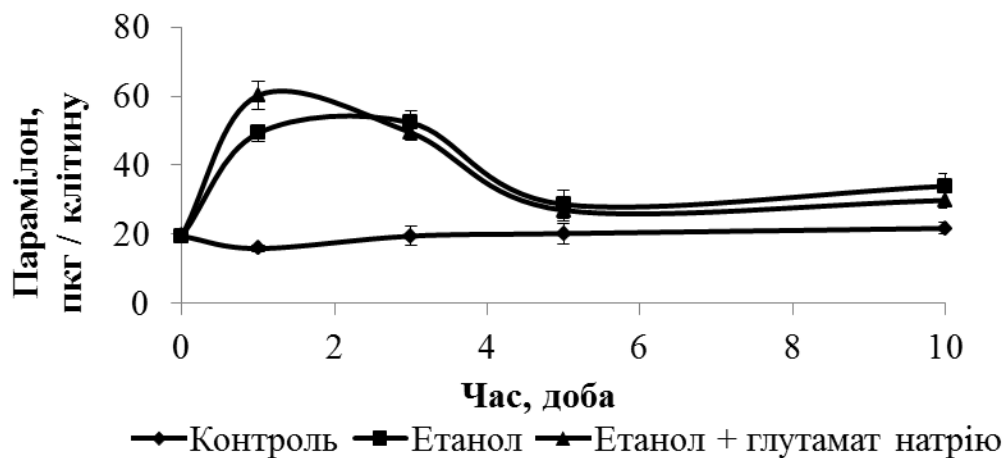


Рис. 11. Динаміка вмісту парамілону у клітинах міксотрофних культур *E. gracilis* ($M \pm m$; $n=5$)

Отже, міксотрофне культивування клітин *E. gracilis* у присутності етанолу стимулює накопичення клітинами парамілону. Найбільший вміст полісахариду за дослідний час мали клітини, культивовані з обома субстратами, після першої доби культивування, коли вміст парамілону в них був вищим на 20 %, ніж в культурі з одним етанолом. Процес розщеплення парамілону у варіанті з обома субстратами починається вже після першої доби культивування, що може бути пов'язано із присутністю глутамату натрію, який сприяє відтоку резервів полісахариду на синтез азотовмісних сполук. За літературними даними до 50% вуглецю етанолу при гетеротрофному культивуванні переходить у парамілон, а метаболізм клітин під дією цього субстрату спрямовується на синтез глюкози, а не білків і жирних кислот, або гліколізу. Отже, етанол може відігравати і на світлі регулюючу роль, таким чином сприяючи максимальному рівню глюконеогенезу та синтезу парамілону із доступних джерел вуглецю.

ВИСНОВКИ

Фізіологічні характеристики (швидкість мітохондріального дихання і фотосинтетичного виділення кисню) і біохімічний склад клітин мікроводорості *Euglena gracilis*, залежать від наявності в середовищі культивування екзогенних джерел вуглецю. Накопичення біомаси за міксотрофних умов значно зросло порівняно з автотрофним контролем, так як і вміст у клітинах запасного полісахариду парамілону та фотосинтетичних пігментів. Концентрація токоферолів в перерахунку на клітину суттєво підвищувалась при автотрофному вирощуванні.

1. Додавання 100 мМ етанолу до середовища культивування *E. gracilis*, яка культивується на світлі $100 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, стимулює швидкість поділу клітин в експоненційній фазі росту в 2,3 рази, а внесення суміші 100 мМ етанолу та 40 мМ глутамату натрію - в 2,7 разів.
2. Зниження вмісту етанолу у концентрації 100 мМ у поживному середовищі *E. gracilis* на світлі з найбільшою швидкістю спостерігається в лаг-фазі росту культур. Метаболізм етанолу клітинами *E. gracilis* призводить до зниження рН середовища культивування, яке починається після лаг-фази, а по досягненні стаціонарної фази росту культури встановлюється на рівні 2,5.
3. Швидкість мітохондріального поглинання O_2 в клітинах міксотрофних культур *E. gracilis* за наявності 100 мМ етанолу, або суміші 100 мМ етанолу та 40 мМ глутамату натрію зростає в чотири рази за період лаг-фази росту. Внесення 100 мМ метанолу як екзогенного субстрату не впливає на дихання клітин.
4. Фотосинтетична активність клітин міксотрофних культур *E. gracilis* зростає за період лаг-фази росту, про що свідчить підвищення рівнів швидкості лінійного транспорту електронів між фотосистемами (qP) та світлозалежного виділення O_2 . Інтенсивність виділення O_2 за цих умов кількісно не компенсує поглинання O_2 в процесах дихання, тому

- рівноважна концентрація O_2 у поживному середовищі міксотрофних культур знижується майже вдвічі.
5. У міксотрофних культурах клітин *E. gracilis* в темряві відбувається відновлення пластохінонового пулу, що свідчить про надлишок відновлювальних еквівалентів у клітинах.
 6. Вміст хлорофілів в клітинах міксотрофної культури *E. gracilis* залежить від фази росту культури. На початку експоненційної фази росту відбувається зниження вмісту хлорофілів у клітинах, а після третьої доби культивування їх вміст зростає і досягає постійного значення в стаціонарну фазу росту культур. Внесення глутамату натрію разом із етанолом призводить до зниження вмісту хлорофілів у клітинах міксотрофної культури, порівняно із клітинами, що росли за наявності лише етанолу.
 7. Рівень накопичення біологічно-активних речовин у клітинах *E. gracilis* залежить від наявності екзогенних джерел вуглецю і фази росту культури. У стаціонарній фазі росту культури за присутності глутамату натрію разом з етанолом ефективно накопичувалися антиоксиданти - β -каротин та токофероли. Максимальна акумуляція запасного полісахариду парамілону відбувалася в лаг-фазі росту міксотрофних культур *E. gracilis*, а при переході культури в експоненційну фазу вміст парамілону стрімко знижувався.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Mokrosnop V. M. Influence of fungicides on the growth of the microalgal culture *Euglena gracilis* Klebs (Euglenophyta) / V.M. Mokrosnop, E.K. Zolotareva // International Journal on Algae. – 2013. – Vol. 15, Is.2. – P. 180-187. (Здобувачем проведено планування експерименту, експериментальну роботу, аналіз отриманих результатів та підготовку матеріалів до друку).
2. Мокросноп В. М. Микроводоросли как продуценты токоферолов / В. М. Мокросноп, Е. К. Золотарева // Biotechnologia acta. – 2014. – Т. 7, № 2. – С. 26-33. (Здобувачем проведено пошук джерел літератури, аналіз літературних даних, написання статті).
3. Mokrosnop V. M. Functions of tocopherols in the cells of plants and other photosynthetic organisms / V. M. Mokrosnop // Ukr. Biochem. J. – 2014. – Vol. 86, Is. 5. – P. 26-36. (Здобувачем проведено пошук джерел літератури, аналіз літературних даних, написання статті).
4. Мокросноп В. М. Вплив етанолу на дихання і фотосинтез *Euglena gracilis* / В. М. Мокросноп, А. В. Поліщук, О. К. Золотарьова // Мікробіологія і біотехнологія. – 2014. – Т. 27, № 3. – С. 49-56. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження за темою статті, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень, написана стаття).
5. Мокросноп В. М. Функціональний стан фотосинтетичного апарату клітин *Euglena gracilis* при міксотрофному культивуванні / В. М. Мокросноп, А.

- В. Поліщук, О. К. Золотарьова // Доповіді НАН України. – 2015. - № 10. – С. 77-84. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження за темою статті, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень, написана стаття).
6. Mokrosnop V. M. Accumulation of α -tocopherol and β -carotene in *Euglena gracilis* cells under autotrophic and mixotrophic culture conditions / V. M. Mokrosnop, A. V. Polishchuk, E. K. Zolotareva // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2016. – Vol. 52, Is. 2. – P.216-221. (Здобувачем проведено планування експерименту, експериментальну роботу, аналіз отриманих результатів та написання статті).
 7. Mokrosnop V. M. Dynamics of chlorophyll and paramylon accumulation in *Euglena gracilis* cells at mixotrophic cultivation / V. M. Mokrosnop // Biol Studii. – 2016. – Vol. 10, N. 2. – 141-148 pp. (Здобувачем проведено планування експерименту, експериментальну роботу, аналіз отриманих результатів, написання статті).
 8. Мокросноп В. М. Умовля накоплення токоферолов клетками микроводоросли *Euglena gracilis*/ В. М. Мокросноп, Е. К. Золотарева // Матеріали науково-практичної конференції «Біологічески активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения», 23-28 мая 2011р.: матер. конф. – Новый Свет, Крым, Украина. – С. 418.
 9. Мокросноп В. М. Влияние фунгицидов на рост культуры микроводоросли *Euglena gracilis* Klebs / В. М. Мокросноп, О. К. Золотарьова // Матеріали VIII Міжнародної наукової конференції «Молодь та поступ біології», 3-6 квітня 2012 р.: матер. конф. – Львів, 2012. – С. 108-109.
 10. Мокросноп В. М. Пигментный состав клеток микроводоросли *Euglena gracilis* при миксотрофном выращивании / В. М. Мокросноп, А. В. Полищук, А. А. Сиваш // Матеріали Международной конференции «Физиология и биотехнология микроводорослей», посвященной 80-летию проф. В. Е. Семененко, 16-19 октября 2012 г.: матер. конф. – Москва, 2012. – С. 85.
 11. Mokrosnop V. M. Dark non-photochemical reduction of PQ pool of photoheterotrophically cultivated cells of *Euglena gracilis* var *bacillaris* / V. M. Mokrosnop, A. V. Polishchuk, E. K. Zolotareva // Матеріали Міжнародної конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології», 18-22 червня 2013 р.: матер. конф. – Щолкіне, 2013. – С. 241-242.
 12. Мокросноп В. М. Рост культуры клеток микроводоросли *Euglena gracilis* и содержание токоферолов в них при миксотрофном культивировании / В. М. Мокросноп, О. К. Золотарьова // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології», 26-27 вересня 2013.: матер.конф. – Дніпропетровськ, 2013. – С. 75-76.
 13. Мокросноп В. М. Пігментний склад клітин *Euglena gracilis* при миксотрофному культивуванні на світлі різної інтенсивності / В. М. Мокросноп, О. К. Золотарьова // Матеріали міжнародної конференції

- молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології», 9-12 вересня 2014 р.: матер. конф. – Умань, 2014. – С. 130.
14. Мокросноп В. М. Продукування токоферолу клітинами *Euglena gracilis* за міксотрофного живлення / В. М. Мокросноп, О. К. Золотарьова // Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, 6-10 жовтня 2014 р.: матер. конф. – Київ, 2014. – С. 206.
 15. Мокросноп В. М. Состояние электрон-транспортной цепи клеток *Euglena gracilis* при миксотрофном культивировании / В. М. Мокросноп, А. В. Полищук, Е. К. Золотарева // XXI Пущинские чтения по фотосинтезу и Всероссийская конференция «Фотосинтез и фотобиотехнология. Фундаментальные и прикладные аспекты», 1-6 июня 2015 г.: матер. конф. – Пущино, 2015. – С. 64.
 16. Мокросноп В. М. Накопление токоферолов в клетках *Euglena gracilis* при миксотрофном культивировании / В. М. Мокросноп, Е. К. Золотарева // XXI Пущинские чтения по фотосинтезу и Всероссийская конференция «Фотосинтез и фотобиотехнология. Фундаментальные и прикладные аспекты», 1-6 июня 2015 г.: матер. конф. – Пущино, 2015. – С. 65.
 17. Мокросноп В. М. Продукування запасного полісахариду парамілону мікрододорістю *Euglena gracilis* / В. М. Мокросноп // V з'їзд Українського товариства фізіологів рослин «Фізіологія рослин: досягнення та нові напрямки розвитку», 15-16 червня 2017р.: матер. конф. - Київ, 2017. - С. 383-392.

АНОТАЦІЯ

Мокросноп В.М. Вплив етанолу на клітини *Euglena gracilis* за умов міксотрофного культивування – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.12 – фізіологія рослин. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2017.

Дисертація присвячена проблемі вивчення міксотрофного культивування мікрододорості *Euglena gracilis* за наявності етанолу у поживному середовищі. Міксотрофне культивування з використанням етанолу як субстрату стимулює ріст культури в експоненційній фазі росту в 2,3 рази та з часом культивування призводить до закислення поживного середовища. Етанол активує мітохондріальне дихання клітин, фотосинтетичне виділення кисню та підвищує відновний потенціал клітин у лаг-фазі росту культури. Внесення глутамату натрію у середовище культивування разом із етанолом посилює вказані ефекти етанолу. Біохімічний склад клітин міксотрофних культур *E. gracilis* змінювався з часом культивування. Вміст у клітинах фотосинтетичних пігментів, хлорофілів та каротиноїдів, знижується в перші доби культивування, тоді як концентрація парамілону, навпаки, стрімко зростає. Максимальне накопичення фотосинтетичних пігментів, яке свідчить про підвищення фотосинтетичного потенціалу клітин, спостерігається в перехідній та стаціонарній фазах росту міксотрофних культур. Найбільший вміст жиророзчинних антиоксидантів, β -

каротину та токоферолів, був в одиниці об'єму культури з етанолом та глутаматом натрію у стаціонарній фазі росту. Отримані дані свідчать про ефективний метаболізм етанолу клітинами *E. gracilis* на світлі, який підвищує їх пластичний та енергетичний потенціал, а також життєздатність.

Ключові слова: *Euglena gracilis*, міксотрофія, етанол, мітохондріальне дихання, хлорофіл, парамілон, токоферол.

АННОТАЦІЯ

Мокросноп В. М. Влияние этанола на клетки *Euglena gracilis* в условиях миксотрофного культивирования – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.12 – физиология растений. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2017.

Диссертация посвящена проблеме изучения миксотрофного культивирования микроводоросли *Euglena gracilis* при наличии этанола в питательной среде. Миксотрофное культивирование с использованием этанола как субстрата стимулирует рост культуры в экспоненциальной фазе роста в 2,3 раза и со временем такое культивирование приводит к закислению питательной среды. рН в стационарной фазе роста миксотрофной культуры с этанолом достигает значения 2.5. Содержание этанола в питательной среде на момент входа культуры в стационарную фазу роста составляет 57% от исходной концентрации (100 мМ). Этанол активизирует митохондриальное дыхание клеток, повышая активность поглощения кислорода миксотрофными культурами в 4 раза. Фотосинтетическое выделение кислорода и скорость электронного транспорта в хлоропластах клеток, инкубированных с этанолом в течении суток, увеличивается на 37 и 48%, соответственно. Повышается восстановительный потенциал клеток в лаг-фазе роста миксотрофных культур. Внесение глутамата натрия в среду культивирования вместе с этанолом усиливает указанные эффекты этанола. Биохимический состав клеток миксотрофных культур изменялся со временем культивирования. Содержание в клетках фотосинтетических пигментов, хлорофиллов и каротиноидов, снижается в течении первых трех суток культивирования, тогда как концентрация парамиллона, наоборот, стремительно возрастает. Содержание парамиллона за первые сутки в клетках миксотрофной культуры с этанолом возрастает в 2.5 раза, а при дополнительном внесении глутамата натрия в 3 раза. В середине экспоненциальной фазы роста миксотрофных культур содержание парамиллона в клетках существенно снижается, а количество хлорофиллов возрастает, сравнительно с первыми днями культивирования. Максимальное накопление фотосинтетических пигментов, которое свидетельствует о повышении фотосинтетического потенциала клеток, наблюдается в переходной и стационарной фазах роста миксотрофных культур. Наибольшее содержание жирорастворимых антиоксидантов, β -каротина и токоферолов, было в единице

объема культуры с этанолом и глутаматом натрия в стационарной фазе роста. Наибольшее содержание токоферолов на клетку наблюдалось в автотрофной культуре, которая в большей мере поддавалась стрессу, чем миксотрофные. Полученные данные свидетельствуют об эффективном метаболизме этанола клетками *E. gracilis* на свету, который повышает их пластический и энергетический потенциалы, а так же жизнеспособность.

Ключевые слова: *Euglena gracilis*, миксотрофия, этанол, митохондриальное дыхание, хлорофилл, парамилон, токоферол.

ANNOTATION

Mokrosnop V. M. Effects of ethanol on *Euglena gracilis* cells under conditions of mixotrophic cultivation. – Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences, speciality 03.00.12 - plant physiology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2017.

The aim of the dissertation is to study the mixotrophic cultivation of microalga *Euglena gracilis* at the presence of ethanol in nutrient medium. Mixotrophic cultivation with using ethanol as substrate stimulates the growth rate of the culture in the exponential growth phase by 2,3 times and causing acidification of culture medium with time. Ethanol activates cell respiration, photosynthetic oxygen evolution and increases reduction potential of the cells in lag phase of the culture growth. Adding sodium glutamate with ethanol simultaneously to the nutrient medium strengthens the noted effects of ethanol. Biochemical composition of the cells of mixotrophic cultures *E. gracilis* changing over cultivation time. Content of photosynthetic pigments, chlorophylls and carotenoids, decreases at the first days of cultivation, while paramylon concentration has sharp increases. Maximum accumulation of photosynthetic pigments which indicate about increase photosynthetic capacity of the cells is observed in transient and stationary growth phases of mixotrophic cultures. The highest content of fat-soluble antioxidants, β -carotene and tocopherols, was in volume unit of the culture with ethanol and sodium glutamate in stationary growth phase. Received evidence suggest about effective metabolism of ethanol by the cells of *E. gracilis*, that cultivating under light conditions.

Key words: *Euglena gracilis*, mixotrophy, ethanol, mitochondrial respiration, chlorophyll, paramylon, tocopherol.