

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології

**ФЕНОЛЬНІ СПОЛУКИ ЗЕЛЕНИХ ВОДОРОСТЕЙ ЯК
ПОТЕНЦІЙНІ АНТИМІКРОБНІ АГЕНТИ**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

студентка 4 курсу, 407 групи

Козак Анна-Марія Русланівна

Керівник:

кандидат біологічних наук,

доцент **Чебан Л.М.**

До захисту допущено

на засіданні кафедри

протокол № _____ від _____ 2023 р.

Зав. кафедрою _____ проф. Копільчук Г.П.

Чернівці – 2023

Анотація

*Робота присвячена вивченню фенольних сполук водоростей *Chlorella vulgaris* і *Dunaliella viridis* як потенційних антимікробних агентів. При проведенні аналізу антимікробної активності методом дифузії в агар було відмічено, що чутливість тест-культур мікроорганізмів залежить від будови їх клітинної стінки. Спектральним методом у культуральній рідині *D. viridis* була встановлена присутність кумаринів, лактонів, флавоноїдів, тоді як *Ch. vulgaris* - флавоноїдів. Біомаси водоростей містили азулени, кумарини, флавоноїди, лактони. За допомогою спектрального аналізу було визначено кількість поліфенолів, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів та активність поліфенолоксидази. Отже, дані водорості містять велику кількість фенольних сполук, тому ми можемо сказати, що ці види володіють високим протимікробним потенціалом.*

Ключові слова: антимікробна активність, поліфенольні сполуки, *Dunaliella viridis*, *Chlorella vulgaris*, флавоноїди, гідроксикоричні кислоти, тест-культури мікроорганізмів.

Abstract

*The work is devoted to the study of phenolic compounds of algae *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella viridis* as potential antimicrobial agents. When conducting an analysis of antimicrobial activity by diffusion in agar, it was noted that the sensitivity of test cultures of microorganisms depends on the structure of their cell wall. The presence of coumarins, lactones, flavonoids was established in the culture liquid of *D. viridis* by the spectral method, while *Ch. vulgaris* - flavonoids. Algae biomass contained azulenes, coumarins, flavonoids, and lactones. The amount of polyphenols, hydroxycinnamic acids, flavonoids and the activity of polyphenol oxidase were determined using spectral analysis. So, these algae contain a large amount of phenolic compounds, so we can say that these species have a high antimicrobial potential.*

Ключові слова: antimicrobial activity, polyphenol compounds, *Dunaliella viridis*, *Chlorella vulgaris*, flavonoids, hydroxycinnamic acids, test cultures of microorganisms.

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

(підпис) А-М.Р. Козак

ЗМІСТ

Вступ	4
Розділ I. Огляд літератури	6
1.1. Біологічно активні сполуки водоростевого походження, що проявляють антимікробні властивості	6
1.2. Фенольні сполуки водоростей: антимікробна активність та можливості застосування	11
Розділ II. Матеріали та методи дослідження	20
2.1. Матеріали дослідження	20
2.2. Методи дослідження	24
2.3. Статистична обробка результатів	27
Розділ III. Результати дослідження та їх обговорення	28
Висновки	36
Список використаної літератури	37
Додатки	44
Додаток А. Техніка безпеки в лабораторії біотехнологічного профілю	45
Додаток Б. Публікації за результатами дослідження	47

ВСТУП

Водорості є цінним джерелом біологічно активних сполук, які синтезуються в процесі їх життєдіяльності. Більшість з них здатні не тільки покращити обмін речовин, травлення, стан шкіри, самопочуття, а й боротися з бактеріальними захворюваннями. Цей новий підхід до використання водоростей базується на екологічних спостереженнях і механізмах контролю навколишнього середовища [10]. Під час дослідження водоростей було виявлено такі сполуки, які здатні виявляти антимікробну дію, включаючи білки та пептиди, вуглеводи, пігменти, фенольні сполуки та триацилгліцероли [14, 28].

Серед величезної кількості сполук феноли є найбільшою та найціннішою групою вторинних метаболітів, які містяться у водоростях. Ці сполуки вважаються хорошими антиоксидантами, які захищають організм людини від пошкодження активними формами кисню, що може призвести до розладів здоров'я [11, 26].

Усі фенольні сполуки містять принаймні одне ароматичне фенольне кільце з одним або кількома гідроксильними замісниками. Сьогодні відомо більше 8000 різних структур фенолів [28]. Так, серед простих фенолів водоростей виділяють фенолокислоти (галову, гідроксибензойну, гентизинову, ферулову, кавову, хлорогенову) [8, 12], катехол, гідрохінон і флуороглюцин. Останній характерний виключно для біомаси різних відділів водоростей [15].

Крім того, у біомасі водоростей можна знайти всі 13 класів флавоноїдів, кумаринів та ізокумаринів [25, 29]. Серед полімерних фенольних сполук водоростей виділяють таніни та лігнани [2, 14]. Особлива увага приділяється виявленню флоротанінів – це олігомерів флороглюцину, який міститься виключно в біомасі водоростей [9].

Водорості вважаються природним і привабливим біотехнологічним джерелом нових ліків. Висока антимікробна активність їх поліфенольних

сполук є перспективною основою для розробки інноваційних лікарських засобів. Вони можуть стати як серйозною альтернативою традиційним протимікробним препаратам, так і ефективним доповненням до антибіотикотерапії [35, 46].

Тому метою даної роботи було дослідження фенольних сполук *Chlorella vulgaris* та *Dunaliella viridis* як потенційних антимікробних агентів.

Відповідно до мети поставлені такі завдання:

1. Провести скринінг антимікробної активності культуральної рідини та біомаси зелених мікроводоростей *Chlorella vulgaris* та *Dunaliella viridis*.
2. Виконати УФ-спектроскопію культуральної рідини та спиртових екстрактів біомаси водоростей задля встановлення спектру біологічно активних сполук.
3. Визначити кількість поліфенольних сполук, гідроксикоричних сполук та флавоноїдів у культуральній рідини та спиртових екстрактах *Chlorella vulgaris* та *Dunaliella viridis*.
4. Визначити поліфенолоксидазну активність у клітинах зелених мікроводоростей.

РОЗДІЛ I. Огляд літератури

1.1. Біологічно активні сполуки водоростевого походження, що проявляють антимікробні властивості

Природними джерелами фітохімічних сполук є водорості, які при введенні в раціон у вигляді страв, біологічно активних добавок мають фізіологічний вплив на людину. Ці функціональні фітохімічні речовини можна розділити на дві основні категорії: первинні та вторинні метаболіти. Первинні метаболіти – це сполуки, які відповідають за розвиток і ріст продуцентів. До них відносяться вуглеводи, амінокислоти, ліпіди та нуклеїнові кислоти. Вторинними метаболітами є сполуки (пігменти, алкалоїди, стерини, ізопреноїди, мікоспориноподібні амінокислоти (МАК)), які необхідні для допоміжних цілей, таких як механізм захисту, передача сигналів, реакції на стрес тощо. В організмі продуцента вторинні метаболіти зазвичай синтезуються ближче до кінця життєвого циклу. На цій стадії клітини піддаються стресу через фактори навколишнього середовища – зменшення доступності поживних речовин, накопичення токсинів, тощо. Окрім інших спеціальних функцій вторинні метаболіти допомагають клітинами справлятися зі стресом, а також ініціюють певні сигнальні шляхи, які беруть участь у захисних реакціях. Одна і та сама рослина, залежно від регіону, в якому вона росте, може містити різні кількості сполук, і навіть може містити різні сполуки [51].

Серед основних біологічно активних сполук водоростей, які здатні проявляти антимікробну дію можна виділити наступні: білки та пептиди, полісахариди, пігменти, триацилгліцероли (ТАГ) та фенольні сполуки [50].

Вміст **білка** в основних видів водоростей коливається в межах 10-40% сухої маси. Білок морських водоростей містить усі амінокислоти, головним чином аланін, гліцин, пролін, аргінін, аспарагінову та глютамінову кислоти. Лектини та фікобіліпротейни – це дві групи білків, які активно функціонують у клітинах морських водоростей. Лектини - це клас вуглеводних

розпізнавальних білків, які зв'язуються з клітинами, сприяючи гемаглютинації та антимікробному ефекту. Повідомлялось про антимікробний потенціал лектинів, отриманих з водоростей *Eucheuma serra* та *Galaxaura marginata* класу *Rhodophyta*, які відповідають за інгібуючий потенціал проти бактерій *Vibrio vulnificus* та *V. pelagicus* [46].

Інтерес до білків пов'язаний із створенням біоактивних пептидів, які вважаються найдавнішими протимікробними агентами. Малі пептиди є давновідомими антибактеріальними сполуками через їх всюдисущість і просту молекулярну структуру. Як правило, біоактивні пептиди містять відносно невеликі молекули (<10 кДа або 12-50 амінокислот), які не виявляють біологічної активності до вивільнення з вихідного білка. Однак у різних процесах, таких як травлення або гідроліз *in vivo*, або в результаті застосування таких технологічних процедур, як обробка високим тиском, ці пептиди демонструють безліч фізіологічних функцій, включаючи антиоксидантні, гіпотензивні, антикоагулянтні та антимікробні властивості.

Антимікробні пептиди поділяються на три групи:

- 1) Лінійні α -спіральні пептиди;
- 2) Багаті цистеїном пептиди;
- 3) Пептиди, які збагачені деякими амінокислотами.

Важливими факторами, які впливають на антибактеріальну активність, є розмір, заряд, конформація, гідрофобність та походження. Основною перешкодою для ефективного вилучення та засвоюваності білкових фракцій, отриманих із водоростей, є локалізація білків під щільною та складною клітинною стінкою.

Інгібуючий ефект білків і пептидів пов'язаний з їх амфіфільною природою, яка дає їм взаємодіяти з неполярними та полярними ділянками мембран. Така взаємодія призводить до появи пор у мембрані, що викликає її руйнування та розрив клітин. Ці сполуки демонстрували свою антимікробну активність проти *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* та *Bacillus subtilis* [50].

Макроводорості у своєму складі містять від 25 до 75% харчових волокон, з яких водорозчинна клітковина становить 50-85%. **Полісахариди** відіграють структурну роль у клітинних стінках водоростей. Вони можуть бути нейтральними або кислими, лінійними або розгалуженими. Водорості відділу Phaeophyta особливо багаті полісахаридами, основними з яких є ламінарини, альгінати, фукани та целюлоза. Червоні, зелені та бурі водорості мають велику кількість сульфатованих полісахаридів з високим ступенем складності в діапазоні рвід 4% до 76% сухої маси. У зелених морських водоростях полісахариди становлять 38-54% сухої речовини, значну частину з них складає ульван, сульфатовані рамнани та сульфатовані галактани. Червоні морські водорості представляють різні сульфатовані галактани, сульфатовані рамнани або маннани, карагенани та агари, які були ефективними проти таких патогенних бактерій, як *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus* [19]. Ці полісахариди, виділені з водоростей, проявляли позитивний вплив на мікробіоту кишечника, діючи як пребіотики. Введенням у раціон свиней і великої рогатої худоби пребіотичних сполук водоростевого походження, які сприяють активності та проліферації корисної шлунково-кишкової мікрофлори на шкоду патогенним бактеріям, можна знизити ризик розвитку кишкових інфекцій [53].

Дослідження вказують на те, що водоростеві пребіотики мають великий потенціал, тому що вони є не лише потенційними антимікробними інгредієнтами в їжі, але й антимікробними засобами *in vivo*, які регулярно додаються в раціон та інгібують розмноження патогенних бактерій у кишечнику (наприклад, у як тварини, так і людини). Однак хімічні властивості таких сульфатованих полісахаридів змінюються залежно від видів водоростей, а оскільки біологічна активність може відрізнятися відповідно до їх структури, розміру молекул та кількості сульфату, слід перевірити не лише їх антимікробні властивості, а й загальний хімічний склад.

Нещодавні дослідження також продемонстрували потенціал фукоїданів – сульфатованих гетерополісахаридів бурих водоростей – для запобігання

інфекції *Helicobacter pylori*, яка є однією з найбільш занепокоєних патогенних мікрофлор світу, він здатний інфікувати різні області шлунка та дванадцятипалої кишки. Також було зазначено, що ефект фукоїдану, таким чином, знижує ризик розвитку раку шлунку [44].

В інших дослідженнях було показано антимікробну дію фукоїдану щодо бактерій зубного нальоту, зокрема патогенних бактерій харчового походження. Для потенційного сульфатованого полісахариду оцінювали його антибіоплівкову активність проти бактерій зубного нальоту. Як результат, фукоїдан мав помітну антимікробну активність щодо вибраних бактерій зубного нальоту з мінімальною інгібуючою концентрацією від 125 до 1000 мкг/мл. Зокрема, фукоїдан у концентраціях вище 250 мкг/мл повністю пригнічував утворення біоплівки та зростання планктонних клітин *Streptococcus mutans* і *Streptococcus sobrinus*, тому ця сполука може бути потенціалом для розробки антибіоплівкового агента, здатного інгібувати утворення зубного нальоту [37].

Антимікробні властивості полісахаридів пояснюються взаємодією між глікорецепторами клітинної стінки бактерій, сполуками мембрани та нуклеїновими кислотами та полісахаридами. Такі взаємодії призводять до дестабілізації мембрани та клітинних функцій.

Жирні кислоти (ЖК) — це органічні сполуки з довгими аліфатичними ланцюгами, які можуть бути прямими або розгалуженими, насиченими або ненасиченими. Протимікробні властивості відомі давно, і, що цікаво, ЖК виробляються рослинами та водоростями для захисту від патогенів, у тому числі бактерій, стійких до багатьох лікарських засобів. Перша антибактеріальна сполука, виділена із зеленої мікроводорості *Chlorella spp.*, була сумішшю жирних кислот. Ця суміш була ефективною проти як грампозитивних, так і грамнегативних бактерій.

Водорості є надзвичайно різноманітною групою рослинних організмів, що має високу здатність до адаптації. Середній вміст ліпідів у клітинах водоростей від кількох відсотків до 70% і більше, частіше – від 12% до 25%.

Невід'ємною частиною більшості молекул ліпідів є їхні жирнокислотні залишки. Мікроводорості, порівняно із вищими рослинами, мають набагато більший набір насичених та ненасичених вищих карбонових кислот, довжина яких становить від 12 до 28 атомів Карбону, більшу частину яких представлені довголанцюговими поліненасиченими омега-3 та омега-6 кислотами. Водорості з прісних водойм частіше містять ідентичний склад жирних кислот із вищими рослинами, але в інших співвідношеннях, з яких найчастіше зустрічаються із парним числом атомів Карбону – від 14 до 18. У морських видів ширший спектр жирних кислот, особливо поліненасичених жирних кислот [59].

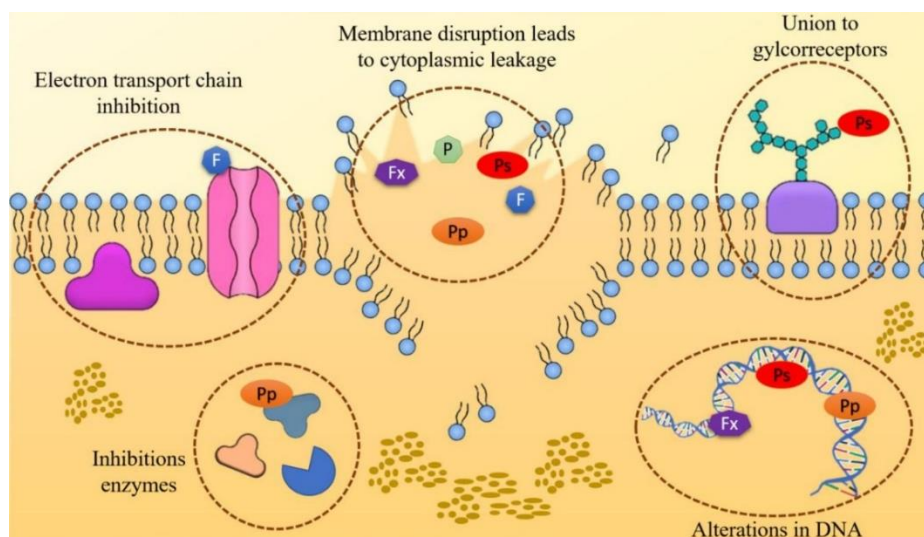


Рис.1.1. Схематичне зображення основних механізмів дії антибактеріальних і протигрибкових сполук, екстрагованих з різних видів водоростей (P: поліфеноли, Ps: полісахариди, F: жирні кислоти, Pp: білки та пептиди та Fx: фукоксантин) [3].

Характерний профіль насичених і ненасичених ЖК у водоростях, з переважанням пальмітинової, олеїнової, міристинової та ейкозапентасенової кислот, є специфічною особливістю, пов'язаною з антибактеріальним потенціалом видів водоростей. Вважається, що пальмітинова кислота є основною сполукою серед жирних кислот, яка відповідає за протимікробну активність водоростей [21].

Антимікробна дія ліпідів і жирних кислот пояснюють здатністю сполук інгібувати електрон-транспортний ланцюг і окисне фосфорилування в клітинних мембранах, що призводить до утворення продуктів перекисного окислення та самоокиснення та клітинного лізису [50].

1.2. Фенольні сполуки водоростей: антимікробна активність та можливості застосування

Фенольні сполуки – найбільша та найцінніша група вторинних метаболітів, яка виявлена у водоростей. Ці сполуки є дуже потужними інструментами, за допомогою яких організм бореться з окислювальним стресом: вони захищають клітини рослин від пошкодження активними формами кисню (АФК), які можуть призводити до порушень функцій організму [4, 6, 13].

Серед різних метаболітів водоростей феноли є найбільш детально вивченими. Всі фенольні сполуки містять принаймні одне ароматичне фенольне кільце з одним або кількома гідроксильними замісниками, які можуть бути сильно полімеризованими, що дозволяє їх класифікувати. На сьогодні відомо понад 8000 різних структур фенолів.

Поліфеноли завдяки своїй унікальній дії відіграють різноманітні ролі у життєвих циклах водоростей: від ранніх стадій розвитку до розвитку дорослих рослин, включаючи ріст і розмноження, формування клітинної стінки, адгезію та запобігання поліспермії.

В залежності від таксономічних, екологічних та екзогенних аспектів можуть бути відмінності у вмісті та складі фенолів у водоростях. Фізіологічні зміни у відповідь на інтенсивність світла, температуру та кількість поживних речовин безпосередньо впливають на хімічний склад водоростей через свій вплив на фотосинтетичні та ферментативні процеси, що регулюються переважно світлом і температурою [26].

Водорості накопичують у великій кількості фенольні сполуки, зокрема флороглюцинол та його полімери флоротаніни. У червоних та зелених водоростей найбільша частка фенолів представлена флавоноїдами, бромфенолами та фенолкарбоновими кислотами. Флоротаніни в найбільшій кількості містяться у бурих водоростях, у червоних водоростях їх менше (1,8-3,2%); ще менше поліфенолів міститься в зелених водоростях [13].

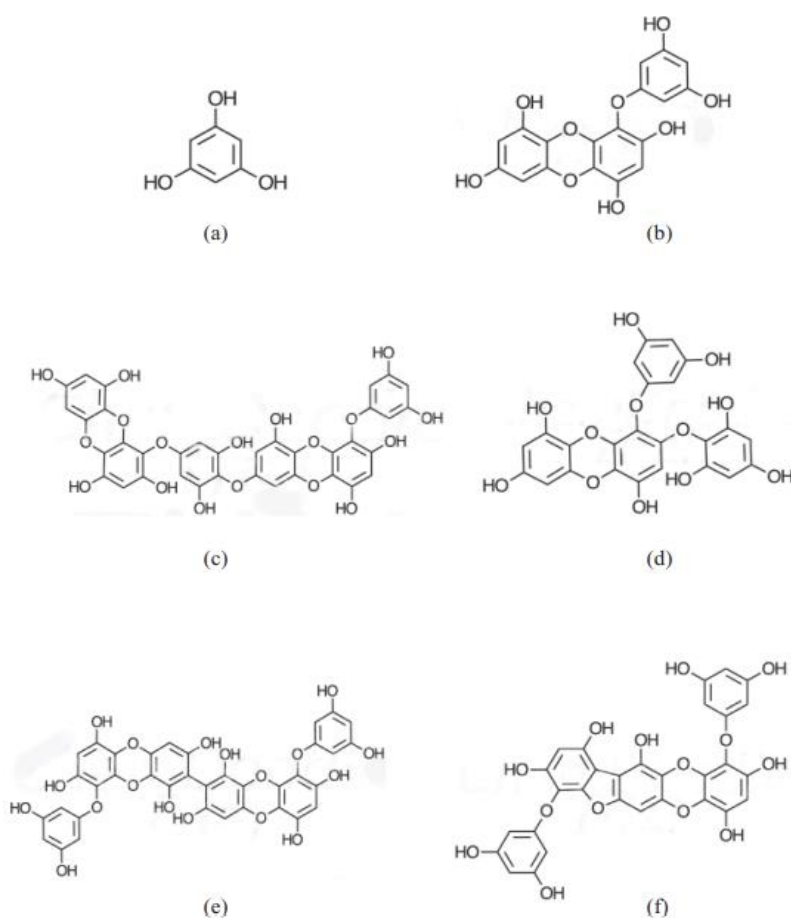


Рис.1.2. Деякі фенольні сполуки, отримані з морських водоростей: (а) флороглюцинол, (b) еккол, (c) діеккол, (d) 2-флороеккол, (e) 6,6-біеккол, (f) флорофукофуроеккол В [30].

Флоротаніни водоростей – найменш вивчена група молекул, олігомери флороглюцинолу, які присутні лише у водоростях та відрізняються за структурою та ступенем полімеризації. Ці сполуки, як і дубильні речовини наземних рослин, добре розчинні у воді, міцно зв'язані з білками, полісахаридами та іншими біополімерами, а також хелатують двовалентні

метали та мають полімерну структуру. Майже 90% загальної кількості флоротанінів знаходяться у вільному стані у фізодах – мембранозв'язаних везикулах бурих водоростей. Решта поліфенольних сполук містяться в клітинній стінці водоростей, де вони зв'язані в комплексі з альгіноювою кислотою ковалентними ефірними та напівацеталевими зв'язками і діють як структурний компонент, регулюючи осмотичний тиск. Деякі сполуки флоротанінів можуть знаходитись у водоростях у сульфатованому або галогенованому стані. Витягти їх із рослини можна лише шляхом руйнування клітин.

Водорості на відміну від наземних рослин, які виробляють дубильні речовини із 3-4 фенольними кільцями, здатні синтезувати флоротаніни, які складаються із восьми кілець. Фенольні кільця є своєрідними електронними пастками для вільних радикалів, тому флоротаніни проявляють досить виражені антиоксидантні властивості. Велика кількість гідроксильних груп дозволяє цим сполукам виробляти більше пероксиду водню, який є токсичним для мікроорганізмів в аеробних умовах. Флоротаніни залежно від типу зв'язку між мономерами поділяють на чотири підкласи: флоретоли і фугалоли; фуколи; фукофлоретоли; екколи та кармалоли (рис. 1.3.).

Фармакологічне значення поліфенольних сполук пов'язане з їх будовою, а насамперед із ступенем полімеризації. Ці біологічно активні сполуки здатні виявляти протиалергічну, протизапальну, протипухлинну, протівірусну, антиоксидантну, антибактеріальну, антидіабетичну та радіозахисну дію.

Флоротаніни є найефективнішими агентами у боротьбі з бактеріальними біоплівками, тому що вони проникають через стінку бактеріальної клітини, тим самим змінюючи форму клітинної мембрани і викликаючи загибель клітини. Проникнувши у бактеріальну клітинну стінку, флоротаніни її пошкоджують і викликають витік протонів у клітинну мембрану, таким чином, структурні зміни призводять до загибелі клітини. Також ці сполуки здатні знищувати бактерії через пригнічення їх розмноження.

Протимікробну дію флоротанінів пояснюють їх здатністю блокувати окисне фосфорилування, а також здатністю приєднуватись до бактеріальних ферментів і білків, що в подальшому викликає лізис клітин. Фенольні ароматичні кільця і -ОН групи флороглюцинолу зв'язуються з -NH групами білків бактерій, призводячи до інгібування. Крім того, вони можуть зв'язуватись із РНК та ДНК, що призводить до пригнічення реплікації, а також можуть модифікувати фосфотирозин, таким чином інактивуючи білок і реплікацію ДНК. Флоротаніни є найбільш ефективними проти грамнегативних бактерій, оскільки вони можуть зв'язуватися з товстим шаром пептидоглікану та ліпополісахаридів, які присутні у бактеріях, тим самим змінюючи проникність клітин [47].

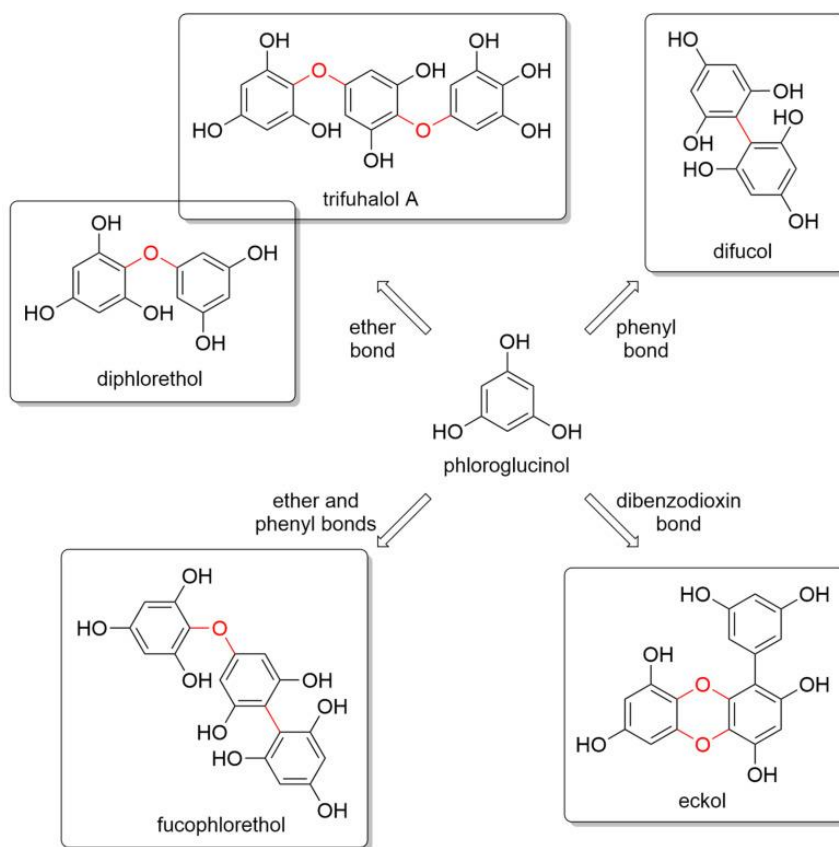


Рис. 1.3. Мономерна одиниця флороглюцинолу (у центрі) та деякі репрезентативні компоненти чотирьох основних класів флоротанінів відповідно до їхніх зв'язків, тобто фугалоли та флоретоли, фуколи, фукофлоретоли і флореколи [47].

Кілька досліджень показали, що флоротаніни пошкоджують стінку бактеріальної клітини, утворюючи отвори на зовнішній стороні клітини, погіршуючи такі функції бактерій, як проникність і дихання, знижуючи здатність клітини до регенерації та зрештою призводячи до загибелі клітини. Ці біоактивні сполуки можуть знижувати активність таких антиоксидантних ферментів як супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT) та глутатіон (GSH), порушуючи окисно-відновний гомеостаз і згодом індукуючи АФК-опосередковану загибель клітин. Однак на сьогодні точний механізм ще недостатньо вивчений (рис. 1.4.).

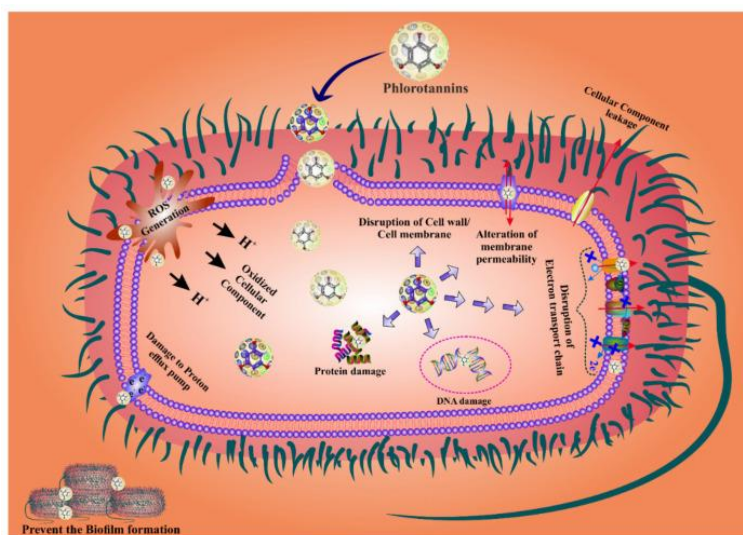


Рис. 1.4. Демонстрація антимікробної активності флоротанінів: загибель клітин через надмірний синтез активних форм кисню [47].

Протягом кількох десятиліть у науковій літературі повідомлялося про антибактеріальну активність багатьох флавоноїдами природних продуктів. В останні роки повідомлялося про наявність цих сполук серед водоростей, особливо багато їх накопичується у водоростей відділів *Rhodophyta* та *Phaeophyta*. Деякі види флавоноїдів, виділені з різноманітних організмів в лабораторіях, мали вражаючу антибактеріальну активність. Традиційне використання цих біоактивних сполук включає лікування та профілактику різних інфекційних та досить токсичних захворювань, таких як виразки, акне,

інфекції ран, шлунково-кишкові захворювання, респіраторні інфекції, та інфекції сечовивідних шляхів [36, 46].

Флавоноїди можуть зв'язуватися з розчинними білками, розташованими поза клітинами і зі стінками клітин бактерій, що сприяє утворенню комплексів. А також ці біологічно активні сполуки можуть діяти шляхом інгібування як енергетичного метаболізму, так і синтезу ДНК, а це в свою чергу впливає на синтез білків і РНК. У разі грампозитивних бактерій повідомлялося про зміну внутрішньоклітинного рН, а також про втручання у систему генерації енергії (АТФ).

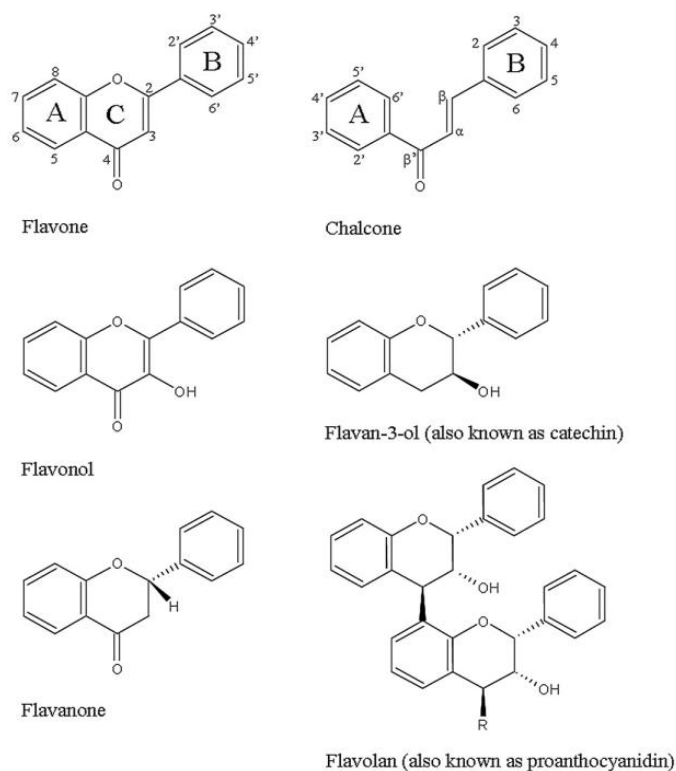


Рис. 1.5. Структури шести основних класів антибактеріальних флавоноїдів [16].

У сфері косметології все частіше з'являються лінійки лікувальної косметики, яка проявляє антивіковий, протибактеріальний та протизапальний ефект, а також допомагають позбутися слідів від акне. У лабораторіях таких фабрик розробляють екстракти водоростей, в яких, окрім фенольних сполук, міститься величезна кількість інших біологічно активних речовин, які у поєднанні створюють позитивний ефект при регулярному використанні [50].

Лікування більшої кількості інфекційних захворювань (таких як гонорея, пневмонія, сальмонельоз, туберкульоз тощо) стає проблемою у зв'язку із зниженням ефективності антибіотиків. Їхня стійкість призводить до тривалого перебування в лікарні, збільшення економічних витрат на охорону здоров'я та збільшення смертності.

Бактерії навчилися розвивати стійкість до антибіотиків за допомогою чотирьох основних механізмів:

- a) зміна клітинної проникності, щоб уникнути проникнення антибіотиків у клітини;
- b) модифікація молекулярних мішеней антибіотиків, щоб вони більше не могли діяти на них;
- c) ферментативна модифікація антибіотиків, щоб зробити їх неактивними;
- d) експресія ефлюксних насосів для викачування антибіотиків із клітинного середовища.

Ці фактори, що відповідають за резистентність, можуть бути внутрішніми або набутими через різні механізми [49].

Загалом механізми антибактеріальної дії фенольних сполук ще повністю не розшифровані, але відомо, що ці сполуки мають багато механізмів дії саме на клітинному рівні. Деякі автори пояснюють цю активність модифікацією проникності клітинних мембран, змінами різних внутрішньоклітинних функцій, викликаними водневим зв'язуванням фенольних сполук з ферментами, або модифікацією жорсткої клітинної стінки із втратою цілісності через різні взаємодії з клітинною мембраною. Тобто якщо посилити ліпофільні властивості фенолів, сприяючи їх взаємодії з клітинною мембраною, це посилить їхню протимікробну активність. Це може спричинити незворотні пошкодження цитоплазматичної мембрани та коагуляцію клітинного вмісту, що може призвести навіть до інгібування внутрішньоклітинних ферментів.

Одним із найважливіших і найбільш значущих механізмів протимікробної дії похідних фенолів є вплив на ефлюксні насоси бактерій. Ефлюксні насоси виконують функцію експорт, а також викликають розвиток резистентності до антибіотиків широкого спектра дії, тому що під час цього механізму антибактеріальний засіб екпортується швидше, ніж відбувається його дифузія в бактеріальні клітини та внутрішньобактеріальна концентрація не досягає ефективного значення.

При використанні деяких флавоноїдів із традиційними антибіотиками було помічено підвищення антимікробної дії проти ефлюксних насосів у *Staphylococci*. Серед поліфенолів повідомлялось, що галати катехіну змінюють резистентність до метицилін-резистентних *Staphylococcus aureus*. Деякі фенольні дитерпени підвищують дію антибіотиків, таких як тетрациклін та еритроміцин, проти штаму *S. aureus* [49].

На сьогодні найменше кандидатів на лікарські засоби виявлено саме серед природних об'єктів, особливо серед водних організмів, незважаючи на велику кількість опублікованих у літературі за кілька десятиліть робіт, що розглядають антибактеріальну, противірусну та протигрибкову активність метаболітів, отриманих із морських водоростей і безхребетних. Синергія природних речовин з антибіотиками може бути ефективною для посилення або відновлення антибіотиків, які наразі не є ефективними у боротьбі із захворюванням, викликаними мультирезистентними бактеріями. Було показано, що фенольні сполуки мають синергічний ефект із деякими антибіотиками. Такі комбінації поліфенолів з антимікробними засобами можуть полегшити або посилити його взаємодію з мішенню в клітині бактерій. Крім того, при використанні синергічних речовин можна зменшити токсичність препарату шляхом зменшення дози останнього. Дослідження встановили сильний синергічний ефект очищеного діеколу, виділеного із водорості *E. stolonifera*, з комерційними β -лактамними антибіотиками щодо метицилін-чутливого та метицилін-резистентного *S. aureus* [12]. Клінічні випробування та експерименти проведені *in vivo* демонструють справжній

потенціал сполук і обмеження, які необхідно подолати при розробленні лікарських форм препаратів.

Велика кількість патогенних мікроорганізмів спричиняє псування харчових продуктів, що призводить до скорочення терміну придатності і спричиняє харчові отруєння, якими щорічно хворіє до 30% населення розвинутих країн. Хімічні консерванти, які на сьогодні широко використовуються, можуть у деяких випадках призводити до розладів печінки і бути нейротоксичними або мутагенними. Тому перевага надається антиоксидантам і антимікробним консервантам природного походження. Цікавим є те, що антибактеріальна активність екстрактів вища, ніж у стандартного консерванту бензоату натрію (200 мг/мл). Екстракти водоростей *Gelidiella acerosa* та *Haligra sp.* були рекомендовані як антибактеріальні препарати проти *S. aureus*, який є поширеним збудником харчових токсикоінфекцій, які супроводжуються блювотою, діареєю та кишковими спазмами. Також ця бактерія здатна викликати псування молочних продуктів, салатів, креветок, шинки та м'яса, включаючи птицю. Екстракти даних водоростей проявляли не тільки антибактеріальну, але й антиоксидантну дію, що дозволяє використовувати їх як харчовий консервант.

Проти *Listeria monocytogenes*, яка є поширеним збудником захворювань різного ступеня тяжкості, пов'язаних із вживанням заражених харчових продуктів, також було встановлено протимікробний ефект у поєднанні флоротанінів з стрептоміцином або при додаванні чистого екстракту флоротанінів. Ця бактерія часто виявляється стійкою до антибіотиків і дезінфікуючих засобів і здатна утворювати біоплівки на їжі, тому важливо здійснювати пошук нових речовин, які будуть боротися із даним збудником [38].

В даний час стійкість до антибіотиків становить світову загрозу здоров'ю людей і тварин. Тому фенольні сполуки або їх синергетичні комбінації з іншими речовинами пропонують можливі оновлені рішення для боротьби з мікробною стійкістю до антибіотиків.

РОЗДІЛ II. Матеріали та методи дослідження

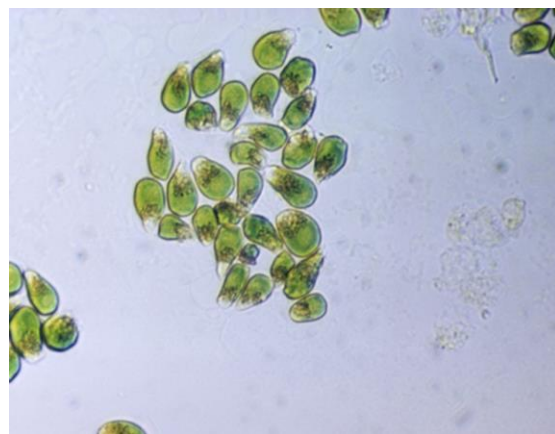
2.1. Матеріали дослідження

Серед неймовірної різноманітності водоростей, які володіють антимікробною активністю, найбільш перспективними вважаються водорості відділу *Chlorophyta*.

Серед них ми обрали *Chlorella vulgaris* – мікроводорість, яка живе як у солоній, так і прісній воді (рис. 2.1.). Вона набула широкого поширення завдяки швидкому накопиченню біомаси, високому адаптивному потенціалу, а також можливості пригнічувати ріст інших представників фітопланктону. Саме з цього виду виділили одну з найперших протимікробних сполук – хлорелін. Дану зелену мікроводорість шикоро використовують у якості харчових добавок, адже в ній присутня велика кількість флавоноїдів, які мають вітаміноподібні властивості, а також вона має хороші антиоксидантні та лікувальні властивості[33].



А



Б

**Рис. 2.1. Клітини зелених водоростей:
А - *Chlorella vulgaris*, Б - *Dunaliella viridis* [32, 33].**

Хлорелла містить різноманітні сполуки, зокрема, вважається, що її організму на 60% складається з білку. Іншими не менш важливими складовими її клітин є вуглеводи, жири, а також різноманітний спектр

фенольних сполук, вітамінів та мінералів. Дубильні речовини, які були виділені з *Chlorella vulgaris*, проявляють ранозагоювальну та протизапальну дію. Терпени, які також представляють групу фенольних сполук, можуть застосовуватись як вітровінні, спазмолітині та стимулюючі засоби із ефективною антисептичною властивістю [52].

Дослідженнями було встановлено, що *Chlorella vulgaris* здатна синтезувати протимікробні сполуки як у лабораторних, так і в промислових умовах, при вирощуванні на відкритому повітрі [33].

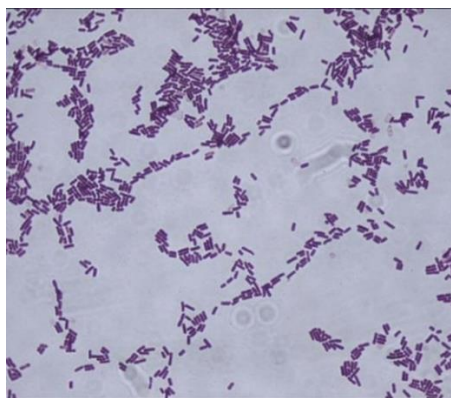
Незважаючи на різноманітну біологічну активність та користь для здоров'я, *Chlorella vulgaris* класифікується як харчовий засіб через відсутність офіційного законодавства щодо якості та вимог до мікроводоростей [58].

Цікавою та не менш ефективною у боротьбі з патогенними мікроорганізмами є мікроводорість *Dunaliella viridis* відділу *Chlorophyta*, яка демонструє дивовижний рівень адаптації до температури, солоності, інтенсивності освітлення та концентрації нітрогену. Такі характеристики роблять даний вид ідеальним кандидатом у якості модельного об'єкту. Даний продуцент здатний виробляти в природних умовах до 0,7% змішаних каротиноїдів (лютеїн, зеаксатин, інші оксигеновані каротиноїди та β -каротин), однак у лабораторних умовах цей відсоток можна значно підвищити.

Зелена водорість *Dunaliella* тривалий час була модельним організмом для вивчення реакції на абіотичний стрес, і її комерційне використання для виробництва β -каротину на сьогодні тільки розширюється. Окрім каротиноїдів, ця водорість має широкий спектр фенольних сполук, які можуть проявляти антимікробну дію [39].

Як тест-культури мікроорганізмів для проведення антимікробного скринінгу нами було обрано представників Гр (+), Гр (-) та еукаріотичних організмів (рис. 2.2.).

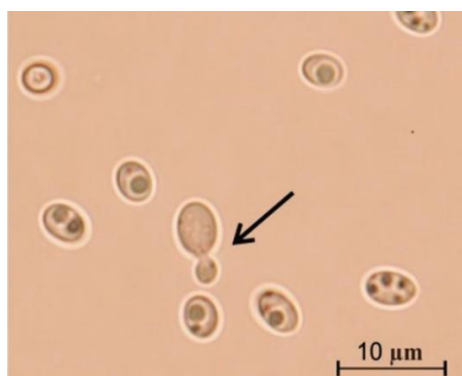
Серед грампозитивних було обрано бактерії *Bacillus subtilis* та *Sarcina flava*.



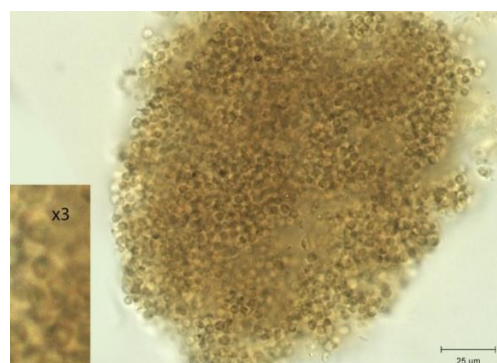
Bacillus subtilis



Sarcina flava



Rhodotorula minuta



Microcystis pulverea

Рис. 2.2. Мікрофотографії тест-культур мікроорганізмів, використані для проведення скринінгу антимікробної активності [20, 27, 31, 48].

Bacillus subtilis — це аеробна ґрунтова бактерія, одна з найбільш охарактеризованих серед грампозитивних бактерій, тому слугує основним модельним об'єктом, який широко використовується у різноманітних дослідженнях. Даний мікроорганізм зазвичай не виступає патогеном людини, однак інколи здатен викликати отруєння їжі токсинами. За несприятливих умов *B. subtilis* утворює спори, які виживають при високих температурах та тривалому нагріванні, тому часто залишаються в їжі після приготування. При проростанні спор у продуктах, бактерія викликає утворення слизького шару на поверхні продуктів, за що відповідають довгі полісахариди, які вона секретує. Після охолодження хліба, в борошні якого знаходились спори, у ньому розвивається картопляна хвороба — м'якуш хліба стає липким із специфічним кислуватим запахом [5].

Sarcina flava - рід грампозитивних коків родини *Clostridiaceae*. Вперше дана бактерія була помічена та зафіксована у вмісті шлунка пацієнта з блювотою [42]. У ветеринарній літературі описані численні випадки летальних захворювань, які пов'язані із цим організмом, а серед людей було задокументовано лише кілька випадків захворювання.

Сарцини є майже сферичними клітинами, діаметром від 1,8 до 3 мікрометрів і зустрічаються у вигляді тетрадів або пакетів по 8 або більше клітин. Відмітна морфологія пакетів і структура клітинної стінки цих бактерій були настільки незвичайними, що на початку досліджень сарцин вважалося, що вони є хвороботворними рослинними речовинами [20].

Із розвитком науки було встановлено, що *Sarcina* ймовірно можуть викликати серйозні захворювання у людей, оскільки ці організми здатні виділяти велику кількість газів, які викликають смертельний синдром здуття шлунка у тварин.

Серед представників еукаріотів було обрано *Rhodotorula minuta*. Цей мікроорганізм є одним з основних збудників грибкового езофагіту, що викликає гематемезис, менінгіту та інших захворювань.

Види *Rhodotorula* є всюдисущими сапрофітними дріжджами, які можна отримувати з багатьох джерел навколишнього середовища. Декілька досліджень зазначають, що ці мікроорганізми можна виділити навіть з різних екосистем, включаючи повітря, ґрунт, морську воду, рослини, молочні продукти, домашнє середовище та у місцях з несприятливими умовами. Також можливе зараження лабораторних зразків цим організмом. У людей види *Rhodotorula* були знайдені з культур шкіри, нігтів, дихальних, шлунково-кишкових і сечовивідних шляхів, і, як правило, вважаються комменсалами [55].

Представником грамнегативних бактерій було взято *Microcystis pulverea* – рід прісноводних ціанобактерій, які можуть виробляти нейротоксини і гепатотоксини, такі як ціанопептолін і мікроцистин. Також у джерелах було знайдено інформацію про їх згубний вплив на ендокринну систему. Вони

характеризуються дрібними клітинами, які часто утворюють колонії. *Microcystis* здатні утворювати великі поверхневі цвітіння за допомогою швидкого поділу та виробництвом газових бульбашок, що дозволяють їм локалізуватись на поверхні водойми [27].

2.2. Методи дослідження

Приготування МПА. Для приготування м'ясо-пептонного агару (МПА) використовували виготовлений промисловим способом сухий порошок фірми «HIMEDIA», який містить усі компоненти і характеризується стандартністю, стабільністю та простотою приготування. До його складу входять, г/л:

- гідролізат м'яса або риби – 17,9;
- пептон – 10,0;
- NaCl – 5,0;
- агар-агар – 20,0.

Готували поживне середовище так, як зазначено в інструкції. На 1000 мл дистильованої води додавали 28 г порошку [33].

Визначення антимікробної активності. Для визначення антимікробної активності культур водоростей *Dunaliella viridis* та *Chlorella vulgaris* використовували наступні культури тест-мікроорганізмів: *Bacillus subtilis*, *Sarcina flava* (грампозитивні), *Microcystis pulvereae* (грамнегативні) та *Rhodotorula minuta* (гриби) .

Чашку Петрі розділяли на сектори для внесення культур водоростей. У чашки Петрі заливали поживне середовище МПА. Після застигання на середовище вносили 100 мкл суспензії тест-культури мікроорганізмів і втирали у середовище за допомогою шпателя Дригальського. У лунки на кожному секторі вносили по 50 мкл культуральної рідини, біомаси або екстракту відповідної водорості.

Готові чашки витримували у термостаті 5 діб при температурі 37°C. Через 5 діб вимірювали діаметри зон затримки росту бактерій [60].

Визначення УФ-спектрів спиртових екстрактів зелених водоростей.

Для приготування спиртового екстракту відбирали культуральну рідину із клітинами водоростей, центрифугували 10 хв при 4000 об/хв. Зливали фугат в окрему пробірку. До біомаси та культуральної додавали по 5 мл 40%-го розчину етанолу. Залишали в темному місці на 5 діб.

Вимірювали оптичну густину розведених екстрактів на спектрофотометрі через кожні 5 нм у діапазоні від 200 нм до 400 нм.

На основі отриманих даних побудували графік [60].

Кількісне визначення поліфенольних сполук. Для визначення кількості поліфенолів 100 мкл екстракту переносили у градуйовану пробірку об'ємом 10 мл і доводили до мітки 96% етанолом. Вимірювали оптичну густину на спектрофотометрі при довжині хвилі 330 нм.

Кількість суми поліфенольних сполук вираховували через показник питомого вбирання хлорогенової кислоти за формулою:

$$X = \frac{D \times (\text{розведення})}{\text{хлор} \times (100 - б)}, \text{ де:}$$

X – сума поліфенольних сполук у мг/г сухої маси;

D – оптична густина досліджуваного розчину;

хлор – показник питомого вбирання хлорогенової кислоти;

б – вміст води в сировині у відсотках [60].

Визначення кількості гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту. Кількість гідроксикоричних кислот визначається через питомий показник хлорогенової кислоти. Для визначення кількості хлорогенової кислоти екстракт водоростей та культуральної рідини вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі 315 нм. Кількість

визначали за калібрувальним графіком. Як стандарт використовували хлорогенову кислоту виробництва фірми Aldrich Chem. Co., Швеція [60].

Визначення суми флавоноїдів. Для визначення кількості флавоноїдів 200 мкл екстракту поміщали у градуйовану пробірку об'ємом 10 мл, додавали 400 мкл 3%-го розчину AlCl_3 , 1 краплю 3%-го розчину CH_3COOH і доводили до мітки 5мл 96% етанолом. Через 15 хв вимірювали оптичну густину на спектрофотометрі при 490 нм. Як контроль використовували розчин, який містив 200 мкл дистильованої води, 400 мкл 3%-го розчину AlCl_3 , 1 краплю 3%-го розчину CH_3COOH і доводили до мітки 96% етанолом. Паралельно вимірювали оптичну густину розчину рутину, приготовленого аналогічно досліджуваному. Як розчин порівняння використовували етанол.

Вміст флавоноїдів у екстракті в перерахунку через питомий показник рутину визначали за формулою:

$$X = \frac{D \times (\text{розведення})}{D_0 \times (100 - б)}, \text{ де:}$$

D – оптична густина досліджуваного розчину;

D_0 – оптична густина розчину рутину;

$б$ – вміст води в сировині у відсотках [60].

Визначення поліфенолоксидазної активності. До 5 мг клітин водоростей додавали 0,1 М фосфатний буфер рН 7,0 і дезінтегрували за допомогою ультразвуку протягом 10 хв. Після чого суміш центрифугували при 4000 об/хв протягом 15 хв, супернатант переносили у пробірку. В кварцеві кювети фотоелектроколориметра додавали компоненти реакційної суміші в порядку: 2 мл супернатанту, 2 мл дистилату, 2 мл 0,5%-го розчину диметил-п-парафенілендіаміну. У кювету-контроль доливають 2 мл 0,01 Н розчину оксалатної кислоти. Після додавання усіх складових реакції включають секундомір. Кювети поміщають у фотоелектроколориметр і встановлюють

нульовий показник. Вимірювання проводять через 60 секунд після включення секундоміру.

Активність поліфенолоксидази визначали за формулою і виражали в умовних одиницях на 1 г сухої речовини:

$$A = \frac{E \times a \times k}{b \times t}, \text{ де}$$

A – активність ферменту;

a – відношення кількості рідини, взятої для приготування витяжки до маси сирої тканини;

b – товщина шару розчину у кюветі;

t – час (у секундах);

k – коефіцієнт перерахунку на суху біомасу клітин [60].

2.3. Статистична обробка результатів

Всі дослідження проводили у 4-х кратній повторюваності (n=4). Результати представлені як середнє значення M та відхилення від середнього значення m ($M \pm m$).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили згідно загальноприйнятих методів з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel. Відмінності отриманих результатів вірогідні при рівні значимості $p \leq 0,01$ за критерієм Ст'юдента.

РОЗДІЛ III. Результати досліджень та їх обговорення

Велика кількість синтетичних хімічних речовин, яка використовується для лікування людей, тварин, допомагають у боротьбі із різноманітними захворюваннями. Широке застосування цих сполук у світовій харчовій промисловості дозволяє усунути патогенні харчові мікроорганізми, а також запобігти псуванню продуктів. Але більшість цих речовин є досить токсичними, що виключає їх використання людиною. Такий суттєвий недолік змушує шукати альтернативні протимікробні сполуки з величезних природних ресурсів. Підвищення резистентності патогенних мікроорганізмів до лікарських препаратів викликає занепокоєння в усьому світі, що вимагає пошуку нових природних сполук з антибактеріальними властивостями. З кожним роком з'являється все більше публікацій про водоростей, які виступають потужним та багатим джерелом антимікробних агентів. Виявлення нових антимікробних засобів із природних ресурсів стає пріоритетним завданням біотехнології.

У природних місцях існування зелені водорості здатні пригнічувати розвиток супутньої мікрофлори, що стає приводом для прогнозування у них антимікробної активності. Тому нами проаналізовано здатність двох видів зелених водоростей *Dunaliella viridis* та *Chlorella vulgaris* пригнічувати ріст тест-культур мікроорганізмів. Скринінг здійснювали методом дифузії в агар.

Було відмічено, що чутливість тест-культур мікроорганізмів залежить від будови їх клітинної стінки. На рис 3.1. показано, що найбільшу антимікробну активність проявила і біомаса, і культуральна рідина *Chlorella vulgaris* до дріжджів *Rhodotorula minuta*, діаметр зони затримки росту становив 19,7 мм та 16,2 мм відповідно. Тоді як біомаса *Dunaliella viridis* (рис. 3.2.) викликала найбільші зони затримки росту щодо *Bacillus subtilis* – 20,4 мм, а культуральна рідина – щодо *Sarcina flava* (16,9 мм). В той же час грамнегативні мікроорганізми виявилися не чутливими до культуральної рідини обох водоростей, діаметр зони затримки росту не перевищував 7 мм.

Проводивши аналіз антимікробної активності спиртових екстрактів, у якості контролю було взято 40%-й розчин етанолу. Найбільш чутливою щодо екстрактів біомаси обох водоростей виявилася *Sarcina flava* - 25 мм до *Dunaliella viridis* та 20,6 мм до *Chlorella vulgaris*.

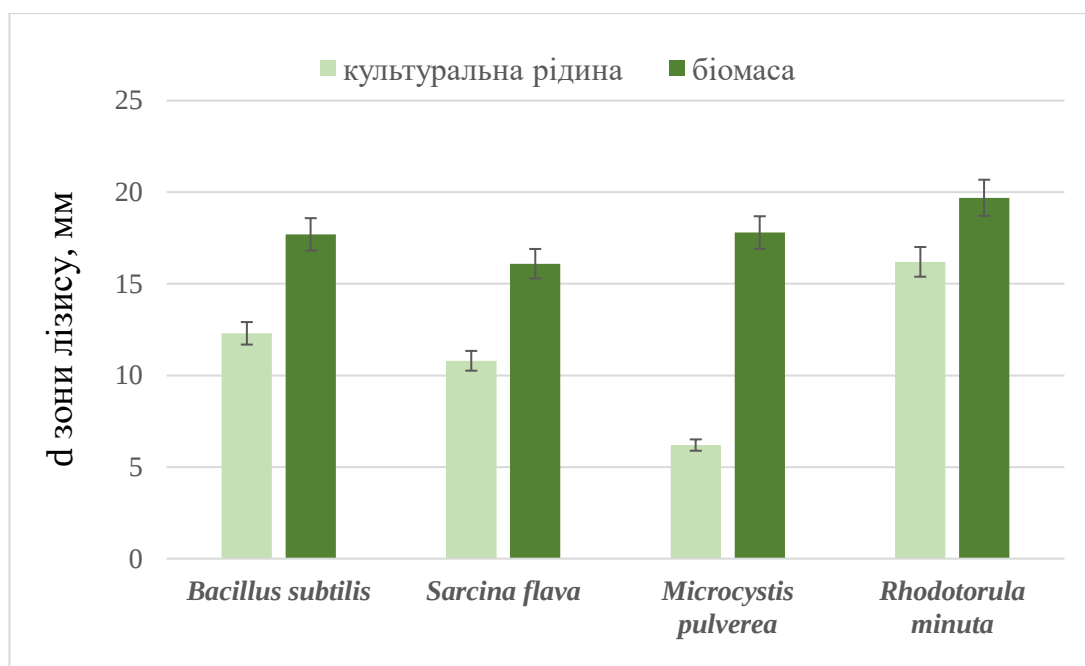


Рис. 3.1. Прояв антимікробної активності *Chlorella vulgaris*

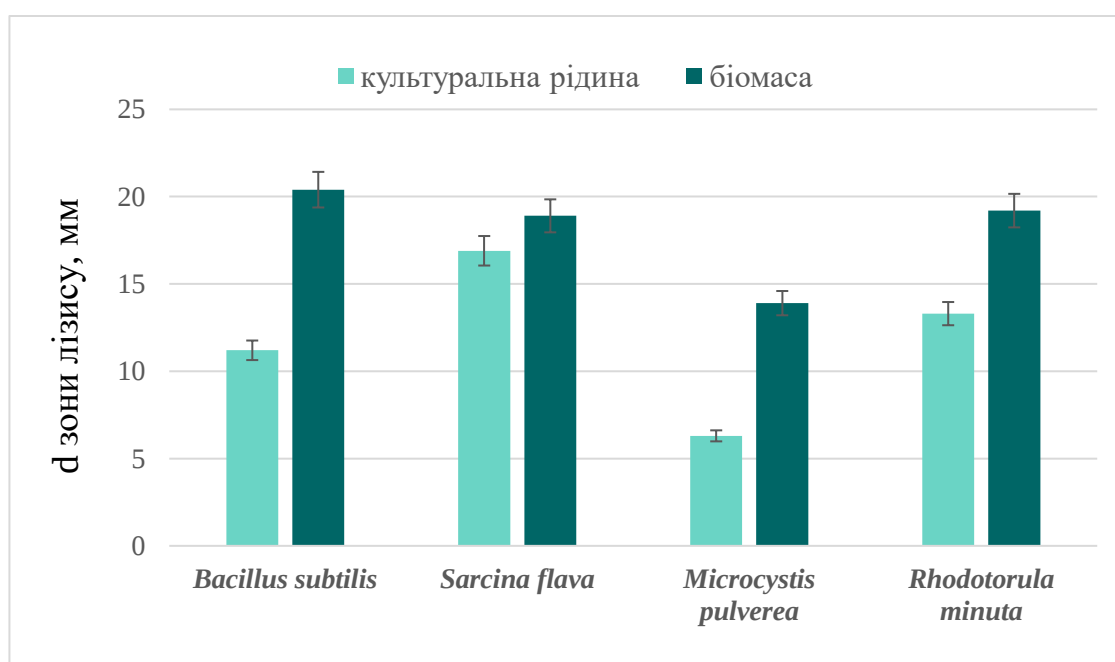


Рис. 3.2. Прояв антимікробної активності *Dunaliella viridis*

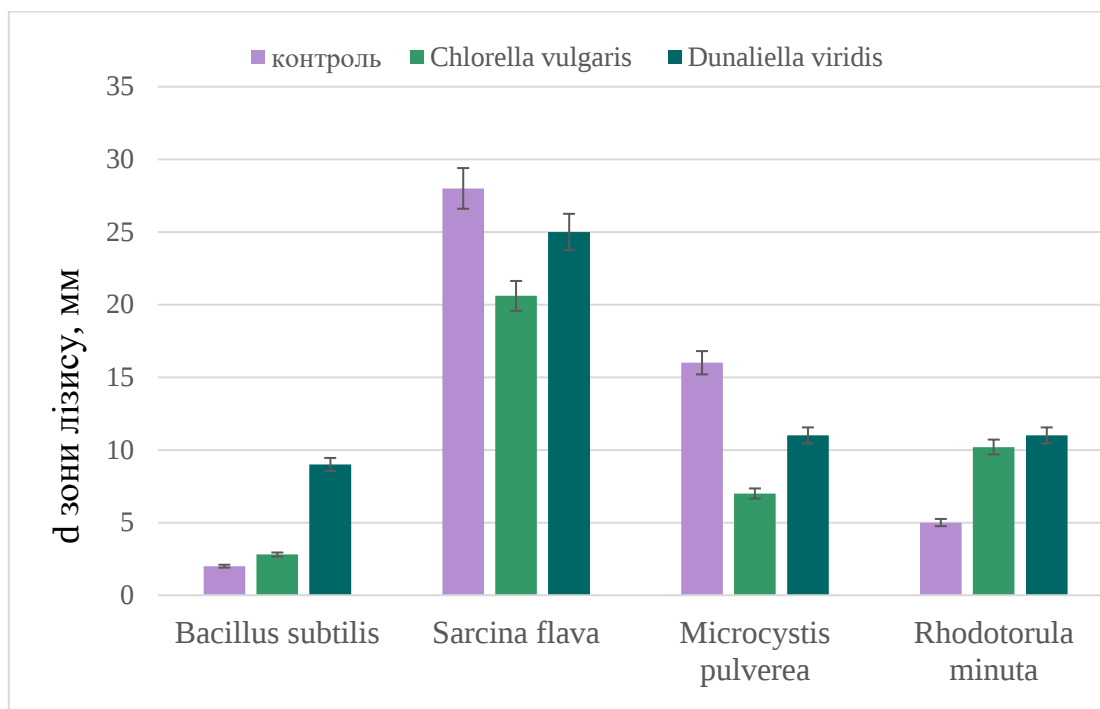


Рис. 3.3. Прояв антимікробної активності спиртових екстрактів біомаси зелених водоростей

Виявлена в ході дослідження антимікробна активність пов'язана з наявністю великої кількості біологічно активних сполук, особливо важливе місце займають фенольні сполуки, які в тій чи іншій мірі здатні пригнічувати ріст мікроорганізмів.

Отримані результати щодо скринінгу антимікробної активності культуральної рідини, біомаси та екстрактів біомаси зелених водоростей, спонукали нас провести вивчення їх біологічно активних сполук. Так, при проведенні спектрального аналізу культуральної рідини та спиртових екстрактів біомаси зелених водоростей, було знайдено різноманітні фенольні сполуки. Показано, що при різних довжинах хвиль відмічені піки найвищої оптичної активності (рис. 3.4., рис. 3.5.). У культуральній рідині *Dunaliella viridis* була встановлена присутність кумаринів, лактонів та флавоноїдів.

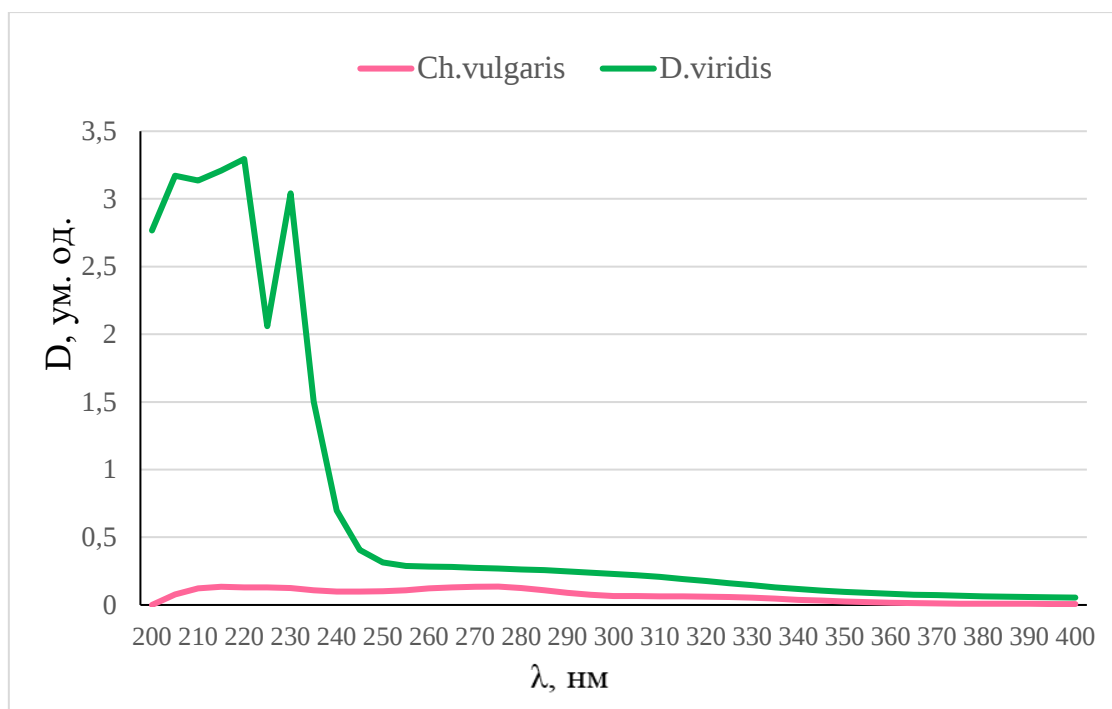


Рис. 3.4. Спектри поглинання БАР культуральної рідини *Chlorella vulgaris* та *Dunaliella viridis*

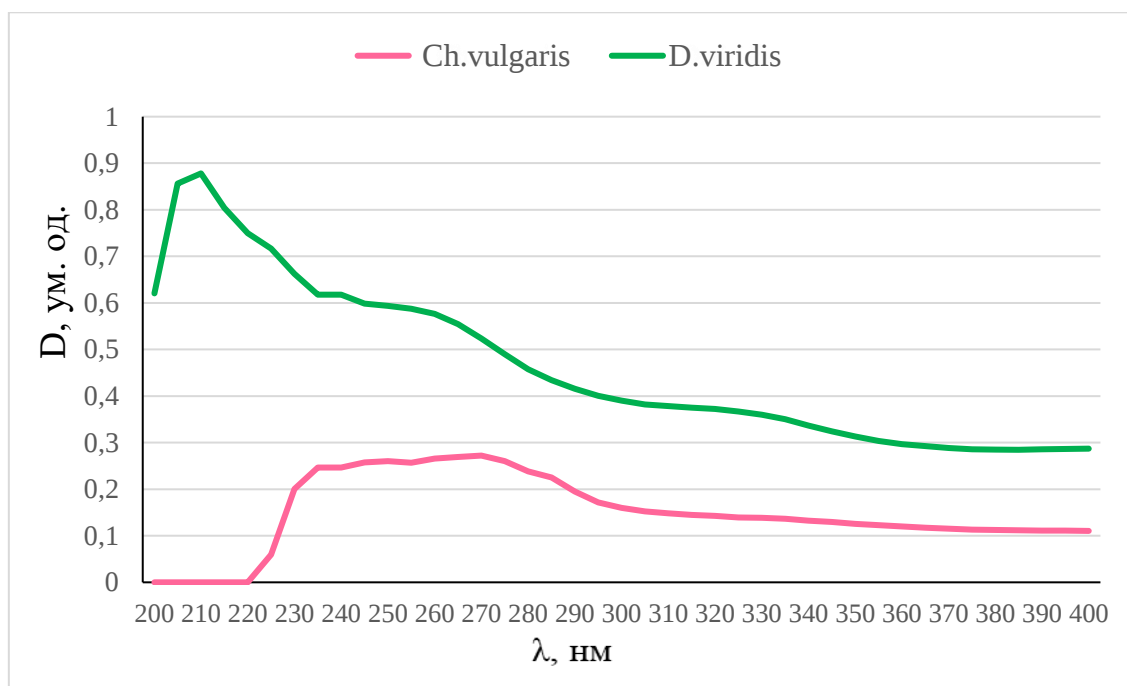


Рис. 3.5. Спектри поглинання БАР біомас *Chlorella vulgaris* та *Dunaliella viridis*

Водночас культуральна рідина *Chlorella vulgaris* містила у слідових кількостях флавоноїди. Зате спиртовий екстракт біомаси *Chlorella vulgaris* містив хлорогенову кислоту, азулени, кумарини, флавоноїди, зокрема халкони, флавоноли, флавонони та ін. У спиртовому екстракті біомаси

Dunaliella viridis була відмічена наявність кумаринів, оксикоричних кислот, азуленів, лактонів та флавоноїдів.

Поліфеноли – це сполуки, які в своєму складі мають дві і більше гідроксильних груп. Вони відіграють різноманітні ролі у життєвих циклах водоростей: від ранніх стадій розвитку до дорослого організму, включаючи ріст і розмноження, формування клітинної стінки, адгезію та запобігання поліспермії. В залежності від таксономічних, екологічних та екзогенних аспектів можуть бути відмінності у вмісті та складі фенолів у водоростях.

Було визначено, що сума поліфенолів в екстракті біомаси мікроводорості *Chlorella vulgaris* дорівнювала 12,4 мг/г, тоді як у культуральній – 0,8 мг/г (рис. 3.6.).

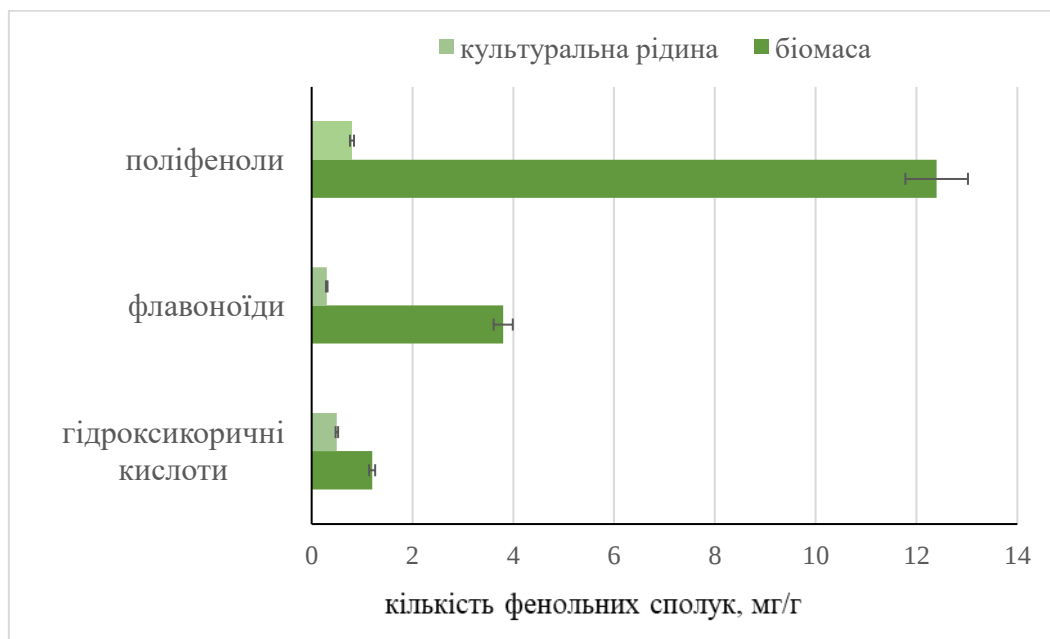


Рис. 3.6. Фенольні сполуки культуральної рідини та біомаси *Chlorella vulgaris*

У екстракті біомаси *Dunaliella viridis* кількість поліфенольних сполук становила 9 мг/г, що в 1,5 рази перевищувала такий у культуральній рідині і дорівнювала 6 мг/г (рис. 3.7.). Висока антимікробна активність цих сполук є перспективною основою для створення біологічних добавок, консервантів та навіть інноваційних фармацевтичних препаратів, які можуть стати як серйозною альтернативною традиційним протимікробним засобам, так і ефективним доповненням до антибіотикотерапії.

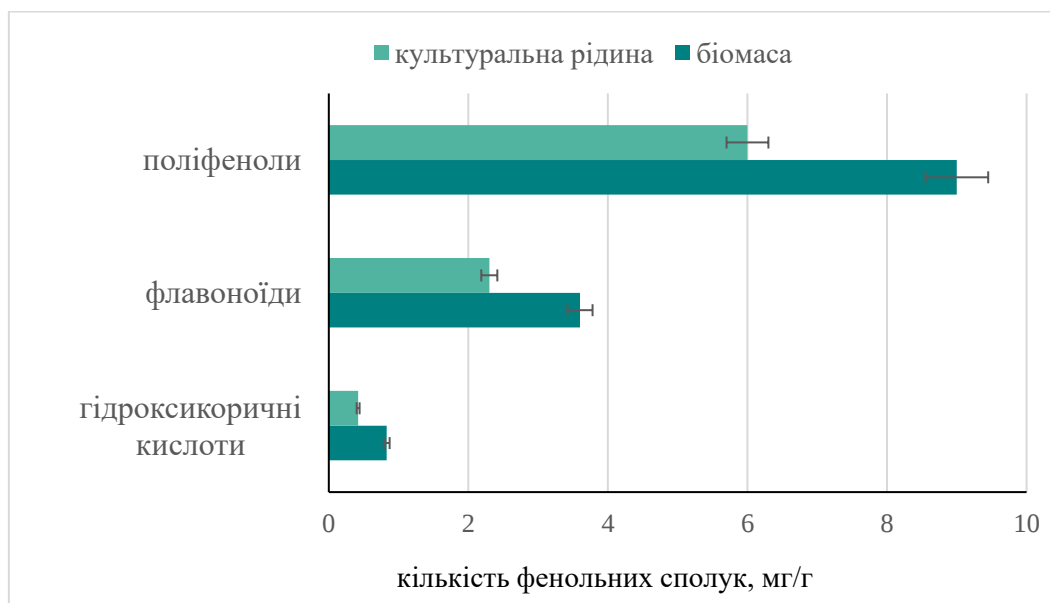


Рис. 3.7. Фенольні сполуки культуральної рідини та біомаси *Dunaliella viridis*

Гідроксикоричні кислоти – фенольні сполуки, які мають основний скелет С6-С3 (фенілпропаноїд). Як і для інших фенольних кислот, ці сполуки майже завжди зв'язані з малими або великими молекулами. При визначенні суми гідроксикоричних кислот використовували стандартні розчини хлорогенової кислоти, адже дана сполука вважається домінуючою серед гідроксикоричних кислот і тому може бути стандартом для перерахунку їхнього вмісту. Екстракти культуральної рідини та біомаси зелених водоростей вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі $\lambda=315$ нм. За калібрувальним графіком було визначено, що кількість гідроксикоричних кислот у спиртових екстрактах *Chlorella vulgaris* та *Dunaliella viridis* була наближеною. Вміст даних сполук у культуральній рідині *Chlorella vulgaris* дорівнював 0,5 мг/г, у біомасі – 1,2 мг/г, тоді як у *Dunaliella viridis* – 0,42 мг/г та 0,83 мг/г відповідно.

Флавоноїди — поліфенольні сполуки, що містять два ароматичних кільця, з'єднаних тривуглецевим містком (дифенілпропановий фрагмент С6-С3-С6). Флавоноїди містять широкий спектр біологічної активності, включаючи антибактеріальні, противірусні, протизапальні, протиалергічні, протипухлинні, антиоксидантні, що робить їх потенційними терапевтичними

засобами проти широкого різноманіття захворювань. Зі збільшенням поширеності невиліковних інфекцій, спричинених бактеріями, стійкими до антибіотиків, флавоноїди привертають великий інтерес, оскільки вони можуть посилювати дію традиційних антибіотиків. При проведенні спектрального аналізу було встановлено, що в біомасі *Chlorella vulgaris* сума флавоноїдів складала 3,8 мг/г, а у біомасі *Dunaliella viridis* – 3,6 мг/г. Культуральна рідина *Dunaliella viridis* містила 2,3 мг/г флавоноїдів, що виявилось більшим за вміст цих сполук у культуральній рідині *Chlorella vulgaris* – 0,3 мг/г.

Поліфенолоксидаза – фермент, який каталізує окислення одно-, дво- та багатоатомних фенолів до високореакційних хінонів. Даний ензим відіграє важливу роль у стійкості водоростей до абіотичних стресів, таких як сольовий стрес, важкі метали, ультрафіолетове випромінювання тощо, у фізіологічному метаболізмі, а також у боротьбі із патогенними мікроорганізмами. Поліфенолоксидаза здатна модифікувати білки, реагуючи з різними сполуками, включаючи аміно-, фенольні та меркаптогрупи, що призводить до зниження біодоступності клітинних білків і запобіганню поглинання поживних речовин мікроорганізмами [51].

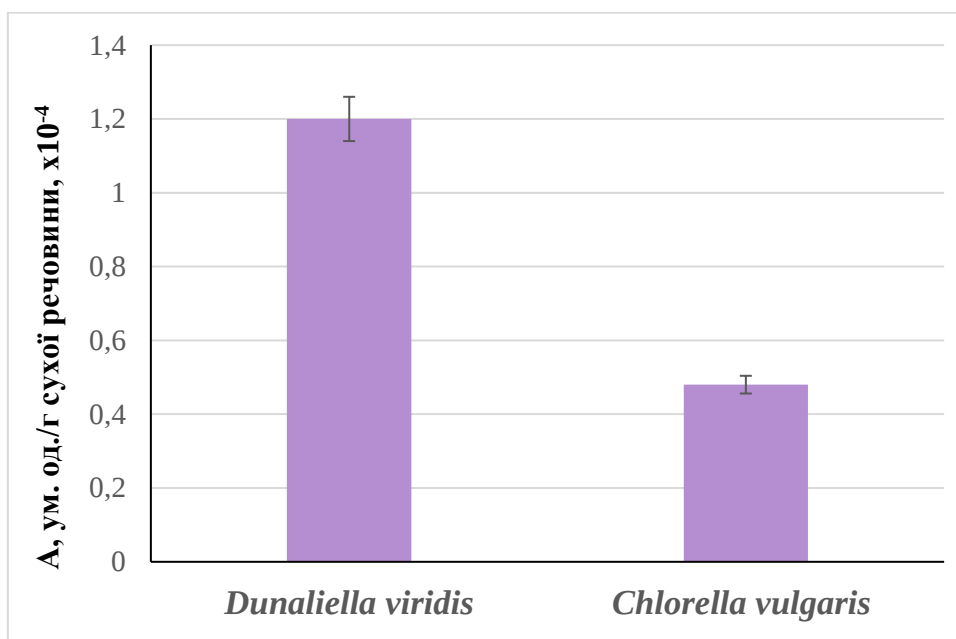


Рис. 3.8. Поліфенолоксидазна активність зелених мікроводоростей

Спектральним методом було встановлено, що активність поліфенолоксидази у клітинах водорості *Dunaliella viridis* дорівнювала $1,2 \cdot 10^{-4}$ ум.од./г сухої речовини, що значно перевищувала таку у *Chlorella vulgaris* і становила $0,48 \cdot 10^{-4}$ ум.од./г сухої речовини (рис. 3.8.).

Отримавши такі дані про вміст біологічно активних речовин у екстрактах біомаси зелених водоростей *Chlorella vulgaris* та *Dunaliella viridis*, можемо сказати, що ці види володіють досить високим протимікробним потенціалом.

Зелені водорості є невичерпним джерелом різноманітних сполук із широким спектром лікувальної цінності. Одними із надважливих сполук виділених з водоростей є саме фенольні сполуки, які вважаються хорошими антиоксидантами та мають виражені протівірусні, фунгіцидні та антибактеріальні властивості. Перевагою цих сполук є те, що вони навіть здатні пригнічувати ріст мультирезистентних бактерій, тим самим не викликаючи їхню стійкість, крім того їх можна використовувати у комплексі з іншими антибактеріальними засобами для синергічного ефекту. Також біологічно активні речовини водоростей можуть стати корисною добавкою до харчового раціону, що значно покращить обмін речовин, самопочуття, допоможе при великих фізичних та розумових навантаженнях. Вторинні метаболіти водоростей також можуть стати натуральними консервантами, що дозволяє продуктам збільшувати свій термін придатності та захищати від розвитку патогенних мікроорганізмів. Розробка нових препаратів на основі сполук водоростевого походження – новий крок у медицині, який допоможе у боротьбі із патогенними мікроорганізмами, які викликають захворювання різної складності, раковими пухлинами та багатьма іншими тяжкими хворобами, з якими ми стикаємося кожного дня.

ВИСНОВКИ

1. При проведенні скринінгу антимікробної активності культуральної рідини та біомаси зелених мікроводоростей *Chlorella vulgaris* та *Dunaliella viridis* було відмічено позитивний результат щодо грампозитивних бактерій та дріжджів. Для них діаметр зон затримки росту визначений у межах від 12 до 22 мм. Грамнегативні мікроорганізми виявилися не чутливими до культуральної рідини обох водоростей, діаметр зони затримки росту не перевищував 7 мм. В той же час, біомаса водоростей *Chlorella vulgaris* та *Dunaliella viridis* проявляла високий антимікробний ефект проти усіх тест-культур мікроорганізмів.

2. Проведений УФ-спектральний аналіз біологічно активних сполук спиртових екстрактів біомаси та культуральної рідини *Chlorella vulgaris* та *Dunaliella viridis* дав підстави визначити ключові класи фенольних сполук - гідроксикоричні кислоти (хлорогенова кислота), різні класи флавоноїдів.

3. Встановлений рівень накопичення флавоноїдів у біомасі як *Chlorella vulgaris*, так і *Dunaliella viridis* складав близько 4 мг/г сухої сировини. У культуральній рідині обох водоростей кількість флавоноїдів не перевищувала 2,5 мг/г. Кількість гідроксикоричних кислот була подібною для обох досліджуваних об'єктів і не перевищувала 1 мг/г сухої сировини. Максимальна сумарна кількість поліфенольних сполук зафіксована для біомаси *Chlorella vulgaris* і становила 12,4 мг/г сухої сировини.

4. Відмічений високий рівень поліфенолоксидазної активності ($1,2 \cdot 10^{-4}$ ум.од./г сухої сировини) для біомаси галофільної зеленої водорості *Dunaliella viridis*, що зумовлено специфічними умовами існування цієї водорості, високою кількістю фенольних сполук у складі її біомаси та може свідчити про високий адаптивний потенціал цієї водорості.

Список використаної літератури

1. Abu-Ghannam N., Rajauria G. Antimicrobial activity of compounds isolated from algae. *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. 2013. P. 287–306.
2. Adhoni S.A., Thimmappa S.C., Kaliwal B.B. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Chorella vulgaris* isolated from Unkal Lake. *J. Coast. Life Med.* 2016. Vol. 4(5). P. 368–373.
3. Afzal S., Yadav, A.K., Poonia, A.K. Antimicrobial therapeutics isolated from algal source: retrospect and prospect. *Biologia*. 2023. Vol. 78. P.291–305.
4. Aires A. Phenolics in Foods: Extraction, Analysis and Measurements. *In Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications*. 2017. P. 61–88.
5. Aizawa, S.-I.. *Bacillus subtilis* — The Representative of Gram-Positive Bacteria. *The Flagellar World*. 2014. P. 22–23.
6. Al-Katib Mira A., Amin Ayman S. Antibacterial activity of *Oscillatoria* ethanolic extract and extracted phenolic compounds. 2020.
7. Al-Saif S. S. A. Ilah, Abdel-Raouf N., El-Wazanani H. A., Aref I. A. Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddah coast of Red sea, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2014. Vol. 21(1). P. 57–64.
8. Alshuniaber M. A., Krishnamoorthy R., AlQhtani W. H. Antimicrobial activity of polyphenolic compounds from *Spirulina* against food-borne bacterial pathogens. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020. P. 200-206.
9. Andrade LM, Andrade CJ, Dias M, et al. *Chlorella* and *spirulina* microalgae as sources of functional foods, nutraceuticals, and food supplements; an overview. *MOJ Food Process Technol.* 2018. Vol.6(1). P. 45–58.
10. Andriopoulos, V.; Gkioni, M.D.; Koutra, E.; Mastropetros, S.G.; Lamari, F.N.; Hatziantoniou, S.; Kornaros, M. Total Phenolic Content, Biomass

Composition, and Antioxidant Activity of Selected Marine Microalgal Species with Potential as Aquaculture Feed. *Antioxidants*. 2022. Vol.11. P. 1320-1341.

11. Arguelles E. Proximate analysis, antibacterial activity, total phenolic content and antioxidant capacity of a green microalga *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*. 2018. Vol. 20. P. 150-158.

12. Besednova N. N., Andryukov B. G., Zaporozhets T. S., Kryzhanovsky S. P., Kuznetsova T. A., Fedyanina L. N., Zvyagintseva T. N. Algae Polyphenolic Compounds and Modern Antibacterial Strategies: Current Achievements and Immediate Prospects. *Biomedicines*. 2020. Vol. 8(9). P. 342-361.

13. Bouarab-Chibane L., Forquet V., Lantéri P., Clément Y., Léonard-Akkari L., Oulahal N., Bordes C. Antibacterial Properties of Polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) Models. *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol.10.

14. Bulut O., Akın D., Sönmez Ç., Öktem A., et al. Phenolic compounds, carotenoids, and antioxidant capacities of a thermo-tolerant *Scenedesmus* sp. (Chlorophyta) extracted with different solvents. *Journal of Applied Phycology*. 2019. Vol. 33. P. 2703-2712.

15. Cichoński J.; Chrzanowski G. Microalgae as a Source of Valuable Phenolic Compounds and Carotenoids. *Molecules*. 2022. Vol. 27. P. 8852-8873.

16. Cushnie T. P. T., Lamb A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2011. Vol. 38(2). P. 99–107.

17. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012. Vol. 23(2). P. 174–181.

18. De Jesus Raposo M.F., Bernardo de Moraes A.M., Santos Costa de Moraes R.M. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Marine Drugs*. 2015. Vol. 13(5). P. 2967–3028.

19. Devi K.P., Suganthi N., Kesika P., Pandian S.K. Bioprotective properties of seaweeds: In vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial

activity against food borne bacteria in relation to polyphenolic content. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2008. Vol. 8(1). P. 38–49.

20. DiMaio M. A., Park W. G., Longacre T. A. Gastric Sarcina organisms in a patient with cystic fibrosis. *Human Pathology: Case Reports*. 2014. Vol. 1(3). P. 45–48.

21. El Shoubaky G.A., El Rahman-Salem E.A. Active ingredients fatty acids as antibacterial agents from the brown algae *Padina pavonica* and *Hormophysa triquetra*. *Journal of Coastal Life Medicine*. 2014. Vol. 2(7). P. 535–542.

22. El-Sheekh M. M., Osman M. E. H., Dyab M. A., Amer M. S. Production and characterization of antimicrobial active substance from the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2006. Vol. 21(1). P. 42–50.

23. Elshobary M. E., El-Shenody R. A., Ashour M., Zabed, H. M., Qi, X. Antimicrobial and antioxidant characterization of bioactive components from *Chlorococcum minutum*. *Food Bioscience*. 2020.

24. Fang Y., Lu Y., Zang X., Wu T., Qi X., Pan S., Xu X. 3D-QSAR and docking studies of flavonoids as potent *Escherichia coli* inhibitors. *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6(1). P. 23634-23647.

25. Frazzini S., Scaglia E., Dell'Anno M., et al. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Algal and Cyanobacterial Extracts: An In Vitro Study. *Antioxidants*. 2022. Vol. 11. P. 992-1012.

26. Freile-Pelegrin Y., Robledo D. Bioactive phenolic compounds from algae. *Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources*. 2014. P. 113-129.

27. Gademann, K., Portmann, C., Blom, J. F., Zeder, M., Jüttner, F.. Multiple Toxin Production in the Cyanobacterium *Microcystis*: Isolation of the Toxic Protease Inhibitor Cyanopeptolin 1020. *Journal of Natural Products*. 2010. Vol. 73(5). P. 980–984.

28. Goiris K., Muylaert K., Fraeye I., et al. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenol-ic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology*. 2012. Vol. 24(6). P. 1477–1486.
29. Haoujar I., Cacciola F., Abrini J., et al. The Contribution of Carotenoids, Phenolic Compounds, and Flavonoids to the Antioxidative Properties of Marine Microalgae Isolated from Mediterranean Mo-rocco. *Molecules*. 2019. Vol.24(22). P. 4037-4054.
30. Heffernan N., Smyth T. J., Fitzgerald R. J., Soler-Vila A., Brunton N. Antioxidant activity and phenolic content of pressurised liquid and solid-liquid extracts from four Irish origin macroalgae. *International Journal of Food Science and Technology*. 2014. Vol. 49(7). P. 1765– 1772.
31. <https://www.algaebase.org/>
32. <https://www.nationalgeographic.org/activity/save-the-plankton-breathe-freely/>
33. Hussein J. H., J. Pharm. S. R.. Antibacterial properties of the Chlorella vulgaris isolated from polluted water in Iraq. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018. Vol. 10(10). P. 2457-2460.
34. Hussein, Z. Alhaddad A., Ahmead S..Improvement Properties of Self-Healing Concrete by Using Bacteria. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2019. Vol. 584.
35. Ibañez E., Cifuentes A. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013. Vol. 93(4). P. 703–709.
36. Jimenez-Lopez C., Pereira A.G., Lourenço-Lopes C., Garcia-Oliveira P., Cassani L., Fraga M., Prieto M.A., Simal-Gandara J.. Main bioactive phenolic compounds in marine algae and their mechanisms of action supporting potential health benefits. *Food Chemistry*. 2020. Vol. 341. P. 128262-128294.
37. Jun J.-Y., Jung M.-J., Jeong I.-H., Yamazaki K., Kawai Y., & Kim B.-M. Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Sulfated Polysaccharides from

Marine Algae against Dental Plaque Bacteria. *Marine Drugs*. 2018. Vol. 16(9). P. 301-314.

38. Kim H.J., Dasagrandhi C., Kim S.H., Kim B.G., Eom S.H., Kim Y.M.. In Vitro Antibacterial Activity of Phlorotannins from Edible Brown Algae, *Eisenia bicyclis* Against Streptomycin-Resistant *Listeria monocytogenes*. *Indian J Microbiol*. 2018. Vol.58(1). P. 105-108.

39. Kocberber Kilic, N., Erdem K., Donmez G. Bioactive Compounds Produced by *Dunaliella* species, Antimicrobial Effects and Optimization of the Efficiency. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2019. Vol. 19(11). P. 923-933.

40. Kokou F., Makridis P., Kentouri M., Divanach P. Antibacterial activity in microalgae cultures. *Aquaculture Research*. 2011. Vol. 43(10). P. 1520–1527.

41. Kumar R.R., Rao P.H., Subramanian V.V., Sivasubramanian V.. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant potentials of *Chlorella vulgaris* grown in effluent of a confectionery industry. *J Food Sci Technol*. 2014. Vol.51(2). No. 322-8.

42. Lam-Himlin D., Tsiatis A. C., Montgomery E., Pai, R. K., Brown, J. A., Razavi M., Anders R. A. Sarcina Organisms in the Gastrointestinal Tract. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2011. Vol. 35(11). P.1700–1705.

43. Li H., Cheng K., Wong C., Fan K., Chen F., Jiang Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*. 2007. Vol. 102(3). P. 771–776.

44. Marudhupandi T., Kumar T.T.A., Senthil L.S., Devi K.N. In vitro antioxidant properties of Fucoïdan fractions from *Sargassum tenerrimum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2014. Vol. 17(3). P. 402–407.

45. Panche A. N., Diwan A. D., & Chandra S. R. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. 2015. Vol. 5. P. 1-13.

46. Pina-Pérez M. C., Rivas A., Martínez A., Rodrigo D. Antimicrobial potential of macro and microalgae against pathogenic and spoilage microorganisms in food. *Food Chemistry*. 2017. Vol. 235. P. 34–44.

47. Pradhan B., Nayak R, Bhuyan P.P., Patra S., Behera C., Sahoo S., Ki J.S., Quarta A., Ragusa A., Jena M.. Algal Phlorotannins as Novel Antibacterial Agents with Reference to the Antioxidant Modulation: Current Advances and Future Directions. *Mar Drugs*. 2022. Vol. 20(6). P. 403-418.
48. Setiawan W., Wiyono S., Tondok E. T., Kanti A., Sudiana I M.. In Vitro Study of Action Mode of *Rhodotorula minuta* Dmg 16 BEP as Biocontrol Agents on *Alternaria solani*. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. Vol. 24, No 1.
49. Sharma A., Gupta V. K., Pathania R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *The Indian journal of medical research*. 2019. Vol. 149 (2). P. 129–145.
50. Silva A., Silva S.A., Carpena M., Garcia-Oliveira P., Gullón P., Barroso M.F., Prieto M.A., Simal-Gandara J.. Macroalgae as a Source of Valuable Antimicrobial Compounds: Extraction and Applications. *Antibiotics (Basel)*. 2020 Vol.10. No.642.
51. Sreenikethanam A., Raj S., J Rajesh B., Gugulothu P/, Bajhaiya A. K. Genetic Engineering of Microalgae for Secondary Metabolite Production: Recent Developments, Challenges, and Future Prospects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022. Vol.10.
52. Syed S., Arasu A., Ponnuswamy I. The Uses of *Chlorella Vulgaris* as Antimicrobial Agent and as a Diet: the Presence of Bio-active Compounds which Caters the Vitamins, Minerals in General. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology*. 2015. Vol. 7(1). P. 185–190.
53. Uyeno Y., Shigemori S., Shimosato T.. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. *Microbes Environ*. 2015. Vol. 30. No.2. P. 126-132.
54. Wang Y., Xing M., Cao Q., Ji A., Liang H., Song S. Biological Activities of Fucoidan and the Factors Mediating Its Therapeutic Effects: A Review of Recent Studies. *Marine Drugs*. 2019. Vol. 17(3). P. 183- 195.
55. Wirth F., Goldani L.Z.. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2012. Vol. 2012. P. 465717-465724.

56. Yuan Q., Li, H., Wei Z., Lv K., Gao C., Liu Y., Zhao L. Isolation, structures and biological activities of polysaccharides from *Chlorella*: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. Vol. 163. P. 2199-2209.
57. Zhang S. Recent Advances of Polyphenol Oxidases in Plants. *Molecules*. 2023. Vol. 28(5). P. 2158-2174.
58. Zielinski D., Fraczyk J., Debowski M., et al. Biological Activity of Hydrophilic Extract of *Chlorella vulgaris* Grown on Post-Fermentation Leachate from a Biogas Plant Supplied with Stillage and Maize Silage. *Molecules*. 2020. Vol. 25, No 8. P. 1790-1808.
59. Михайленко Н. Ф. Поліненасичені жирні кислоти водоростей: властивості та перспективи застосування. *Науковий часопис НПУ М. П. Драгоманова*. 2016. Вип. 53. С. 176-183.
60. Мусієнко М.М., Паршикова Т.В., Славний П.С. Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин. К. Фітосоціоцентр, 2001. - 200с.

ДОДАТКИ

Додаток А**Правила роботи в біотехнологічній лабораторії**

При проведенні робіт у біотехнологічній лабораторії потрібно ретельно дотримуватись вимог, наведених в інструкції з техніки безпеки. Якщо студент не ознайомлений з зазначеними вимогами, він повинен повідомити про це викладача.

Студент несе персональну відповідальність за власну безпеку під час виконання експериментальних робіт у лабораторії, що підтверджено його особистим підписом у журналі з техніки безпеки.

У лабораторію забороняється входити у верхньому одязі. Усі студенти повинні працювати в чистих бавовняних халатах, які мають бути застебнуті на всі гудзики. Волосся необхідно прибрати з обличчя та сховати під шапочку. У лабораторії кожен працює на постійному місці та виконує завдання індивідуально. На робочому місці потрібно підтримувати зразковий порядок.

Під час виконання лабораторної роботи категорично забороняється користуватися мобільними телефонами та залишати їх увімкненими. У лабораторії забороняється вживати їжу та напої.

До роботи у біотехнологічній лабораторії не допускаються студенти, які мають пошкодження на відкритих ділянках шкіри, не оброблені та не заклеєні бактерицидним пластиром.

Працюючи з відкритим полум'ям (газовий пальник, спиртівка), потрібно дотримуватися таких вимог: запалювати спиртівку та газовий пальник лише за допомогою сірника, гасити запалену спиртівку потрібно, закривши доступ повітря спеціальним ковпачком, а газовий пальник – перекриттям доступу газу. Розташовувати спиртівку потрібно на відстані не менш, ніж 20 см від краю робочого стола. У разі випадкового займання ватно-марлевого корка необхідно терміново загасити його, закривши доступ повітря.

Під час роботи з живими культурами мікроорганізмів необхідно слідкувати за наявністю запобіжних ватних тампонів у піпетках та ватномарлевих корків у пробірках. У випадку потрапляння мікробного матеріалу на відкриті ділянки шкіри, стіл чи підлогу це місце треба ретельно обробити дезінфікувальним розчином та ретельно промити водою.

Роботу у мікробіологічному боксі дозволено проводити лише за проходження додаткового інструктажу з техніки безпеки, наявності відповідного захисного одягу (халат, шапочка, захисна маска та захисні окуляри).

Категорично забороняється заходити у бокс за увімкненої бактерицидної лампи.

Всі предмети, використані у роботі з живими мікроорганізмами, мають бути знезаражені фламбуванням (петлі, голки), кип'ятінням (пробірки, чашки Петрі), обробленням дезінфікувальними розчинами (шпателі, піпетки, предметні й накривні скельця). Забороняється користуватися скляним посудом, що має сколи, тріщини, гострі краї.

У лабораторії необхідно дотримуватися обережності під час роботи з хімічними речовинами. При потребі (робота з концентрованими хімічними речовинами) потрібно використовувати засоби індивідуального захисту (рукавички, респіратори, гумовий фартух, захисні окуляри). У процесі розведення концентрованої кислоти необхідно кислоту вносити у розчинник, а не навпаки. У випадку потрапляння будь-яких хімічних речовин на шкіру необхідно змити реактив великою кількістю води; нейтралізувати кислоту необхідно слабким розчином соди, а луг – слабким розчином оцтової кислоти.

Роботу з концентрованими та леткими хімічними речовинами необхідно проводити під витяжною шафою.

Необхідно суворо дотримуватися вимог електробезпеки. Забороняється користуватися несправним електрообладнання і вмикати прилади без дозволу викладача або лаборанта, а також торкатися поверхні приладу мокрими руками.

Після закінчення роботи студент повинен упорядкувати робоче місце, руки необхідно ретельно вимити, а за потреби обробити дезінфікувальним розчином. Слід мати індивідуальний рушник або серветки для витирання рук.

Публікації за результатами дослідження