

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ, ІНЖЕНЕРІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЙ
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач випускової кафедри

_____ М. М. Барановський

«__» _____ 2020 р.

ДИПЛОМНА РОБОТА

(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)

ВИПУСКНИКА ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

ЗА СПЕЦІАЛЬНІСТЮ 162 «БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ»

Тема: «Спектр вторинних мікроміцетів у комплексах мікроміцетів *Septoria* і
Ramularia»

Виконавець: студентка 205-м ФЕБІТ

Ковальчук Ю.М.

Керівник: к.б.н., доцент кафедри біотехнології

Андріанова Т.В.

Консультант розділу «Охорона праці» :

Павлиш В.Д.

Консультант розділу

«Охорона навколишнього середовища» :

Рябчевський О.В.

Нормоконтролер:

Дражнікова А.В.

КИЇВ 2020

НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Спеціальність: 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач випускової кафедри

_____ М.М.Барановський

«___» _____ 2020 р

ЗАВДАННЯ

на виконання дипломної роботи

Ковальчук Юлія Миколаївна

1. Тема роботи «Спектр вторинних у комплексах мікроміцетів *Septoria* і *Ramularia*» затверджена наказом ректора від «15» вересня 2020 р. № 1657/ст.
2. Термін виконання роботи: з 5 жовтня по 23 грудня 2020 р.
3. Вихідні дані роботи: власні експериментальні дані, зроблені на базі лабораторії кафедри біотехнології НАУ; рослини надані Інститутом ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України.
4. Зміст пояснювальної записки: ВСТУП; РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД; РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ; РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ; РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ; РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА; ВИСНОВКИ; СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.
5. Перелік обов'язкового графічного (ілюстративного) матеріалу: 8 таблиц, 14 рисунки.
6. Календарний план-графік

№ з/п	Завдання	Термін виконання
1	Вибір теми дипломної роботи, узгодження змісту з дипломним керівником	13.09.19-15.09.20
2	Літературний огляд та збір інформації за темою дипломної роботи	14.09.19-28.09.20
3	Ознайомлення з методикою постановки експерименту на базі проходження переддипломної практики.	28.09.19-01.10.20
4	Проведення експерименту на базі проходження переддипломної практики. Аналіз та обробка отриманих даних.	10.10.20-29.11.20
5	Оформлення практичної частини дипломної роботи на основі отриманих результатів.	30.11-04.12.20
6	Перевірка дипломної роботи керівником	06.12.20
7	Попередній захист дипломної роботи.	09.12.20
8	Захист дипломної роботи	22.12.20

7. Консультація з окремого(мих) розділу(ів):

Назва розділу	Консультант (посада, П.І.Б.)	Дата, підпис	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Охорона праці			
Охорона навколишнього середовища			

8. Дата видачі завдання: « _____ » _____ 2020 р.

Керівник дипломної роботи _____ Андріанова Т.В.

Завдання прийняла до виконання _____ Ковальчук Ю.М.

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Спектр вторинних у комплексах мікроміцетів *Septoria* і *Ramularia*»: с.80, табл.60, рис.34, літературних джерел.81

Мета роботи: Вивчити асоційовані мікроскопічні гриби рослин *Urtica dioica* L. і *Stachys officinalis*, а також порівняти вміст метаболітів, а саме флавоноїдів та азотистих речовин у досліджених рослинах і виділених з них мікосферелоїдних грибів.

Для досягнення поставленої мети були поставлені такі **завдання**:

1. Проаналізувати стан досліджень хімічних сполук, які можуть використовуватися в фармацевтичній біотехнології, що є метаболітами лікарських рослин (кропива та хрін) та охарактеризувати пов'язані з ними у своєму розвитку мікосферелоїдні гриби, як потенційні продуценти цих речовин.

2. Виділити мікроскопічні гриби *Ramularia urticae* та *Septoria stachydi* в чисту культуру та наростити міцеляльну масу для подальших дослідів.

3. Визначити та порівняти вміст флавоноїдів і азотистих речовин у лікарських рослинах - кропиві дводомній (*Urtica dioica*) і чистецю (*Stachys officinalis*), а також у грибах (*Ramularia urticae* та *Septoria stachydi*), що розвиваються в їх тканинах.

Об'єкт дослідження: аналіз кількісного і якісного вмісту речовин з групи флавоноїдів і азотистих речовин *Urtica dioica* L. і *Stachys officinalis* та виділених в чисту культуру мікроскопічних грибів..

Предмет дослідження: *Urtica dioica* L. і *Stachys officinalis* та асоційовані з ними гриби (*Ramularia urticae* та *Septoria stachydi*).

Методи дослідження: мікробіологічні, фізико-хімічні, аналітичні, статистичні.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	
1.1. Короткі теоретичні відомості про алкалоїди та флавоноїди.....	
1.2. Загальна характеристика <i>Urtica dioica</i> та <i>Stachys officinalis</i>	
1.3. Біологічні властивості ендоефітних грибів.....	
1.4. Характеристика <i>Ramularia urticae</i> Ces.....	
1.5. Характеристика <i>Septoria stachydis</i>	
1.6. Висновки до розділу.....	
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	
2.1. Відбір проб.....	
2.2. Виділення грибів з <i>Septoria Stachydis</i> та <i>Ramularia urticae</i>	
2.3. Методи визначення флавоноїдів.....	
2.4. Методи визначення алкалоїдів.....	
2.5. Висновки до розділу.....	
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	
3.1. Мікроскопічне дослідження грибів.....	
3.2. Вміст алкалоїдів та флавоноїдів.....	
3.3. Висновки до розділу.....	
РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ.....	
4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори при дослідженні мікроміцетів <i>Septoria</i> і <i>Ramularia</i>	
4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів при дослідженні мікроміцетів <i>Septoria</i> і <i>Ramularia</i>	
4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки при дослідженні мікроміцетів <i>Septoria</i> і <i>Ramularia</i>	
4.4. Висновки до розділу.....	
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА.....	

5.1. Функціональна класифікація біологічно-активних речовин.....	
5.2. Реакція вторинних метаболітів рослин на фактори навколишнього середовища.....	
5.3. Висновки до розділу.....	
СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	

ВСТУП

Актуальність. Рослини містять велику кількість вторинних метаболітів (флаваноїди, дубильні речовини, таніни, азотисті речовини, олії, смоли, поліфруктани), які активно використовуються в біотехнології, фармацевтичній та агропромисловості, але на даний момент метод вирощування рослин для отримання необхідних речовин є економічно не вигідним, тому що має багато недоліків. Пошук альтернативних шляхів отримання метаболітів є дуже важливим, бо він дозволить вирішити проблеми пов'язані з вирощуванням та виділенням речовин з рослинної сировини.

Ендофітний гриб має багате джерело вторинних метаболітів, які діють як біологічно активний агент у вищих рослинах. Похідні грибів відіграють життєво важливу роль у житті людини, і їх сполуки є джерелом ліків від раку, мікробних та вірусних захворювань. Природні сполуки з ендофітів діють як інгібітори росту патогенного рослинного організму. Ендофіти є багатими джерелами природних продуктів, які використовуються в сільському господарстві (ріст рослин та інсектициди), фармацевтичній промисловості, а також використовуються для фітореMediaції. Ендофіти приносять користь рослині-господареві, запобігаючи заселенню патогенних організмів. Він був класифікований на дві основні групи (цвілевий та неклавічний) на основі відмінностей в еволюції, систематиці, рослинні-хазяїні та екологічних функціях. Клавіпітатні здатні заражати лише деякі види трав, а неклавіцитатні - у безсимптомних тканинах інших вищих рослин. Це стимулює ріст рослин, підвищує стійкість до хвороб, покращує здатність рослин протистояти стресам навколишнього середовища та переробляти поживні речовини. Ендофіти є багатим джерелом вторинних метаболітів, що мають багаторазове значення.

Порівняно з іншими ендофітними мікроорганізмами, грибкові ендофіти виробляють велику кількість вторинних активностей. Ендофіти, виділені з лікарських рослин, мають сильні фунгіцидні, бактерицидні та цитотоксичні метаболіти. Він виробляє ферменти, які використовуються для різних застосувань,

таких як деградація та біотрансформація органічної сполуки. Похідні ендоефітів використовуються в біотехнологічних цілях. Він має широке значення у фармацевтичній науці завдяки своїй протимікробній, протипухлинній та протівірусній активності.

Мікроскопічні гриби є продуцентами біологічно активних речовин, тому їх культивування з метою виділення даних речовин є перспективними в наш час, тому що гриби характеризуються доступністю та різноманітністю своїх метаболітів. Однак, такі гриби мало вивчені в Україні та світі, хоча у їхньому використанні є великий потенціал.

Мета роботи: Вивчити асоційовані мікроскопічні гриби рослин *Urtica dioica* L. і *Stachys officinalis*, а також порівняти вміст метаболітів, а саме флавоноїдів та азотистих речовин у досліджених рослинах і виділених з них мікосферелоїдних грибів.

Для досягнення поставленої мети були поставлені такі **завдання**:

1. Проаналізувати стан досліджень хімічних сполук, які можуть використовуватися в фармацевтичній біотехнології, що є метаболітами лікарських рослин (кропива та хрін) та охарактеризувати пов'язані з ними у своєму розвитку мікосферелоїдні гриби, як потенційні продуценти цих речовин.

2. Виділити мікроскопічні гриби *Ramularia urticae* та *Septoria stachydi* в чисту культуру та наростити міцеляльну масу для подальших дослідів.

3. Визначити та порівняти вміст флавоноїдів і азотистих речовин у лікарських рослинах - кропиві дводомній (*Urtica dioica*) і чистецю (*Stachys officinalis*), а також у грибах (*Ramularia urticae* та *Septoria stachydi*), що розвиваються в їх тканинах.

Об'єкт дослідження: аналіз кількісного і якісного вмісту речовин з групи флавоноїдів і азотистих речовин *Urtica dioica* L. і *Stachys officinalis* та виділених в чисту культуру мікроскопічних грибів..

Предмет дослідження: *Urtica dioica* L. і *Stachys officinalis* та асоційовані з ними гриби (*Ramularia urticae* та *Septoria stachydi*).

Методи дослідження: мікробіологічні, фізико-хімічні, аналітичні, статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше було вибрано для досліджень мікроскопічні гриби *Ramularia urticae* та *Septoria stachydi*, як потенційних продуцентів біологічно активних речовин; було виділено і накопичено культуру мікроскопічних грибів *Ramularia urticae* та *Septoria stachydi*.

Практичне значення отриманих результатів. В роботі показаний альтернативний шлях отримання флаваноїдів та алкалоїдів для подальшого використання на фармацевтичному підприємстві.

Особистий внесок випускника. Весь обсяг експериментальних досліджень за темою дипломної роботи, аналіз літературних даних, статистична обробка результатів, їх опис. Експериментальна частина виконана випускником на базі Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України; в департаменті мікології.

РОЗДІЛ 1

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Короткі теоретичні відомості про алкалоїди та флавоноїди

Біологічно активні речовини - це неорганічні й органічні сполуки, загальною особливістю яких є висока активність в невеликих кількостях. До біологічно активних речовин відносяться низькомолекулярні (наприклад, вітаміни, алкалоїди) і високомолекулярні сполуки (наприклад, ферменти, білкові гормони) [1 м р].

Спільною рисою є висока активність в невеликих кількостях. Більшість біологічно активних речовин відносяться до продуктів вторинного метаболізму, враховуючи первинні білки, ліпіди і вуглеводи. Вони не виконують ні будівельних, ні енергетичних функцій, а забезпечують зміну швидкості метаболізму, адаптуючи організм до змін навколишнього середовища і захищаючи його від несприятливих впливів. До біологічно активних речовин відносяться ферменти, гормони, фітогормони, вітаміни, фітонциди, алкалоїди, феромони, антибіотики та інші [2 м р].

Алкалоїди – це група органічних нітрогеновмісних речовин, рослинного походження, що мають основний характер та високий вплив на фізіологію організму людини і тварин. Алкалоїди утворюються внаслідок вторинного метаболізму речовин. Алкалоїди є продуктами нітрогенного обміну у рослинах і класифіковані за хімічним принципом – наявності в молекулі атома нітрогену [1].

Більшість алкалоїдів за хімічною будовою є похідними різноманітних нітрогеновмісних гетероциклів і належать до третинних амінів [2].

Алкалоїди накопичуються у тканинах різних типів: у тих, що активно ростуть; в епідермальних та гіподермальних; в обкладці судинних пучків; у латексних судинах[1].

Зазвичай рослина містить суміш декількох алкалоїдів, інколи до 15-20, як правило, схожих за структурою. При сушінні та зберіганні рослинної сировини всієї алкалоїдів може змінюватись. Швидке або повільне висушування призводить до

зменшення кількості алкалоїдів. Вологість приміщень негативно впливає на кількість алкалоїдів.

У рослинах алкалоїди зустрічаються розчиненими в клітинному соку у вигляді солей органічних кислот – щавлевої, оцтової, молочної, яблучної, винної, лимонної, янтарної; або специфічних для певної рослини – аконітової, хелідонової, хінної та ін., а також солей мінеральних кислот – хлороводневої, сірчаної, фосфорної, роданистоводневої. Солеутворення відбувається лише по одному атомі азоту в молекулі алкалоїду. Дуже рідко в рослинах алкалоїди зустрічаються у вигляді N-оксидів і вільних основ [3].

Механізми дії деяких алкалоїдів на організм людини добре вивчені. Ці речовини діють на специфічні рецептори або впливають на активність ферментів. Алкалоїди досить сильно впливають на активність ферментів. Дія деяких з них пов'язана з індукцією або зниженням активності ензимів. Наприклад, фізостигмін, неостигмін та інші антихолінестеразні засоби знижують активність ацетилхоліну. Алкалоїди-аналептики безпосередньо або рефлекторно збуджують життєво важливі центри довгастого мозку, їх застосовують при станах, що пов'язані з пригніченням ЦНС, при асфіксії, колапсі, серцевій недостатності тощо [1].

Також алкалоїди є головною діючою речовиною ряду пестицидів та інсектицидів. використання яких має явні переваги над класичними хімічними речовинами захисту рослин та знижує забруднення довкілля. Флавоноїди – це біологічно активні речовини, в основі яких лежить дифенілпропановий фрагмент, із загальною формулою $C_6 - C_3 - C_6$. Назва походить від латинського слова *flavus* – жовтий, тому що перші виділені флавоноїди мали жовте забарвлення [3]. Молекула флавоноїда складається з двох фенольних залишків (кільця А і В), з'єднаних пропановою ланкою, тому їх можна розглядати як похідні фенілпропаноїдів [1].

Флавоноїди містяться мало не в усіх рослинах, зустрічаються у мікроорганізмах та у комах. Найбагатші на флавоноїди родини *Fabaceae*, *Polygonaceae*, *Asteraceae*, *Rosaceae*. Накопичуються вони здебільшого в квітках, листках, менше – в стеблах, кореневищах, коренях. Вміст їх коливається від 0,1 до 20 % і змінюється залежно від фази вегетації рослини. Максимальна кількість

флавоноїдів спостерігається під час цвітіння, потім їх стає менше. Флавоноїди є типовими рослинними барвниками, що відіграють роль фільтрів і захищають тканини рослини від ультрафіолетового проміння, запобігають руйнуванню хлорофілу [1].

Флавоноїди мають широкий спектр біологічної дії: вони беруть участь в окислювально-відновлювальних процесах, виконуючи антиоксидантні функції; поглинають УФ-світло; запобігають руйнуванню хлорофілу тощо. Проявляють Р-вітамінну активність, жовчогінну, спазмолітичну, діуретичну, гіпозотемічну, гіпоглікемічну, седативну, естрогенну та інші види фармакологічної дії [3].

Усі природні флавоноїди малотоксичні, при широкому спектрі біологічної дії, що робить їх привабливими для створення нових фітопрепаратів. Похідні флавонолів, катехинів і антоціанів збільшують амплітуду серцевих скорочень, нормалізують серцевий ритм. Флавоноїди посилюють серцеві скорочення, прискорюють мікроциркуляцію крові, внаслідок чого покращується живлення серцевого м'яза і виникає позитивний інотропний ефект [1].

1.2. Загальна характеристика *Urtica dioica* та *Stachys officinalis*

Urtica dioica L. широко відома як кропива це багаторічна трав'яниста рослина, яка росте в помірних і тропічних районах по всьому світі, кропива є серед ключових рослин Європейської Фармакопеї з давніх часів. Належить до сімейства *Urticaceae* в порядку *Rosales*, що містить близько 60 родів і понад 700 видів. *U. dioica* - дводомне трав'яниста багаторічна рослина, що досягає 1-2 м у висоту (рис. 1.4.). У ньому широко поширені кореневища та столони, які мають яскраво-жовтий колір, як і багаторічні корені. М'які зелені листя завдовжки 3-15 см і розташовані навпроти на прямостоячому жилавому зеленому стеблі [37].

Листя мають сильно зазубрений край, серцеподібну основу та гострий кінчик із кінцевим зубцем листа довшим за сусідні бічні (рис. 1.5). На ньому є дрібні зеленуваті або коричневі численні квітки в щільних пазушних суцвіттях.



Рис.1.1. *Urtica dioica* L.

Чоловічі квіти мають лише тичинки, а жіночі - лише маточку або органи, що продукують насіння [36].

Зазвичай рослина несе на собі або чоловічі, або жіночі квіти. Листя і стебла дуже волохаті з нежалими волосками, а також містять безліч уїдлих волосків або трихомів, кінчики яких відриваються при дотику, перетворюючи волосся в голку, яка вводить кілька хімічних речовин, включаючи ацетилхолін, гістамін, 5-НТ (серотонін), мороїдин, лейкотрієни та, можливо, мурашина кислота [37].

При попаданні на шкіру людини подразнююча речовина виділяється і викликає біль, плескання або печіння, що може тривати більше 12 годин. *U. dioica* застосовується в традиційній медицині як сечогінний засіб та для лікування артриту та ревматизму [38].

В даний час це важлива лікарська рослина, яка використовується як частина раціону людини завдяки своїм мінералам, хлорофілу, амінокислотам, лецитину, каротиноїдам та вітамінам. Ряд хімічних інгредієнтів, таких як флавоноїди, дубильні речовини та стерини, були виділені з різних частин рослини. За результатами сучасних фармацевтичних досліджень додаткові фармацевтичні застосування *U. dioica* дали антиоксидантну, протизапальну, противиразкову, противірусну, протиракову, антибактеріальну, протигрибкову, антиандрогенну, інсектицидну та інші ефекти [39].



Рис. 1.2. Листок *Urtica dioica* L

Хімічний склад Листя *Urtica dioica* містять глікозид уртицин, дубильні речовини (більше 2%), флавоноїди (понад 2%), каротиноїди (каротин, ксантофіл, ксантофіл, віолаксантин), хлорофіл (до 5%), вітаміни С, В2 . Органічні кислоти, мікро- та макроелементи (кремній, залізо-41 мг%, мідь - 1,3 мг%, бор 4,3 мг%, титан - 2,7 мг%, марганець - 8,2 мг%, нікель - 0,03 мг%). Крім того, у свіжому листі є значна кількість вітаміну К1, який під час сушіння сировини руйнується. У корені кропиви є дубильні речовини, алкалоїди, нікотин і вітамін С; у насінні - жирна олія (16-33%), основним компонентом якої є лінолева кислота (73,6%) [40].

Кропива має помітну антимікробну активність щодо грампозитивних та грамнегативних бактерій у порівнянні зі стандартними та сильними антимікробними сполуками, такими як ніконазол міконазолу, амоксицилін-клавуланова кислота, офлоксацин та нетилміцин [48].

Для визначення їх антимікробної активності вивчали різні фракції різних видів *Urtica*. Результати вказують на великий потенціал цієї рослини для відкриття нових ефективних сполук. Результати, представлені в таблиці 5, показують антимікробну активність різних екстрактів кропиви, отриманих різними дослідниками. Як видно, деякі екстракти кропиви проявляють активність у концентрації 72 мг / мл, а інші - 1 мкг / мл. Ці відмінності здаються надмірними, і тому на результати слід дивитися з обережністю. Такі варіації можуть бути пов'язані з розташуванням середовища існування рослини та кліматичними умовами, а також внаслідок використання різних технік видобутку та методів оцінки. Однак, незважаючи на їх суттєві відмінності, результати цих досліджень показують, що рослини кропиви проявляють антимікробну активність щодо широкого спектру мікробних штамів, часто виділених із продуктів низької мікробіологічної якості. Дослідження Kukrić та співавт. виявили, що екстракти кропиви мали інгібуючий вплив на різні грампозитивні та грамнегативні бактерії, включаючи *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, синьогнійну паличку та кишкову паличку [16].

В останніх дослідженнях, проведених Antolak та співавт., Етаноловий екстракт *U. dioica* виявляв інгібуючу активність проти росту оцтовокислих бактерій, що належать до роду *Asaia*, бактерії, що псує напій, що міститься у функціональних напоях [63]. З іншого боку, Шейл та ін. зазначили, що кишкова паличка та *P. aeruginosa* були повністю стійкими до етанолу та екстрактів метанолу зі стебел та листя *U. dioica* [64].

Різні протимікробні властивості можуть бути результатом виділення різних сполук у різних розчинниках, різної ефективності екстракції та, можливо, хімічної деградації полярними та неполярними розчинниками. Метод вилучення, тип рослини, географічний та екологічний статус, клімат, сезонні та експериментальні умови, вік рослини, фактори стресового стану навколишнього середовища, а також

міжвидові відмінності відіграють певну роль і можуть пояснити різноманітність результатів в різних дослідженнях.

Stachys officinalis також відомий як Чистець лікарський - багаторічна трав'яниста рослина сімейства ясноткових (*Lamiaceae*). Рід містить понад 270 видів і розділений на розділи. Нещодавно *Stachys officinalis* (L.) Trevis. було розміщено в розділі *Betonica* підроду *Betonica* зі *Stachys alopecuroides*. Рід неодноразово переглядався, і *Stachys betonica* L. та *Betonica officinalis* є синонімами *Stachys officinalis*. *Stachys officinalis* є витривалим багаторічником і зустрічається по всій Європі на відкритих луках і лісах.



Рис.1.3. *Stachys officinalis*

Стебло чотиригранне, волосиста, до 75-100 см заввишки, з супротивнорозташованими листям. Пластина листа довгаста, по краю круглозубчата.

Прямі, нерозгалужені квадратні стебла (15–40 см) несуть вузькі стеблеві листя. Прикореневі прикореневі листя овальні та тупозубчасті з серцеподібною

основою. Щільні, кінцеві, циліндричні колоски червонувато-пурпурових пурпурових квітів трапляються влітку. Циліндричні квіткові головки відрізняють його від поранених. Квітки трубчасті з п'ятьма часточками, три нижні частки відігнуті назад, а під кожною мутовкою квіток є пазушні квітки з характерною парою листяних приквітків. Плід складається з чотирьох маленьких горішків, захищених у стійкій, гладкій п'ятизубій чашечці. Квіти рожеві, бузкові, пурпурові, білі або жовті, зібрані в помилкові мутовки в вузлах по 10-12 шт., що утворюють колосоподібні суцвіття агальне колосоподібне суцвіття на верхівці стебла.



Рис. 1.4. Суцвіття *Stachys officinalis*

Чашечка трубчасто-дзвонові або дзвоноподібні, пятизубчата, з гострими зубцями; верхня губа віночка звичайно увігнута або шоломоподібна, нижня трилопатевою з більшою середньою лопаттю; тичинки 4, після відцвітання звичайно відігнуті в бік; пильовики двогніздна; стовпчик дволопатево.

Плід - тригранний, яйцеподібний або довгастий горішок. Цвіте в червні - серпні. Плоди дозрівають в серпні.

Хімічний склад. Хімічне вивчення трави чистеця показало, що в траві міститься до 0,83% ефірного масла, 1,43% флавонових глікозидів, до 2,42%

стахідрін, 5,72% смол, 135,4 мг% вітаміну С і антоціани, ірідоїди до 1%, органічні кислоти до 2%, солі Са до 1,02%, цукристі речовини, фенолкарбонові кислоти, філохінон, дубильні речовини.

На складах сировину зберігають в сухих вентильованих приміщеннях. Використання. З трави чистеца отримують рідкий екстракт, який застосовується в якості маточного кошти в післяпологовий період, а також при гінекологічних кровотечах різної етіології.

Багаторічна трава, витривала до зони 4, деревна бетонія (*Stachys officinalis*) є рідною для Європи, Західної Азії та північної Африки. Як і багато інших представників сімейства м'яткових, *S. officinalis* має квадратні стебла з короткими тонкими волосками. Зубчасте листя росте біля основи рослини, а в середині та наприкінці літа на 2–3-футових стеблах з'являються колосові головки трубчастих червоно-фіолетових квітів. Протягом століть вважалося, що ця трава має особливі властивості. Стародавні єгиптяни та англосакси вважали, що Бетоні є магічним, і в середні століття і чоловіки, і жінки носили амулети з бетону, щоб захистити зло. Ранні римляни перерахували деревну бетонію як ліки від 47 окремих хвороб. Деякі заявляють, що назва бетоні походить від кельтського слова bewton ("добре для голови"), посиляючись на його використання при мозкових захворюваннях, таких як головний біль, нервозність і навіть похмілля.

Репутація трави зцілювалась і в 17 столітті, коли бетоні використовували для лікування астми, бронхіту, проблем з нирками, надмірного потовиділення та очищення організму від глистів.

Сучасне використання Бетоні. Застосовується для лікування хвороб, пов'язаних з головою (включаючи мігрень, зубний біль, тривогу та проблеми зі сном). Бетоні також застосовується при діареї, менструальних проблемах, подразненнях рота та горла та захворюваннях шкіри. Російське дослідження показало, що бетоні містить глікозиди, які можуть знижувати артеріальний тиск - одне з можливих пояснень відомих здібностей трави полегшувати головний біль і тривогу. За даними Тайлера "Чесна трава" Стівена Фостера та Варро Тайлера, бетоні

містить близько 15 відсотків дубильних речовин, що підтверджує його використання як в'язучого для лікування діареї, подразнень у роті та горлі та проблем зі шкірою.

Деревна бетонія - це трава зі спеціальними та загальнозміцнюючими органами влади. Як загальнозміцнюючий посібник він давно відповідає із сонячним сплетенням тіла і є чужим тонізуючим засобом для травлення. Це покращує кровообіг і гармонізує функції травної системи. У поєднанні зі своїми заспокійливими ефектами він відмінно підходить для розкладання трав, спричинених нервовою напругою, тривого та депресії. Він може стимулювати слабке травлення, а також заспокоює та заспокоює. Таким чином, він може бути чужим для полегшення симптомів запальних станів. Це трохи зігріває та м'яко бадьорить систему. Він стимулює апетит і підтримує тих, хто виснажений і виснажений. Він також підтримує здорову нервову систему, знижуючи напругу та напругу з розуму та тіла. Найменш потужний, часто потрібно лише один ковток, щоб відчувати, як плечі опускаються, а щоменші починають вводити і розмахуватися.

Довгий час користування головою, він допомагає зняти головний біль, особливо якщо він спричинений напругою. Це чудове доповнення будь-якій формулі сну і допомагає підтримувати здоровий сон, особливо, якщо неспанування спричинені тим «бурхливими думками, які просто не в центрі». Вуд Бетоні покращує пам'ять і концентрацію, особливо до Гінко, але більше ефективний. У поєднанні зі своїм заспокійливим ефектом він чудовий підходить для іспитів та інших стресових ситуацій, що вимагають зосередження. Це підбадьорливий (не стимулюючий), тонізуючий і нервовий властивості в поєднанні роблять його чужою рукою для людей похилого віку та тих, хто відходить після тривалої хвороби. Зовні він має подібні ранозаговорюючі властивості, як дереві, так і чудово підходить для вмивання при опіках.

1.3. Біологічні властивості ендofітних грибів.

Ендофітні гриби рослин визначаються як гриби, які проводять весь або частину свого життєвого циклу, всередині клітини всередині здорових тканин рослин-господарів, як правило, не викликаючи явних симптомів захворювання. Вони є важливими складовими мікроекосистем рослин. У кожного досліджуваного виду рослин виявлені ендофітні гриби рослин. За підрахунками, в природі існує понад мільйон грибкових ендофітів. Ендофітні рослинні гриби визнані важливим та новим ресурсом природних біоактивних продуктів, які потенційно можуть застосовуватися у сільському господарстві, медицині та харчовій промисловості. З тих пір, як у 1993 році "золоту" біоактивну сполуку паклітаксел (таксол) було виявлено з ендофітного гриба *Taxomyces andreanae*, багато вчених збільшують свої інтереси до вивчення грибкових ендофітів як потенційних продуцентів нових та біологічно активних сполук. За останні два десятиліття з ендофітних грибів було успішно виявлено багато цінних біоактивних сполук, які мають антимікробну, інсектицидну, цитотоксичну та протиракову активність.

Ці біоактивні сполуки можна класифікувати як алкалоїди, терпеноїди, стероїди, хінони, лігнани, феноли та лактони [43].

Протягом тривалого періоду спільної еволюції між кожним ендофітним грибом та його рослиною-господарем поступово встановлювалися дружні стосунки. Рослина-господар може забезпечити поживними речовинами та житлом для виживання своїх ендофітів. З іншого боку, ендофіти вироблятимуть низку біоактивних компонентів, щоб допомогти рослинам-господарям протистояти зовнішнім біотичним та абіотичним стресам та отримати користь для зростання хазяїна у відповідь. Деякі ендофітні гриби розвинули здатність виробляти ті самі або подібні біоактивні речовини, що й ті, що походять від рослин-господарів. Це корисно для нас для вивчення взаємозв'язку між ендофітами та їх рослинами-господарями.

Крім того, ми можемо розробити підхід, який можна замінити для ефективного отримання цих дефіцитних та цінних біоактивних сполук з метою захисту рослинних ресурсів та природного середовища. Схеми біоактивних сполук

ендофітних грибів, та і їх рослин-господарів, а також їх потенційне застосування наведено на (рис. 1.5) [43].

Вважається, що ендофітні рослинні гриби як нове джерело природних біоактивних сполук мають великий потенціал застосування в сільському господарстві, медицині та харчовій промисловості.

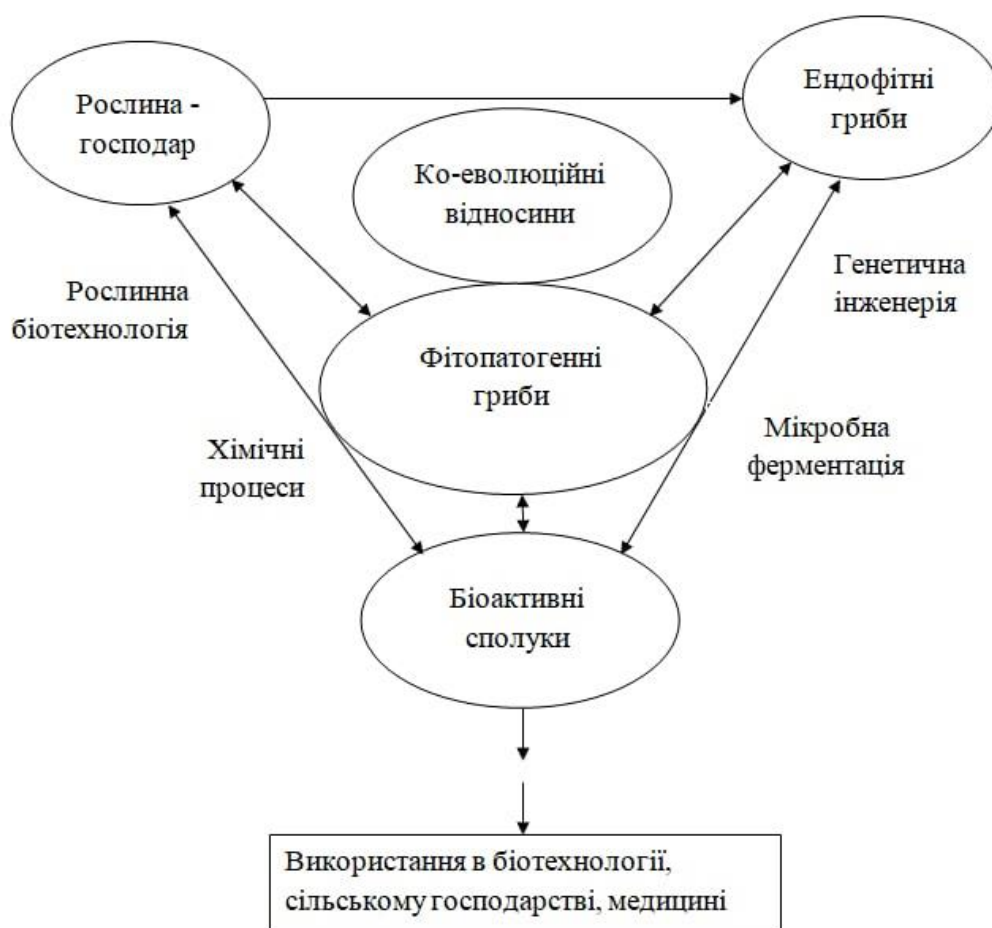


Рис 1.5.Схема взаємодії ендофітних грибів та їх рослин-господарів

Користуючись перевагами сучасних біотехнологій, таких як генна інженерія, метаболічні технології та процеси ферментації мікробів, ми можемо краще зрозуміти та маніпулювати цим важливим мікроорганізмом та зробити його більш корисним для людства[43].

Першим кроком є пошук потенційного ендоефітного грибного ресурсу з природи. Другим, шлях відбору мутацій, злиття протопластів, маніпуляції генами та інших методів рекомбінації ДНК можна було відібрати кандидатів з високою продуктивністю, придатних для промислового культивування. Крім того, колонізація та експресія відповідних функціональних генів у біосинтетичних шляхах також корисні для підвищення продуктивності кандидатів. Загальновідомо, що ферментація мікробів - це складний проект, і він широко застосовувався у багатьох випадках протягом тривалого часу. Пеніцилін, авермектин, стрептоміцин та інші відомі антибіотики успішно виробляються за допомогою широкомасштабних ферментативних процесів. Порівняно з культурою рослинних рослин, живильне середовище для клітин грибів є простим, недорогим при великій кількості запасів, а виробнича вартість порівняно низька.

Більше того, період культивування короткий, і процеси мікробної ферментації можуть забезпечити найкращі умови росту та розмноження, а різні параметри культури можна легко оптимізувати відповідно до конкретних застосувань. Крім того, можна застосувати багато можливих стратегій для ефективного збільшення виробництва біоактивних сполук під час процесів бродіння. Ці стратегії в основному включають: додавання біотичних та абіотичних елісіторів, додавання інгібіторів, використання спеціальних ферментів та інших речовин шляхом метаболічного дослідження [43].

Біологічні властивості ендоефітних грибів. Протипухлинна діяльність Таксол - високофункціоналізований дитерпеноїд, який широко використовується як протипухлинний препарат. Вперше його було виділено з кори західного тису, *Taxus brevifolia*. Під час поділу клітин таксол запобігає деполімеризації тубуліну. Виробництво таксолу з різних родів ендоефітів шляхом ферментації є більш дешевим методом. Протипухлинний препарат таксол був знайдений у багатьох родах ендоефітних грибів. Понад 15 родів грибів продукували паклітаксел та його аналоги.

Панді та ін. повідомили, що таксол, виділений з *Lasiodiopodia theobromae*, виявляв активність проти клітинної лінії раку молочної залози. Альтернативно 9-метиловий ефір є основним мікотоксином, що продукується грибами роду *Alternaria*.

Це може індукувати апоптоз мітохондрій у клітинах карциноми товстої кишки людини та викликати розриви ланцюгів ДНК, мікроядра та мутації генів у різних культивованих клітинах ссавців. Гіридхаран та ін. повідомляють, що склеротіорин, виділений з *Cephalotheca faveolata*, виявляв антипроліферативну активність проти ракових клітин, а також індукує апоптоз у клітинах раку товстої кишки. Екстракти з ендоефітів, *Fusarium sp.* та *Aspergillus fumigatus* виявляли інгібуючу активність щодо клітинних ліній раку шийки матки HeLa.

Ендоефітні гриби, *A. terreus*, продемонстрували цитотоксичний ефект проти клітинної лінії раку HepG2. Полікетидні сполуки, вироблені *Phoma sp.*, мали високу інгібуючу активність щодо клітин мишачого лейкозу. Протипухлинна активність була помічена в етилацетатному екстракті *Alternaria alternata* проти клітинних ліній раку молочної залози людини, і він також продемонстрував добру цитотоксичність. Chen et al повідомили, що цитохалазини ендоефітних грибів *Phoma mutirostrata* виявляли помірну протипухлинну активність щодо SMMC-7721 (клітинна лінія гепатоцелюлярної карциноми), SK-BR-3 (клітинна лінія раку молочної залози), PANC-1 (клітинна лінія раку підшлункової залози), HL-60 (клітинна лінія мієлолейкозу людини) та A-549 (клітинна лінія раку легенів).

Антимікробна активність. Проблем зі здоров'ям у світі, спричинених стійкими до наркотиків бактеріями та грибками, збільшується. Багато патогенних мікроорганізмів розвинули стійкість через неправильне використання або тривале використання одного і того ж класу антибіотиків. Зараз ведеться інтенсивний пошук нових та більш ефективних антибіотиків для вирішення цих проблем. Виділення нових вторинних метаболітів з ендоефітів є поступовим напрямом досліджень. Такі грибкові ендоефіти, як *Phaeosphaeria avenaria*, *Leptosphaeria sp.*, *Fusarium sp.*, *P. chrysanthemicola*, *Cladosporium sp.*, *Cylindrocarpon sp.*, *Saussurea involucrata*, *Fusarium solani*, *Cordyceps memorabilis*, *P.* проти людських патогенних бактерій та грибів, таких як *Micrococcus luteus*, *Enterococcus shirae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *S. epidermidis*, *Candida tropicalis*, *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* (*A. fumigigilla*). *Phomopsis sp.*, виявляв антимікробну активність щодо *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, *M.*

luteus та *C. albicans*. Сільва та ін. повідомляли, що вторинні метаболіти *A. niger*, *Curvularia pallescens*, *Guignardia bidwelii*, *Paecilomyces variotii* та *Mycelia sterilia* виявляли антибактеріальну активність щодо *S. aureus*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *M. luteus*, *E. coli* та *Pseudomonas aeruginosa*. *Gibberella sp.*, виявляла антимікробну активність щодо *S. aureus* та *C. neoformans*. Екстракти з *Colletotrichum gloeosporioides* та *Chaetomium globosum* виявляли антимікробну активність щодо *Mycobacterium tuberculosis*, *Gordonia terrae*, *S. aureus* та *E. coli*. Екстракти, виділені з *C. gloeosporioides*, виявляли антимікробну активність щодо *Streptococcus pyogenes* та *Enterococcus faecalis*. Екстракт з *Diaporthe arengae* демонстрував антимікробну активність щодо *S. aureus* та *B. subtilis*. Попередні дослідження чітко показують, що сполуки, отримані з ендofітних грибів, використовуються для розробки протимікробних препаратів.

Інсектицидна активність. Гриби ендofіти можуть захищати рослини-господарі від патогенних мікроорганізмів та шкідників. Листяні ендofіти можуть зменшувати рослиноїдність, виробляючи алкалоїди, токсичні для комах та хребетних. Веббер, який був першим дослідником ендofітних грибів *P. oblonga* для захисту в'язів від жука *Physocnemum brevilineum*. Ендofітні гриби (*Acremonium coenophialum*) виявляли інсектицидну активність по відношенню до попелиці (*Rhopalosiphum padi*, *Schizaphis graminum*) та клопів молочаїв (*Oncopeltus fasciatus*).

Cladosporium herbarum, *A. alternata*, *Rhodotorula rubra*, *Epicoccum nigrum*, *Cryptococcus sp.*, *Penicillium sp.*, *Fusarium graminearum* діяли як захисні речовини для рослин з рослиноїдних. Різні роди ентомопатогенних грибів *Acremonium*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Clonostachys* та *Paecilomyces*; були виділені з кавових рослин, серед них *B. bassiana* та *Clonostachys rosea* були патогенними для кавового ягідника. Було встановлено, що *B. bassiana* контролює комах-розточілок на розсаді кави. Баскар та ін. зазначили, що *B. bassiana*, виділена з *Pulegy*, виявляла ларцидидну та інгібуючу активність проти *Spodoptera litura*.

Ендofітні гриби *Claviceps purpurea* мають значну інсектицидну активність щодо *A. gossypii* Glover. Senthilkumar et al повідомили, що такі фітохімікати, як додеканова кислота, етилестер, фталева кислота, октил-2-пентиловий ефір, виділені

з *Phomopsis* sp. використовуються як інсектицид. *Cladosporium oxysporum* виявляв інсектицидну активність щодо *A. fabae*. Екстракти *Emericella nidulans*, *A. oryzae*, *A. tamaritii* та *A. versicolor* місцево застосовували на личинках *S. litura* і виявляли, що весь гриб виявляв інсектицидну активність; особливо *A. versicolor* виявляв максимальну інсектицидну активність.

Стимулятори росту рослин. Ендоефіти можуть активно або пасивно сприяти росту рослин за допомогою різноманітних механізмів, оскільки ендоефітні метаболіти забезпечують різноманітну придатність для прийому рослин, посилену за рахунок підвищення стійкості рослин до біотичних та абіотичних стресів, а також посилення росту рослин. Багато ендоефітів здатні до солубілізації фосфату, посилення поглинання фосфору (P), фіксації азоту, вироблення сидерофорів та рослинних гормонів, таких як ауксин, абсцисини, етилен, гібереліни та індол оцтова кислота (ІОК), які важливі для рослин правила зростання. Гіберелінова кислота (ГА) є потужним фітогормоном, який регулює ріст рослин. Грибковий ендоефіт, *Cladosporium sphaerospermum* з рослини, *Glycine max* (L) Merr. виробляють GA3, GA4 і GA7. Це спричинило ріст рослин у рисі та сої. Аналог песталотину, виділений з мікроорганізму *Pestalotiopsis*, виявляв значну активність гібереліну щодо насіння *Distylium chinense* та збільшував рівень схожості (85,56%). Похідні індолу оцтової кислоти *Fusarium tricinctum* та *A. alternata* посилюють ріст рослин.

Захист рослин. Ендоефітні гриби також здатні викликати стійкість до хвороб, і для цієї стійкості запропоновано багато механізмів. Механізми індукованої ендоефітами резистентності пов'язані з харчовим статусом хазяїна та підвищенням придатності рослин шляхом підвищення їхньої толерантності до абіотичного стресу. Ендоефітні гриби *Cryptosporiopsis* sp. *quercina* та *Colletotrichum* sp., виявляються ефективними проти фітопатогенів, таких як *Rhizoctonia cerealis*, *Phytophthora capsici*, *Pyricularia oryzae*, *Gaeumannomyces graminis*.

Фіторемедіація. Встановлено, що вона відіграє важливу роль в екологічному співтоваристві з метою зменшення псування землі та води, спричиненого надмірним токсичним органічним інсектицидом, погіршенням середовища, промисловими стічними водами, отруйними газами та втратою біорізноманіття. Біологічний

контроль з використанням ендофітів як нового ефективного методу широко використовується для оздоровлення навколишнього середовища та знищення комах або патогенних мікроорганізмів. Нове застосування ендофітів в області фітореMediaції (виведення ксенобіотиків та важких металів із ґрунту за допомогою рослин). Однак успіх фітореMediaції залежить від мікробів та здатності рослин переносити та накопичувати високі концентрації забруднюючих речовин, отримуючи при цьому велику біомасу.

Через потенціал мікроорганізмів для біоаккумуляції важких металів та інших забруднюючих речовин із навколишнього середовища або його посилення росту рослин та поглинання забруднюючих речовин із ґрунту рослиною шляхом мобілізації / іммобілізації забруднювачів

Рослини, *Festuca arundinacea* Schreb. та *F. pratensis* Huds. заражені ендофітними грибами *Neotyphodium coenophialum* та *N. uncinatum*, а неінфіковані рослини вирощують на забрудненому нафтою ґрунті. Заражені ендофітами рослини мали більше біомаси пагонів та коренів у порівнянні з неінфікованими рослинами. Це доводить, що ендофіти відіграють важливу роль у фітореMediaції.

Ендофіти можуть відігравати непрямую або безпосередню роль у процесі фітореMediaції та деградації токсинів навколишнього середовища, опосередковано через посилення росту рослин, що мають здатність до фітореMediaції, і це прискорює процес фітореMediaції, або безпосередньо шляхом деградації та / або накопичення забруднюючих речовин само по собі. Ендофіти існують загадково, і однією з їх головних ролей в екосистемі є декомпозитори, оскільки вони є одними з основних колонізаторів мертвих рослинних тканин. Ендофіти *Neotyphodium* посилюють активність толерантності до кадмію у двох видів рослин *Festuca arundinacea* та *F. pratensis* у порівнянні з рослинами, не зараженими ендофітами.

Ендофіт гриба *Penicillium funiculosum* діє проти мідного стресу і підсилює ріст рослини; він може бути використаний для біомедикаментозного забруднення оброблюваних площ за допомогою ендофітів, що опосередковують стрес.

1.3. Characteristics of *Ramularia urticae* Ces

Середовище проживання: на живих листках, ураження розвиваються на листках різного віку та протягом усього вегетаційного періоду. Листяні плями спочатку на живих листках, сірувато-зелені, дрібні, орбікулярні або кутові, завширшки 1–2 мм, розсіяні і без чітких полів; пізніше неправильна або орбікулярна, розсіяна, розвивається між основними жилками листя, діаметром 3–5 мм. (іноді діаметром до 10–12 мм), коричневий або сірувато-коричневий, без чітких полів, або іноді світло-сірий до сірувато-білого кольору в центрі спочатку інфікованих тканин, зовнішня сторона кожного краю утворює не яскраво виражений коричневий до темного коричневий ореол, ширина 1–3 мм, на верхній поверхні листя; [44].

Ті самі ураження на нижніх листових поверхнях від сірувато-коричневого до сірувато-білого і різко відмежовані від здорових тканин, без чіткого запасу; коли численні ураження листя стають сухими, пригніченими, делікатними, нарешті, випадають невеликі ділянки мертвих тканин; несуть сірувато-білі або жовтувато-білі пляшки на нижній і рідше верхній поверхні листа[44].



Рис.1.8. Листя кропиви уражених *Ramularia urticae* Ces

Асоційовані організми: *Urtica angustifolia* Fisch. ex Hornem. (листя), *U. breweri* S. Watson (листя), *U. cannabina* L. (листя), *U. dioica* L. (листя), *U. ferox* G. Forst. (листя), *Ugaleopsisifolia* Wierzb. ex Opiz (листя), *U. gracilis* Ait. (листя), *U. holosericea*

Nutt. (листя), *U. kioviensis* Rogow. (листя), *U. laetevirens* Maxim. (листя), *U. lyallii* S. Watson (листя), *U. membranacea* Poir. ex Savigny (листя), *U. pilulifera* L. (листя), *U. platyphylla* Buch.-Ham. ex D. Don (листя), *U. procera* Muhl. ex Willd. (листя), *U. urens* L. (листя), *Urtica* sp. (листя); *Urticastrum divaricatum* Kuntze (листя) *Urtica dioica*[45].

Взаємодія та середовища існування: Цей гриб викликає плямистість листя на різних кропивах і є досить часто реєструваним патогеном, головним чином у північній півкулі, хоча його також реєстрували з Нової Зеландії. Рівень шкоди, як правило, оцінюється як помірний [45].

Географічний розподіл: Північна Америка: Канада (Британська Колумбія), США (Аляска, Каліфорнія, Айдахо, Айова, Монтана, Невада, Північна Дакота, Орегон, Південна Дакота, Юта, Вашингтон, Вісконсін, Вайомінг). Північна Америка: Аргентина. Азія: Вірменія, Азербайджан, Грузія, Індія, Іран, Казахстан, Киргизстан, Пакистан, Росія, Пакистан, Узбекистан, Нова Зеландія. Європа: Австрія, Білорусь, Бельгія, Болгарія, Данія, Естонія, Фарерські острови, Фінляндія, Франція, Німеччина, Ірландія, Італія, Латвія, Литва, Нідерланди, Польща, Португалія, Румунія, Іспанія, Швеція, Україна, Великобританія [46].

1.4. Характеристика *Septoria stachydi*

Середовище проживання: на живих і сухих листках і стеблах протягом усього вегетаційного періоду. Ураження плямистості листя з'являються на живих листя у вигляді дрібних та кутових плям, поперек 1–2 мм, червонувато-коричневі та жовтуваті, без певного поля, розсіяний, пізніше змінний за зовнішнім виглядом, неправильний, іноді орбітулярний, іноді кутовий, розсіяний, маленький, діаметром 2–4 мм, іноді до 5–6 мм у найбільшому розмірі, обмежений дрібними листовими жилками, з блідими сірувато-жовтий або блідо-коричневий до коричневого центру, блідо-зеленувато-коричневий на нижній стороні листа, з тонкими, червонувато-коричневий, досить чіткий край, різко відмежований від центру плями, що поширюється і утворює погано виражені, але помірно широкий пурпуровий ореол, сухі ураження листя виглядають як сухі плями коричневого

кольору, з мертвою рослинною тканиною в центрі, іноді досить численні, із зовнішнім виглядом мозаїки через різні відтінки та кольорові відтінки, з тонкими, нечіткі і трохи підвищені поля. Conidiomata циркуляр, якщо дивитись зверху, як правило, охоплюється тонкий шар епідермальної тканини листа, згодом руйнуючи деградовані епідермальні клітини або розсуваючи продихи, пікнідіальний, на верхній стороні листа, окремий, розсіяний, напівзанурений, вивержений, світло-коричневий, кулястий до підглобоподібний, купуватий при повному відкритті, тонкостінний, (75–) 85–120 (–130) мкм діам., остіольний, зі стінкою 8– Товщиною 10 мкм, складається з двох або трьох прозорих шарів *textura angularis*, що варіюються від коричневих у зовнішніх частинах до блідо-коричневий внутрішньо. Остіола кругла, центральна, (15–) діаметром 25–45 мкм, зазвичай с. 35 мкм діам., Оточений дрібні клітини, трохи темніші за інші клітини стінок конідіомата.



Рис. 1.8. Листя чистецю уражені *Septoria stachydis*

Конідіогенні клітини безбарвні, голобластні, циліндрична, від ампуліформної до піриформної, $10\text{--}14 \times 2\text{--}3$ мкм, дискретна або інтегрована, що виникає з менших клітин вистилаюча конідіоматальна порожнина, іноді невизначена, зазвичай з двома неясними перкурентними ентеробластками верхівковій проліферації (аненеляції), рідко з обмеженою кількістю симподіальних проліферацій і не потовщені рубці, де конідії відокремилися. Конідії безбарвні, $(25\text{--}) 34\text{--}50$ ($\text{--}58$) $\times (1 \cdot 0\text{--}) 1 \cdot 5\text{--}1 \cdot 8$ мкм,

прямі або злегка вермикулярна, ниткоподібна, злегка загострена на верхівці та основі, звужена на верхівці, злегка ослаблена і іноді зрізані біля основи, 1–3 (–5) - септати, злегка звужені в перегородках, іноді кишкові, верхівкова клітина не довше інших клітин.

Septoria stachydis - заражає рослини з кінця квітня по жовтень. Це відбувається в помірних регіонах на широкому діапазоні мертвої кропиви, деякі з них є лікувальними. Грибок пошкодив с. 60% популяції *Glechoma hederacea*, з ураженнями, що охоплюють 18% листяних поверхонь.

Septoria stachydis характерна для вологих місця, такі як луки, береги та лісові навіси, мають достатню кількість вологи для рослин-господарів, або на північних схилах гір.

У чистій культурі *S. Stachydis* виробляє два типи міцелію: безбарвний, дрібнодисперсний (діаметр 0,75–1,9 мкм) і зеленувато-оливкова, товста (2·0–5·5 мкм діам.). Темний міцелій бере участь у процесі утворення пікніду шизогенний розвиток. Сприятливі умови для проростання конідію та ріст міцелію становить 20–25 ° С. Проростання займає 4 години в краплі води і 6–8 годин на агарі; зростання уповільнюється при 15 ° С і 25–30 ° С. Формування репродуктивної структури спостерігається через 13 днів на листках у експерименти по інокуляції та через 10 днів на агаровому середовищі в чистій культурі .

Septoria stachydis не є патогенним для широкого кола господарів; не заражає *Cannabis sativa*, *Chelidonium majus* або *Urtica dioica*.

1.6. Висновки до розділу

Кропива (лат. *Urtica dioica* L.) належить до сімейства кропивові (Urticaceae). Хімічний склад *Urtica dioica*: ефірні олії; дубильні речовини (більше 2%); Каротиноїди; Стероїди; Вітаміни С, В2, В, Е, К, РР; Флавоноїди (кверцетин, кемпери) 1,96%; Алкалоїди (нікотин, гістамін, 5-гідрокситриптамін) 0,010-0,29%; Мікро та макро елементи.

Чистець лікарський (лат. *Stachys officinalis*) багаторічна трав'яниста рослина сімейства ясноткових (*Lamiaceae*)

Ендофітні гриби рослин є важливим та новим ресурсом природних біоактивних сполук, які можуть застосовуватися у сільському господарстві, медицині та харчовій промисловості. За останні два десятиліття з ендофітних грибів було успішно виявлено багато цінних біоактивних сполук, що мають антимікробну, інсектицидну, цитотоксичну та протиракову активність. Протягом тривалого періоду спільної еволюції між кожним ендофітом та його рослиною-господарем було встановлено дружні стосунки. Деякі ендофіти мають здатність продукувати ті самі або подібні біоактивні сполуки, що й ті, що походять від рослин-господарів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для експериментальної частини дипломної роботи було виділено гриби, використані зразки лікарських рослин *Urtica dioica* L та *Stachys officinalis*, взяті з гербарію М.Г. Холодний інститут ботаніки НАН України.

Картопляно-глюкозний агар був обраний живильним середовищем для селекції та вирощування грибів. Приготування живильного середовища: 1 літр холодної дистильованої води, візьміть 200 г очищеної та нарізаної шматочками картоплі і кип'ятіть на повільному вогні 20 хвилин. Відвар фільтрують через вакуумний фільтр, гарячою окропом, вміст доводять до 1 літра. Також було додано антибіотик широкого спектру Стрептоміцин, щоб попередити ріст та розвиток небажаних мікроорганізмів.



Рис 2.1. Процес фільтрації картопляного відвару

У відфільтрований відвар додають 15 г агар-агару і 20 г глюкози, кип'ятять до розчинення агару. Реагенти для приготування живильного середовища повинні бути хімічно чистими, оскільки вони можуть негативно впливати на ріст грибків. Встановіть рН, залийте колби і стерилізуйте в автоклаві протягом 1 атм. протягом 30 хв. Суть методу виділення грибків з листя рослини: нарізані на сегменти довжиною

1 см листя рослини переносять у чашку Петрі з змоченим у стерильній воді фільтрувальним папером, залишають на 5 хвилин. Далі кожен сегмент рослини стерилізують етанолом (96%) шляхом занурення та екстракції кілька разів, потім промивають стерильною водою. Потім сегменти рослин переносять в чашки Петрі з картопляно-глюкозним агаром.

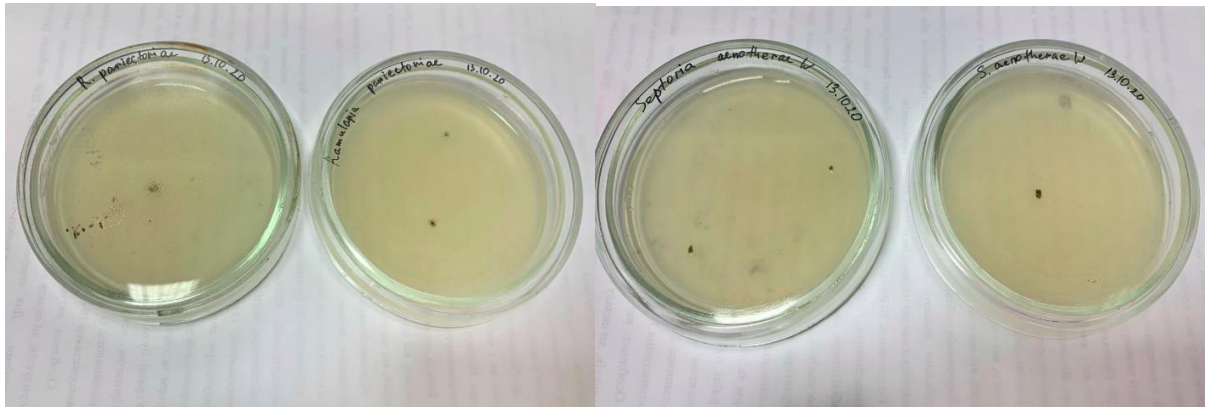


Рис. 2.2. Чашки Петрі з фрагментами уражених рослин *Urtica dioica* L and *Septoria stachydis*

Через 3 дні інкубації спостерігається поява міцелію грибів, що росте зсередини сегментованих листків у чашках Петрі. Окремі гіфальні кінчики різних грибів ретельно відбираються з поверхні середовища за допомогою прищепної петлі; потім їх переносять у нове середовище КГА та інкубують при 25 ° С протягом 7-10 днів. Кожну культуру перевіряють на чистоту та пересаджують у нове живильне середовище КГА для збереження та накопичення біомаси. Ідентифікація грибів базується на морфології культури, механізмах спороутворення та морфологічних характеристиках спор.

2.1. Методи визначення флаваноїдів

Приготування екстракту з лікарської рослинної сировини: Аналітичний тест сировини подрібнюється до розміру частинок, що проходять через сито з розмірами пор 0,5 мм [19].

Приблизно 1,0 г (точна вага) подрібненої сировини поміщають в конічну колбу на 250 мл з ситом, 50 мл спирту додають до 70%, колбу зважують з похибкою $\pm 0,01$ г, прикріплюють до конденсатора і нагрівають до киплячої водяної бані протягом 60 хвилин періодично перемішують вміст.



Рис. 2.3. Рослинна сировина

Потім колбу охолоджують до кімнатної температури і зважують, при необхідності, доводять до початкової маси 96% спирту. Вміст колби фільтрують через складений у папір фільтр, відкидаючи перші 25 мл фільтрату (розчин А) [19].

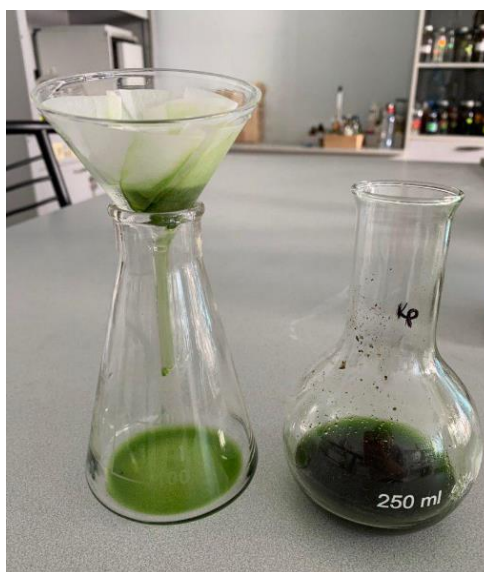


Рис. 2.4. Процес фільтрації екстракту рослин

Приготування екстракту з грибів: 1 г міцелію грибів виймають з живильного середовища і переносять у фарфоровий розчин і натирають 1 г піску з метою руйнування клітинної стінки [20].

Потім додають 20 мл етанолу і фільтрують. Фільтрат (розчин А) використовується для подальшого визначення флавоноїдів.



Рис. 2.5. Процес фільтрації екстракту грибів

Далі готують розчини для визначення оптичної щільності та для витяжки з рослин та грибів: 1,0 мл розчину А поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 4 мл спиртового розчину хлориду алюмінію 5% і регулюють розчин до етикетки спиртом 70% (розчин В) і залиште на 30 хвилин. У разі помутніння розчинів їх фільтрують. [19]

Для приготування розчину для порівняння в іншій 25-мл колбі додають 1 мл розчину А. Потім об'єм колби доводять до позначки 70% спиртом і залишають на 30 хвилин. У разі помутніння розчинів їх фільтрують. Оптичну щільність визначають при 425 нм в кюветі товщиною 10 мм. У робочу кювету поміщають розчин з додаванням хлориду алюмінію (розчин В), в камеру порівняння - розчин порівняння[19]

Концентрація флавоноїдів у перерахунку на кверцетин (%) визначається за формулою:

$$X = \frac{(D_1 \times a \times 25 \times 100)}{(D_0 \times 100 \times 25 \times 1)}$$

де D1 - оптична щільність розчину В; D0 - оптична щільність розчину кверцетину (0,22); а- маса маси зразка досліджуваної сировини, в грамах [19]. Отримати попередню інформацію про особливості будови ізольованих флавоноїдних сполук за допомогою методів хімічного аналізу. Флавоноїди виявляються за допомогою якісних реакцій. Для цього використовується цей екстракт, приготування якого описано вище [19].

Циановий тест або тест Шинода. Флавоноли, флаванони та флавони, коли магній оновлюється у присутності соляної кислоти, дають червоний або оранжевий колір завдяки утворенню антоціану. До 1 мл екстракту додайте 2-3 краплі соляної кислоти та щіпку металевого порошку магнію.

Реакція з хлоридом заліза III. До 1 мл екстракту додають 1-2 краплі 10% розчину заліза III хлориду. З'являється коричневий колір.

Реакція з ацетатом свинцю. До 1 мл екстракту додають 3 - 5 крапель 10% розчину ацетату свинцю; утворюється осад.

Реакція з хлоридом алюмінію. Флавоноїди з 1 - 2% спиртовим розчином хлориду алюмінію утворюють забарвлені сполуки від жовтого до зеленого.

Реакція з лугом. До 1 мл екстракту додають 1-2 краплі 10% спирту і водний розчин калію або гідроксиду натрію; з'являється жовтий колір [20].

2.2. Методи визначення алкалоїдів

Визначення алкалоїдів ґрунтується на їх властивостях давати прості або складні солі з кислотами, солями важких металів, йодидами та іншими речовинами. З деякими реагентами алкалоїди дають кольорові реакції або утворюють нерозчинні осад, що лягло в основу методів їх визначення [21].

Екстракція алкалоїдів: 10 г сухих рослин, перетворених у дрібний порошок, поміщають у колбу і заливають 1% розчином оцтової кислоти (можна використовувати 1% розчин вина, щавлевої кислоти та інших органічних кислот) у співвідношенні 1 : 10 до повішення. Далі колбу опускають на водяну баню і нагрівають до кипіння, періодично струшуючи [20].

Після виймання з водяної бані колбу охолоджують, струшують протягом 15 хвилин і фільтрують через складений фільтр. Отриманий фільтрат визначає наявність алкалоїдів. На скло наносять стільки крапель фільтрату, скільки підготовлених реагентів для осадження алкалоїдів. До кожної краплі фільтрату додається крапля реагенту. У присутності алкалоїдів колір змінюється або виникає осад. Якщо алкалоїдів немає, краплі залишаються незмінними [21].

– Реакція з реагентом Драгендорфа (розчин йодистого вісмуту в калію йодиді). Цей алкалоїдний реагент у середовищі соляної кислоти або сірчаної кислоти дає аморфний оранжево-червоний осад.

– Реакція із реактивом Занненштейна (фосфорно-молібденовою кислотою). Цей реагент викликає утворення осаду вже у дуже розбавлених (нейтральних або кислих) розчинах солей алкалоїдів і є одним з найбільш чутливих реагентів. Облоги пофарбовані в світло-жовтий або коричнево-жовтий колір і часто змінюють забарвлення на синій або зелений в результаті відновлення молібденової кислоти. Частина осадів розчиняється в розчині аміаку.

– Реакція із струшуючим реагентом (фосфорно-вольфрамова кислота). Цей реагент призводить до утворення осаду, який забарвлюється від молочного до сірого.

– Реакція з 5% розчином таніну. Цей реагент викликає утворення більшості солей алкалоїдів у нейтральному та слабокислому середовищі, жовтих відкладах, розчинних у спирті, оцтовій кислоті та розчинах солей амонію.

– Реакція з розчином пікринової кислоти. 1% -ний водний розчин пікринової кислоти осаджує більшість алкалоїдів у вигляді жовтих пікратів в аморфному або кристалічному стані. Для аналізу алкалоїдів лікарська та рослинна

сировина використовується переважно для об'ємних та інструментальних методів[20].

Методика визначення вмісту алкалоїдів у перерахунку на хелодонін, запропонована у Державній фармакопеї України, наведена нижче. Тестовий розчин. До 0,750 г порошкоподібної сировини додають 200 мл розведеної оцтової кислоти, нагрівають на водяній бані протягом 30 хвилин, струшуючи, і охолоджують. Отриману суміш підкислюють оцтовим розбавленням до 250,0 мл і фільтрують, капаючи перші 20 мл фільтрату [20].

До 6,0 мл концентрованого розчину аміаку і 100,0 мл метиленхлориду додають 30,0 мл отриманого фільтрату і струшують протягом 30 хв. Органічний шар відокремлюють, 50,0 мл переносять у круглодонну колбу ємністю 100 мл і сушать насухо у вакуумі при температурі не більше 40 ° С. Отриманий залишок розчиняють приблизно в 2 - 3 мл 96 % алкоголю, злегка зігріваючий. Отриманий розчин з діоксидом сірки переносять у мірну колбу об'ємом 25 мл і об'єм розчину доводять до тієї ж кислоти до 25,0 мл. 5,0 мл отриманого розчину поміщають в мірну колбу об'ємом 25 мл, додають 5,0 мл розчину 10 г / л хромотропної кислоти натрієвої солі в сірчаній кислоті, колбу закривають, ретельно перемішують, об'єм розчину підкислюють сіркою до 25,0 мл і колбу закривають [20]. Для визначення алкалоїдів у грибах я використовую спиртовий екстракт, про приготування якого написано вище. 5,0 мл отриманого екстракту поміщають у мірну колбу об'ємом 25 мл, додають 5,0 мл розчину 10 г / л хромотропної кислоти натрієвої солі в сірчаній кислоті, колбу закривають, обережно перемішують, об'єм розчину підкислюють сіркою до 25,0 мл і колбу закривають [20].

Компенсаційне розчин. Готується паралельно з досліджуваним розчином. 5,0 мл сірчаної кислоти і 5,0 мл розчину 10 г / л хромотропної кислоти натрієвої солі в сірчаній кислоті поміщають в мірну колбу об'ємом 25 мл, колбу закривають, обережно перемішують, об'єм розчину підкисляють сірки до 25,0 мл і колбу закривають. Обидва розчини витримують на водяній бані протягом 10 хвилин, охолоджують до температури близько 20 ° С, а при необхідності з сірчаною кислотою доводять до обсягу 25,0 мл. Виміряйте оптичну щільність досліджуваного

розчину при довжині хвилі 570 нм у посуді товщиною 10 мм. Вміст суми алкалоїдів у перерахунку на хелідонін, у відсотках, обчислюється за формулою [20].

$$X = \frac{A \times 2.23}{m}$$

де: А - оптична щільність досліджуваного розчину при довжині хвилі 570 нм; m - маса зразка досліджуваної сировини, в грамах [20].

2.3. Висновки до розділу

З уражених лікарських рослин *Urtica dioica* і *Stachys officinalis*. ізольовано гриби *Ramularia urticae* Ces. та *Septoria stachydis* у чисту культуру, шляхом багаторазових пересівів. Культивування та накопичення культур грибів здійснювалося на картопляно-глюкозному агарі при температурі 25 °С.

Використано спектрофотометричний метод для визначення вмісту алкалоїдів та флавоноїдів, після проведених якісних реакцій з дослідними зразками.

РОЗДІЛ 3

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Мікроскопія грибів

Виділення грибів проводили стерилізацією рослинного матеріалу, посівом уражених частинок і спор на навколишнє середовище та отриманням чистої культури методом зрізання. Вирощування грибів протягом 14 днів у термостаті при температурі + 25 ° С за відсутності світла. Отримання кумулятивних культур методом твердофазного бродіння. Зразки міцелію мікроскопічних грибів (*Septoria stachydis* та *Ramularia urticae*) відбирали з чистих культур.

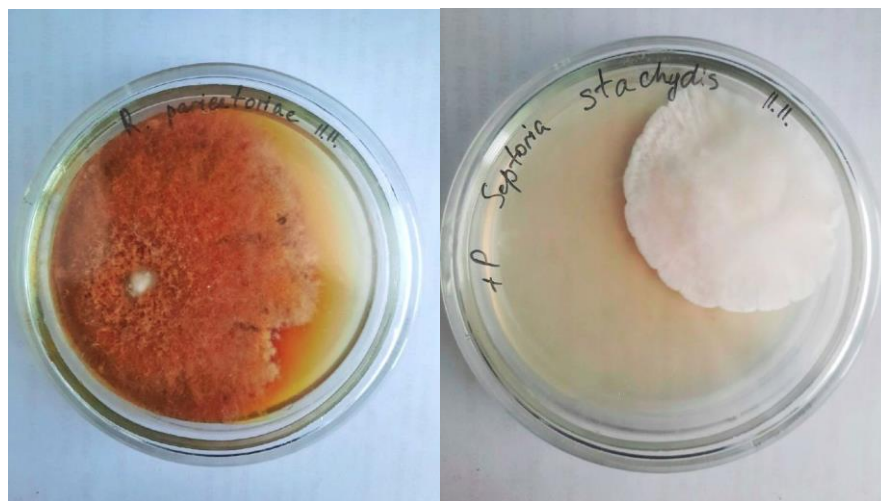


Рис 3.1.(а,б) Вигляд *Ramularia urticae* and *Septoria stachydis* на КГА поживному середовищі (10-тий день культивування)

Зразки грибів досліджували під електронним мікроскопом (ЕМ) та стандартним світловим мікроскопом, встановлюючи у воді або 5% -ному водному розчині молочної кислоти, або 1% бавовняного синього у лактофенолі. Зразки для скануючої електронної мікроскопії (SEM) покривали тонким шаром золота і

паладію за допомогою іонно-променевого розпилювального покриття JFC-1100. Зображення були отримані під скануючим електронним мікроскопом JEOL JSM-6060 LA в інститут ботаніки НАН України ім. М.Г. Холодного.



Рис.3.4. Електронно-скануючий мікроскоп JEOL JSM-6060 LA

Ізольовані гриби вивчали під світловим мікроскопом та скануючим електронним мікроскопом. Була використана модель світлового мікроскопа МВІ-3, окуляри Carl Zeiss 12,5 та лінзи (x10, x20, x40). Мікроструктури та деталі морфології грибів вивчали під скануючим електронним мікроскопом із збільшенням x500 - x50 000. Модель скануючого електронного мікроскопа була JEOL JSM-6060 LA. Напруга становила 19-23 кВ. Електронний мікроскоп працював в умовах вакууму та при низькій вологості. Принцип роботи електронного мікроскопа заснований на використанні пучка прискорених електронів як джерела світла.

Ці електрони взаємодіють з атомами всередині зразка і виробляють різні сигнали, що містять інформацію про топографію поверхні зразка.

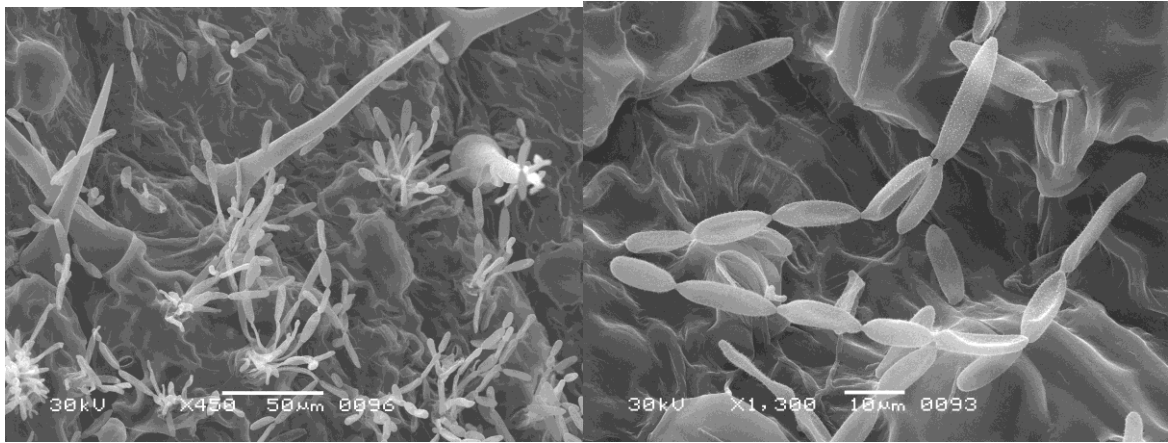


Fig.3.5-3.6 *Ramularia urticae*, X 450, X 1 300

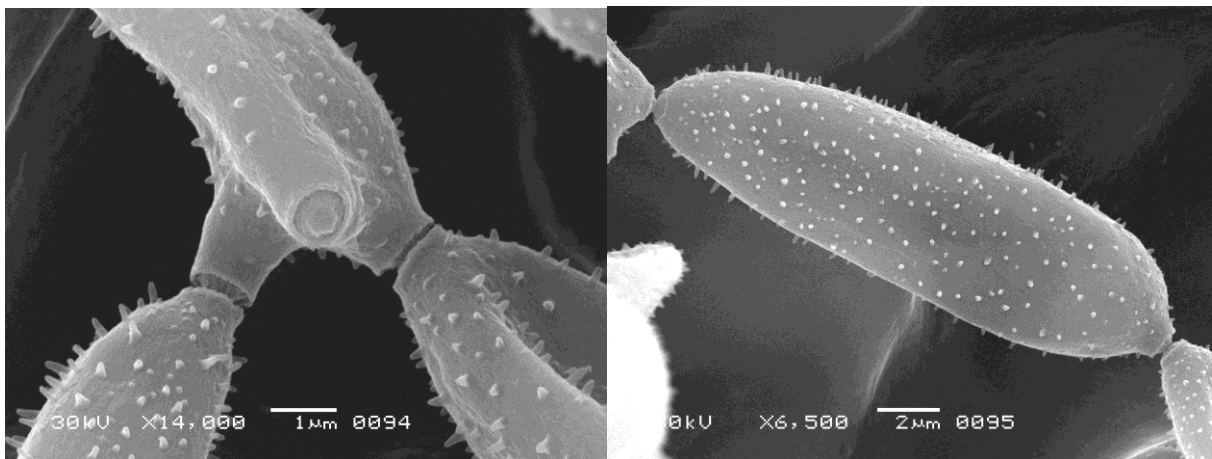


Fig.3.7-3.8 *Ramularia urticae* X 4 000, X 6 000

Середовище проживання: на живих листках, ураження розвиваються на листках різного віку та протягом усього вегетаційного періоду. Листяні плями спочатку на живих листках, сірувато-зелені, дрібні, орбікулярні або кутові, завширшки 1–2 мм, розсіяні і без чітких полів; пізніше неправильна або орбікулярна, розсіяна, розвивається між основними жилками листя, діаметром 3–5 мм. (іноді діаметром до 10–12 мм), коричневий або сірувато-коричневий, без чітких полів, або іноді світло-сірий до сірувато-білого кольору в центрі спочатку інфікованих тканин, зовнішня сторона кожного краю утворює неяскраво виражений коричневий до темного коричневий ореол, ширина 1–3 мм, на верхній поверхні

листя; ті самі пошкодження на нижніх листкових поверхнях від сірувато-коричневого до сірувато-білого і різкіше відмежовані від здорових тканин, без чіткого запасу; коли численні ураження листя стають сухими, пригніченими, делікатними, нарешті, випадають невеликі ділянки мертвих тканин; несуть сірувато-білі або жовтувато-білі цеспітули на нижній і рідше верхній поверхні листа. Міцелій безбарвний, занурений, шириною 1–4 мкм, перегородковий, розгалужений, утворюючи в тканинах листя строматичні, безбарвні, дрібні, кулясті або підглобові гіфали, діаметром 12–20 (–22) мкм, функціонуючи як склероції для перезимівлі гриба. ; скупчення поступово трохи піднімають поверхню листа і розсувають продихи листя, несучи мало-багато конідіофор, що виступають вгору. Конідіофори безбарвні, циліндричні до субциліндричні, (12–) 30–60 (–85). (1–5–) 2–5–5 · 0 (–7 · 0) мкм, гладкі, прямі або гнучкі, колінчасті, іноді вузлуваті, кінцево розгалужені, утворюючи вузькі та короткі вирости, одноклітинні і, отже, не більше одного конідіогенного клітина, або довша і 1–3-септатна. Клітини конідіогенних кінцевих, безбарвні, глобластні, з невеликою кількістю симподіальних проліферацій. Конідіогенні рубці товстіші, темніші, помітні (розглядаються під складним світловим мікроскопом), діаметр 1 · 0–1 · 2 мкм .; з низьким, неправильним до розірваного периклінального обідка, шириною 0,1 мкм і піднятим до 0,13–0,16 мкм, де стінки конідіогенної клітини і конідію з'єднані до сецесії, а центральний купол утворений незначним випинанням розмежувальна перегородка, до. Висота 0 · 1 мкм із сплющеною гладкою площею діаметром 0,5 мкм, пізніше менш конічна, більш плоска та більш гранульована (розглядається під скануючим електронним мікроскопом). Конідії безбарвні, контактні, ланцюжки симподіальні, короткі або більш розвинені, рясні, утворюються глобластично; одиничні конідії веретеноподібно-еліпсоїдні до веретеноподібно-циліндричних, 5–30 (–40). 2 · 5–3 · 0 (- 4 · 0) мкм, із масовим зеленуватим відтінком, ехінулят (розглядається під складним світловим мікроскопом) з орнаментациєю до 1 · 0–0 · 5. 0 · 1–0 · 2 мкм (переглядається під скануючим електронним мікроскопом); Конідії іноді замість них веррукозні (розглядаються під складним світловим мікроскопом) і рідко мурикуються з поверхневими орнаментами 0 · 1–0 · 2. 0 · 15–0 · 17 мкм

(переглядається під скануючим електронним мікроскопом); рідко гладка; зазвичай одноклітинні або з 1–3 перегородками, не вужчі в перегородках, верхівкові та базальні клітини, не відрізняються за розмірами; кінці тупі та злегка звужені в місцях з'єднання, конідіальні рубці загострені, товстіші, темніші, підняті до висоти 0,2 мкм (розглядаються під скануючим електронним мікроскопом), у більш старих конідій, більше вбудованих у стінку конідіалу.

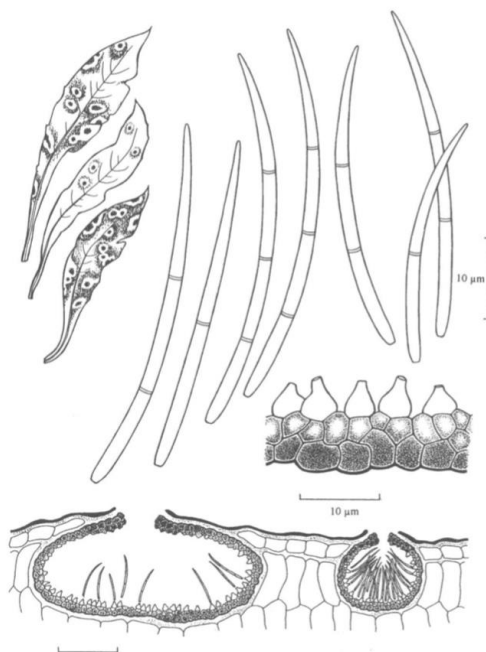


Рис.3.9. Symptoms on leaves. B. Cross section of conidiomata. C. Conidiogenous cells. D. Conidia.

Середовище проживання: На живих листках у середній та нижній частинах стебла, зрідка на нижніх частинах стебла протягом усього вегетаційного сезону. Листяні плями. Спочатку орбітулярний, завдовжки 1-2 мм і зеленуватий; пізніше орбікулярний, неправильний, розсіяний, невеликий, діаметром приблизно 2–4 мм, іноді до 10 мм, з блідо-зеленувато-коричневим, пізніше блідо-жовтувато-коричневим центром і тонким, червонувато-коричневим, досить чітким краєм, різко відмежованим від центру пляма, яка згодом стає широкою і утворює погано виражений фіолетовий ореол; коли численні, часто зростаються на нерегулярних ділянках із мертвою рослинною тканиною в центрі та зливаючись червонуватим до

фіолетового ореолом по краях листа; іноді покриває до 60–70% поверхні листа; утворюючи численні конідіомати. Конідіомати. Круглий або еліптичний, якщо дивитись зверху; як правило, покритий тонким шаром епідермальної тканини листа, поступово трохи піднімаючи поверхню листа над остіолом, згодом розбиваючись, зруйнувався епідермальні клітини або рухомі деградовані продиhi листа; пікнідіальний, на верхній стороні аркуша, окремих, зібраних в центрі плями, занурений, пізніше вивержений, коричневий, кулястий або підглобовий до стиснутого з боків, тонкостінного, (75-) 80-125 (-160) μm diam., остіолятна, зі стінкою товщиною 7,5-9 (-10) μm , складеною з двох-трьох шарів *textura angularis*, що варіюється від коричневого в зовнішніх частинах до блідо-коричневого всередині. Остіола. Круглий, іноді трохи сосочковий, центральний, діаметром 20-30 μm , оточений дрібними темними клітинками. Конідіогенні клітини. Безбарвний, голобластний, лагеніформний, 6–8 х, що виникає із менших клітин, що вистилають порожнину конідіомата, кожна з яких утворює лише один конідій, з не потовщеними рубцями. Конідії. Безбарвний, (25-) 35-50 (-65) х (1-) 1,5-2 μm , прямий або злегка зігнутий, широко-лопатевий, ниткоподібний, звужений і підгострий на верхівці, злегка ослаблений і усічений біля основи, 1- 3-септатна, не стиснута в перегорodkaх, верхівкова клітина іноді довша за базальну клітину. 3,5-5 μm , дискретний. Захворювання: пляма листа. У насінневих запасах конідіомати зазвичай зустрічаються на фрагментах стручків, стебел або листа, і лише рідко на насінні. Розвиток *Septoria stachydis* призводить до сильного опіку, сушіння всіх листа починається знизу рослини. Це знижує життєвий тонус рослини і може спричинити його загибель.

3.2. Вміст біологічно активних речовин

Аналіз алкалоїдів, флавоноїдів та вітамінів проводили в грибах *Urtica dioica*, *Stachys officinalis* та асоційованих з ними *Ramularia urticae* Ces та *Septoria stachydis* грибів відповідно. алкалоїдів, флавоноїдів та вітамінів проводили за допомогою фотоколориметра КФК-3-01 (див. рисунок 3.9). Фотоелектричний фотометричний

КФК-3-01- «ЗОМЗ» призначений для вимірювання спектрального коефіцієнта пропускання, оптичної щільності та швидкості зміни оптичної щільності прозорих рідких розчинів, а також для визначення концентрації речовин у розчині.

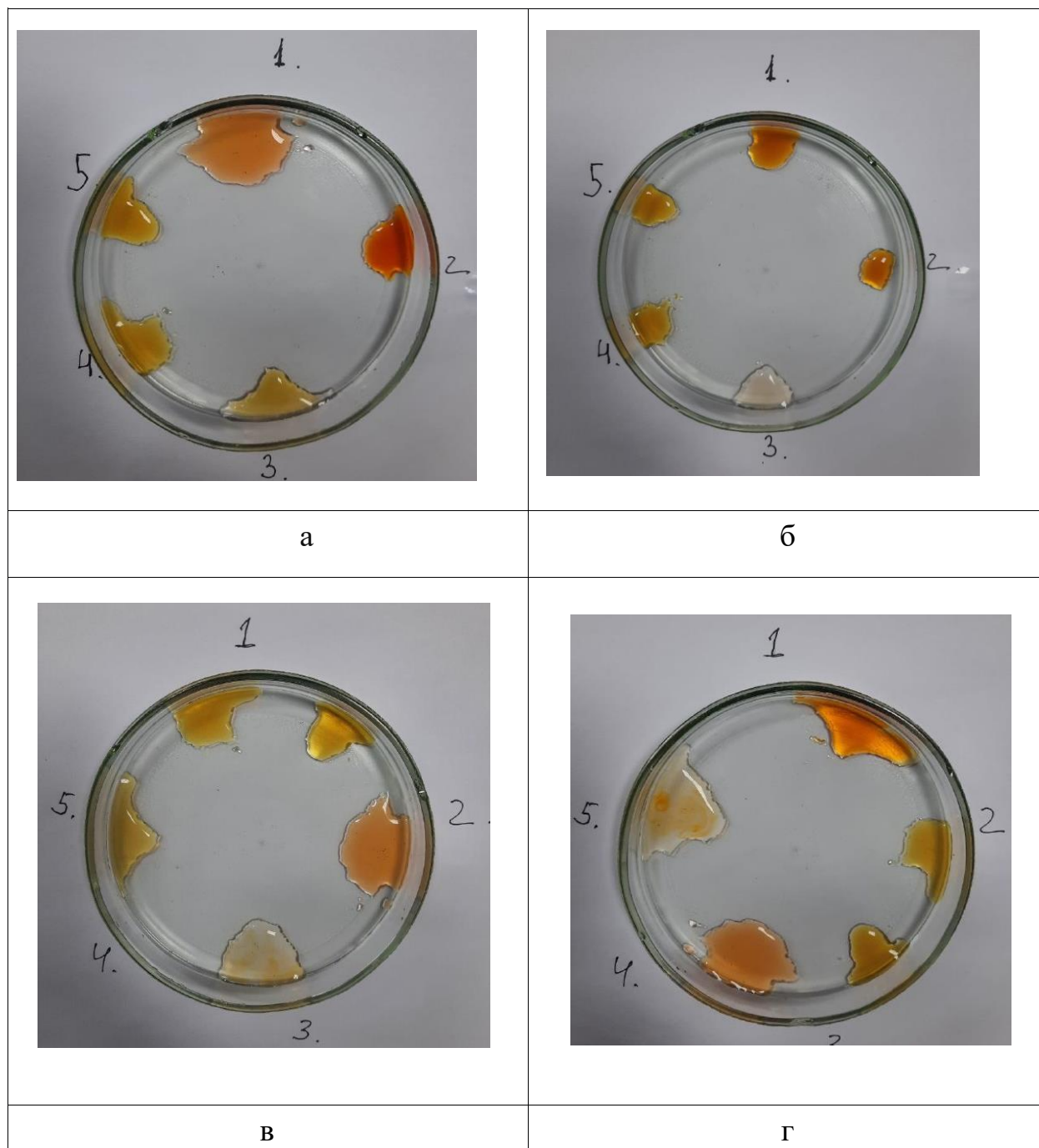


Рис. 3.10. Результати якісних реакцій на флавоноїди: а - *Stachys officinalis*, б - *Urtica dioica*, в - *Septoria stachydis*, г - *Ramularia urticae*

Якісні реакції на флавоноїди (див. рис. 3.10) проводили з експериментальними зразками. Флавоноїди дають з деякими реагентами кольорові реакції або утворюють нерозчинні осад, які лягли в основу методів їх визначення.

Таблиця 3.1

Результати якісних реакцій на флавоноїди

№	Реактиви	<i>Urtica dioica</i>	<i>Stachys officinalis</i>	<i>Ramularia urticae</i>	<i>Septoria stachydis</i>
1	Реактив Драгендорфа	Оранжевий осад +	Оранжевий осад +	Оранжевий осад +	Оранжевий +
2	Реактив Зонненштейна	Жовтий осад +	Оранжево-коричневий +	Жовтий осад +	Жовтий +
3	Реактив Шейблера	Не відбулося зміни	Слабко жовтий колір +	Не відбулося зміни	Не відбулося зміни
4	5% розчин таніну	Жовтий осад +	Жовтий +	Слабко жовтий осад +	Слабко жовтий колір +
5	Розчин пікринової кислоти	Жовтий +	Жовтий +	Слабко жовтий +	Оранжевий осад +

Результати кількісного визначення флавоноїдів описані в табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Оптична густина експериментальних зразків при довжині хвилі 425 нм.

	<i>Urtica dioica</i>	<i>Ramularia urticae</i>	<i>Stachys officinalis</i>	<i>Septoria stachydis</i>
1	0,47	0,12	0,32	0,060
2	0,53	0,10	0,32	0,065

3	0,52	0,12	0,31	0,063
---	------	------	------	-------

Вміст кількості флавоноїдів у перерахунку на кверцетин, у відсотках, розраховується за формулою, зазначеною в методах визначення.

Таблиця 3.3

Результати кількісного визначення флавоноїдів

	<i>Urtica dioica</i>	<i>Ramularia urticae</i>	<i>Stachys officinalis</i>	<i>Septoria stachydis</i>
1	2,12	0,53	1,4	0,27
2	2,4	0,49	1,4	0,3
3	2,36	0,51	1,39	0,31

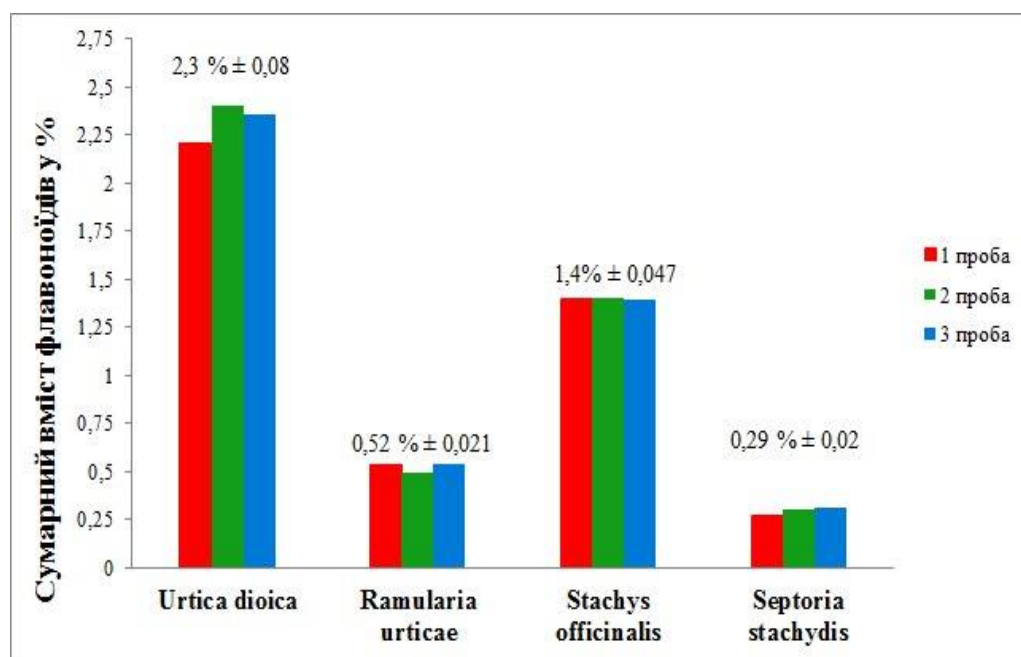


Рис. 3.11 1 - *Urtica dioica*, 2 - *Ramularia urticae*, 3 - *Stachys officinalis*, 4 - *Septoria stachydis*

Відповідно до схеми (див. рис 3.11) можна зробити такі висновки: *Urtica dioica*. містить найбільшу кількість алкалоїдів - 2,3%, *Stachys officinalis*. - 1,4%. Гриби, пов'язані з *U. dioica* L. та *Stachys officinalis* - *Ramularia urticae* та *Septoria*

stachydis, відповідно, також виробляють алкалоїди, але в менших кількостях, порівняно з рослинами, 0,53% та 0,3%. Також були проведені якісні реакції на алкалоїди (див. бабл 3.1) з експериментальними прототипами. Результати проведення якісних реакцій наведені на Рис. 3.12

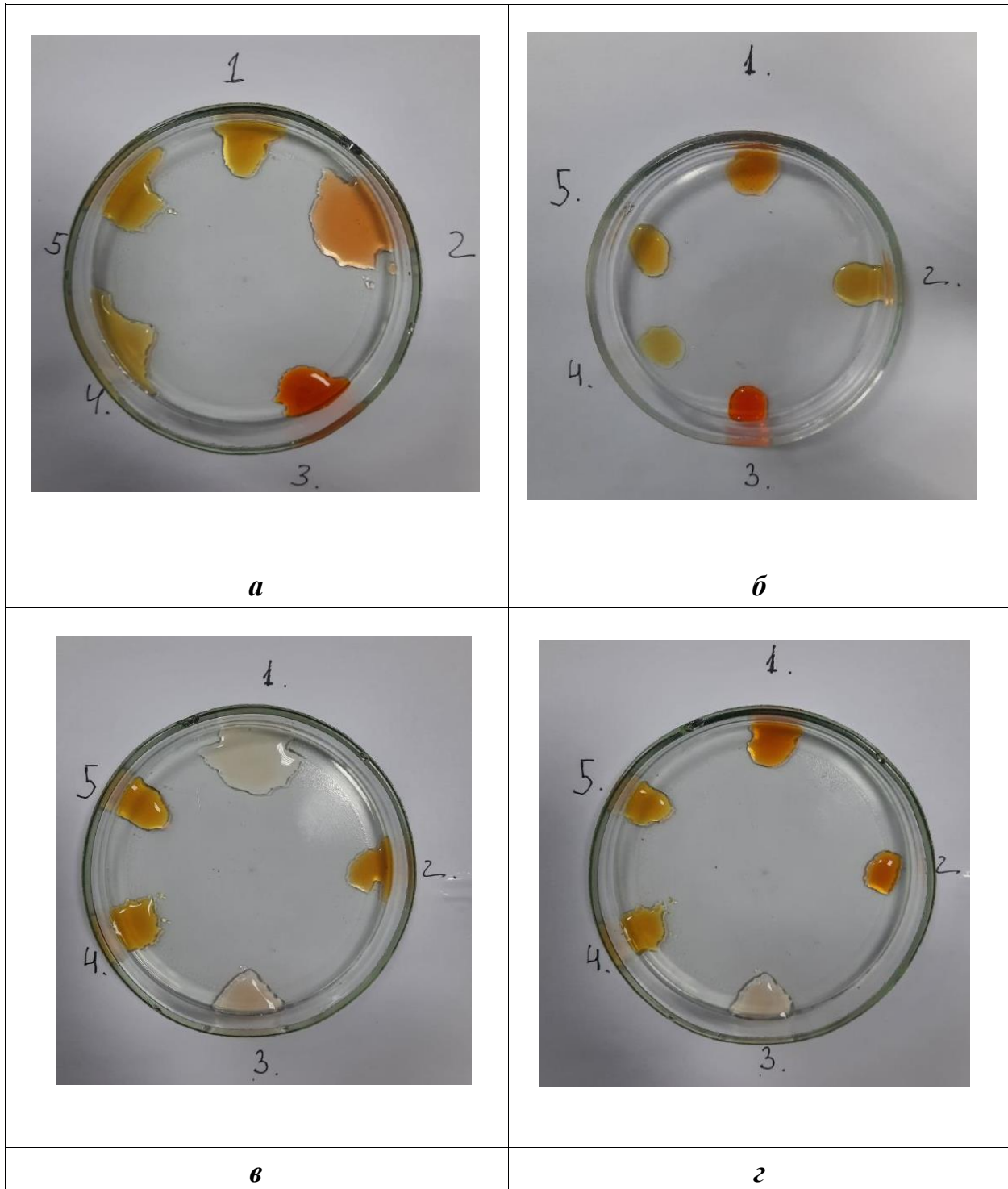


Рис. 3.12 Результати якісних реакцій на алкалоїди: а - *Stachys officinalis*, б - *Urtica dioica*, в - *Septoria stachydis*, г - *Ramularia urticae*

Наявність кольорової реакції або поява осаду вказує на наявність алкалоїдів у досліджуваних зразках.

Таблиця 3.4

Результати якісного визначення алкалоїдів

№	Реактиви	<i>Urtica dioica</i>	<i>Stachys officinalis</i>	<i>Ramularia urticae</i>	<i>Septoria stachydis</i>
1	Залізо III хлорид	Світло Коричневий +	Світло Коричневий +	Світло Коричневий +	Не відбулося зміни -
2	Свинцю ацетат	Насичений жовтий осад +	Жовтий осад +	Слабко жовтий осад +	Слабко жовтий осад +
3	Проба Шинода	Оранжево- червоне забарвлення +	Оранжеве забарвлення +	Не відбулося зміни	Не відбулося зміни
4	Алюміній хлорид	Жовтий +	Жовтий +	Жовтий +	Жовтий +
5	10% спиртово- водний розчин NaOH	Жовтий +	Жовтий +	Жовтий +	Жовтий +

Результати кількісного визначення алкалоїдів описані в табл. 3.5

Таблиця 3.5

Оптична густина експериментальних зразків при довжині хвилі 570 нм.

	<i>Urtica dioica</i>	<i>Ramularia urticae</i>	<i>Stachys officinalis</i>	<i>Septoria stachydis</i>
1	0,103	0,068	0,12	0,075
2	0,101	0,070	0,11	0,072

3	0,101	0,070	0,12	0,070
---	-------	-------	------	-------

Вміст кількості алкалоїдів у перерахунку на хелодонін, у відсотках, розраховується за формулою, зазначеною в методах визначення.

Таблиця 3.6.

Результати якісного визначення алкалоїдів

	<i>Urtica dioica</i>	<i>Ramularia urticae</i>	<i>Stachys officinalis</i>	<i>Septoria stachydis</i>
1	0,35	0,1	0,53	0,15
2	0,33	0,097	0,49	0,13
3	0,34	0,098	0,51	0,12

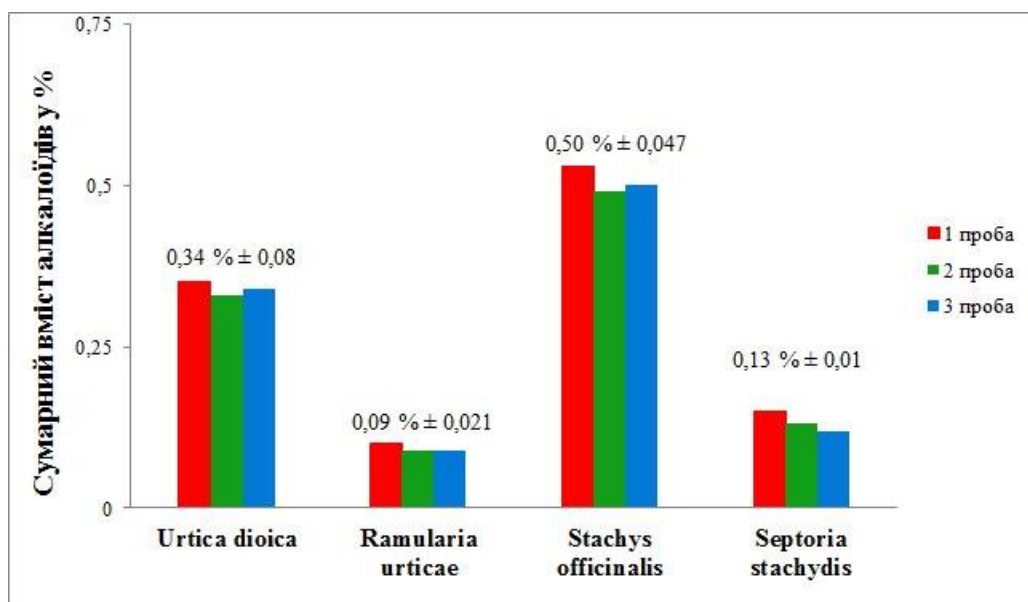


Рис. 3.12 1 - *Urtica dioica*, 2 - *Ramularia urticae*, 3 - *Stachys officinalis*, 4 - *Septoria stachydis*

Відповідно до діаграми (див. Рис 3.12) можна зробити такі висновки: *Stachys officinalis* містить найбільшу кількість алкалоїдів - 0,5%, *Urtica dioica* L. - 0,33%. З ними пов'язані гриби - *Ramularia urticae*, відповідно отримують алкалоїди *Septoria stachydis*, відповідно, алкалоїди, але в меншій кількості, порівняно з рослинами, 0,1% і 0,13%.

РОЗДІЛ 4

ОХОРОНА ПРАЦІ

4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори при дослідженні мікроміцетів *Septoria* і *Ramularia*

Експериментальна частина дипломної роботи проводилась в лабораторії на базі Факультету екологічної безпеки інженерії та технологій Національного авіаційного університету. Експериментальна частина роботи складається з процесів виділення та культивування мікроміцетів *Septoria* і *Ramularia*, а також подальшого скринінгу біологічно активних речовин в виділених грибах. При виконанні роботи було проаналізовано умови праці та виявлено ряд небезпечних та шкідливих виробничих факторів, які впливають на працездатність та здоров'я працівників лабораторії.

Відповідно до ГОСТ 12.0.003-74 на працівника у біотехнологічній лабораторії діяли фізичні, хімічні та біологічні небезпечні та шкідливі виробничі фактори. До фізичних небезпечних та шкідливих виробничих факторів відносяться – підвищений рівень ультрафіолетової радіації; відсутність природного сонячного світла в робочій зоні; Знижена рухомість повітря та збільшена запиленість/загазованість повітря в робочій зоні.

До хімічних небезпечних та шкідливих виробничих факторів відносяться – токсичні речовини, що використовувались для проведення дослідів та очистки інструментів.

До біологічних небезпечних та шкідливих виробничих факторів відносяться – патогенні мікроорганізми ендofіти та продукти їх життєдіяльності.

Підвищений рівень ультрафіолетової радіації. Ультрафіолетові хвилі невидимі для людського ока, та наслідок перебування під таким випромінюванням організм отримує негативний вплив. Ультрафіолетовими вважаються хвилі з довжиною хвилі від 0,0137 до 0,4 мкм. Для оцінки ультрафіолетового випромінювання використовують еритемну дозу (мін час перебування під хвилями, що викликає на непідготовленій

(незагорілій) шкірі почервоніння). Для того щоб запобігти негативного впливу достатньо отримувати 1/10 еритемної дози, тобто 50-90 мбер хв/см². Бактерицидна дія УФ –випромінювання, а саме здатність убивати хвороботворні мікроорганізми, залежить від довжини хвилі. Уф-промені з довжиною хвилі 0,335 мкм мають бактерицидний ефект в 1000 разів вищий, ніж УФ-промені з довжиною хвилі 0,41 мкм. УФ-випромінювання з довжиною хвилі 0,255-0,258 мкм мають максимальний бактерицидний ефект [1].

Відсутність природного світла в робочій зоні. Важливим фактором для комфортної роботи в лабораторії, є освітлення в робочій зоні (робочих поверхонь) [2]. Якщо природне освітлення відсутнє, важливо забезпечити достатню освітленість приміщення для працівників. Непропорційна освітленість втомлює очі, призводить до зниження продуктивності в роботі та сильно зростає потенційна небезпека хибних дій та нещасних випадків [3].

Штучне освітлення передбачається у лабораторному приміщенні в період з недостатнім природним освітленням, а також для освітлення в нічний період доби. Найменша освітленість у виробничих приміщеннях регламентується ДБН В.2.5-28-2018 і визначена в характеристиці зорової роботи [4]. Верхня точка нормованої освітленості дорівнює 5000 лк (розряд перший а), а найменша – 30 лк. Основою штучного освітлення можуть бути лампи розжарювання та газорозрядні лампи[4].

Понижена рухомість повітря, підвищена запиленість/загазованість повітря в робочій зоні. Іноді на підприємствах виникає проблема зі зниженістю рухомості повітря, яка може зашкодити нормальному робочому процесу. Для врегулювання швидкості руху повітря застосовують природні та штучні вентиляційні системи. У робочій зоні в лабораторних приміщеннях ДСН 3.3.6.042-99 встановлені загальні норми температури, відносної вологості та швидкості циркуляції повітря в теплий та холодний періоди року [5].

Швидкість переміщення повітря в робочій зоні має бути не більше 0,2м/сек[6].

Якщо вентиляції в приміщенні занижка, то утворюються застійні зони, де накопичуються шкідливі речовини (гази, волога, пил, пар).

Будь-яка схема вентиляції має прогнозувати одночасно збільшення потоку зовнішнього повітря і витяжку використаного, забезпечуючи баланс повітря в лабораторії. Мікроклімат робочій зоні – головний фактор, що зумовлює зручні умови праці [3]. На рівень працездатності працівників та обсяг чистоти повітря в робочій зоні можуть впливати наявні в повітряному потоці патогенні мікроорганізми.

Токсичні хімічні небезпечні і шкідливі виробничі фактори. До цієї групи хімічних факторів належать спирт етиловий, який застосовується для дезінфекції інструментів. Етиловий спирт належить до IV-го класу безпеки, а його ГДК у повітрі робочої зони згідно ГОСТ 12.1.005-88 становить 1000 мг/м^3 [7]. До цієї групи відносять також ацетон, що використовувався для очистки хімічного посуду. Ацетон відносять до IV-го класу безпеки із встановленим ГДК у повітрі робочої зони – 300 мг/м^3 .

Патогенні мікроорганізми та продукти їх життєдіяльності. В процесі дослідження мікроміцетів *Septoria* і *Ramularia* у лабораторії наявні різні штами мікроорганізмів, деякі з них можуть мати патогенну природу.

Тому, у лабораторії можливе забруднення повітря робочого приміщення, одягу персоналу, поверхонь та обладнання що використовувалось для роботи з мікроорганізмами та речовинами що виділяються в процесі їхньої життєдіяльності. Контамінація може відбуватись під час контролю відібраних проб, виділення чистої культури, а також з чашок Петрі та колб під час утилізації.

Максимальна допустима концентрація мікроорганізмів-продуцентів в повітрі лабораторії дорівнює $5 \cdot 10^{-4} \text{ КУО/м}^3$ згідно Наказу МОЗ №521 від 26.10.2004 року про затвердження методичних вказівок «Медико-біологічні дослідження виробничих штамів мікроорганізмів і токсиколого-гігієнічна оцінка мікробних препаратів, визначення їх безпеки та обґрунтування гігієнічних нормативів і регламентів».

Повітря робочої зони також забруднюється хімічними речовинами, що використовуються для аналізу, а також виробляються мікроорганізмами. Правила організації роботи в лабораторії, вчасності з мікроорганізмами повинні відповідати нормативно-правовому документу ДСП 9.9.5.-080-02.

4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів при дослідженні мікроміцетів *Septoria* і *Ramularia*

Засоби захисту направлені на зменшення рівня ультрафіолетових випромінювань містять такі прилади: вентиляційні, огорожувальні (екрани), автоматичного і дистанційного керування [8].

Ультрафіолетове випромінювання з довжиною хвилі менше 0,33 мкм, може викликати електрофтальмію. Також часто спостерігаються захворювання шкіри обличчя та повік. Можливо виникнення хронічних катаракт, кон'юнктивітів та блефаритів [6].

Ультрафіолетові бактерицидні лампи мають використовуватися в приміщеннях з високим та середнім рівнем забрудненості мікроорганізмами та при великих скупченнях людей. Від ультрафіолетового випромінювання застосовують захист – віддалення робочого місця від джерел випромінювання, захисні екрани, ширми, фарбування стін у світлі тони для більшого відображення променів. Як засоби персонального захисту використовують захисний одяг, взуття, рукавички, головні убори.

Шкіру захищають нанесенням спеціальних засобів, що містить салол саліцилово-метиловий ефір тощо. Очі потрібно захищати окулярами, щитками зі світлофільтрами в залежності від інтенсивності випромінювання [5].

Засоби захисту та нормалізації світла лабораторій – світлофільтри, світлозахисні механізми, засоби індивідуального захисту очей. Рівень освітленості робочих поверхонь повинен відповідати гігієнічним нормам згідно з ДБН В.2.5.-28–2018. У виробничій лабораторії та всіх суміжних приміщеннях має використовуватись природне та штучне освітлення [10].

До засобів захисту, а також нормалізації повітряного середовища відносяться вентиляція, кондиціонування, автоматичний контроль. Повітря повинно поступати та відводитися проходячи через бактеріальні фільтри, очищаючись від шкідливих

речовин. Вентиляція повинна здійснюватися за допомогою припливно-витяжної системи відповідно до ДБН В.2.5-67:2013 та ДСН 3.3.6.042-99 [8-9].

Захист співробітників від негативного впливу хімічних небезпечних і шкідливих виробничих факторів. Для того, щоб зменшити вплив шкідливої дії хімічних речовин на здоров'я персоналу насамперед в лабораторії повинні бути встановлені ефективні загальні і місцеві витяжні вентиляції приміщень і робочих місць, замінені хімічні небезпечні виробничі процеси на безпечні або менш небезпечні шляхом встановлення новітніх технологій малого ризику.

Зберігання хімічних реактивів та речовин потрібно здійснювати у спеціально відведених для цього місцях в стерильному посуді із щільно проникаючими гумовими пробками для зменшення можливості летючості відповідних речовин. Слід вдосконалювати наявні технологічні процеси комплексною механізацією та автоматизацією, що супроводжуються шкідливими виділеннями. Необхідно проводити контроль концентрацій шкідливих хімічних речовин у повітрі робочої зони згідно методам та засобам, що відповідають вимогам ГОСТ 12.1.016-79[7].

Перед початком роботи кожен співробітник повинен отримати відповідну підготовку в сфері безпеки та гігієни праці, зокрема, у формі викладення інформації та проведення інструктажу стосовно робочого місця або виконуваної роботи, а також отримати необхідний медичний огляд для отримання допуску в лабораторію. До перебування персоналу в лабораторному приміщенні мають бути допущені особи, яким виповнилося 18 років, мають профільну освіту та користуються засобами персонального захисту – халатом, латексними рукавичками, змінному взутті, одноразовою маскою та шапочкою, респіратором, антисептиком тощо.

Для запобігання отруєнь хімічними речовинами та помилки користування усі ємкості мають бути з етикеткою (назва реактиву, хімічна формула, дата, токсичність). Відходи хімічних речовин та органічних розчинників повинні зберігатись у спеціальних контейнерах [11].

Мінімальне число персоналу в лабораторії при виконанні небезпечних робіт та вночі повинне бути не менше двох осіб. Обов'язковою вимогою для приміщення є розташування укомплектованої аптечки на доступному місці із засобами першої

медичної допомоги. В лабораторії повинні бути передбачені заходи для того, щоб працівники отримали можливість обстеження здоров'я в зв'язку з ризиком для їх безпеки і здоров'я, якому вони піддаються в процесі роботи, відповідно до національного закону.

Системи вентиляції та опалення повинні забезпечувати відповідні параметри мікроклімату. В умовах жаркого клімату в робочих кімнатах та боксах встановлюються кондиціонери. Під час роботи з біологічним матеріалом їх вимикають.

Для лабораторій мікробіологічного профілю слід передбачати системи припливно-витяжної вентиляції, які відповідають СНіП 2.04.05-91, ДСН 3.3.6.042-99. В усіх лабораторіях, що будуються або реконструюються, необхідно передбачати обладнання автономної припливно-витяжної вентиляції з встановленням фільтрів тонкого очищення повітря, що викидається з «заразної» зони (або обладнання цих приміщень боксами біологічної безпеки). Магістральні коробки припливно-витяжної вентиляції, електричних, водопровідних, каналізаційних мереж розміщуються у спеціальних нішах коридорів, щоб забезпечити вільний доступ до них під час профілактичного огляду [12].

Розрахунок продуктивності вентиляції лабораторії. Відповідно до санітарних документів лабораторні приміщення повинні мати вентиляційні системи. Потрібний повітрообмін (к-ть повітря, що поступає чи видаляється з приміщення) за одиницю часу (L , m^3 /год) може бути обрахований різними методами, які залежать від конкретних умов. При стандартному мікрокліматі і відсутності шкідливих речовин повітрообмін може бути визначений по формулі:

$$L = n \cdot L',$$

де n – число працюючих;

L' – використання повітря на одного співробітника, прийнята в залежності від об'єму лабораторії, що приходить на одного працюючого V' , m^3 (при $V' < 20 m^3$ $L' = 30 m^3$ /год; при $V' = 20...40 m^3$ $L' = 20 m^3$ /год; при $V' > 40 m^3$ і при наявності природної вентиляції повітрообмін не розраховують); при відсутності природної

вентиляції (герметичні кабінки) $L' = 60 \text{ м}^3 / \text{год}$). Тобто для 5 лаборантів при нормальному мікрокліматі та відсутності шкідливих речовин повітрообмін повинен становити:

$$L = 5 \cdot 20 = 100 \text{ м}^3 / \text{год}$$

Для точного визначення повітрообміну (L , $\text{м}^3 / \text{год}$) застосовують розрахунок по кратності повітрообміну. Кратність повітрообміну (K) показує, скільки разів за годину змінюється повітря у всьому об'ємі приміщення (V , м^3):

$$L = K \cdot V,$$

де K – коефіцієнт кратності повітрообміну ($K = 1 \dots 10$).

Визначаємо повітрообмін в лабораторії з виробництва функціональної продукції за формулою:

$$L = 5 \cdot 100 = 500 \text{ м}^3 / \text{год}$$

Тобто, під час перебування працівників у виробничій лабораторії потрібно визначати повітрообмін, адже система вентиляції не повинна створювати додаткових шкідливих і небезпечних факторів (переохолодження, перегрів, шум, вібрацію, пожежовибухонебезпечність).

4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки при дослідженні мікроміцетів *Septoria* і *Ramularia*

Забезпечення протипожежної та противибухової безпеки – важливий етап в процесі відкриття та акредитації кафедральної лабораторії. Тому важливо забезпечити систему пожежної безпеки та профілактики. Для запобігання пожежі в лабораторії вводять систему організаційно-технічних заходів [13].

Джерелами пожежі у мікробіологічній лабораторії можуть бути:

- відкрите полум'я;
- несправне електроустаткування, несправності в електропроводці,

- електричних розетках та вимикачах;
- перевантаження освітлювальних та силових мереж;
- несправні електроприлади;
- коротке замикання;
- перегрів електричного обладнання;
- невиконання вимог нормативних документів з питань пожежної безпеки та паління в недозволених місцях.

До можливих причин вибуху у мікробіологічній лабораторії можна віднести наявність в приміщенні ємкості з легкозаймистими розчинниками, несправне обладнання, ємкості з горючими рідинами.

На випадок можливої пожежі в лабораторії мають бути:

- вогнегасник;
- листовий азбест або азбестова тканина;
- відро з дрібним піском;
- пожежний рукав;
- чотирихлористий вуглець.

В лабораторії пожежна безпека забезпечується за рахунок пожежної протипожежних заходів з попередженням можливих виникнення пожежі й організації пожежогасіння, саме швидкої ліквідації, що виникла [6].

Для того, щоб забезпечити пожежо- та вибухо- безпеку передбачені профілактичні заходи та плановий повний ремонт технологічного обладнання. Вони мають здійснюватися в терміни, передбачені проектом, технологічним регламентом, технічним протоколом.

Якщо були виявлені ознаки пожежі (горіння) в лабораторії має бути оголошена пожежна тривога та включений сигнал загальної евакуації. негайно має бути повідомлений пожежно-рятувальний підрозділ та керівник чи відповідальну компетентну особу. За можливості потрібно реалізувати заходи щодо евакуювання людей, гасіння пожежі первинними засобами пожежогасіння та збереження матеріальних цінностей.

Потрібно відключити від енергопостачання обладнання з дотриманням техніки безпеки. Для того щоб загасити пожежу використовують класичні засоби для гасіння пожежі (вогнегасник, простирадло, пісок та інше). Способи гасіння пожежі залежать від причин, так і від характеру об'єкту, що горить.

З прибуттям на пожежу пожежно-рятувальних підрозділів має бути забезпечено безперешкодний доступ їх на територію об'єкта, за винятком випадків, коли чинним законодавством встановлений особливий порядок допуску [14].

4.4. Висновки до розділу

Отже, у розділі 4 було проаналізовано небезпечні та шкідливі виробничі фактори, технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів у виробничій лабораторії, а також забезпечення пожежної та вибухової безпеки.

Серед небезпечних та шкідливих факторів кафедральної лабораторії важливе місце займає підвищений рівень забруднення повітря. Для регулювання якості повітря використовують вентиляційне обладнання.

Нами було розраховано повітрообмін, тобто обсяг повітря, що буде надаватися в приміщення. Для 5-ти працівників лабораторії необхідний повітрообмін становить $100 \text{ м}^3 / \text{год}$.

Для орієнтованого визначення повітрообміну було застосовано формулу для розрахунку кратності повітрообміну. Відповідно до розрахунків оптимальна коефіцієнт кратності повітрообміну визначений на позначці 5, а орієнтований повітрообмін для приміщення об'ємом 100 м^3 повинен бути 500 м

РОЗДІЛ 5

ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

Вторинні метаболіти (ВМ) - це природні продукти, що синтезуються рослинами, бактеріями, грибами. Це молекули з низькою молекулярною масою з різноманітною хімічною структурою та біологічною активністю. Назва вторинний метаболіт походить від первинного спостереження, що їх виробництво не є необхідним для росту та розмноження організмів, на відміну від первинних метаболітів, які включають ліпіди, амінокислоти, вуглеводи та нуклеїнові кислоти. Однак для ВМ краще використовувати термін "спеціалізовані метаболіти". Зараз прийнято, що ВМ відіграють ключову роль у виживанні організмів, що їх продукують, оскільки ВМ беруть участь у взаємодії рослини з навколишнім середовищем у формуванні захисних реакцій також ці сполуки часто беруть участь у захисті рослин від біотичних (бактерії, гриби, нематоди, комахи або випас тваринами) або абіотичних (більш висока температура і волога, затінення, травми або наявність сильних метали) стресів.

Вивчення біологічних функцій та структури вторинних метаболітів мають велике значення, оскільки завдяки цим знанням стало можливим їх використання в різних галузях промисловості. Багато вторинних метаболітів використовують як ароматизатори, смоли, камеді, підсилювачі смаку, інсектициди та гербіциди. З іншого боку, більшість ВМ знайшли користь у фармацевтичній промисловості, враховуючи велику кількість фармакологічних видів діяльності, які відомі про них.

5.1. Класифікація та основні функції

Для класифікації СМ було розглянуто декілька критеріїв: хімічна структура (наявність кілець або цукрів), склад (містить азот чи ні), їх розчинність в органічних розчинниках або воді та біосинтетичний шлях. З них найпоширенішим критерієм,

що використовується для групування СМ у рослин, був біосинтетичний шлях. Відповідно до цього СМ у рослинах можна розділити на три великі групи: терпени, фенольні сполуки та алкалоїди. 12

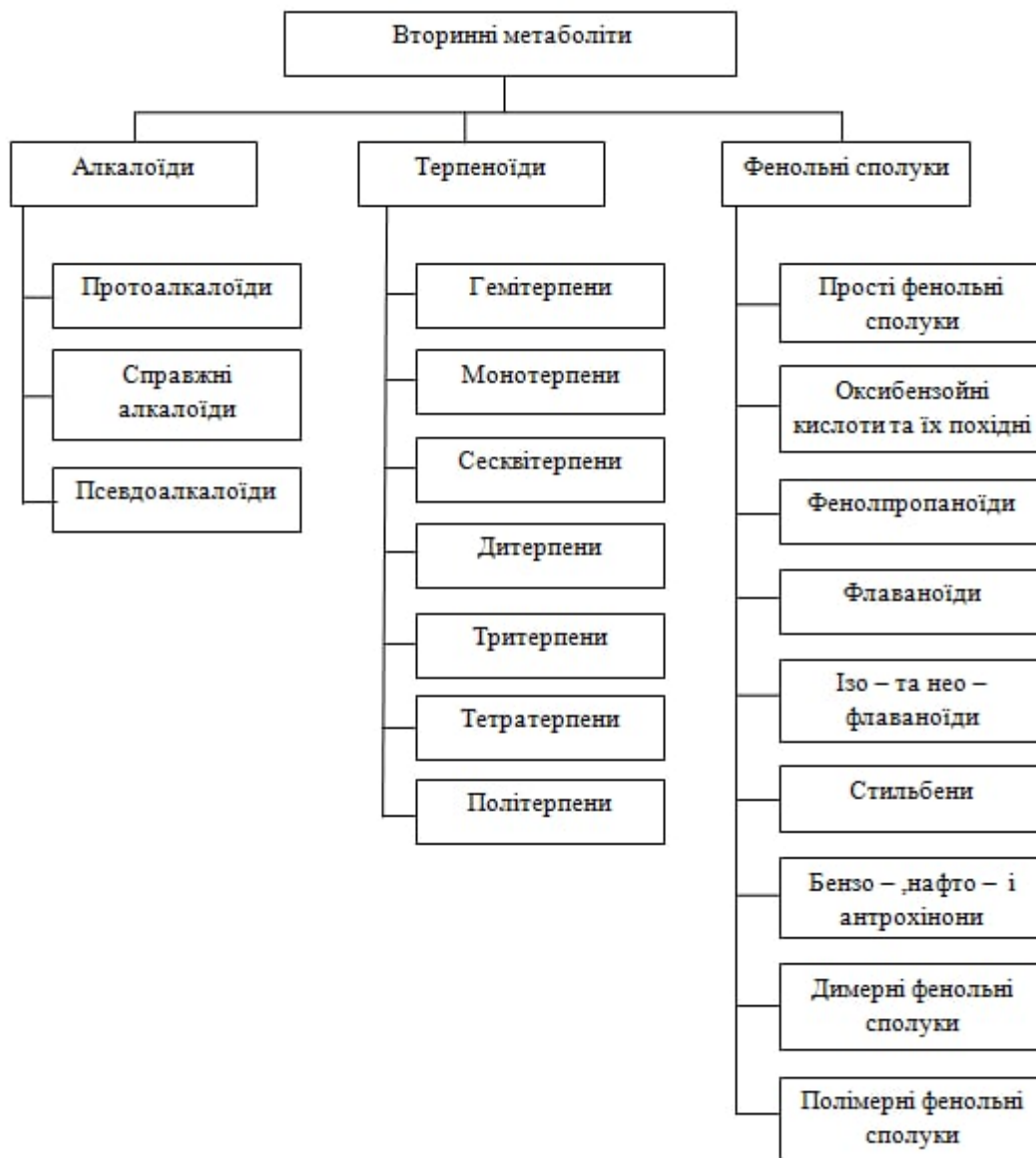


Рис. 5.1. Класифікація вторинних метаболітів

Терпени: вони складають найбільшу групу вторинних метаболітів у рослинах, до складу яких входить понад 40 000 різних молекул виділено¹².

Вони також відомі як ізопrenoїди, оскільки основною структурною одиницею, яка їх утворює, є молекула ізопрену¹³. Вони класифікуються за кількістю одиниць ізопрену, які вони містять. Найпростіший клас серед усіх - це гемітерпени з однією

одиницею ізопрену та п'ятьма вуглецевими структурами. Найвідомішим гемітерпеном є ізопрен, легкий продукт, що виділяється з фотосинтетично активних тканин.

Багато рослин містять у своїх квітах і плодах терпени у вигляді сумішей легких сполук зі специфічним запахом; серед них можна згадати лимон, м'яту, евкالیпт, імбир та великий базилік 24.

Терпени виконують кілька біологічних функцій і беруть участь як у первинному, так і у вторинному метаболізмі рослин. У центральному метаболізмі вони являють собою фотосинтетичні пігменти (каротини), електронноносії (убихінон та пластикінон), регулятори росту та розвитку рослин (гібериліни, стріголактони, брасиностероїди), входять до складу клітинних мембран (фітостерини) і беруть участь у глікозилюванні білка 25. У вторинному в метаболізмі вони беруть участь як захисні молекули, токсичні сполуки та харчові відлякувачі для комах. У деяких рослинах вони є відповідальними молекулами для залучення запилювачів, або вони діють як диспергатори 26,27,28,29.

Фенольні сполуки - це кількість вуглеців, присутніх у молекулі. Згідно з цим критерієм фенольні сполуки класифікуються на прості феноли, кислі феноли, ацетофенони та фенілоцтові кислоти, гідроксикоричні кислоти, кумарини, флавоноїди, біфлавоноїли, бензофенони, ксантони, стильбени, хінони та бетаціаніни.

До цієї групи належать також лігнани, неолігнани, дубильні речовини та флобафени. Останні є полімерами і мають більш складні структури 34,35.

Фенольні сполуки виконують у рослинах різні функції: вони швидко окислюються і діють як антиоксиданти 41,42,43, вони діють як інгібітори росту рослин 44, насіння накопичують значну кількість фенолів, які діють як фільтр, щоб кисень не потрапляв до зародка і не пригнічував його схожість 45. Феноли також накопичуються на поверхнях листя, вловлюючи до 90% УФ-випромінювання 46. Феноли надають плодам аромати і барвники, роблячи їх апетитними для рослиноїдних, що сприяє розпорошенню насіння через кал 47.

Рослини змагаються між собою за збереження своїх територій, і в цьому процесі (алелопатія) феноли беруть участь 48. Рослини також захищаються проти

атаки патогенних мікроорганізмів шляхом синтезу токсичних для мікроорганізмів фітоалексинів, а їх наявність запобігає інфекціям 49.

Феноли також захищають рослини, створюючи гіркі смаки або фактури, неприємні для травоядних тварин 50.

Алкалоїди: алкалоїди становлять ще одну велику та різноманітну групу СМ, яка включає молекули, виділені переважно із судинних рослин⁵¹. Рослини, як правило, виробляють складну суміш алкалоїдів, у якій домінує значний компонент. У даній рослині біосинтетичне походження присутніх алкалоїдів є загальним, навіть якщо їх структура дещо відрізняється 51. Іншим цікавим спостереженням є те, що концентрація алкалоїдів значно варіюється від однієї частини до іншої тієї ж рослини, і навіть в деяких частинах вона може не містити таких 52.

Алкалоїди містяться також у грибах, бактеріях та тваринах 53. Вони включають атом азоту у своїй структурі, є токсичними сполуками та реагують на загальні реакції осадження 54,55.

Навіть коли не існує єдиної класифікації алкалоїдів, для їх класифікації використовувались декілька критеріїв: біосинтетичне походження, наявність основного гетероциклічного ядра в структурі, фармакологічні властивості та розподіл у сімействах рослин 56. Серед цих критеріїв біосинтетичне походження алкалоїдів використовується досить часто. Відповідно до цього критерію алкалоїди класифікуються як справжні алкалоїди, протоалкалоїди та псевдоалкалоїди 57.

Сьогодні визнано, що роль, яку вони відіграють, полягає в захисті рослини від комах та рослиноїдних тварин завдяки його токсичності та стримуючій здатності. Хоча одні служать для захисту рослини від хижаків або мікроорганізмів (отруйних або відлякуючих речовин), інші роблять це, щоб конкурувати з іншими видами рослин у даному середовищі існування (алелопатичні речовини) 59,60.

Алкалоїди мають надзвичайні фізіологічні та токсикологічні властивості, які в основному діють на нервову систему центральний, з переважанням на деяких його рівнях. На сьогоднішній день з рослин було виділено близько 15 000 алкалоїдів. Якщо вважається, що було обстежено менше 25% верхніх видів рослин на планеті, очевидно, що для його досліджень ще є широке поле. Через його фармакологічне та

лікарське значення існує чудова мотивація продовжувати хіміко-біологічне вивчення алкалоїдів. Це один з найважливіших вторинних метаболітів рослини з терапевтичним інтересом [60]

5.2. Реакція вторинних метаболітів рослин на фактори навколишнього середовища.

Реакція ВМ рослин на вплив температури. Протягом 20 століття середня глобальна температура вже зросла на 0,74 ° C, приблизно зростаючи на 0,2 ° C за десятиліття. Моделювання підраховує, що потепління клімату спричинить значний вплив на виробництво Вторинних метаболітів з рослин. Оскільки одна з основних змінних погодних умов - температура, вона може суттєво впливати на склад ВМ, а загалом підвищення температури може посилити вироблення ВМ у всіх видів рослин. Більш висока температура призводить до вищого вмісту алкалоїдів [68].

Дослідження температури, що впливає на вміст алкалоїду в 60-денних саджанцях *C. roseus*, показало, що при короткочасному тепловому шоці вміст віндоліну, катарантину та вінбластину в листках саджанців був вищим при 40 ° C, ніж при 30 ° C. Більш конкретно, вміст катарантину збільшувався на 40% після інкубації при 40 ° C протягом 2 годин, тоді як повільно збільшувався при 30 ° C і досягав найвищого значення через 6 годин, а в довгостроковому експерименті при 35 ° C концентрації мономерних алкалоїдів катарантин та віндолін різко зросли [69]. Коли листя *C. roseus* піддавались низькій температурі, спостерігалось майже 2-кратне та 2–4-кратне зниження рівня катарантину та віндоліну відповідно [70]. Крім того, концентрації загальних алкалоїдів піперидину та двох окремих алкалоїдів піперидину в хвої 1-річної норвезької смереки, що зазнала впливу високої температури, були значно вищими, ніж у голках при температурі навколишнього середовища.

Більше того, підвищення температури призвело до зменшення кількості загальних флавоноїдів у корі, а також загальних катехінів та загальних ацетофенонів у голках [71]. Загалом, регуляція метаболізму алкалоїдів припустила, що низька

температура послаблює регуляцію більшості генів біосинтетичного шляху алкалоїдів [70].

Підвищення температури також було підтверджено для зниження концентрації СМ в рослинах. Вміст антоціаніну в оболонках листя саджанців *Zea mays* збільшувався із тяжкістю та тривалістю холоду через індукцію генів біосинтетичного шляху антоціаніну [78]. Подібним чином низькотемпературне індукування накопичення антоціаніну в листі та стеблах *Arabidopsis thaliana* та сприяння синтезу антоціаніну через фенілпропаноїдний шлях, пов'язаний із збільшенням транскриптів флавоноїдних біосинтетичних генів, включаючи фенілаланін амоніалазу (PAL) та халконсинтазу (CHS) [79].

Реакція СМ рослин на солоність ґрунту. Засолення може спричинити складні взаємодії між різними морфологічними, фізіологічними та біохімічними процесами [107,108,109]. Крім того, засолення може спричинити окислювальний стрес через велику продукцію активних форм кисню (АФК), щоб змінити метаболізм рослин. Насправді рослини виробляють велику кількість ВМ для знешкодження або детоксикації АФК. За час дії *Aegiceras corniculatum*, обробленого 250 мМ NaCl, вміст поліфенолу значно збільшився більш ніж удвічі порівняно з контрольними рослинами, що свідчить про те, що накопичення поліфенолів відіграло роль захисних метаболітів [110]. У двох туніських приєднаннях *Sakile maritima* (Джерба та Табарка) накопичення поліфенолів у Джербі значно збільшилось на 56% та 30% у відповідь на обробку 100 мМ та 400 мМ NaCl відповідно, тоді як у Табарці зменшилось через Треамент NaCl [111].

Після обробки з помірною соленістю (25–50 мМ NaCl) вміст фенолу в листі *Synara cardunculus* різко підвищився, щоб досягти пікового значення, що відповідає концентрації NaCl 50 мМ [112]. Напруження різної солоності призводили до накопичення фенольних сполук у *F. esculentum* на 57%, 121% та 153%, що перевищувало показники контролю, обробленого 10, 50 та 100 мМ протягом 7 днів відповідно. Більше того, накопичення фенольних сполук було спричинене насамперед збільшенням вмісту чотирьох основних сполук, включаючи ізоорієнтин, орієнтин, рутин та вітексин [113].

Встановлено також, що зростаюча солоність стимулює біосинтез фенолів та олеuropeїну у чотирьох сортах оливок, особливо у листі. Збільшення загального вмісту фенолів було різким при 125 мМ NaCl, що було більш ніж удвічі більше, ніж у контрольних рослин, що спостерігалось у всіх сортів. Завдяки обробці з найвищою солоністю концентрація Олеuropeїну була в 18,5, 5,5, 2,5 та 3,8 рази більшою, ніж у контрольних рослин для „Zard”, „Ascolana”, „Koroneiki” та „Arbequina”, відповідно. Однак тенденція до зміни концентрації гідрокситирозолу в листках відрізнялася від тенденції олеuropeїну. При дії 125 мМ NaCl гідрокситирозоль у кожному з усіх сортів різко зменшився нижче значень контрольних рослин [114].

Серед трьох хлористих солей (NaCl, KCl та CaCl₂) обробка KCl продемонструвала більш виражений вплив на вміст загальних фенолів та флавоноїдів у листках артишоку (*C. cardunculus*) та кардону (*C. cardunculus* var. *Altilis*) [115]. Більше того, ріпак (*Brassica napus* var. *oleifera*) при зростанні солоності проростав, щоб оцінити вплив солоності на загальний вміст фенолів (TP), нефлавоноїдів (NF), дубильних речовин (TAN), фенольних кислот (PA). У ранніх паростків TP збільшився на 35% із засоленням до 50 мМ NaCl, порівняно з контролем, а потім дещо зменшився, було показано максимальне збільшення загального NF (30%), що відповідає обробці 25 мМ NaCl, і загальний TAN збільшувався з концентрацією солі до 50 мМ і залишався таким високим у відповідь на обробку 100 і 200 мМ NaCl, тоді як солоність не давала чіткого впливу на вміст загального Па. Загалом, помірний солоний вміст у 25–50 мМ NaCl спричинив найвище відносне збільшення концентрації фенолу [116].

Однак накопичення фенольних сполук у рослинах під впливом солоності також залежатиме від видів рослин, тому фенольні сполуки не накопичувались у деяких видах рослин. Щодо контрольних рослин, підкреслена солоність також призвела до зменшення фенольних сполук (похідних хлорогенної та синапінової кислоти та флавоноїдів) у листі брокколі (*B. oleracea* var. *Italica* cv. *Marathon*), і втрати були більшими для флавоноїдів, ніж для похідні синапінової кислоти [117]. Крім того, стрес на солоність може змінити хімічний вміст різних фенольних сполук у рисових сортах (толерантні та сприйнятливі сорти), спричиняючи значне

збільшення загальної кількості фенолів та вмісту ваніліну та протокатехуєвої кислоти в толерантних сортах, тоді як, навпаки, виявлений у сприйнятливому сорті [118].

Вплив концентрації NaCl на загальний вміст фенолу в *S. macrosiphon* показав, що всі обробки з різною концентрацією NaCl викликали значне зниження загального вмісту фенолу в листі, яке зменшувалося при лікуванні збільшення концентрації NaCl. Після індукції 6,8 dS m⁻¹ NaCl вміст загальних фенольних речовин зменшився у 2,6 рази порівняно з контрольним листям [118]. Однак солоність NaCl збільшувала загальну антиоксидантну активність у метанольному екстракті листа, ймовірно, завдяки зростаючій активності пероксидази (POD) в умовах сольового стресу [119].

Подібним чином засолення може суттєво змінити накопичення вторинного метаболіту розмарину (*Rosmarinus officinalis*), в основному викликаючи виражений вплив на склад монотерпенів. Було встановлено, що розчин NaCl при 100 мМ значно збільшує відносну кількість цинеолу та камфори, але дещо зменшує вміст борнеолу, α -терпінеолу, нополу та камфену [123]. Більше того, кореневі тканини кукурудзи, що зазнають сольового стресу, можуть також збільшувати концентрації кислих терпеноїдних фітоалексинів, так що занурення тканин кореня в розчин NaCl при 500 мМ різко збільшує кількість зеалексинів приблизно в п'ять разів, тоді як обробка розчином NaCl з меншою концентрацією (100 мМ) суттєво стимулює підвищення вмісту кауралексинів удвічі порівняно з контрольними рослинами в середовищі 0 мМ NaCl [103].

5.3. Висновки до розділу

Пристосованість рослин до стресів навколишнього середовища є широко розповсюдженою екологічною поведінкою в природі. Фенотипову, морфологічну пристосованість рослин до навколишнього середовища порівняно легко спостерігати та розпізнавати, тоді як внутрішню, біохімічну пристосованість рослин відносно важко виявити тому що вона досі повністю не зрозуміла. На основі

відповідних літературних звітів та даних, вищезазначений огляд зосереджений на реакції важливих рослинних вторинних метаболітів, таких як фенольні речовини, флавоноїди, терпеноїди та алкалоїди, що утворюються внаслідок різних біохімічних процесів, екологічні стреси, включаючи опромінення світлом, температуру, воду ґрунту, ґрунт родючість і солоність тощо.

Реакція різних вторинних метаболітів рослин на стреси в навколишньому середовищі дуже різноманітна та мінлива. Що ще цікавіше, це те, що індивідуальний стрес навколишнього середовища може вибірково збільшити вміст кількох ВМ у рослинах. Таким чином, можна зробити висновок, що синтез деяких природних продуктів може змінюватися різними абіотичними факторами. Як добре відомо, деякі ВМ знайшли комерційне застосування як ліки, ароматизатори, ароматизатори, інсектициди тощо.

Такі дрібнодисперсні хімічні речовини видобуваються та очищаються з рослинних матеріалів, але їх виробництво часто залежить від фізіологічної та стадії розвитку рослини, і зазвичай їх вміст занадто низький, щоб відповідати вимогам на ринку медичних препаратів, тому оптимізація умов росту рослин для поліпшення концентрацій високоцінних ВМ є важливим та важливим. В перспективі використання екологічних стресів може забезпечити потенційний та вигідний спосіб поліпшити якість та збільшити накопичення біоактивних сполук в лікарських рослин.

ВИСНОВКИ

1. З'ясовано, що лікарські рослини *Urtica dioica* і *Stachys officinalis* містять велику кількість біологічно активних речовин і можуть бути джерелом алкалоїдів, флавоноїдів для біотехнологічної промисловості. Показано, що мікроскопічні гриби, асоційовані з певними рослинами, можуть стати потенційними об'єктами фармацевтичної промисловості, як більш економічно та екологічно вигідні продуценти аналогічних рослинним метаболітів. Нещодавно вивчені властивості грибів включають протипухлинну, імуномодулюючу, антиоксидантну, антимікробну, гепатопротекторну та протидіабетичну інсектицидну активність, можуть використовуватись як стимулятори росту рослин, для захисту рослин та в процесі фітореMediaція.

2. З уражених лікарських рослин *Urtica dioica* і *Stachys officinalis*. ізольовано гриби *Ramularia urticae* Ces та *Septoria stachydis* у чисту культуру, шляхом послідовних багаторазових пересівів. Культивування та накопичення культур грибів здійснювалося на картопляно-глюкозному агарі при температурі 25 °С. Використано спектрофотометричний метод для визначення вмісту алкалоїдів та флавоноїдів, після проведених якісних реакцій з дослідними зразками.

3. Встановлено, що вивчені лікарські рослини та культури ізольованих грибів містять в своєму складі алкалоїди. Найбільшу кількість продукує *Urtica dioica*. містить найбільшу кількість алкалоїдів - 2,3%, *Stachys officinalis*. - 1,4%. Гриби, пов'язані з *U. dioica* L. та *Stachys officinalis* - *Ramularia urticae* та *Septoria stachydis*, відповідно, також виробляють алкалоїди, але в менших кількостях, порівняно з рослинами, 0,53% та 0,3%.. , в той же час при визначенні вмісту флавоноїдів встановлено *Stachys officinalis* містить найбільшу кількість флавоноїдів - 0,42%, *Urtica dioica* L. - 0,29%. З ними пов'язані гриби - *Ramularia urticae*, відповідно отримують алкалоїди *Septoria stachydis*, відповідно, алкалоїди, але в меншій кількості, порівняно з рослинами, 0,07% і 0,22%.

Відповідно. *Ramularia urticae* може використовуватись як продуцент алкалоїдів і бути культивованим у промислових масштабах при підборі відповідних штамів, а ефективність виробництва біологічно активних речовин може бути підвищена експериментально на основі сучасних біотехнологій.

СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Енциклопедичний тлумачний словник термінів. українсько-латинський-Російсько-англійський [навч. посіб. для студ. Вищих навч. закладів] / [Уклад.: І. М. Перцев. € .1. Світлична, О. Л. Рубап та ін.] Вішніця: Нова Кпіга. 2014. 824 с. фармацевтичних: за ред. проф. В. П. Черпіха
2. Каркищенко Н. Н. Клиническая и экологическая фармакология в терминах и понятиях. — М., 1995;
3. A. N. Pache, A. D. Diwa, and S. R. Chandra (2017) Flavonoids: an overview Journal of nutritional science Vol 6 (47)
4. Phytochemicals. Flavonoids [Електронний ресурс]. – 2010. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.phytochemicals.info/phytochemicals/flavonoids.php>.
5. Manach C, Williamson G, Scalbert A, Remesy C. Bio availability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 98 bioavailability studies // 2005- 81. С- 230S-242S.
6. Dajs F. Life or death: Neuroprotective and anticancer effects of quercetin. J Ethnopharmacol. // 2012 — 143. С — 383-396.
7. Ferry R, Smith A, Fyfe DW, Deakats PG, Anderson D, Baker J. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. Clin Cancer. // 1996 — 2.С— 659-668.
8. Jan AT, Murtooza I, Singh JB, Ali A, Haqq Dietary Flavonoids Quercetin and Associated Health Benefit An Overview. Food Review Int. // 2011— 27.С— 302-318.
9. Boot AW, Haanen GR. Health effect of quercetin: antioxidant - nutraceutical. Europe J Pharmacology. // 2009— 585.С— 324-337.

10. Coballase E, Pedraza-Chaaverri J, Huerta-Gertrudis B, Garcia-Cruz ME, Montesinos-Correa H, Sanchez-Gonzalez DJ, Camacho-Carranza R, Espinosa-Aguire JJ. Acetonic and Methanolic Extract of *Heterotheca inuloide*, flavonoid and Decreased CCl(4)-Oxidative Stress in Several Rat Tissues. Evid Based Complement Alternat Med. //2015
11. Mazi L, Terzuoli G, Bonecki C, Iacoponi F, Rossi C, Collodel G. Effects of the quercetin, rutin and epicatechin to lipids peroxidation induced in human organism. *Reprod Toxicol* 2013; 34: 652-657.
12. Maciel R, Martin D, Franca R, Graca D, Duarte MM, Mazanti M, Schetinger M, Zimpl C, Felin Antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids in functional and morphological alterations in streptozotocin-induced rats. *Res Veterinaria Science*. // 2013;-95 C.- 387-397.
13. Russo M, Spagnulo C, Tedesco I, Biloto S. The quercetin in disease prevention and the therapy process: facts. *Biochemistry Pharmacol.*//2012-83C-6-15.
14. Leu YL, Al-Suwayeh SA, Ku MC, Hang T, Fang JY. Antiinflammatory activities and percutaneous absorption of quercetin and its polymethoxylated compound and glycoside: the relationship to chemical structure. *Europe Pharm Science.*// 2013- 47-C- 857- 864.
15. Kim O, Lee JS, Kim JA, Kim MR, Choi HS, Shim JH, Kang KW, Kim YC. Inhibition of angiogenesis by quercetin in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 3227-3234.
16. Wang L, Wang B, Li H, Lu H, Qiu F, Xiong L, Xu Y, Wang G, Liu X, Wu H, Jing H. Quercetin, a flavonoid with anti-inflammatory activity, suppresses the development of abdominal aortic aneurysms in mice. *Eur J Pharmacol* 2012; 690: 133-141.
17. Cipak GA, Vukovic L, Vlainic J, Zarkovic N, Orsolcic N. Quercetin supplementation: insight into the potentially harmful outcomes of neurodegenerative prevention. *N-S Arch Pharmacol* 2012; 385: 1185-1197.
18. Coelho-Dos-Reis JG, Gomes OA, Bortolini DE, Martins ML, Almeida MR, Martins CS, Carvalho LD, Souza JG, Vilela JM, Andrade MS, Barbosa-Stancioli EF.

- Evaluation of the effects of Quercetin and Kaempferol on the surface of MT-2 cells visualized by atomic force microscopy. *J Virol Methods* 2011; 174: 47-52.
19. Boots AW, Wilms LC, Swennen EL, Kleinjans JC, Bast A, Haenen GR. In vitro and ex vivo anti-inflammatory activity of quercetin in healthy volunteers. *Nutrition* 2008; 24: 703-710.
20. Pharmacological Applications of Quercetin and its Derivatives: A Short Review / Aneela Maalik, Farhan A. Khan, Amara Mumtaz, Adeem Mehmood. // *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. – 2014. – №13. – С. 1561–1566.
21. Kaempferol [Электронный ресурс] // retrieved October 20. – 2017. – Режим доступа до ресурсу: <https://www.merriam-webster.com/dictionary/kaempferol>.
22. Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.*, 2002, 82, 47-95.
23. Finkel, T. Radical medicine: treating ageing to cure disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2005, 6, 971-6.
24. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007, 39, 44-84.
25. Mira, L.; Fernandez, M.T.; Santos, M.; Rocha, R.; Florencio, M.H.; Jennings, K.R. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic. Res.*, 2002, 36, 1199-208
26. Ren, J.; Meng, S.; Lekka, C.; Kaxiras, E. Complexation of flavonoids with iron: structure and optical signatures. *J. Phys. Chem. B.*, 2008, 112, 1845-50.
27. Kampkotter, A.; Gombitang, N.C.; Zurawski, R.F.; Timpel, C.; Chovolou, Y.; Watjen, W.; Kahl, R. Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Arch. Toxicol.*, 2007, 81, 849-58.
28. Bonina, F.; Puglia, C.; Ventura, D.; Aquino, R.; Tortora, S.; Sacchi, A.; Saija, A.; Tomaino, A.; Pellegrino, M.L.; de Caprariis, P. In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effects of a lyophilized extract of *Capparis spinosa* L buds. *J. Cosmet. Sci.*, 2002, 53, 321-35.

29. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, 8, 349-61.
30. Harborne, J.B. and Williams, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 2000, 55, 481-504.
31. Cushnie, T.P. and Lamb, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 2005, 26, 343-56.
32. J.M. Calderón-Montaño. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol / J.M. Calderón-Montaño, E. Burgos-Morón, C. Pérez-Guerrero. // *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. – 2011. – №11. – P. 298–344.
33. Bohm, Bruce A. Flavonoids of the sunflower family (Asteraceae) / Bohm, Bruce A., Tod F. Stuessy. // Springer. – 2007. – P. 597.
34. S. Kandakumar. Pharmacological Applications of Isorhamnetin: A Short Review / S. Kandakumar, V. Manju. // *International Journal of Trend in Scientific Research and Development*, Volume. – 2017. – №1. – P. 672–678.
35. Sergio L, Lourdes MV, Rocio RA, Ana J, Rocio A. et al. The Flavonols isorhamnetin exhibit cytotoxic effect on human cancer cells, *Food Chemistry*, 2010; -58C-10869-10875.
36. Федотов О.В. Лікарські речовини рослин і грибів: Монографія у вигляді навчального посібника. Донецьк, 2007, 26-90с.
37. Jinous Asgarpanah and Razieh Mohajerani (2012) Phytochemistry and pharmacologic properties of *Urtica dioica* L. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 6(46), pp. 5714-5719
38. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник/Л-56 Відп ред. А. М. Гродзінський.- К.: Голов. ред. УРЕ, 1989.- 10-16с.
39. Сарычева З.А. Дикорастущие лекарственные и пищевые растения Украины. Киев. Фитон.-2005. 147с.
40. Крпива двудомна (*Urtica dioica* L) [Електронний ресурс] // 2011 – Режим доступу до ресурсу: <http://lektrava.ru/encyclopedia/krapiva-dvudomnaya/>.
41. Diversity and Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi Associated with the Alpine Plant *Saussurea involucre*. // *Biol Pharm Bull.* – 2010. – С. 1300-1306.

42. Biological properties of Endophytic Fungi. // Braz. arch. biol. technol.–2016.– C.67–70.
43. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. // Crop Science.. – 2000; 40: –C. 923-940.
44. Antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and cytotoxic properties of fungal endophytes from *Garcinia* species. // Int J Pharm Pharm Sci.. – 2013. – №5. – C. 889–897
45. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp.. // World J Microbiol Biotechnol. – 2007. – №23. – C. 79– 83.
46. Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. // Curr Res Technology Edu Top Appl Microbial Microbial Biotechnol. – 2010. – C. 567–576.
47. J. Zhao. Plant-Derived Bioactive Compounds Produced by Endophytic Fungi / J. Zhao, Y. Mou, T. Shan. // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. – 2011. – №11. – C. 159–168.
48. *Ramularia urticae* Ces., in RABENHORST, *Klotzschii Herbarium Vivum Mycologicum Sistens Fungorum per Totam Germanium Crescentium Collectionem Perfectam*, Fasc. 2(17): no. 1680 (1852).
49. *Cylindrosporium urticae* (Ces.) J. Schrot., in COHN, *Kryptogamen-Flora von Schlesien* 3.2(4): 492 (1897, publ. 1908).
50. *Septocylindrium urticae* (Ces.) Subram., *Hyphomycetes* (New Delhi): 310 (1971).
51. Chupp, C. 1954. A monograph of the fungus genus *Cercospora*. :1-667
52. *Cercospora armoraciae* Sacc., *Nuovo Giorn. Bot. Ital.* 8: 188. 1876
53. Режим доступа до ресурсу:
https://www.bioimages.org.uk/html/Cercospora_armoraciae.htm
54. Фитохимический анализ растительного сырья, содержащего флавоноиды: Федосеева Г.М.; Миронович В.М.; Горячкина Е.Г., Переломова М.В. Иркутск 2009.-67 с.

55. Державна фармакопея України/Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр».-1-ше вид.(доповнення 2)-,2008.-620с.
56. International Pharmacopoeia. Third edition. Volume 3. Specifications for quality control of pharmaceuticals. World Health Organization - Geneva, 1990 - 435 p.
57. Шевченко А.Ф. Основи медичної і біологічної фізики. – К. : Медицина, 2008. – 655 с.
58. Основи охорони праці / Запорожець О. І. [та ін.]. – Підручник. – К.:Центр учбової літератури, 2009. – 264 с.
59. Березюк О. В. Безпека життєдіяльності/ О. В. Березюк, М. С. Лемешев.– Вінниця : ВНТУ, 2011. – 204 с.
60. Державні будівельні норми ДБН В.2.5.-28-2018. Природне і штучне освітлення. – К.: Мінбуд України, 2018 – 19 с
61. ДСН 3.3.6.042-99. Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень. – Київ, 2000.
62. Основи охорони праці: Підручник. 2-ге видання / К. Н. Ткачук [та ін.]; за ред. К. Н. Ткачука, М. О. Халімовського; 2-ге вид., переробл. та допов. – К.:Основа, 2006 – 448 с.
63. Захаров Л. П. Техника безопасности в химических лабораториях. – Л.: Химия, 1985. – 184 с.
64. Охорона праці та промислова безпека/ К. Н. Ткачук [та ін.]; Посібник. –Київ: Лібра, 2010. –559 с.
65. Катренко Л.А. Охорона праці. Курс лекцій/ Л. А. Катренко, Ю. В. Кіт, І.П. Пістун; Практикум: Навч. посіб. – Суми: Університетська книга, 2009. – 540 с.
66. Русаловський А. В. Правові та організаційні питання охорони праці/ А.В. Русаловський; Навч. посіб. – 4-те вид., допов. і перероб. – К.: Університет «Україна», 2009. – 295 с.
67. Наказ 16.07.2012 № 992Про затвердження Правил безпеки під час проведення навчально-виховного процесу в кабінетах (лабораторіях) фізики та хімії загальноосвітніх навчальних закладів

68. Охорона праці: навч. посіб. / З.М. Яремко, [та ін.]; за ред. проф. З.М. Яремка. – Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2010. – 374 с.
69. Основи охорони праці/ Березуцький В. В. [та ін.]; за ред. В. В. Березуцького. – Х.: Факт, 2005. – 480 с.
70. Ємельянова Л. В. Основи охорони праці / Л. В. Ємельянова. – Харків:ХДАДМ, 2014. - 58 с.
71. Plant secondary metabolites: a review. // International journal of engineering research and general science. – 2015. – №3. – С. 661–670.
72. Phytochemical analysis and antifungal potential of *Duranta erecta* against some phytopathogenic fungi. // International Journal of Pharmaceutical Science and Research. – 2012. – №3. – С. 2686–2689.
73. Secondary Metabolites [Електронний ресурс]. – 2018. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.intechopen.com/books/herbal-medicine/plants-secondary-metabolites-the-key-drivers-of-the-pharmacological-actions-of-medicinal-plants>.
74. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. // New Phytol. – 1994/-№127 – С. 617–633.
75. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective.. // Phytochemistry. – 2003. – №64. – С. 3–19.
76. Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. // Plant Sci. – 2001. – №161. – С. 839–851.
77. Essential oils as green pesticides: Potential and constraints. // Biopestic. Int.. – 2008. – №4. – С. 63–84.
78. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites.. // J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants.. – 2015. – №2. – С. 105–113.
79. Plant behavioural ecology: Dynamic plasticity in secondary metabolites.. // Plant Cell Environ. – 2009. – №32. – С. 641–653.
80. Effects of secondary plant metabolites on microbial populations: changes in community structure and metabolic activity in contaminated environments. // Int. J. Mol. Sci.. – 2016. – №17. – С. 1205.

81. The Effect of environmental factors on growth, development and alkaloid production of Poppy (*Papaver somniferum* L.): I. Responses to day-length and light intensity. // *Biochem.* – 2001. – №174. – C. 468–478..
82. Salinity effects on phenolic content and antioxidant activity of *Salvia macrosiphon*. // *Iran. J. Sci. Technol.* – 2017. – №41. – C. 295–300.
83. Galieni A. Influence of light, temperature, and macronutrients on growth and scopolamine biosynthesis. Effects of nutrient deficiency and abiotic environmental stresses on yield, phenolic compounds and antiradical activity in lettuce (*Lactuca sativa* L.) in Duboisia s / Galieni A., Di Mattia C.. // *Sci. Hortic.* – 2015. – №187. – C. 93–101.