

УДК (577.112:582.232):581.524.13

Кірпенко Н.І.

ПОЗАКЛІТИННІ БІЛКОВІ СПОЛУКИ ОДНОВИДОВИХ ТА ЗМІШАНИХ КУЛЬТУР ВОДОРОСТЕЙ

Інститут гідробіології НАН України, м. Київ,
e-mail: nativ51@mail.ru

Ключові слова: культури водоростей, алелопатична взаємодія, екзогенні білкові сполуки

Алелопатична взаємодія водоростей супроводжується зміною інтенсивності їх росту, фотосинтезу, дихання, екскреції органічних речовин, активності ферментів тощо [2, 4]. Як відомо, регуляція метаболічної активності представників альгофлори при спільному зростанні відбувається на рівні їх екзогенних метаболітів. Мікрowodорості виділяють у воду органічні речовини різної хімічної природи, в тому числі білки, які не тільки відповідальні за численні реакції, що відбуваються всередині живих клітин, але й приймають активну участь у процесах взаємодії організму з зовнішнім середовищем [5]. Можна припустити, що ці сполуки відіграють важливу роль і у формуванні взаємовідносин водоростей, тому дослідження особливостей екскреції білків в умовах їх алелопатичної взаємодії, зокрема при спільному вирощуванні, становить значний інтерес. В зв'язку з цим метою даної роботи було порівняння вмісту білків у культуральних середовищах моновидових та змішаних культур водоростей.

Об'єкти і методи досліджень

Дослідження проводили на одновидових та змішаних культурах водоростей *Acutodesmus obliquus* (Turp.) P. Tsarenko HPDP-104, *Selenastrum gracile* Reinsch. HPDP-115, *Oscillatoria neglecta* Lemm. HPDP-25. Змішані культури одержували шляхом одночасного внесення інокулятів двох видів водоростей однакової щільності у свіже стерильне поживне середовище. Контрольні і дослідні культури вирощували при температурі 22–24°C і освітленні 4 клк. На перший, третій і сьомий день культивування частину суспензії центрифугували при 8 тис об/хв для одержання культуральних фільтратів, які надалі використовували для аналізу.

З літератури відомо, що сполуки білкової природи здатні поглинати світло в ультрафіолетовій області спектру. На цій особливості засновані спектрофотометричні методи їх визначення. В

діапазоні 200–220 нм вибіркоче поглинання світла властиве пептидним зв'язкам (–CO–NH–), які є основою структурної будови всіх білків [1]. В області 280–290 нм поглинання УФ-променів розчинами білків зумовлене наявністю амінокислотних залишків, R-групи яких містять циклічні структурні одиниці. В першу чергу це триптофан, тирозин та, меншою мірою, фенілаланін і гістидин. Максимум поглинання тирозину знаходиться на довжині хвилі 294 нм, триптофану – 280 нм [7, 8]. У роботах морських гідробіологів для розчинених білкових сполук наводяться спектри з максимумом поглинання на довжині хвилі 270 нм і депресією на 250 нм [9]. Базуючись на цих відомостях, ми проаналізували спектральні характеристики культуральних фільтратів одновидових та змішаних культур водоростей в динаміці у процесі їх вирощування з метою оцінки інтенсивності нагромадження позаклітинних білкових сполук. Визначення спектрів поглинання культуральних фільтратів проводили на спектрофотометрі SPECORD UV VIS в ультрафіолетовому діапазоні, використовуючи як контроль чисте поживне середовище*. Оцінку нагромадження позаклітинних білкових сполук проводили на основі методу Уолделла, який передбачає диференційне вимірювання поглинання досліджуваних розчинів при довжині хвилі 215 та 225 нм, тобто в області депресії та максимуму поглинання, і порівняння одержаних відносних одиниць (екстинцій) [10].

Результати дослідження і їх обговорення

Спектрофотометрія культуральних фільтратів показала, що спектри поглинання в короткохвильовій області для всіх досліджених культур водоростей мають подібну форму і відрізняються лише за інтенсивністю окремих структурних одиниць спектру (рис. 1).

Характерними для спектрів поглинання є депресія на довжині хвилі 210–230 нм, пік на 235 нм, плато на 260–275 нм та незначний пологий підйом на 280–295 нм. Сукупність цих ознак дає підставу стверджувати, що одержані спектри характеризують поглинання саме білкових сполук.

Аналіз результатів, одержаних при спектрофотометрії культуральних фільтратів монокультур, свідчить, що інтенсивність спектрів поглинання залежить від тривалості вирощування водоростей, проте для різних видів динаміка змін цього процесу відрізняється, незважаючи на близький характер росту їх культур.

* У виконанні цієї роботи допомогу надавали А.В. Ліщук та О.М. Усенко

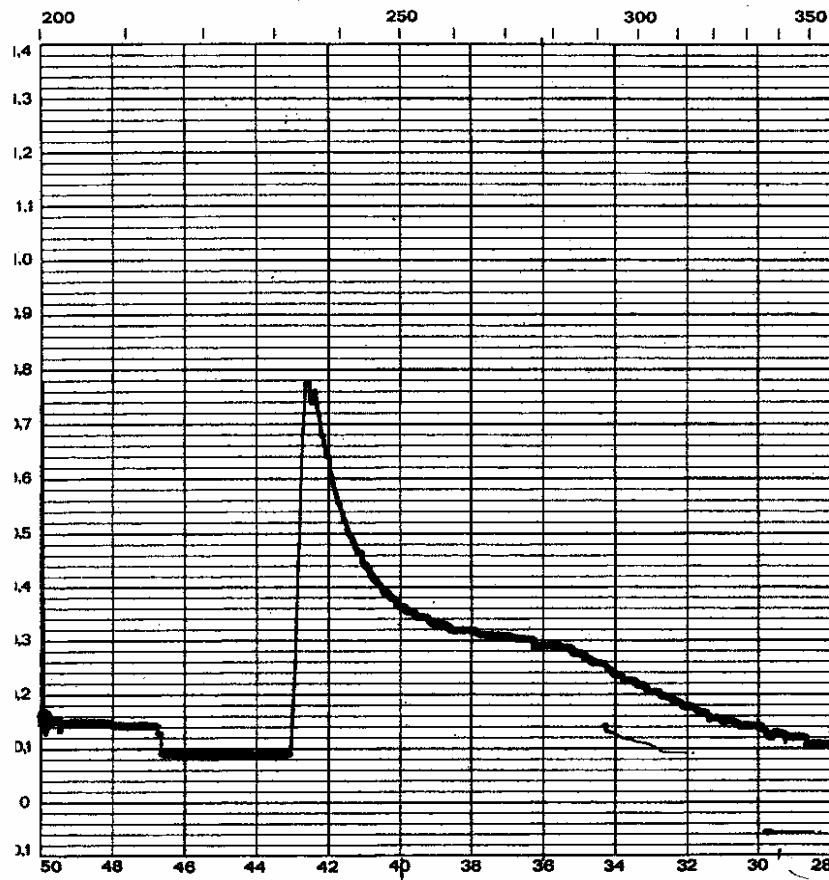


Рис. 1. Характерна форма спектру поглинання культуральних фільтратів водоростей в УФ-області.

При першому вимірюванні через добу після посіву найвища інтенсивність поглинання зафіксована для фільтрату синьозеленої водорості *Oscillatoria neglecta*. Через 3 доби культивування показники цієї культури майже не змінились, проте суттєво зросла величина поглинання фільтратів зелених водоростей – *Selenastrum gracile* і, особливо, *Acutodesmus obliquus*. Надалі інтенсивність поглинання фільтратів *O. neglecta* і *A. obliquus* помітно зменшилась, в той час як для *S. gracile* вона зростала протягом тижня спостережень і значно перевищила показники інших культур (таблиця).

Таблиця. Інтенсивність поглинання культуральних фільтратів монокультур водоростей (екстинкції)

Тривалість вирощування, дні	Культури водоростей		
	<i>Oscillatoria neglecta</i>	<i>Acutodesmus obliquus</i>	<i>Selenastrum gracile</i>
1	0,36	0,29	0,30
3	0,37	0,40	0,38
7	0,23	0,30	0,68

Таким чином, нагромадження екзогенних білків у середовищах різних водоростей характеризується видовими особливостями. На початку культивування кількість позаклітинних білкових сполук, очевидно, в першу чергу зумовлена внесенням їх з посівним матеріалом, а надалі вона відображає інтенсивність видільних процесів водоростей. Для *O. neglecta* і *A. obliquus* в перші дні культивування, тобто в лаг- і на початку логарифмічної фази, спостерігається тенденція короткочасного посилення виділення білків з наступним зниженням інтенсивності цього процесу, в той час як *S. gracile* відзначається постійним збільшенням екскреції білкових сполук.

У фільтратах змішаних культур змінювались і динаміка, і амплітуда коливань показників поглинання порівняно з відповідними монокультурами. Для різних пар водоростей характер змін відзначався власними особливостями. При спільному вирощуванні *Oscillatoria neglecta* і *Selenastrum gracile* через добу після посіву інтенсивність поглинання фільтратів дорівнювала середньому значенню між обома монокультурами; через 3 дні вона перевищувала його більше, ніж на третину, а через тиждень була значно нижчою (рис. 2).

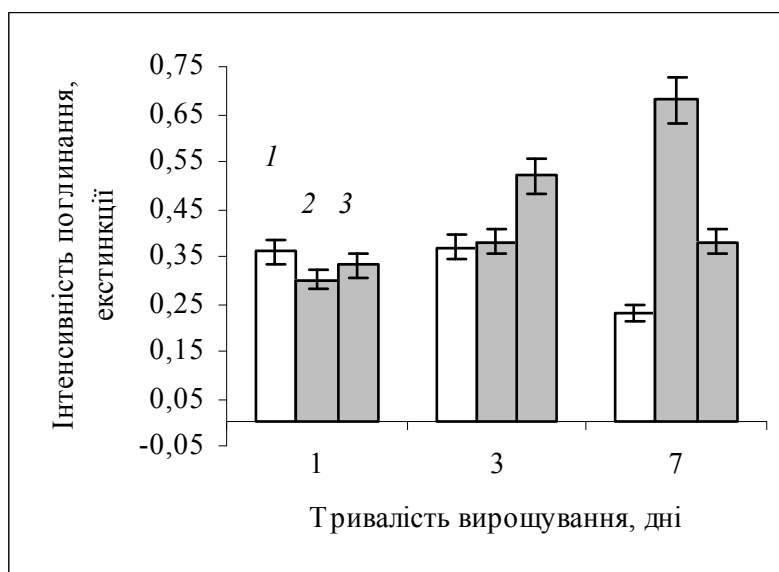


Рис. 2. Інтенсивність поглинання в УФ-області культуральних фільтратів монокультур *Oscillatoria neglecta* (1), *Selenastrum gracile* (2) та їх змішаної культури (3).

Таким чином, зразу після посіву інтенсивність виділення білків у змішаній культурі не відрізнялась від монокультур, на третю добу вона суттєво зросла, а через 7 днів помітно знизилась, ставши на 17,4% меншою, ніж середнє значення для монокультур.

Oscillatoria neglecta є сильним антагоністом по відношенню до *Selenastrum gracile* [3], тому можна було б припустити, що зниження концентрації позаклітинних білкових сполук через 7 днів культивування викликане уповільненням росту зеленої водорості, чий внесок у пул позаклітинних білків значно вищий в силу її фізіологічних особливостей. Проте в цих же умовах на третій день досліду кількість екзогенних білків в змішаній культурі на 36,8% перевищувала середнє значення для монокультур. Як відомо, екскреція білків може посилюватись в екстремальних ситуаціях. Наприклад, при додаванні етанолу, незалежно від його концентрації, кількість екзогенного білку в середовищі росту *Spirulina platensis* зростала вдвічі [6]. Таким чином, посилення виділення білкових сполук, зафіксоване в наших дослідах, може свідчити про виникнення екстремальних умов внаслідок алелопатичного взаємовпливу водоростей.

Для змішаної культури *Oscillatoria neglecta* з іншою зеленою водорістю *Acutodesmus obliquus* інтенсивність поглинання фільтрату, на відміну від попередньої пари водоростей, була нижчою за монокультури вже на перших етапах вирощування і зросла тільки в кінці терміну спостережень (рис. 3).

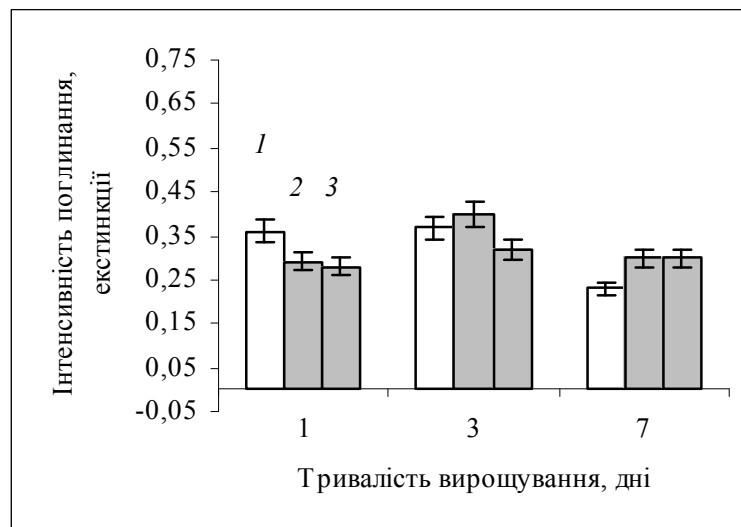


Рис. 3. Інтенсивність поглинання в УФ-області культуральних фільтратів монокультур *Oscillatoria neglecta* (1), *Acutodesmus obliquus* (2) та їх змішаної культури (3).

O. neglecta виступає сильним антагоністом також по відношенню до *A. obliquus*, кількість клітин якого зменшувалась з першого дня їх спільного вирощування (коефіцієнт приросту чисельності *A. obliquus* за тиждень вирощування у змішаній культурі склав лише 0,79 порівняно з 1,29 у монокультурі). Значний негативний вплив очевидно

викликав загальне пригнічення метаболічних процесів водоростей, яке супроводжувалось уповільненням видільних процесів і тимчасовим зменшенням екскреції білкових сполук.

Якщо проаналізувати динаміку нагромадження позаклітинних білків при змішаному вирощуванні двох зелених водоростей *Acutodesmus obliquus* і *Selenastrum gracile*, одержимо інший характер змін (рис. 4).

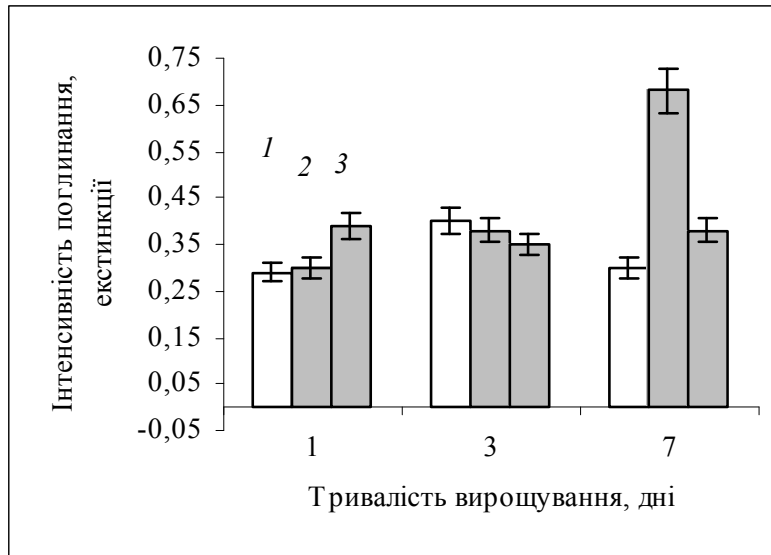


Рис. 4. Інтенсивність поглинання в УФ-області культуральних фільтратів монокультур *Acutodesmus obliquus* (1), *Selenastrum gracile* (2) та їх змішаної культури (3).

В цьому випадку, на відміну від попередніх змішаних культур, в першу добу спостерігалось посилення виділення білків. Надалі воно змінилось стійким пригніченням цього процесу і через тиждень експозиції вміст екзогенних білкових сполук зменшився на 22,4%, порівняно з середньою величиною для монокультур.

Короткочасне посилення екскреції білкових сполук, очевидно, є реакцією клітин водоростей на вплив метаболітів інших видів, а час його настання залежить від фізіологічних особливостей видів. Проте частіше відбувається зниження кількості екзогенних білкових сполук, що може свідчити про загальне пригнічення метаболізму водоростевих клітин при їх взаємодії.

Зменшення інтенсивності нагромадження позаклітинних білкових сполук зафіксоване й при попарному вирощуванні ще трьох водоростей – *Desmodesmus armatus*, *Monoraphidium contortum* і *Tetraedron caudatum*. Середня величина екстинкції фільтратів змішаних культур цих водоростей на 7 добу культивування становила

0,14 (0,12 ÷ 0,15), порівняно з 0,17 (0,16 ÷ 0,17) для монокультур, тобто була майже на 20% нижчою.

Таким чином, при змішаному культивуванні водоростей спостерігається зменшення або підвищення нагромадження позаклітинних білкових сполук порівняно з монокультурами відповідних видів. Динаміка змін виділення білків відрізняється у різних видів водоростей, що, очевидно, пов'язане з їх фізіологічними особливостями. Проте не викликає сумніву, що внаслідок алелопатичної взаємодії водоростей інтенсивність екскреції їх клітинами білків змінюється.

На початку роботи ми припускали, що спільне вирощування водоростей призведе до посилення виділення білків, які в силу своїх різноманітних властивостей і викликають різнобічні глибокі зміни обмінних процесів. Проте, як свідчать одержані результати, насправді часто відбувається не посилення, а зменшення екскреції білків, отже їх вплив може бути зумовлений не кількістю, а складом цих сполук. Порівняльний аналіз компонентного складу білків у моно- та змішаних культурах водоростей, виявлення й ідентифікація найбільш лабільних компонентів допоможе з'ясувати механізми алелопатичної взаємодії водоростей, тому це питання потребує подальшого детального дослідження.

Висновки

У змішаних культурах водоростей внаслідок їх алелопатичної взаємодії спостерігаються зміни інтенсивності нагромадження у середовищі екзогенних білкових сполук. Ці зміни полягають у короткочасному збільшенні екскреції білків внаслідок створення екстремальних умов при взаємному впливі різних видів або, частіше, у зменшенні виділення білків в результаті загального пригнічення метаболічних процесів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Агатова А.И., Полуяктов В.Ф. Спектрофотометрический метод определения белка в морской воде // Методы исследования органического вещества в океане. – М.: Наука, 1980. – С. 86–93.
2. Кирпенко Н.И. Рост и функционирование некоторых планктонных водорослей в условиях смешанного культивирования // Гидробиол. журн. – 2005. – 41, № 3. – С. 58–71.
3. Кирпенко Н.И. До питання про алелопатичні взаємовідношення водоростей // Мат. Міжн. наук. конф. «Алелопатія та сучасна біологія» (Київ, 17–19 жовтня 2006р). – К.: Фітосоціоцентр, 2006. – С. 58–64.
4. Кирпенко Н.И., Медведь В.А. Особенности функционирования зеленых водорослей *Tetraedron caudatum* и *Desmodesmus communis* при раздельном и смешанном культивировании // Науковий вісник Чернівецького ун-ту: Зб. наукових праць. – Вип. 416: Біологія. – Чернівці: «Рута», 2008. – С. 256–264.

5. Ленинджер А. Биохимия. – М.: Мир, 1974. – 987 с.
6. Мензянова Н.Г., Божков А.И. Влияние этилового спирта на метаболизм водорослей. Динамика роста, содержания нуклеиновых кислот, белков и липидов в клетках *Chlorella vulgaris* Beijer. и *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. // Альгология. – 2003. – 13, № 4. – С. 72–78.
7. Физико-химические методы анализа / Под ред. В.Б. Алесковского и К.Б. Яцимирского. – Л.: Химия, 1971. – 420 с.
8. Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот / Под ред. Ю.С. Лазуркина. – М.: Наука, 1967. – 322 с.
9. Хайлов К.М. Экологический метаболизм в море. – К.: Наук. думка, 1971. – 252 с.
10. Waddell W.J. Quantitative determination of protein // J. Lab. Clin. Med. – 1956. – Vol. 48. – P. 311–320.

Н.И. Кирпенко

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ БЕЛКОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ОДНОВИДОВЫХ И СМЕШАННЫХ КУЛЬТУР ВОДОРОСЛЕЙ

Ключевые слова: культуры водорослей, аллелопатическое взаимодействие, экзогенные белки

Исследованы спектры поглощения культуральных фильтратов моно- и смешанных культур водорослей *Acutodesmus obliquus* (Turp.) P. Tsarenko HPDP-104, *Selenastrum gracile* Reinsch. HPDP-115, *Oscillatoria neglecta* Lemm. HPDP-25 в ультрафиолетовом диапазоне, которые дают представление о содержании белковых соединений. Установлено, что количество внеклеточных белков изменяется в процессе роста водорослей как в моно-, так и в смешанных культурах. В смешанных культурах происходит изменение интенсивности и динамики накопления белков по сравнению с соответствующими монокультурами. Аллелопатическое взаимодействие видов, как экстремальный фактор, может вызывать кратковременное повышение количества экзогенных белков. Однако чаще происходит снижение накопления белковых соединений в культуральной среде, что может быть вызвано общим угнетением метаболических процессов водорослей.

N.I. Kirpenko

EXTRACELLULAR PROTEIN COMPOUNDS OF MONO- AND MIXED ALGAE CULTURES

Key words: algae cultures, allelopathic interaction, exogenous proteins

The article examines the spectra of light absorption in the ultra-violet range by filtrates of the mono- and mixed algae cultures (*Acutodesmus obliquus* (Turp.) P. Tsarenko HPDP-104, *Selenastrum gracile* Reinsch. HPDP-115, *Oscillatoria neglecta* Lemm. HPDP-25) which give a picture of the composition of protein compounds. It is shown that the number of extracellular proteins changes in the course of algae growth both in mono- and mixed cultures. Mixed cultures display a change in intensity and dynamics of protein accumulation as compared to corresponding monocultures. The allelopathic interaction of species can cause a brief increase in the number of exogenous proteins. However, more frequent is a decrease in the accumulation of protein compounds in cultural environment, which can be caused by the depression of metabolic processes in algae.