УДК 581.5:(581.19:582.26)

Н.І. КІРПЕНКО[1], Є.О. КУРАШОВ[2], Ю.В. КРИЛОВА[3]

[1]Інститут гідробіології НАН України
пр-т Героїв Сталінграду, 12, Київ 04210
[2]Інститут озерознавства РАН
ул. Севастьянова, 9, Санкт-Петербург 196105, Росія
[3]Санкт-Петербурзький державний університет
Університетська наб., 7-9, Санкт-Петербург 199034, Росія

СКЛАД ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ ДЕЯКИХ ЗЕЛЕНИХ ВОДОРОСТЕЙ НА РІЗНИХ СТАДІЯХ РОСТУ

Експериментально показано, що склад позаклітинних метаболітів водоростей видоспецифічний, відрізняється за кількостю, співвідношенням і біологічною активністю компонентів і змінюється на різних стадіях зростання. Відмінності у складі екзометаболітів можуть обумовлювати різний алелопатичний ефект при взаємодії різноманітних представників альгофлори.

Ключові слова: водорості, фази росту, екзометаболіти, алелопатія

Виділення в процесі життєдіяльності різноманітних органічних речовин у водне середовище є нормальною фізіологічною функцією водоростей. Позаклітинним метаболітам представників альгофлори належить важливе місце в екологічному метаболізмі водойм. Ці сполуки відіграють трофічну роль, беруть участь у формуванні якості води, внаслідок біологічної активності впливають на склад та кількісні показники розвитку інших гідробіонтів [2, 3]. Водночас кількість і склад екзогенних метаболітів відзначаються видоспецифічністю, залежать від абіотичних чинників та фізіологічного стану водоростевих клітин. Закономірності формування пулу екзометаболітів водоростей досі остаточно не з'ясовані. Зокрема, недостатньо відомостей щодо зміни компонентного складу цих речовин на різних стадіях росту водоростей. В зв'язку з цим ми дослідили склад екзогенних метаболітних комплексів деяких зелених водоростей у логарифмічній та стаціонарній фазах росту їхніх культур.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проведені на альгологічно чистих культурах зелених водоростей *Chlorella vulgaris* Beijer., HPDP-119 і *Monoraphidium contortum* (Thur.) Kom.-Legn. IBASU-A 364. Культури вирощували в стерильних умовах на середовищі Фітцджеральда в модифікації Цендера й Горхема (23–26ºС, освітлення лампами ДС 16 год. на добу з інтенсивністю 3,5 клк). У дослідах використовували культури на логарифмічній стадії росту (через 7 діб після пересіву на свіже середовище) та на стаціонарній стадії – *Chlorella vulgaris* після 30 діб і *Monoraphidium contortum* після 25 діб вирощування.

Для аналізу позаклітинних метаболітів культуральне середовище звільняли від клітинної маси водоростей фільтруванням через щільний паперовий фільтр. Розчинені речовини екстрагували гексаном з розрахунку 6 $см^3$ гексану на 450-500 $см^3$ культурального середовища. Гексан, як відомо, є універсальним розчинником для екстракції з водного середовища різноманітних органічних низькомолекулярних сполук.

Склад екзогенних метаболітів у гексанових екстрактах встановлювали на хромато-мас-спектрометричному комплексі TRACE DSQ II (Thermo Electron Corporation) з квадрупольным мас-аналізатором з використанням колонки Thermo TR-5ms SQC 15 м х 0,25 мм з фазою ID 0.25 мкм. Як газ-носій використовували гелій. Мас-спектри знімали в режимі сканування по повному діапазону мас (30-580 m/z) у програмованому режимі температур з наступною послідовною обробкою хроматограм. Ідентифікацію речовин здійснювали з використанням

бібліотек мас-спектрів «NIST-2005» и «Wiley». Кількісний аналіз виконували за допомогою внутрішніх стандартів декафлуоробензофенону, бензофенону та метилстеарату.

Результати досліджень та їх обговорення

Одержані результати підтверджують, що компонентний склад екзометаболітів водоростей відзначається видоспецифічністю. В середовищі *Chlorella vulgaris* у найбільшій кількості визначено насичені вуглеводні (10 сполук). Крім того ідентифіковано ароматичні сполуки, похідні карбонових кислот та один ненасичений вуглеводень (табл. 1).

В процесі росту культури склад позаклітинних метаболітів змінюється досить суттєво. Якщо на логарифмічній стадії ідентифіковано 16 речовин, то на стаціонарній – лише 11.

В міру старіння водоростей зникає більшість насичених вуглеводнів, в той час як ненасичена сполука 2,6-ди(t-бутил)-4-гідрокси-4-метил-2,5-циклогексадієн-1-он зафіксована в середовищі і молодої, і старої культури. Незалежно від стадії розвитку *Ch. vulgaris* виділяє у зовнішнє середовище низку насичених нормальних та майже всі ідентифіковані ароматичні сполуки. Від фази розвитку *Ch. vulgaris* залежить обмін карбонових кислот, причому, якщо ефір масляної кислоти можна вважати ознакою молодої культури, оскільки надалі він зникає, то метиловий ефір пропанової кислоти та бензойна кислота з'являються лише у стаціонарній фазі і, отже, характеризують її старіння.

Таблиця 1

Склад екзометаболітів *Chlorella vulgaris* на логарифмічній (7 доба) та стаціонарній (30 доба) стадіях росту

№	Сполука	Формула	t_R	Логариф-мічна стадія	Стаціо-нарна стадія
Карбонові кислоти та їх похідні					
1	1-пропілпентиловий ефір масляної кислоти	$C_{12}H_{24}O_2$	13,08	+	-
2	2-метил-, 1-(1,1-диметилетил)-2-метил-1,3-пропанедиловий ефір пропанової кислоти	$C_{16}H_{30}O_4$	17,62	-	+
Насичені вуглеводні та їх похідні					
1	3-метилен-нонан	$C_{10}H_{20}$	3,13	+	-
2	1,2-диетил-3-метил-циклогексан	$C_{11}H_{22}$	3,66	+	-
3	2,4,6-триметил-декан	$C_{13}H_{28}$	4,00	+	-
4	4-(1,1-диметилетил)-циклогексанон	$C_{10}H_{18}O$	4,1	+	-
5	4-метил-тетрадекан	$C_{15}H_{32}$	14,52	+	-
6	2-метил-гексадекан	$C_{17}H_{36}$	19,12	+	-
7	Октакозан	$C_{28}H_{58}$	42,7	+	+
8	Нонакозан	$C_{29}H_{60}$	44,50	+	+
9	Триаконтан	$C_{30}H_{62}$	46,84	+	+
10	Гентриаконтан	$C_{31}H_{64}$	49,85	+	+
Ненасичені вуглеводні					
1	2,6-ди(t-бутил)-4-гідрокси-4-метил-2,5-циклогексадієн-1-он	$C_{15}H_{24}O_2$	14,74	+	+
Ароматичні сполуки					
1	1,3,5-триметил-бензен	C_9H_{12}	3,61	+	+
2	Бензойна кислота	$C_7H_6O_2$	6,82	-	+
3	Ізобутилфталат	$C_{16}H_{22}O_4$	24,86	+	+
4	Дибутилфталат	$C_{16}H_{22}O_4$	27,66	+	+
5	Моноетилгексилфталат	$C_{16}H_{22}O_4$	38,91	+	+

На відміну від *Ch. vulgaris* серед екзометаболітів *Monoraphidium contortum* виявлено лише два насичених вуглеводні, водночас значно вища кількість ненасичених сполук (табл. 2).

У *M. contortum* число екзогенних метаболітів збільшувалося у стаціонарній стадії росту, причому відбувалось це за рахунок ароматичних та терпенових речовин. Як і у *Ch. vulgaris*, в стаціонарній фазі росту *M. contortum* в середовищі також з'явилася бензойна кислота, що свідчить про її можливу участь у процесах старіння і обмеження росту водоростей. Уповільнювати ріст водоростей можуть і терпенові сполуки, що також з'явились в середовищі на стаціонарній стадії. Крім антифунгальних та інсектицидних властивостей монотерпен камфора, терпеноїд ювабіон і дитерпен склареолід відзначаються також здатністю пригнічувати ростові процеси рослинних клітин [5, 6, 8]. Терпеноїди відзначаються різноманітною біологічною активністю, зокрема алелопатичною, при цьому деякі дослідники вважають, що більш активні вони по відношенню до прокаріот [4].

Таблиця 2

Склад екзометаболітів *Monoraphidium contortum* на логарифмічній (7 діб) та стаціонарній (25 діб) стадіях росту

№	Сполука	Формула	t_R	Логариф-мічна стадія	Стаціонар-на стадія
Терпенові сполуки					
1	Камфора	$C_{10}H_{16}O$	5,97	-	+
2	4-(1,5-диметил-3-оксогексил)-метиловий ефір 1-циклогексен-1-карбоксильної кислоти (ювабіон)	$C_{16}H_{26}O_3$	28,97	-	+
3	Склареолід	$C_{16}H_{26}O_2$	29,69	-	+
Насичені вуглеводні					
1	1,2-диетил-3-метил-циклогексан	$C_{11}H_{22}$	3,67	+	+
2	8-гексил-пентадекан	$C_{21}H_{44}$	19,14	+	+
Ненасичені вуглеводні					
1	2,6-диметил-2-октен	$C_{10}H_{20}$	3,11	+	-
2	9-метил-, (Z)-2-ундецен	$C_{12}H_{24}$	5,36	+	+
3	3-метил-, (Z)-2-ундецен	$C_{12}H_{24}$	7,21	+	-
4	2-бутил-1-октанол	$C_{12}H_{26}O$	9,38	+	-
5	2,6-ди(t-бутил)-4-гідрокси-4-метил-2,5-циклогексадієн-1-он	$C_{15}H_{24}O_2$	14,74	-	+
Ароматичні сполуки					
1	Бензойна кислота	$C_7H_6O_2$	6,82	-	+
2	Диетилфталат	$C_{12}H_{14}O_4$	17,64	-	+
3	Дибутилфталат	$C_{16}H_{26}O_3$	28,97	+	+

Екзогенні метаболіти водоростей беруть безпосередню участь у формуванні алелопатичних взаємовідносин між представниками альгоугруповань. Проте різні водорості відрізняються силою впливу на інші види. Крім того, численні дослідження алелопатичного взаємовпливу поки що не дають однозначної відповіді на питання про роль такого біологічного чинника, як фаза розвитку водоростей. Максимальний алелопатичний ефект різні дослідники спостерігали і на лаг-, і на логарифмічній та стаціонарній стадіях росту [2, 7], причому від фази росту залежить не тільки сила, але інколи і спрямованість ефекту взаємовпливу (пригнічення чи стимуляція) [1]. Одержані нами результати свідчать, що ці розбіжності можуть бути зумовлені різницею у складі діючих компонентів, які формують пул екзометаболітів. При цьому відмінності можуть спостерігатись не тільки для різних видів водоростей, але і на різних стадіях розвитку водоростевих популяцій.

Висновки

Склад позаклітинних метаболітів водоростей характеризується видоспецифічністю, відрізняється за кількістю, співвідношенням та ступенем біологічної активності компонентів і змінюється на різних стадіях росту. Відмінності у складі екзометаболітів можуть зумовлювати різний алелопатичний ефект в разі взаємодії різних представників альгофлори.

1. *Кирпенко Н. И.* Рост и функционирование некоторых планктонных водорослей в условиях смешанного культивирования / Н. И. Кирпенко // Гидробиологический журнал. – 2005. – Т. 41, № 3. – С. 58–71.
2. *Сакевич О. Й.* Алелопатія в гідроекосистемах / О. Й. Сакевич, О. М. Усенко. – Київ : Ін-т гідробіології НАН України, 2008. – 342 с.
3. *Сиренко Л. А.* Биологически активные вещества водорослей и качество воды / Л. А. Сиренко, В. Н. Козицкая. – К.: Наук. думка, 1988. – 254 с.
4. *Усенко О. М.* Резистентність водоростей до біологічно активних речовин / О. М. Усенко, О. Й. Сакевич, О. В. Баланда. – К. : Логос, 2010. – 192 с.
5. *Bohlmann J.* Insect-Induced Terpenoid Defenses in Spruce / J. Bohlmann // Induced Plant Resistance to Herbivory. – Netherlands : Springer, 2008. – P. 173–187.
6. *Chou Ch.-H.* Introduction to allelopathy / Ch.-H. Chou // Allelopathy. A Physiological Process with Ecological Implications / eds. M. J. Reigosa, N. Pedrol, L. Gonzalez. – Netherlands : Springer, 2006. – P. 1–9.
7. *Mulderij G.* Differential sensitivity of green algae to allelopathic substances from *Chara*: Recent Developments in Fundamental and Applied Plankton Research / G. Mulderij, E. Van Donk, J. G. M. Roelofs. // Hydrobiologia. – 2003. – Vol. 491, № 1–3. – P. 261–271.
8. *Sirikantaramas S.* Mechanisms of resistance to self-produced toxic secondary metabolites in plants / S. Sirikantaramas, M. Yamazaki, K. Saito // Phytochem. Rev. – 2008. – Vol. **7**. – P. 467–477.

Н.И. Кирпенко[1], Е.А. Курашов[2], Ю.В. Крылова[3]
[1]Институт гидробиологии НАН Украины, Киев
[2]Институт озероведения РАН, Санкт-Петербург, Россия
[3]Санкт-Петербуржский государственный университет, Россия

СОСТАВ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ НЕКОТОРЫХ ЗЕЛЕНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РОСТА

Экспериментальные результаты свидетельствуют, что состав внеклеточных метаболитов водорослей видоспецифичен, отличается по количеству, соотношению и биологической активности компонентов и изменяется на разных стадиях роста. Отличия в составе экзометаболитов могут обусловливать различный аллелопатический эффект при взаимодействии разных представителей альгофлоры.

Ключевые слова: водоросли, фазы роста, экзометаболиты, аллелопатия

N.I. Kirpenko[1], E.A. Kurashov[2], Yu.V. Krylova[3]
[1]Institute of hydrobiology of NAS of Ukraine, Kyiv
[2]Institute of Lakes RAS, St.-Pitersburg, Russia
[3]St.-Pitersburg State University, Russia

COMPOSITION OF EXOMETABOLITES SOME GREEN ALGAE ON THE DIFFERENT STAGES OF GROWTH

Experimental results testify that composition of algal exogenous metabolites is species-specific, differing in quantity, relation and biological activity and changes on the different stages of growth. The distinction in exometabolites composition can determine a different allelopathic effect in interaction of some algal species.

Keywords: algae, growth stages, exometabolites, allelopathy

Рекомендує до друку
В.В. Грубінко

Надійшла 17.02.2011