

Н.І. КІРПЕНКО

Інститут гідробіології НАН України  
просп. Героїв Сталінграда, 12, м. Київ, 04210, Україна  
[www.nativ51@mail.ru](mailto:www.nativ51@mail.ru)

## ФРАКЦІЙНИЙ СКЛАД БІЛКІВ У БІОМАСІ АЛЬГОЛОГІЧНО ЧИСТИХ ТА ЗМІШАНИХ КУЛЬТУР ВОДОРОСТЕЙ

*Ключові слова: культури водоростей, алелопатична взаємодія, фракційний склад білків*

### Вступ

Вивчаючи взаємовплив водоростей у лабораторних умовах, ми встановили, що в біомасі змішаних культур змінюється загальний вміст білкових сполук порівняно з монокультурами відповідних видів [7]. Ці зміни неоднозначні: в одних випадках кількість білків зростає в 1,5—3 рази, в інших — зменшується більш як удвічі. Такі порушення, очевидно, є наслідком алелопатичної взаємодії видів. Відіграючи роль стресового чинника, вона може сприяти як збільшенню вмісту білкових сполук у результаті синтезу стресових білків, так і його зменшенню — пригнічуючи синтез білків *de novo* або посилюючи їх протеолітичне розщеплення [5].

У вищих рослин унаслідок алелопатичного впливу не лише зменшується концентрація білків, а й змінюється їх фракційний склад [8]. Цілком імовірно, що і водорості, через прояв механізмів, загальних для всього рослинного світу, так само реагують на алелопатичний вплив. У зв'язку з цим нашою метою було порівняльне дослідження фракційного складу розчинних білків у біомасі синьозеленої водорості *Oscillatoria neglecta* та зелених *Acutodesmus obliquus* і *Selenastrum gracile* за умов їх моновидового та змішаного культивування.

### Об'єкти та методика досліджень

Вивчали біомасу культур *Oscillatoria neglecta* Lemm. HPDP-25; *Acutodesmus obliquus* (Turp.) P. Tsarenko HPDP-104; *Selenastrum gracile* Reinsch HPDP-115, які вирощували окремо й попарно з метою моделювання алелопатичного взаємовпливу. Для одержання змішаних культур однакові за щільністю інокуляти одночасно висівали на живильне середовище Фітцджеральда у модифікації Цендера й Горема [10] у співвідношенні об'ємів 1 : 1. Через 7 діб культивування за температури 23—25 °С та освітленості 4 клк (80 мкЕ/м<sup>2</sup>·с) суспензію водоростей центрифугували за 8 тис. об./хв (3500 г) протягом 15 хв, а клітинну масу використовували для аналізу білкових сполук.

Фракційний склад розчинних білків біомаси культур водоростей за моновидового та змішаного культивування вивчали за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі. Цей метод застосовують для порівняльної характе-

ристики білкових сполук різних об'єктів, зокрема водоростей [9]. Диск-електрофорез біомаси водоростей проводили у 10—12 %-му поліакриламідному гелі у 6 М сечовині за рН 8,8—8,9 [13]. Електрофореграми фіксували 7 %-ю трихлороцтовою кислотою, фарбували амідочорним. Білкові компоненти характеризували за їх відносною електрофоретичною рухливістю (ВЕР) та площею дисків на електрофореграмах. Для приблизної оцінки молекулярної маси фракцій використовували стандартні мітчики для диск-електрофорезу фірми Pharmacia, зокрема фосфорилазу Б, бичачий сироватковий альбумін, овальбумін, карбоангідразу, соєвий трипсиновий інгібітор, б-лактальбумін.

### Результати досліджень та їх обговорення

Одержані експериментальні дані засвідчують, що у спектрі білкових сполук досліджених водоростей як при альгологічно чистому, так і змішаному вирощуванні спостерігаються відмінності, що стосуються загальної кількості фракцій, вмісту і співвідношення окремих з них (рис. 1).

У монокультурі *O. neglecta* загалом виявлено 18 білкових фракцій, зелених водоростей — 21—22, у змішаних культурах — 18—23, що суттєво не відрізняється від результатів інших дослідників. Так, для ряду зелених водоростей кількість фракцій розчинних білків становила 14—19 [2, 3], для синьозелених — 19—30 [4].

Порівнюючи білковий спектр змішаних культур і відповідних монокультур за показниками ВЕР, ми виявили, що здебільшого їхні спектри подібні, але інколи помітно різняться. Зокрема, у змішаній культурі *Oscillatoria neglecta* + *Acutodesmus obliquus* відсутня фракція з ВЕР 0,44, наявна в монокультурі *O. neglecta*. На електрофореграмах змішаної культури *Acutodesmus obliquus* + *Selenastrum gracile* не зафіксовано фракції з ВЕР 0,09, 0,12, 0,36, 0,69, характерні для однієї або обох монокультур. Крім того, у цієї пари водоростей з'явилася додаткова смуга з ВЕР 0,18, яка може відповідати білку з досить високою молекулярною масою — близько 110—115 кДа. Цілком можливо, що ця сполука належить до класу фітоалексинів — стресових метаболітів рослинного походження, біосинтез яких індукується або інтенсифікується в разі взаємодії двох різних метаболічних систем [1]. Як відомо, здатність продукувати стресові білки (зокрема з Мм 110 кДа) у відповідь на пошкоджуючий вплив різноманітних фізичних, хімічних і біологічних чинників властива клітинам представників практично всіх класів тваринного й рослинного світу [5].

Цікаво, що у біомасі *Oscillatoria neglecta*, *Acutodesmus obliquus* та їх змішаних культур виявлено білок з ВЕР 0,71, який відповідає карбоангідразі — ферменту, котрий бере безпосередню участь в асиміляції вуглекислого газу. Карбоангідразу відповідальна за асиміляцію вуглекислого газу шляхом участі в його дифузії через клітинні мембрани, а також засвоєнні у процесі фотосинтезу екзогенного бікарбонату та концентруванні CO<sub>2</sub> у зонах карбоксилювання з бікарбонатного пулу у хлоропласті [11, 14]. Водночас у біомасі *Selenastrum gracile* цю фракцію не ідентифіковано, хоча знайдено фракцію 0,73—0,74, яка зберігалась

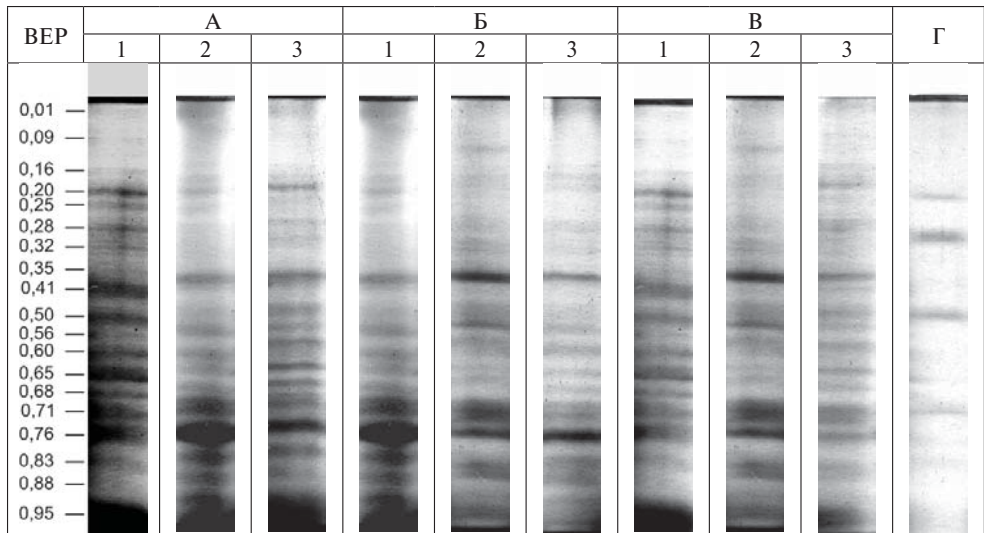


Рис. 1. Електрофореграми білкового спектра одновидових і змішаних культур водоростей: А — монокультури *Oscillatoria neglecta* (1) і *Acutodesmus obliquus* (2) та їх змішана культура (3); Б — монокультури *Acutodesmus obliquus* (1) і *Selenastrum gracile* (2) та їх змішана культура (3); В — монокультури *Oscillatoria neglecta* (1) і *Selenastrum gracile* (2) та їх змішана культура (3); Г — контроль з відомими білками

Fig. 1. Electroforegrams of protein spectrum of unialgal and mixed algae cultures: А — unialgal cultures of *Oscillatoria neglecta* (1) and *Acutodesmus obliquus* (2) and their mixed culture (3); Б — unialgal cultures of *Acutodesmus obliquus* (1) and *Selenastrum gracile* (2) and their mixed culture (3); В — unialgal cultures of *Oscillatoria neglecta* (1) and *Selenastrum gracile* (2) and their mixed culture (3)

і в змішаних культурах цього виду. Досліджуючи особливості росту зелених водоростей за умов підвищеного насичення середовища вуглекислим газом, ми звернули увагу, що додаткове навантаження  $\text{CO}_2$  супроводжувалося припиненням росту й погіршенням стану культури *Selenastrum gracile*. Можливо, у цієї водорості вміст карбоангідази незначний або наявний її менш активний ізомер, чим і пояснюється негативний вплив надлишку вуглекислоти.

У разі спільного вирощування *Oscillatoria neglecta* з *Selenastrum gracile*, як і попередніх змішаних культур, зафіксовано певні відмінності від монокультур. У біомасі змішаної культури цих видів відсутня фракція з ВЕР 0,59, знайдена в обох монокультурах. Водночас фракція з ВЕР 0,12, виявлена у монокультурі *S. gracile*, розподілилась на дві смуги, що дає підстави припустити наявність двох ізомерів з близькими молекулярними масами.

Зауважимо, що на багатьох фореграмах спостерігається широка смуга з ВЕР 0,95—1,00, максимально інтенсивна для змішаної культури *Oscillatoria neglecta* + *Acutodesmus obliquus*, мінімально — для змішаної культури двох зелених водоростей (див. рис. 1). Можливо, вона зумовлена концентруванням у цій області та слабким розділенням низькомолекулярних поліпептидів, що могли утворитися внаслідок їх посиленого синтезу, а також розщеплення білкових молекул. Це могло би пояснити зменшення вмісту білків у біомасі водоростей,

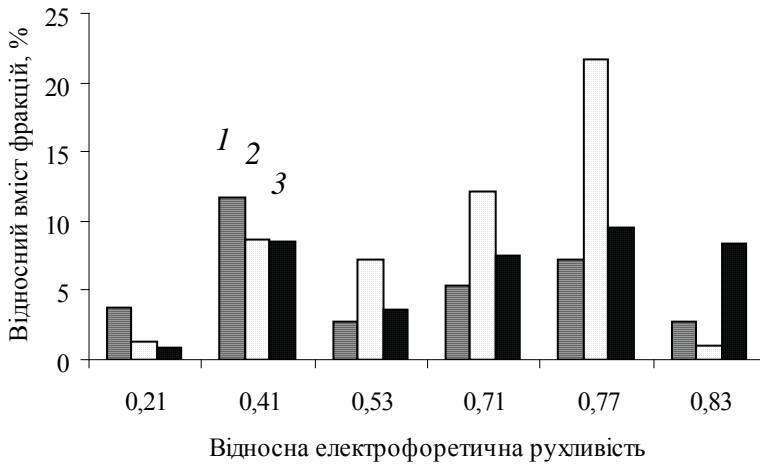


Рис. 2. Відносний вміст окремих білкових фракцій у біомасі монокультур *Oscillatoria neglecta* (1), *Acutodesmus obliquus* (2) та їх змішаної культури (3)

Fig. 2. Relative content of individual protein fractions in the biomass of monocultures of *Oscillatoria neglecta* (1), *Acutodesmus obliquus* (2) and their mixed culture (3)

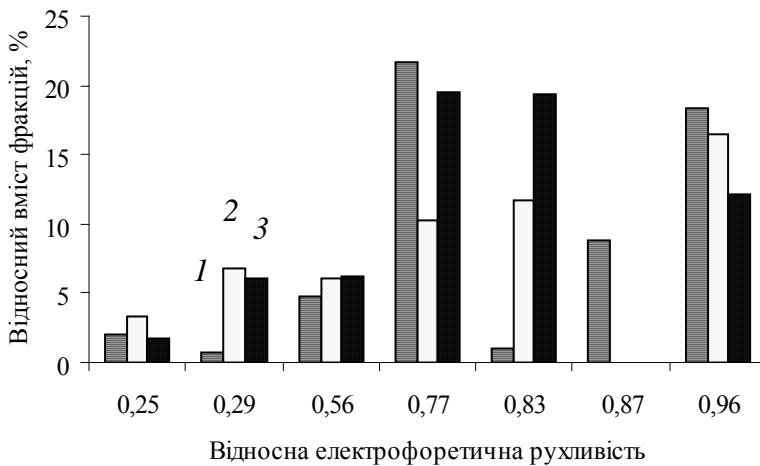


Рис. 3. Відносний вміст окремих білкових фракцій у біомасі монокультур *Acutodesmus obliquus* (1), *Selenastrum gracile* (2) та їх змішаної культури (3)

Fig. 3. Relative content of individual protein fractions in the biomass of monocultures of *Acutodesmus obliquus* (1), *Selenastrum gracile* (2) and their mixed culture (3)

про яке згадувалося раніше. Слід наголосити, що значна кількість біологічно активних сполук синьозелених водоростей є саме низькомолекулярними пептидами. Наприклад, у біомасі *Oscillatoria agardhii* 126/8 виявлено чотири пептиди з високою біологічною активністю: аеругінозин, мікрівіридин, анабенопептин та мікроцистин — сполуки, що є альготоксинами [12]. Отже, синтез токсичних сполук може посилюватися в разі взаємовпливу не тільки синьозелених водоростей, як це ми з'ясували раніше [6], а й представників інших систематичних груп.

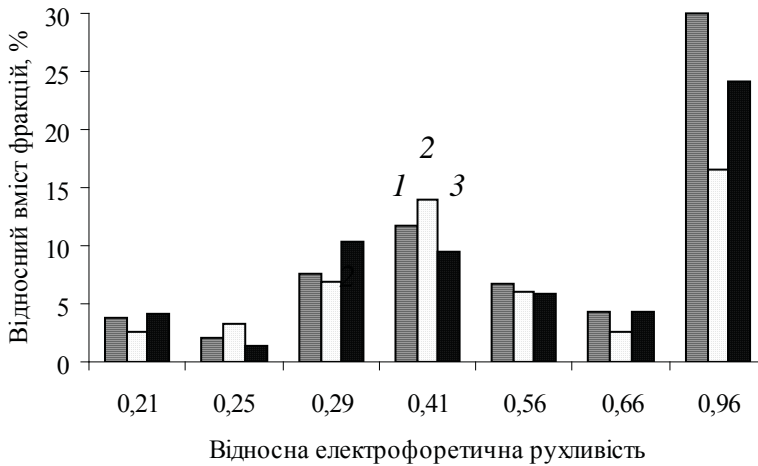


Рис. 4. Відносний вміст окремих білкових фракцій у біомасі монокультур *Oscillatoria neglecta* (1), *Selenastrum gracile* (2) та їх змішаної культури (3)

Fig. 4. Relative content of individual protein fractions in the biomass of monocultures of *Oscillatoria neglecta* (1), *Selenastrum gracile* (2) and their mixed culture (3)

Слід зазначити, що одержані спектри досить подібні до характеристик білків низки синьозелених водоростей, детально досліджених в Інституті ботаніки НАН України [4]. При цьому подібність спостерігається як для стабільних білків, що рееструються незалежно від віку культур, так і для мінливих, які з'являються лише у певні періоди росту. Такі мінливі білки можуть становити майже половину від загальної кількості цих сполук, що зумовлює значні коливання досліджуваного показника.

Порівняння площі дисків найінтенсивніших фракцій білка на електрофореграмах показало, що за відносною кількістю деяких фракцій досліджені монокультури досить подібні, наприклад, уміст фракцій з ВЕР 0,24 та 0,57 у біомасі всіх трьох водоростей характеризувався величинами одного порядку (2,06—3,30 та 4,76—6,75 %, відповідно). У ряді випадків спільні риси відзначені для представників одного відділу водоростей, але виявилися різними для іншого. Так, кількість фракції з ВЕР 0,49 у зелених водоростей становила 3,95—5,12 % і була значно нижчою, ніж у *Oscillatoria neglecta* (7,79 %). Водночас вміст фракції 0,52 у Chlorophyta дорівнював 4,90—7,18, а в синьозеленої водорості — лише 2,73 %. Проте ця закономірність зберігалася не для всіх фракцій. Так, за вмістом фракцій з ВЕР 0,29 і 0,41 більшою була подібність між зеленою *Selenastrum gracile* й синьозеленою водоростями, ніж у межах відділу Chlorophyta (кількість фракції 0,29 в *Oscillatoria neglecta* — 7,66 %, у *Selenastrum gracile* — 6,83, а у *Acutodesmus obliquus* — тільки 0,72 %). Отже, спектр білкових сполук водоростей в умовах дослідження меншою мірою залежав від систематичної належності видів, а відзначався видовими особливостями, про що свідчать і висновки інших дослідників [2].

У біомасі змішаних культур водоростей відносна кількість окремих фракцій переважно посідала проміжне місце між такою монокультурою, чого й можна було очікувати, з'єднуючи біомасу двох культур у майже рівному співвідношенні. Проте для багатьох фракцій спостерігалися значні відхилення показників змішаної культури від усереднених — монокультур. Так, для *Oscillatoria neglecta* + *Acutodesmus obliquus* кількісний вміст фракцій з ВЕР 0,21 та 0,77 був нижчим, а 0,83 — значно вищим за середні показники монокультур (рис. 2). Водночас в *Acutodesmus obliquus* + *Selenastrum gracile* концентрація низькомолекулярної фракції з ВЕР 0,83 також суттєво перевищувала показники обох монокультур, але вірогідне зменшення вмісту зафіксоване для інших фракцій — з ВЕР 0,25 та 0,96 (рис. 3).

Як свідчить аналіз одержаних даних, для *Oscillatoria neglecta* й *Selenastrum gracile* вміст фракцій здебільшого був досить близьким як у монокультурах, так і в змішаній культурі (рис. 4).

У разі спільного вирощування цих видів також відбувався перерозподіл білкових фракцій. Так, помітно зменшувався відносний вміст фракцій з ВЕР 0,41 і 0,25 (як і в *Acutodesmus obliquus* + *Selenastrum gracile*), а збільшувався — 0,29.

Отже, при спільному вирощуванні водоростей перерозподіляється фракційний склад білків у біомасі змішаних культур порівняно з монокультурами тих самих видів. Цілком можливо, що живильне середовище Фітцджеральда не є оптимальним для всіх трьох досліджених видів, що могло позначитись і на їх біохімічному складі. Проте порівняння білкових спектрів моно- і змішаних культур, які росли в однакових умовах, неоднозначно засвідчує, що алелопатична взаємодія водоростей спричинює перебудову метаболічних процесів клітин, зокрема, суттєво впливає на білковий обмін. Неоднозначність таких змін потребує подальшого детального дослідження цих процесів у динаміці для з'ясування їх закономірностей та виявлення найбільш лабільних білкових компонентів, які, можливо, і зумовлюють весь комплекс метаболічних змін, що відбуваються в умовах взаємовпливу видів.

Взаємодія водоростей є біотичним чинником формування та функціонування їх угруповань, який необхідно враховувати, досліджуючи біохімічний склад природних популяцій водоростей, оскільки за наявності у фітопланктоні алелопатично активного виду кількість окремих компонентів, зокрема білків, може суттєво відрізнятись від справжніх показників кожної окремої популяції.

## Висновки

1. Спектр білкових сполук альгологічно чистих культур значною мірою залежить від видових особливостей водоростей.

2. За умов спільного вирощування різних видів водоростей спостерігаються неоднозначні зміни фракційного складу їх білків. У біомасі змішаних культур *Oscillatoria neglecta* + *Acutodesmus obliquus*, *O. neglecta* + *Selenastrum gracile*, *A. obliquus* + *S. gracile* зникають окремі фракції, виявлені в одній чи обох монокультурах, і з'являються нові, не знайдені в жодній монокультурі, а також змі-



нюється кількість окремих білкових фракцій. Встановлені порушення свідчать про глибоку перебудову білкового обміну водоростей у разі їх аделопатичної взаємодії.

*Роботу виконано за часткової підтримки гранту Ф 28/6.-013 ДФФД-РФФД-2009.*

1. Барбье М. Введение в химическую экологию. — М.: Мир, 1978. — 229 с.
2. Берс Э.П., Пиневиц В.В. Изучение белков низших водорослей в пределах разных таксономических рангов. 1. Характеристика растворимого белкового комплекса у представителей отделов Chlorophyta и Cyanophyta // Вестн. Ленингр. ун-та. — 1969. — № 15. Биология, вып. 3. — С. 114—120.
3. Берс Э.П., Пиневиц В.В., Резник К.П. Характеристика растворимых белков некоторых низших водорослей методом дискового электрофореза // Мат-лы V Рабоч. совещ. по вопр. круговорота веществ в замкнутых системах на основе жизнедеятельности низших организмов. — Киев: Наук. думка, 1968. — С. 94—96.
4. Биохимия синезеленых водорослей / Судина Е.Г., Шнекова Е.И., Костлан Н.В. и др. — Киев: Наук. думка, 1978. — 264 с.
5. Браун А.Д., Моженок Т.П. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. — Л.: Наука, 1987. — 232 с.
6. Кирпенко Н.И. Токсичность некоторых массовых видов синезеленых водорослей в условиях моновидового и смешанного выращивания: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Киев, 1991. — 24 с.
7. Кирпенко Н.И. Метаболічна активність водоростей в умовах їх аделопатичної взаємодії // Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку: у 2 т. НАН України, Ін-т фізіології рослин і генетики, Укр. Т-во фізіологів рослин; голов. ред. В.В. Моргун. — К.: Логос, 2009. — Т. 2. — С. 460—465.
8. Крилов Ю.В. Влияние картофеля на яблоню и ее фотосинтез // Физиол.-биохим. основы взаимодействия растений в фитоценозах / Под ред. А.М. Гродзинского. — Киев: Наук. думка, 1970. — Вып. 1. — С. 128—134.
9. Маурер Г. Диск-электрофорез. — М.: Мир, 1971. — 247 с.
10. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. — Киев: Наук. думка, 1975. — 256 с.
11. Пронина Н.А., Семененко В.Е. Молекулярная и клеточная организация CO<sub>2</sub>-концентрирующих механизмов в фотоавтотрофных клетках микроводорослей // Альгология. — 1991. — 1, № 2. — С. 80—92.
12. Christiansen G., Dittman E., Burner Th. Molecular studies on non-ribosomal peptide biosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* 126/8 // 10<sup>th</sup> Int. Symp. Phototroph. Prokaryotes (Barcelona, Aug. 26—31, 2000) ISPP 2000: Program and Abstr. — Barcelona, 2000. — P. 220.
13. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // Nature. — 1970. — 227. — P. 680—685.
14. Rotatore C., Colman B. The localization of active inorganic carbon transport at the plasma membrane in *Chlorella elipsoidea* // Can. J. Bot. — 1991. — 68, N 5. — P. 1025—1031.

Рекомендує до друку  
І.В. Косаківська

Надійшла 13.05.2009

*Н.И. Кирпенко*

Институт гидробиологии НАН Украины, г. Киев

**ФРАКЦИОННЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ В БИОМАССЕ  
АЛЬГОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТЫХ И СМЕШАННЫХ КУЛЬТУР ВОДОРΟΣЛЕЙ**

При совместном выращивании водорослей наблюдается перераспределение фракционного состава белков, сопровождающееся изменением относительного содержания отдельных фракций. В биомассе смешанных культур водорослей отсутствуют некоторые фракции, выявленные в одной либо обеих монокультурах, и в то же время отмечены фракции, не свойственные водорослям при отдельном культивировании в данных условиях.

*К л ю ч е в ы е с л о в а: культуры водорослей, аллелопатическое взаимодействие, фракционный состав белков*

*N.I. Kirpenko*

Institute of Hydrobiology, National Academy of Sciences of Ukraine

**FRACTIONAL COMPOSITION OF PROTEINS IN THE BIOMASS  
OF UNIALGAL AND MIXED ALGAE CULTURES**

Redistribution of the fractional composition of proteins accompanied by changes in a relative content of individual fractions is registered in mixed cultures of algae. Not all fractions registered in one or both monocultures were found in the biomass of mixed algae cultures. At the same time, mixed algae cultures were characterized by the presence of specific fractions not peculiar to unialgal cultures (monocultures).

*Key words: algae cultures, allelopathic interaction, fractional composition of proteins.*