

УДК (577.121:582.232):581.524.13

Н.И. КИРПЕНКО¹, Е.А. КУРАШОВ², Ю.В. КРЫЛОВА³¹Институт гидробиологии НАН Украины
пр-т Героев Сталинграда, 12, Киев 04210, Украина²Институт озераведения РАН, С.-Петербург, Россия³ф-т географии и геоэкологии СПбГУ, С.-Петербург, Россия

ЭКЗОГЕННЫЕ МЕТАБОЛИТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ДВУХ СИНЕЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ В МОНО- И СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРАХ

Исследованы гексановые экстракты культуральных фильтратов моно и смешанной культур *Oscillatoria neglecta* Lemm. и *Anabaena variabilis* Kütz. Показано наличие соединений с потенциальной аллелопатической активностью. Выявлены изменения состава экзометаболитов в смешанной культуре.

Ключевые слова: водоросли, экзометаболиты, аллелопатия

В формировании и функционировании альгосообществ наряду с абиотическими факторами существенную роль играют взаимодействия между самими водорослями. Взаимовлияние видов приводит к изменению структуры сообществ, популяционной динамики, характера роста водорослей, интенсивности фотосинтеза, дыхания, свободнорадикальных процессов, активности окислительно-восстановительных ферментов, интенсивности белкового обмена [1, 5]. Нарушается также характерная динамика накопления в среде растворенного органического вещества и соотношение его компонентов, что является не только следствием, но, очевидно, и причиной перечисленных изменений.

В состав экзометаболитов водорослей входят соединения различной природы. Они принимают участие либо в трофическом обмене, либо, обладая биологической активностью, выполняют роль аллелохимических агентов и информационных медиаторов, влияющих на развитие и функционирование контактирующих популяций водорослей. Изучение изменения состава и соотношения экзометаболитов водорослей в процессе их взаимодействия может дать ключ к пониманию механизмов аллелопатии, а также выявить действующее начало, ответственное за формирование таких взаимоотношений.

Целью настоящей работы было изучение экзогенных метаболитных комплексов водорослей, выращиваемых в монокультурах, а также в смешанных культурах, моделирующих аллелопатическое взаимодействие.

Материал и методы исследований

Культуры синезеленых водорослей *Anabaena variabilis* Kütz. HPDP-4 и *Oscillatoria neglecta* Lemm. HPDP-25 выращивали на среде Фитцджеральда в модификации Цендера и Горхема (температура 23–26°C, интенсивность освещения 3,5 клк). Водоросли культивировали в течение 5 сут (до начала логарифмической стадии роста) и пересевали на свежую питательную среду – отдельно (монокультуры) или в равном соотношении по показателям сухой массы (смешанные культуры). По истечении 3 сут экспозиции суспензию клеток фильтровали через плотный бумажный фильтр. Экзогенные метаболиты водорослей из фильтрата экстрагировали гексаном (6 см³ гексана на 500 см³ культуральной среды). Их состав определяли на хромато-масс-спектрометрическом комплексе TRACE DSQ II (Thermo Electron Corporation) с квадрупольным масс-анализатором (колонка Thermo TR-5ms SQC 15 м x 0,25 мм с фазой ID 0.25 мкм). В качестве газа-носителя служил гелий. Масс-спектры снимали в режиме сканирования по полному диапазону масс (30–580 m/z) в программном режиме температур с последующей пошаговой обработкой хроматограмм. Для идентификации обнаруженных веществ использовали библиотеки масс-спектров «NIST-2005» и «Wiley», а для количественного анализа – внутренние стандарты декафлуоробензофенон, бензофенон и метилстеарат.

Результаты исследований и их обсуждение

В составе экзогенных метаболитов *Oscillatoria neglecta* обнаружено 26, *Anabaena variabilis* – 8 соединений (табл.). Сравнение состава веществ в фильтратах монокультур водорослей показало, что среди них находятся насыщенные, ненасыщенные и ароматические углеводороды,

ПРИСНОВОДНА ГІДРОБІОЛОГІЯ

ароматические производные карбоновых кислот, терпены, фенолы и их производные. Часть соединений осталась неидентифицированной.

Таблиця

Состав экзометаболитов монокультур синезеленых водорослей

N	Вещество	Формула	Время удерживания, мин	Индекс Ковача	C, мг/дм ³	%
<i>Oscillatoria neglecta</i>						
1	6,10-диметил-,(Z)-5,9-ундекадиен-2-он	C ₁₃ H ₂₂ O	39,72	1465	0,0008	0,04
2	2,6-Дитертбутилбензо-1,4-квинон	C ₁₄ H ₂₀ O ₂	39,90	1469	0,0010	0,04
3	Неидентифицированное вещество	?	40,33	1480	0,0028	0,13
4	22,6-ди(т-бутил)-4-гидрокси-4-метил-2,5-циклогексадиен-1-он	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	40,45	1483	0,0028	0,13
5	β-Гуайен	C ₁₅ H ₂₄	41,18	1501	0,0004	0,02
6	2,6-Дитерт-4-метилфенол	C ₁₅ H ₂₄ O	41,82	1517	0,0281	1,29
7	Додекановая кислота	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	44,84	1586	0,0004	0,01
8	2-метил-, 1-(1,1-диметилэтил)-2-метил-1,3-пропаноидловый эфир Пропановой кислоты	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	45,57	1603	0,0086	0,40
9	Гексил 2-гидроксibenzoат	?	48,33	1681	0,0020	0,09
10	Неидентифицированное вещество	?	49,38	1711	0,0068	0,32
11	Диизобутилфталат	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	54,32	1881	0,0268	1,23
12	Дибуталфталат	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	55,94	1971	0,2593	11,89
13	Эйкозан	C ₂₀ H ₄₂	56,44	2008	0,0133	0,61
14	Неидентифицированное вещество	?	57,18	2086	0,0053	0,24
15	Генейкозан	C ₂₁ H ₄₄	57,39	2108	0,0494	2,27
16	Октадекановая кислота	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	57,92	2175	0,0170	0,78
17	Докозан	C ₂₂ H ₄₆	58,16	2205	0,0754	3,45
18	Трикозан	C ₂₃ H ₄₈	58,84	2304	0,1250	5,74
19	Тетракозан	C ₂₄ H ₅₀	59,47	2405	0,1381	6,33
20	Пентакозан	C ₂₅ H ₅₂	60,14	2506	0,1885	8,65
21	Гексакозан	C ₂₆ H ₅₄	60,94	2604	0,2286	10,49
22	Гептакозан	C ₂₇ H ₅₆	61,98	2701	0,2147	9,85
23	Октакозан	C ₂₈ H ₅₈	63,36	2801	0,2428	11,14
24	Сквален	C ₃₀ H ₅₀	63,74	2823	0,1442	6,62
25	Нонакозан	C ₂₉ H ₆₀	65,16	2901	0,2225	10,21
26	Триаконтан	C ₃₀ H ₆₂	67,59	3002	0,1751	8,03
	ВСЕГО				2,1797	
<i>Anabaena variabilis</i>						
1	1-этилбутил Гидропероксид	C ₆ H ₁₄ O ₂	7,79	967	0,0464	27,9
2	1-метилпентил Гидропероксид	C ₆ H ₁₄ O ₂	8,26	977	0,0403	24,2
3	Дигидрометилжасмонат	C ₁₃ H ₂₂ O ₃	47,74	1663	0,0018	1,1
4	Неидентифицированное вещество	?	49,38	1711	0,0037	2,2
5	Диизобутилфталат	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	54,32	1881	0,0118	7,1
6	Дибутилфталат	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	55,92	1970	0,0380	22,8
7	Сквален	C ₃₀ H ₅₀	63,68	2819	0,0168	10,1
8	Нонакозан	C ₂₉ H ₆₀	65,00	2892	0,0077	4,6
	ВСЕГО				0,1666	

Спектр соединений водорослей особо не отличается по сравнению с другими растительными объектами. Большинство идентифицированных веществ обнаруживаются среди экзогенных метаболитов различных растений [3, 11, 12], например, 2,6-дитерт-4-метилфенол, вещество из группы антиоксидантов [8, 12].

Необходимо отметить, что некоторые вещества, в частности, алканы и фталаты, находятся в культуральной среде в довольно высоких концентрациях. Так, в среде *O. neglecta* диизобутилфталат и дибутилфталат составляют соответственно около 0,03 и 0,26 мг/дм³. Эти соединения используются в химической промышленности и рассматриваются как загрязнители природной среды. Однако растения в природных условиях также их синтезируют, и они выступают как фитотоксины в аллелопатических взаимодействиях [14].

Состав экзометаболитов *A. variabilis* существенно отличался от такового *O. neglecta*. Количество и концентрации веществ были значительно ниже. Общим для обеих монокультур было наличие алкана нонакозана, ациклического тритерпена сквалена, неидентифицированного вещества с временем удерживания 49,38 мин., а также высокое содержание фталатов (см. табл.). В отличие от *O. neglecta*, значительную долю среди экзометаболитов *A. variabilis* составляли 1-этилбутил Гидропероксид и 1-метилпентил гидропероксид.

Особый интерес представляет дигидрометилжасмонат, выявленный в монокультуре *A. variabilis*. Это вещество очень близко к метилжасмонату, который является активным аллелопатическим агентом и участвует во взаимодействиях организмов в наземных [9] и водных экосистемах [7]. Вещества группы жасмонатов выступают в качестве информационных медиаторов, индуцирующих синтез веществ, ответственных за осуществление химической защиты растений [13], а также способствуют увеличению устойчивости водорослей против температурного стресса и инфекций [2]. Роль метилжасмоната в функционировании водорослей неоднозначна и зависит от его концентрации. При высоких концентрациях это вещество может выступать как самостоятельный аллелохимический агент, уменьшая численность клеток водорослей, концентрацию фотосинтетических пигментов, моносахаридов и других эндо- и экзометаболитов. При низких концентрациях метилжасмонат выполняет сигнальную функцию, инициируя синтез различных веществ (в том числе высокомолекулярных), очевидно, используемых растениями в ходе аллелопатических взаимодействий [4].

В смешанных культурах водорослей наблюдались определенные изменения в составе и концентрации экзометаболитов по сравнению с монокультурами. Исчезли 1-этилбутил Гидропероксид и 1-метилпентил Гидропероксид, снизились концентрации алканов и фталатов, особенно дибутилфталата по сравнению с монокультурой *O. neglecta*. В то же время появилась бензойная кислота (0,0089 мг/дм³) и увеличилась концентрация дигидрометилжасмоната по сравнению с монокультурой *A. variabilis* (от 0,0018 мг/дм³ до 0,0041 мг/дм³), что представляет наибольший интерес. По-видимому, обнаруженные в смешанной культуре концентрации производного жасмоновой кислоты не способны оказывать прямое негативное воздействие на *O. neglecta*, т.к. концентрации жасмонатов, ингибирующие развитие водных растений, вероятно, выше (10^{-4} – 10^{-5} М) [4]. Однако, увеличение концентрации дигидрометилжасмоната в среде свидетельствует об определенной реакции *A. variabilis* на присутствие другого вида и возможное включение иных защитных механизмов, запускаемых при помощи сигнального эффекта через это вещество.

Известно, что при концентрации метилжасмоната 0,0224 мг/дм³ инициируется синтез полипептидов [4], при 0,0022 мг/дм³ наблюдается аналогичный, хотя и менее выраженный эффект. В смешанной культуре водорослей концентрация дигидрометилжасмоната составила 0,0041 мг/дм³. Очевидно, при этом уровне проявляется именно информационная роль дигидрометилжасмоната, как сигнального фактора для запуска аллелопатических механизмов.

Заслуживает внимания также снижение концентрации фталатов и алканов. Поскольку концентрация фталатов в монокультуре *A. variabilis* ниже, чем у *O. neglecta*, можно предположить, что *A. variabilis* активно снижает их концентрацию в смешанной культуре до приемлемого для себя уровня.

Появление бензойной кислоты в смешанной культуре, вероятно, можно трактовать как образование аллелохимического агента, поскольку она участвует в аллелопатических взаимодействиях многих наземных и водных растений [6, 10, 14]. В частности, известно, что бензойная кислота и ее производные оказывают ингибирующее воздействие на синезеленые водоросли [15].

Выводы

Среди экзогенных метаболитов водорослей имеются соединения с потенциальной аллелопатической активностью. Эксперименты показали, что синезеленые водоросли способны активно изменять состав экзометаболитов в присутствии других видов. Летучие низкомолекулярные метаболиты могут выступать, как непосредственные аллелохимические агенты,

либо іграти роль інформаційних медиаторів, ініціюючих синтез других метаболітів (в том числі високомолекулярних) для виконання аллелопатических і захисних функцій. Специфіка екзометаболітних комплексів водоростей в зв'язі з аллелопатическими взаємодіями потребує дальшого серйозного вивчення.

1. Кірпенко Н.І. Метаболічна активність водоростей в умовах їх аллелопатичної взаємодії / Н.І. Кірпенко // 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.
2. Christov C. Influence of temperature and methyl jasmonate on *Scenedesmus incrasulatus* / C. Christov, I. Pouneva, M. Bozhkova [et al.] // Biol. Plant. – 2001. – Vol. 44. – P. 367–371.
3. Courtois E.A. Diversity of the Volatile Organic Compounds Emitted by 55 Species of Tropical Trees: a Survey in French Guiana / E.A. Courtois, C. E. Timothy Paine, P.-A. Blandinieres [et al.] // J. Chem. Ecol. – 2009. – Vol. 35. – P. 1349–1362.
4. Czerpak R. Jasmonic acid affects changes in the growth and some components content in alga *Chlorella vulgaris* / R. Czerpak, A. Piotrowska, K. Szulecka // Acta Physiol. Plantarum. – 2006. – Vol. 28, N 3. – P. 195–203.
5. Gross E.M. Allelopathy of Aquatic Autotrophs / E.M. Gross // Critical Reviews in Plant Sciences. – 2003. – Vol. 22, N 3. – P. 313–339.
6. Macías F.A. Allelopathic agents from aquatic ecosystems: potential biopesticides models / F.A. Macías, J.L.G. Galindo, M.D. García-Díaz, J.C.G. Galindo // Phytochem. Rev. – 2008. – Vol. 7. – P. 155–178.
7. Nam S. Induced Metabolite Changes in *Myriophyllum spicatum* during Co-existence Experiment with the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* / S. Nam, S. Joo, S. Kim [et al.] // J. Plant Biology. – 2008. – Vol. 51, N 5. – P. 373–378.
8. Palá-Paúl J. Essential oil composition of the aerial parts of *Cachrys sicula* L. / J. Palá-Paúl, A. Velasco-Negueruela, M.J. Pérez-Alonso, J. Sanz // Flavour Fragr. J. – 2002. – Vol. 17. – P. 64–68.
9. Preston C.A. Methyl Jasmonate as an Allelopathic Agent: Sagebrush Inhibits Germination of a Neighboring Tobacco, *Nicotiana Attenuata* / C.A. Preston, H. Betts, I.T. Baldwin // J. Chem. Ecol. – 2002. – Vol. 28, N 11. – P. 2343–2369.
10. Putnam A.R. Allelopathic chemicals / A.R. Putnam // Chem. Eng. News. – 1983. – Vol. 61. – P. 34–45.
11. Rezanka T. Fatty Acid Composition of Six Freshwater Wild Cyanobacterial Species / T. Rezanka, I. Dor, A. Prell, V.M. Dembitsky // Folia Microbiol. – 2003. – Vol. 48, N 1. – P. 71–75.
12. Skaltsa H.D. Essential oil analysis of *Nepeta argolica* Bory & Chaub. subsp. *argolica* (Lamiaceae) growing wild in Greece / H.D. Skaltsa, D.M. Lazari, A.E. Loukis, T. Constantinidis // Flavour Fragr. J. – 2000. – Vol. 15. – P. 96–99.
13. Wittstock U. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens / Wittstock U., Gershenzon J. // Curr. Opin. Plant Biol. – 2002. – Vol. 5. – P. 300–307.
14. Xuan T.D. Identification of Phytotoxic Substances from Early Growth of Barnyard Grass (*Echinochloa crusgalli*) Root Exudates / T.D. Xuan, M. Chung, T.D. Khanh, S. Tawata // J. Chem. Ecol. – 2006. – Vol. 32. – P. 895–906.
15. Zhang T.-T. The allelopathy and allelopathic mechanism of phenolic acids on toxic *Microcystis aeruginosa* / T.T. Zhang, Ch.-Y. Zheng, W. Hu et al. // J. Appl. Phycol. – 2010. – Vol. 22. – P. 71–77.

Н.І. Кірпенко¹, Є.А. Курашов², Ю.В. Крилова³

¹Інститут гідробіології НАН України, Київ

²Інститут озерознавства РАН, С.-Петербург, Росія

³Ф-т географії і геокології СПбДУ, С.-Петербург, Росія

ЕКЗОГЕННІ МЕТАБОЛІТНІ КОМПЛЕКСИ ДВОХ СИНЕЗЕЛЕНИХ ВОДРОСТЕЙ В МОНО- І ЗМІШАНИЙ КУЛЬТУРАХ

Досліджено гексанові екстракти культуральних фільтратів моно- й змішаної культур *Oscillatoria neglecta* Lemm. та *Anabaena variabilis* Kütz. Показано наявність сполук з потенційною аллелопатичною активністю. Виявлено зміни складу екзометаболітів у змішаній культурі.

Ключові слова: водорості, екзометаболіти, аллелопатія

N.I. Kirpenko¹, E.A. Kurashov², Yu.V. Krilova³

¹ Institute of Hydrobiology of NAS of Ukraine, Kyiv

² Institute Studies of Lakes RAS, S.-Petersburg, Russia

³ Faculty of Geographies and Geoecology of S.-Petersburg State University, S.-Petersburg, Russia

EXOGENOUS METABOLIC COMPLEXES OF *OSCILLATORIA NEGLECTA* LEMM. AND *ANABAENA VARIABILIS* KÜTZ. IN MONO- AND MIXED CULTURES

The hexane extracts of mono- and mixed cultures *Oscillatoria neglecta* Lemm. and *Anabaena variabilis* Kütz. filtrates were investigated. The presence of the substances with potential allelopathic activities was shown. The changes of the metabolite composition in the filtrates of mixed culture were revealed.

Key words: *Oscillatoria neglecta* Lemm., *Anabaena variabilis* Kütz., exometabolites, allelopathy