MICROBIOLOGIA ŞI BIOTEHNOLOGIA

ПРОДУКТИВНОСТЬ И АККУМУЛЯЦИЯ ГЕРМАНИЯ (IV) ЦИАНОБАКТЕРИЕЙ *SPIRULINA PLATENSIS* ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ НА СРЕДЕ С ДОБАВЛЕНИЕМ ГЕРМАНИЙ - СОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ

[1]Джур Светлана, [2]Бульмага Валентина, [2]Зосим Лилиана, [1]Рудь Людмила, [1]Кирияк Татьяна, [1]Чепой Лилиана, [2]Гуля Аурелиан, [1]Рудик Валерий

[1]Институт Микробиологии и Биотехнологии
[2]Молдавский Государственный Университет

Rezumat

S-a studiat nivelul acumulării germaniului (IV) şi modificările induse în productivitatea cianobacteriei *Spirulina platensis* la cultivare pe mediu cu adaos de compuşi anorganici şi organici ai germaniului. Compuşii germaniului au fost suplimentaţi la mediul nutritiv al spirulinei în trei concentraţii: 10, 20 şi 30 mg/l, în prima zi de cultivare. S-a stabilit, că acumularea germaniului de către celulele cianobacteriene depinde de concentraţia administrată a compusului. Nivelul maximal de acumulare al germaniului (75,7 mg%) s-a determinat în cazul utilizării $GeSe_2$ în concentraţie de 30 mg/l. Suplimentarea mediului nutritiv al spirulinei cu unii dintre compuşii germaniului (IV) testaţi a condus la o scădere a creşterii comparativ cu controlul. Compuşii $GeSe_2$, MesGe(F)PHMes

și ArP=C(Cl)Ge(F)-(Tip)t-Bu au stimulat productivitatea cu 25,4%, 11,1%, 8,9%, respectiv, comparativ cu controlul.

Cuvinte cheie: Spirulina platensis, compuși ai germaniului, productivitatea, acumulare
Depus la redacție 24 iunie 2020

Adresa pentru corespondență: Djur Svetlana, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, str. Academiei, 1, MD-2028 Chișinău, Republica Moldova, e-mail: djurlana@hotmail.com

Введение

Германий не относится к эссенциальным элементам живых организмов, но благодаря своим биологическим свойствам и терапевтическим эффектам, является важным микроэлементом. Считается, что органический германий ведет себя аналогично гемоглобину, несущему в себе отрицательный заряд, и участвует в процессе переноса кислорода в тканях организма, предупреждая развитие кислородной недостаточности (гипоксии) на тканевом уровне, а также повышает иммунный статус организма, подавляя процессы размножения микробных клеток, активируя макрофаги; имеет противогрибковые, противовирусные и антибактериальные свойства. Он является мощным антиоксидантом – блокатором свободных радикалов в организме; задерживает развитие злокачественных новообразований и препятствует появлению метастаз; регулирует все клапанные системы пищеварения, венозной системы; уменьшает боль (соединения германия блокируют движение электронов в нервных клетках, тем самым купируя боль); способствует предотвращению накопления тяжелых металлов [1, 13, 21, 26, 28].

Пищевые добавки, содержащие германий, впервые стали известны в 1970 году в Японии, а позже и в других странах [22]. Испытания различных германий - органических соединений в опытах на животных и в клинических испытаниях на людях показали, что они в разной степени положительно влияют на организм человека и животного [9, 11]. В литературе есть данные об отрицательном влиянии препаратов, содержащих германий, что связано в первую очередь с некачественным производством (с содержанием большого количества примесей неорганического германия), неправильным потреблением и несоблюдением дозировки [6, 20, 22].

Несмотря на положительный терапевтический эффект германия, неорганические соединения германия являются токсичными [4]. Использование цианобактерии *Spirulina platensis* в качестве биотехнологического объекта для биотрансформации неорганической формы германия в органическую позволило бы получить биокомплекс природного носителя – спирулины и встроенного в его структуру органического германия.

Некоторые исследования [8, 24-25, 27] показали, что влияние оксида германия на водоросли зависит от нескольких факторов: вводимой концентрации соединения, вида и штамма водорослей, длительности культивирования и др. Можно предположить, что использование органических соединений германия окажется более благоприятным для роста культуры, нежели неорганических и позволит получить новый, более безопасный источник органического германия, но уже природного происхождения. Поэтому для получения биомассы спирулины, обогащенной германием, представляет интерес использование в процессе её

культивирования химических соединений, содержащих неорганический и органический германий различной природы.

Таким образом, **целью данной работы** являлось изучение влияния соединений германия различной природы на рост и продуктивность цианобактерии *Spirulina platensis*, а также на уровень накопления германия в ее биомассе.

Материалы и методы

Объект изучения: Штамм цианобактерии *Spirulina platensis* CNMN-CB-11 [18].

Процесс и условия культивирования. Культивирование осуществлялось на модифицированной минеральной среде Zarrouk в колбах Эрленмейера с объемом суспензии спирулины в питательной среде 100 мл. В среду были добавлены 2 неорганических соединения германия: GeO_2 и $GeSe_2$, а также 7 органических соединений, содержащих германий: Mes_2GeCl_2 - (FM-1), $MesGe(OMe)_2$ - (FM-2), ArP=C(Cl)Ge(F)(Tip)t-Bu - (FM-3), ArP=C(Te) Ge(Tip)t-Bu - (FM-8), ArP=C(SeSe)Ge(Tip)t-Bu – (FM-9), ArP=C(PhCH=CHCHO)Ge(Tip)t-Bu - (FM-10) и $Mes_2Ge(F)$-PHMes - (FM-11). Соединения были добавлены в среду в следующих концентрациях: 10, 20 и 30 мг/л в первый день культивирования. Для растворения органических соединений германия был использован изопропанол, поскольку они нерастворимы в воде. Такое же количество изопропанола было добавлено в контрольную пробу. Что касается неорганических соединений германия, то в случае GeO_2 была использована стандартная среда Zarrouk, а в случае $GeSe_2$ - среда Zarrouk с уменьшенным содержанием соды и сульфатов (2 г/л и 0,4 г/л соответственно).

На протяжении всего срока культивирования соблюдались следующие параметры: количество инокулята – 0,4-0,45г/л АСБ; температура 28-32^oC, pH среды 8-10, освещение - 37-55 мкмоль фотонов/м^2/с. Культура ежедневно перемешивалась в течении двух часов на универсальной лабораторной мешалке типа WU-4 с частотой колебаний 2500 Гц. Продолжительность цикла культивирования - 144 часа.

Методы исследования:

Продуктивность спирулины: Продуктивность спирулины в контрольном и экспериментальных вариантах определяли спектрофотометрически с пересчетом клеточной массы в абсолютно сухую биомассу (АСБ). Продуктивность выражали в г/л абсолютно сухой биомассы (АСБ) и в % по сравнению с контролем для сравнительного анализа результатов исследования [17, 19].

Содержание германия в биомассе спирулины определяли спектрофотометрическим методом с использованием фенилфлуорона [14]. Все полученные экспериментальные результаты были статистически обработаны с применением описательных статистических инструментов, а расчет статистических показателей проводился с использованием возможностей MS Excel.

Тест Граббса применялся как тест на достоверность, а тест Стьюдента в качестве теста на значимость. При анализе данных, представленных в статье, указываются те различия между полученными данными, для которых $P < 0,01$ или $P < 0,05$.

Результаты и обсуждения

Согласно литературным данным [2, 10, 23], разные микроорганизмы демонстрируют совершенно разные уровни толерантности к германию. Также они накапливают различные количества германия, либо путем адсорбции на поверхности клетки, либо активным транспортом [2, 10, 15, 23]. Был отмечен ингибирующий эффект германия на рост диатомовых водорослей, которым необходим кремний. Даже при концентрации 1 мг/л GeO_2 значительно снижал рост этих водорослей [5, 12], а в концентрации 10 мг/л практически подавлял их рост. Это объясняется, по-видимому, тем, что биогеохимия германия тесно связана с кремнием. Во многих случаях, (био-)геохимическое поведение германия можно объяснить, рассматривая его как очень тяжелый изотоп кремния, с которым он связан в относительно постоянном молярном соотношении $0,6*10^{-6}$. Отклонения от этого соотношения имеют место в окружающей среде и являются следствием и показателем более тесного комплексообразования германия с поверхностными водами, богатыми органическим веществом [3, 16].

Что касается спирулины, то по некоторым данным [8], она более устойчива к воздействию германия, по сравнению с диатомовыми водорослями и хлореллой. Объясняется это возможно тем, что среда для культивирования имеет достаточно высокий pH, а германий при значениях pH выше 9,5 постепенно переходит в ионы германата (HGeO3) [7]. Эта измененная ионная форма германия является менее токсичной и более легко адсорбируется клетками.

Для данного исследования были выбраны неорганические и органические соединения, содержащие германий, которые добавлялись к среде в трех концентрациях в 10, 20 и 30 мг/л.

На Рисунке 1 приведены экспериментальные результаты по аккумуляции германия в биомассе и изменении уровня продуктивности спирулины при её культивировании в присутствии соединений германия различной природы.

Согласно полученным данным, эти соединения по-разному влияют на рост цианобактерии: наблюдается как стимулирующий эффект (FM-3, FM-8, FM-9, FM-11) так и ингибирующий (FM-1, FM-2, FM-10). Рассмотрим каждое соединение в отдельности, поскольку если даже соединение имеет стимулирующий эффект, то он в большой степени зависит от вводимой концентрации соединения. Так соединение FM-1 во всех трех исследуемых концентрациях отрицательно влияет на продуктивность культуры, снижая её на 11% при концентрациях 10 и 30 мг/л по сравнению с контролем и на 17% при концентрации 20 мг/л. Что касается накопления германия, то можно заключить, что уровень его накопления в биомассе возрастает с повышением концентрации соединения в питательной среде. Для этого соединения, максимальное накопление германия - 25,34 мг% в биомассе было отмечено при концентрации 30 мг/л.

Химическое соединение FM-2 также не способствует приросту биомассы спирулины, а наоборот приводит к ее снижению на 8 – 22% по сравнению с контролем, в зависимости от вводимой концентрации. Накопление германия в биомассе спирулины в присутствии FM-2 зависит от того, какая концентрация соединения вводится в среду. Максимум накопления германия (22,29 мг%) наблюдается при добавлении химического соединения FM-2 в концентрации

20 мг/л. При концентрации 30 мг/л наблюдается резкое снижение накопления германия, по сравнению с предыдущей концентрацией (20 мг/л) и составляет 8,65 мг%, что, по-видимому, можно объяснить возрастанием его токсичности с увеличением концентрации.

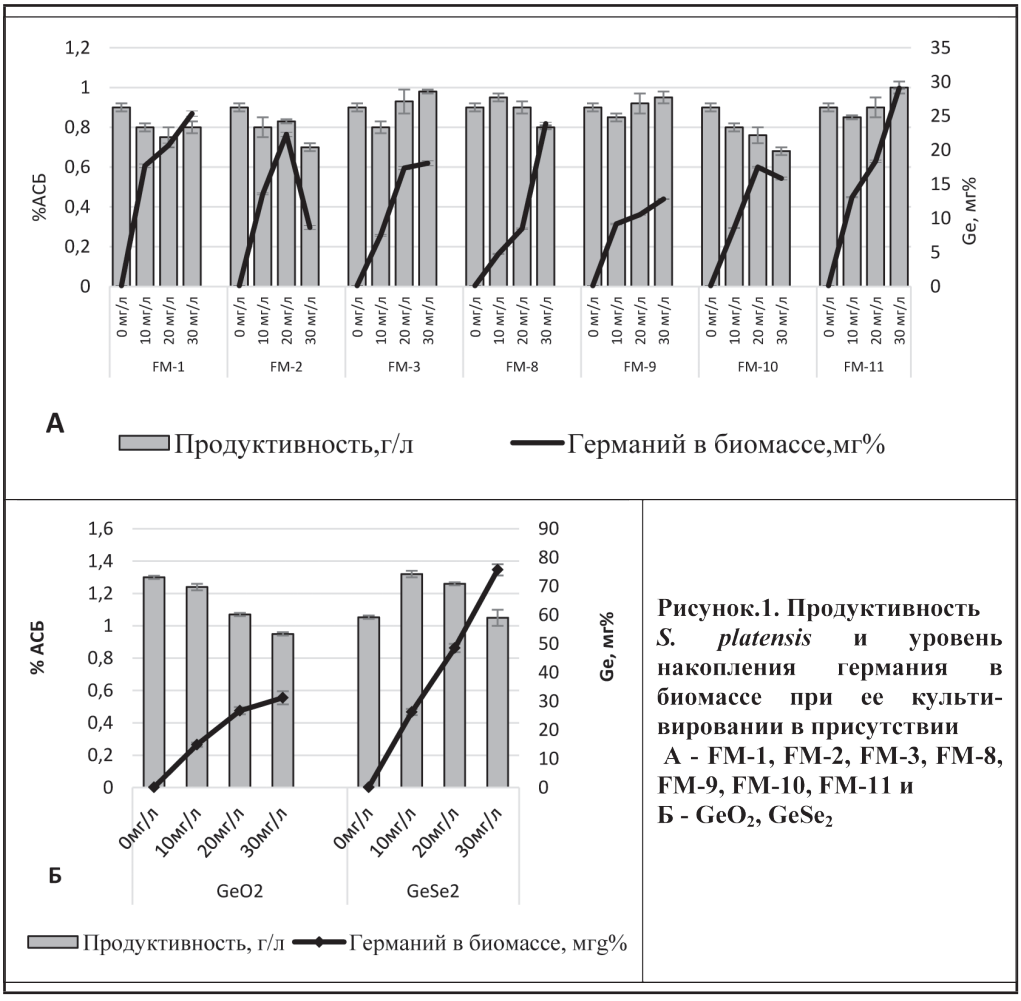


Рисунок.1. Продуктивность *S. platensis* и уровень накопления германия в биомассе при ее культивировании в присутствии А - FM-1, FM-2, FM-3, FM-8, FM-9, FM-10, FM-11 и Б - GeO_2, $GeSe_2$

Другое химическое соединение FM-3 в целом положительно влияет на продуктивность спирулины. При более высоких концентрациях (20 и 30 мг/л) соединения FM-3 наблюдается незначительное увеличение прироста биомассы. Что касается накопления германия в биомассе, то с увеличением концентрации соединения в среде, увеличивается и уровень его аккумуляции клетками спирулины. Наибольшее содержание германия в 18,07 мг%, наблюдается при концентрации FM-3 в 30мг/л.

Добавление соединений FM-8 и FM-9 не способствует изменению прироста биомассы по сравнению с контролем. Отмечается тенденция к снижению уровня продуктивности по сравнению с уровнем контроля при увеличении концентрации соединения FM-8. Накопление германия в присутствии этих химических соединений возрастает с повышением его концентрации в среде. При

добавлении 30 мг/л соединения FM-8 было отмечено наибольшее накопление германия в биомассе спирулины - 23,85 мг%. В случае 30 мг/л соединения FM-9, уровень накопления германия в биомассе спирулины был значительно меньше (12,81мг%).

Органическое соединение германия FM-10 показало его токсическое действие на рост и продуктивность спирулины. При его добавлении к среде было отмечено, что с увеличением концентрации соединения, уровень продуктивности спирулины значительно снижается. При концентрации 10 мг/л наблюдалось снижение прироста биомассы на 11,1%, а при 30 мг/л - на 24,5% по сравнению с контролем. Что касается накопления германия, то следует отметить, что пик накопления германия в биомассе - 17,49 мг%, был отмечен при его концентрации в среде 20 мг/л.

В случае FM-11 продуктивность культуры остается на уровне контроля с незначительным увеличением при его концентрации 30 мг/л. Степень аккумуляции германия цианобактерией *S. platensis* напрямую зависит от концентрации химического соединения FM-11 в среде: чем она выше, тем выше накопление германия в биомассе спирулины. Наибольшее накопление германия 29,07мг% было отмечено при добавлении FM-11 в концентрации 30 мг/л.

Результаты по изучению влияния неорганических соединений германия (GeO_2 и $GeSe_2$) на рост и продуктивность цианобактерии *Spirulina platensis* представлены на Рисунке 1Б. Исходя из полученных данных, видно, что диоксид германия оказывает ингибирующее действие на рост цианобактерии. Чем выше уровень концентрации соединения в среде, тем ниже продуктивность спирулины. В своих исследованиях, Cao Ji-Xiang [8] использовал более высокие концентрации соединения GeO_2, при культивировании цианобактерии *Spirulina platensis* (5-100 мг/л). Он отмечает, что, если концентрация германия превышает 100 мг/л, культура начинает терять спиральную форму, нити становятся фрагментарными, а сама культура приобретает желтоватый цвет. Оптимальной концентрацией он считает 35 мг/л. Такое различие в данных, по-видимому, объясняется особенностями штаммов цианобактерии, а также условиями культивирования.

В нашем исследовании, при накоплении германия наблюдается следующая тенденция: с увеличением концентрации соединения в среде, увеличивается и уровень его накопления в биомассе. Так максимальное накопление германия в 31,21 мг% отмечено при добавлении GeO_2 в максимальной концентрации (30 мг/л). Wang Da-zhi [25] отмечает, что более низкая температура в основном влияет на поглощение германия, а более высокая влияет на биохимическое образование макромолекулярных соединений германия с белком, липидами и углеводами.

Другое неорганическое соединение германия - $GeSe_2$ оказалось менее токсичным нежели GeO_2. Наибольший прирост биомассы был отмечен при более низких концентрациях соединения, а с его увеличением начинал снижаться, и при концентрации 30 мг/л достигал уровня контроля. При добавлении селенида германия в концентрации 10 мг/л, значение продуктивности цианобактерии достигало 1,32 г/л, что на 25,36% выше значения контроля. Стоит отметить, что, хотя и наблюдается та же тенденция: с увеличением концентрации соединения в среде увеличивается его накопление в биомассе спирулины, аккумулирование

германия цианобактерией в присутствии селенида германия при этом значительно выше, чем в присутствии GeO_2. Максимальное содержание германия (75,73 мг%) в биомассе спирулины было найдено при добавлении $GeSe_2$ в концентрации 30 мг/л.

Несмотря на то, что считается, что органические соединения германия менее токсичны, чем неорганические, наши исследования показали, что те и другие в равной степени не проявили значительного стимулирующего эффекта на рост спирулины. Стоит отметить соединения $GeSe_2$; FM-11 и FM-3, способствующие увеличению продуктивности на 25,36%; 11,1% и на 8,9% по сравнению с контролем, соответственно.

Так, все исследуемые химические соединения, в той или иной степени, способствуют накоплению германия в биомассе спирулины. Максимальное накопление германия (75,7 мг%) было отмечено при добавлении $GeSe_2$ в концентрации 30мг/л. Также, стоит отметить соединение GeO_2, при концентрации 30 мг/л которого, аккумулировалось 31,2 мг% германия в биомассе. Что касается органических соединений германия, то соединения можно расположить в следующей последовательности по способности спирулины к аккумулированию германия (мг%): FM-2 (8,65) < FM-9 (12,81) < FM-10 (15,84) < FM-3(18,07) < FM-8 (23,85) < FM-1 (25,34) < FM-11 (29,07).

На основании данных по вводимой концентрации соединений, содержащих германий, и содержанию германия в биомассе спирулины были расчитаны коэффициент детерминации и коэффициент корреляции, которые приведены в Таблице1. Корреляционный анализ показал, что практически для всех соединений наблюдается прямая зависимость накопления германия в биомассе спирулины от величины добавляемой концентрации соединения: чем выше концентрация соединения, тем выше уровень аккумулирования германия клетками спирулины. Исключение составляют два соединения: $MesGe(OMe)_2$ - (FM-2) и ArP=C(PhCH=CHCHO)Ge(Tip)t-Bu - (FM-10).

Таблица 1. Корреляция между концентрацией соединения и содержанием германия, аккумулированным клетками цианобактерии *S. platensis.*

№	Соединение	Коэффициент детерминации R^2	Коэффициент корреляции
1	GeO_2	0,9017	0,95
2	$GeSe_2$	0,9659	0,98
3	Mes_2GeCl_2 - (FM-1)	0,9868	0,99
4	$MesGe(OMe)_2$ - (FM-2)	0,1268	0,36
5	ArP=C(Cl)Ge(F)(Tip)t-Bu - (FM-3)	0,8001	0,89
6	ArP=C(Te) Ge(Tip)t-Bu - (FM-8)	0,8969	0,95
7	ArP=C(SeSe)Ge(Tip)t-Bu – (FM-9)	0,9788	0,99
8	ArP=C(PhCH=CHCHO)Ge(Tip)t-Bu-(FM-10)	0,5866	0,77
9	$Mes_2Ge(F)$-PHMes - (FM-11)	0,9651	0,98

Таким образом, все исследуемые химические соединения германия не проявили значительного стимулирующего эффекта, а некоторые даже наоборот –

ингибирующий, в независимости от природы соединения. Накопление германия клетками спирулины в большинстве случаев зависит от вводимой концентрации соединения, а не от природы соединения.

Выводы

Цианобактерия *Spirulina platensis* CNMN-CB-11 проявила относительно высокую толерантность к следующим германий - содержащим соединениям: ArP=C(Cl)Ge(F)(Tip)t-Bu, ArP=C(Te)Ge(Tip)t-Bu, ArP=C(SeSe)Ge(Tip)t-Bu, $Mes_2Ge(F)$-PHMes и $GeSe_2$. По сравнению с данными, полученными на других видах водорослей, наш штамм более устойчив к высоким концентрациям этого элемента. В присутствии соединений $GeSe_2$; MesGe(F)-PHMes и ArP=C(Cl)Ge(F)(Tip)t-Bu происходит увеличение продуктивности *Spirulina platensis* CNMN-CB-11 на 25,36%, 11,1% и на 8,9% соответственно, по сравнению с контролем. При культивировании данного штамма в присутствии Mes_2GeCl_2, $MesGe(OMe)_2$, ArP=C(PhCH=CHCHO)Ge(Tip)t-Bu и GeO_2 продуктивность снижается, но штамм способен накапливать германий в достаточно высоких количествах (до 75,7 мг% в случае $GeSe_2$).

Большинство исследуемых соединений германия могут быть использованы для получения биомассы спирулины, с повышенным содержанием германия.

Список литературы:

1. *Asai K*. Miracle Cure: Organic Germanium. Tokyo, Japan Publications Inc., 1980.
2. *Chmielowski J., Klapclnska B*. Bioaccumulation of germanium by Pseudomonas putida in the presence of two selected substrates. // *Appl. Environ. Microblol*. 1986, 51, 1099-1103.
3. *Derry, L. A., Sparks J. P., Chandra. S*. Ge/Si fractionation by higher plants: Mechanisms and applications to biogeochemical cycles. // *Geochemica et Cosmochimica Acta.* 2007, 71(15):A219.
4. *Dobrzynski D., Boguszewska -Czubara A., Sugimori K*. Hydrogeochemical and biomedical insights into germanium potential of curative waters: a case study of health resorts in the Sudetes Mountains (Poland). // *Environ Geochem Health*. 2018, 40(4):1355–1375.
5. *Furst A*. Biological testing of germanium. // *Toxicoljgy Industrial Health.* 1987, 3(1):166-204.
6. *Gerber G. B., Leonard A*. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of germanium compounds. // *Mutat. Res*. 1997, 387(3): 141–146.
7. *Glockling F*. The Chemistry of Germanium. Academic Press, London & New York 1969, p. 36.
8. *Ji-xiang, C.* Effect of germanium dioxide on growth of *Spirulina platensis*. // *Chin. J. Ocean. Limnol.* 1996*,* 14(4): 378–381.
9. *Kaplan B. J. et al.* German facts about germanium sesquioxide: chemistry and anticancer propertiesю // *J. Altern Complement Med.* 2004, 10(2): 337-344.
10. *Klapcinska B., Chmielowski J.* Binding of germanium to Pseudomonas putida cells. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1986, 51, 1144-1147.
11. *Lakhtin V. G. et al* Synthesis and application of organogermanium compounds. *// Polym. Sci. Ser. D 4.* 2011, 4(3): 221-227.
12. *Lewin J.* Silicon Metabolism in Diatoms. V. Germanium dioxide, a specificinhibitor of diatom growth // *Phycologia.* 1966, 6:1-12.
13. *Lukevics E, Ignatovich L*. Biological activity of organogermanium compounds. // *Rappoport Z (ed) The chemistry of organic germanium, tin and lead compounds.* Wiley, Chichester, 2002, pp 1653–1683.

14. Marczenko, Z.; Balcerzak, M. Separation, preconcentration and spectrophotometry in inorganic analysis. E-book type: Imprint: Elsevier, 2000. 521 p.

15. Markham E., Hagmeier J. W. Observations on the effects of germanium dioxide on the growth of macro-algae and diatoms. // *Phycologia.* 1982, 21(2): 125-130.

16. Rosenberg E. Germanium: Environmental occurrence, importance and speciation. Reviews. // *Environmental Science and Biotechnology*, 2009, 8(1): 29–57

17. Rudic V. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. Chişinău, Ştiinţa, 1993 140 p.

18. Rudic V. Tulpină de algă *Spirulina platensis (Nordst) Geitl* în calitate de sursă de substanţe biologic active. Brevet de invenţie MD 4123. 29-02-2012

19. Rudic, V. et al Metode de investigaţie în ficobiotehnologie. Chişinău: CE USM, 2002, 60p.

20. Schauss, A. G. Nephrotoxicity and neurotoxicity in humans from organogermanium compounds and germanium dioxide. // *Biological Trace Element Research*. 1991, 29(3): 267–280.

21. Sellappa, S., Jeyaraman, V. Antibacterial properties of organic germanium against some human pathogens. // *International Journal of Pharma and Bio Sciences.* 2011, 2(1): 854–859.

22. Tao S., Bolger P. Hazard assesment of germanium suppliments // *Regulat Toxicol Pharmacol*. 1997, 6(3): 211-219.

23. Van Dyke M. I., Lee H., Trevors J. T. Germanium accumulation by bacteria. // Arch. Microbiol. 1989, 152(6): 533–538.

24. Wang Da Zhi et al. Effects of germanium on photosynthetic pigments of four species in microalgae. // *Acta Ecologica Sinica*. 2000, 20(3):482-484.

25. Wang Da-zhi, *et al.* Study on the accumulation and binding of germanium in *Spirulina platensis* cultured in two temperatures regimes. // Oceanologia et Limnowgia Sinica. 1999, 30(6): 646-651.

26. Zelinsky N.D. Biological activity of organogermanium compounds. (A Review). // Pharm. Chem. J. 2013, 46(11): 635-638.

27. Zhu You-fang, Wang Da-Zhi Toxicity and bioaccumulation of germanium in two microalgae *Spirulina platensis* and *Dunaliella salina*. // *Marine Sciences.* 2001, 25(10): 5-7.

28. Лукевиц Э.Я., Гар Т. К., Игнатович Л. М., Миронов В. Ф. Биологическая активность соединений германия. Рига, 1990. 192с.