MICROBIOLOGIA ŞI BIOTEHNOLOGIA

STUDIUL INFLUENȚEI COMPUŞILOR COORDINATIVI AI Cu(II) ASUPRA PRODUCTIVITĂȚII CIANOBACTERIEI *SPIRULINA PLATENSIS*

Ludmila Batîr*, Aurelian Gulea, Victor Țapcov**, Valeriu Rudic***

**Institutul de Microbiologie şi Biotehnologie, AŞM*
***Laboratorul „Chimia Coordinativă”, USM*

Introducere

În ultimii ani în calitate de obiecte biotehnologice sînt valorificate tot mai intens microorganismele fotosintezatoare, cum sunt microalgele şi cianobacteriile [6-8]. Cercetările de explorare biotehnologică a cianobacteriilor şi microalgelor, desfăşurate în Laboratorul de Cercetări Ştiinţifice „Ficobiotehnologie” al Universităţii de Stat din Moldova şi laboratorul Ficobiotehnologie al Institutului de Microbiologie şi Biotehnologie al Academiei de Ştiinţe a Moldovei, de rînd cu abordarea unor probleme legate de optimizarea mediilor, parametrilor şi condiţiilor de cultivare sunt consacrate soluționării unor astfel de aspecte importante, ca precăutarea căilor noi de reglare cantitativă şi calitativă a metabolismului microalgal şi cianobacterian spre sporirea eficacităţii producerii de biomasă şi de intensificare a sintezei principiilor bioactive, componente ale acesteia.

Unul dintre cele mai explorate obiecte biotehnologice în ultimii ani este cianobacteria Spirulina platensis. Numeroase rezultate ale cercetărilor, publicate în literatura de specialitate, au demonstrat faptul că, cultivarea spirulinei în prezența unor compuşi coordinativi permite obținerea unei biomase nu numai cu un conținut prognozat de principii bioactive, dar şi cu un conținut înalt de bioelemente cu efecte sanogene [1,2,7,14,15].

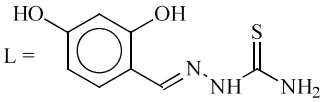
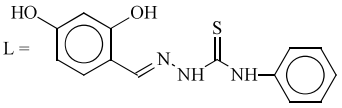
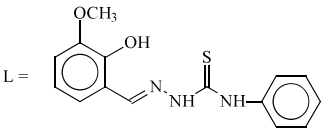
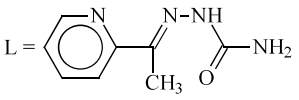
Cu toate că spirulina a servit ca obiect de studiu în numeroase cercetări biotehnologice şi biomedicale, mai rămîn neexplorate şi alte posibilități de modificare a potențialului ei biosintetic, fiind precăutate noi modele de producere a biomasei, evidențierea unor noi stimulatori, studierea condițiilor şi parametrilor optimi de creştere şi dezvoltare etc.

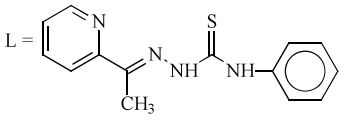
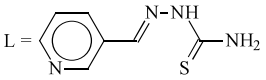
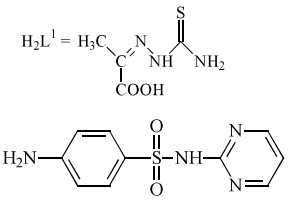
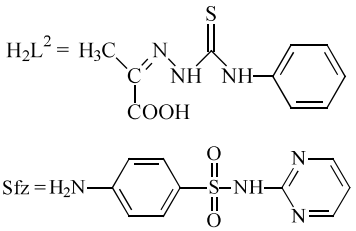
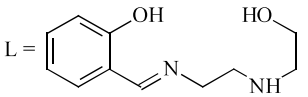
Scopul investigațiilor: Studiul eficacității utilizării unor compuşi coordinativi ai Cu (II) în calitate de reglatori ai creşterii şi dezvoltării cianobacteriei Spirulina platensis.

Materiale şi metode

Obiectul cercetărilor a fost tulpina cianobacteriei *Spirulina platensis CNM-CB-02* – sursă de substanțe bioactive, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie şi Biotehnologie al AŞM. *Spirulina platensis* a fost cultivată pe mediul lichid SP-1 cu o componență echilibrată de macro şi microelemnete [9]. Drept stimulatori ai creşterii şi dezvoltării au fost utilizați compuşii coordinativi ai Cu(II) care diferă după natura ligandului (tab.1) suplimentați la mediul de cultivare în concentrații de 2,00, 4,00 şi 6,00 mg/l. Compuşii coordinativi ai Cu (II) au fost sintetizați de către cercetătorii din laboratorul „Chimia Coordinativă" al USM şi oferiți cu amabilitate de profesorul univ. A. Gulea.

Tabelul 1. Compuşii coordinativi ai Cu(II) utilizați la cultivarea spirulinei

Compusul	Ligand
[Cu (L^1-H)H$_2$O(NO$_3$)]	
[Cu (L^2-H)H$_2$O(NO$_3$)]	
[Cu (L^3-H)H$_2$O(NO$_3$)]	
CuL(NO$_3$)$_2$	

$Cu(L\text{-}H)NO_3$	
$CuL^3{}_2(NO_3)_2$	
Cu L^1(Sfz) · H_2O	
Cu L^2(Sfz) · $3H_2O$	
Cu(L-2H)	

Cultivarea spirulinei s-a efectuat în baloane Erlenmeyer a cîte 250 ml cu 100 ml suspensie de spirulină la o temperatură de 30^0C şi iluminarea de 2000 – 3000 lucşi în primele 2 zile şi de 3000 – 4000 lucşi în următoarele zile ale cultivării.

Productivitatea spirulinei în a 6–a zi de cultivare s-a determinat fotocolorimetric [11] cu recalculul masei celulare la biomasa absolut uscată (BAU) [8,10,11].

Rezultate şi discuţii

Rezultatele cercetărilor descrise în literatura de specialitate privind influenţa unor compuşi ai cuprului asupra creşterii şi dezvoltării cianobacteriilor şi microalgelor au scos în evidenţă faptul că stresul, provocat de prezenţa în mediul de cultivare a unor concentraţii înalte de cupru, induce la cianobacterii şi microalge dezvoltarea diferitor mecanisme de protecţie celulară, unele specii manifestînd toleranţă înaltă faţă de acest metal [3,4,12,13].

Astfel la expunerea culturii de *Scenedesmus sp*. timp de 48 ore la concentraţii de 2,5-10 microM de cupru s-a constat o diminuare a creşterii şi dezvoltării culturii, valorile productivităţii fiind în mod direct dependente de concentraţia utilizată. Odată cu diminuarea creşterii şi dezvoltării s-a semnalat o micşorare a activităţii fotosintetice şi a respiraţiei. De asemenea s-a observat o scădere a conţinutului de proteine, carbohidraţi

şi pigmenţi fotosintetici ca urmare a proprietăţilor toxice manifestate de către cupru [12].

Alte cercetări întreprinse au fost axate pe studierea toxicităţii cuprului la diatomea *Thalassiosira weissflogii* în biomasa căreea s-a obţinut un conţinut mai înalt de tiol şi cisteină cu implicare posibilă a lor în mecanismele de detoxicare. La expunerea timp de 96 ore a microalgei *Tetraselmis chuii* unor concentraţii de 0,10-20,00mg/l de cupru s-a observat o diminuare a creşterii şi dezvoltării culturii, mai intens exprimată în primele 24 ore de cultivare [13].

Prezenţa în mediul de cultivare a microalgei *Chlamydomonas reinhardtii* a unor concentraţii excesive de cupru a accelerat sinteza intracelulară a alfa tocoferolului implicat în protecţia membranelor celulare, fiind totodată semnalată o creştere a conţinutului de superoxiddismutază şi proteinkinază ciclin-dependentă [4]. Creşterea peroxidării lipidice, a conţinutului de carotenoizi şi activităţii superoxiddismutazei a fost semnalată în cazul cultivării microalgei *Chlorella vulgaris* în prezenţa unei concentraţii de 3,00 microg ml(-1) de cupru, fiind accelerată sinteza catalazei, ascorbat peroxidazei şi a glutation reductazei înregistrîndu-se un conţinut mai sporit cu 35% de prolină [3,13].

Administrarea unor concentraţii de 1mg/l de sulfat sau clorură de cupru în mediul de cultivare al algei *Scenedesmus obliquus* a dus la diminuarea semnificativă a productivităţii, precum şi a conţinutului de proteine, semnalîndu-se distrugeri ale legăturilor peptidice a proteinelor histonice [12].

Alte cercetări întreprinse au demonstrat că algele verzi *Pseudokirchneriella subcapitata* şi *Chlorella* vulgaris cultivate în prezenţa unor concentraţii înalte de Cu (II) au dus la apariţia unui stres oxidativ, fiind urmat de diminuarea productivităţii şi micşorarea cu 12 % a activităţii fotosintetice [13].

Pentru alga cianofită *Enteromorpha compressa* a fost identificată o creştere a activităţii ascorbat peroxidazei asociată şi cu o sporire a conţinutului de glutation odată cu creşterea concentraţiei de cupru în mediul de cultivare [5].

La cianobacteria *Spirulina platensis,* la concentraţiile de 0,05-0,2mg/l de Cu(II) s-a modificat conţinutul intracelular de prolină, malonildialdehid şi superoxiddismutază ca urmare a stresului oxidativ provocat de prezenţa în mediul de cultivare a unor concentraţii sporite de cupru, fiind astfel activate mecanismele de protecţie celulară.

Rezultatele cercetărilor privind influenţa compuşilor coordinativi ai Cu (II) asupra productivităţii tulpinii *Spirulina platensis CNM-CB-02* sunt prezentate în tab. 2 şi figura 1.

Analiza rezultatelor obţinute a demonstrat că odată cu creşterea concentraţiei de compuşi coordinativi în mediul de cultivare productivitatea spirulinei scade. Astfel că cele mai mari valori ale productivităţii s-au obţinut în cazul administrării concentraţiei minime de compus (2,00 mg/l). Compuşii $[Cu(L^2\text{-}H)H_2O(NO_3)]$, $[Cu(L^3\text{-}H)H_2O(NO_3)]$, şi $Cu(L\text{-}H)NO_3$ au manifestat o acţiune toxică mai pronunţată, astfel încît valorile productivităţii sunt cu pînă la 44% mai mici faţă de proba martor, iar la concentraţii ce întrec 2,00 mg/l au înregistrat proprietăţi toxice pronunţate, cultura menţinîndu-se viabilă doar primele 48 ore de cultivare.

Tabelul 2. Productivitatea spirulinei la cultivare în prezența unor compuşi coordinativi ai Cu (II)

Compusul coordinativ	Concentrația mg/l	Productivitatea g/l, X±tSx	% M
[Cu (L^1-H) $H_2O(NO_3)$]	2 4 6	1,00 ± 0,02 0,90 ± 0,02 0,80 ± 0,04	117,64 105,88 94,11
[Cu (L^2-H) $H_2O(NO_3)$]	2 4 6	0,84 ± 0,04 - -	98,82 - -
[Cu (L^3-H) $H_2O(NO_3)$]	2 4 6	0,48 ± 0,02 - -	56,47 - -
$CuL(NO_3)_2$	2 4 6	1,00 ± 0,02 0,80 ± 0,03 0,66 ± 0,04	117,64 94,11 77,64
$Cu(L\text{-}H)NO_3$	2 4 6	0,80 ± 0,02 - -	94,11 - -
$CuL^3{}_2(NO_3)_2$	2 4 6	1,04 ± 0,03 0,88 ± 0,04 0,88 ± 0,02	122,35 103,52 103,52
Cu L^1(Sfz) · H_2O	2 4 6	0,80 ± 0,02 0,64 ± 0,02 0,64 ± 0,03	94,11 75,29 75,29
Cu L^2(Sfz) · $3H_2O$	2 4 6	0,90 ± 0,03 0,80 ± 0,02 0,66 ± 0,03	105,88 94,11 77,64
Cu(L-2H)	2 4 6	0,80 ± 0,04 0,66 ± 0,03 0,64 ± 0,02	94,11 77,64 75,29
Martor		0,85 ± 0,02	100

Toxicitatea compuşilor cercetați poate fi determinată atît de atomul central de cupru, cît şi de natura liganzilor în componența cărora intră radicalul fenil care de rînd cu cuprul poate manifesta proprietăți toxice. În structura ligandului compusului [Cu(L^3-H) $H_2O(NO_3)$], este prezent şi radicalul metoxi -OCH_3 care de asemenea poate manifesta o toxicitate înaltă, întrucît la administrarea compusului în concentrații mai mari de 2,00 mg/l este toxic. În cazul administrării acestui compus productivitatea se menține la nivelul valorii experimental- inițiale (0,48 g/l), chiar şi după 6 zile de cultivare.

Pentru compusii $CuL^1(Sfz)*H_2O$, $CuL^2(Sfz)*3H_2O$ şi Cu(L-2H) productivitatea se menține la nivelul probei martor doar la administrarea concentrației de 2,00 mg/l, fiind în descreştere odată cu creşterea concentrației compusului, astfel, încît la administrarea lor în concentrația de 6,00 mg/l productivitatea coboară cu 24,71-22,36% față de proba martor.

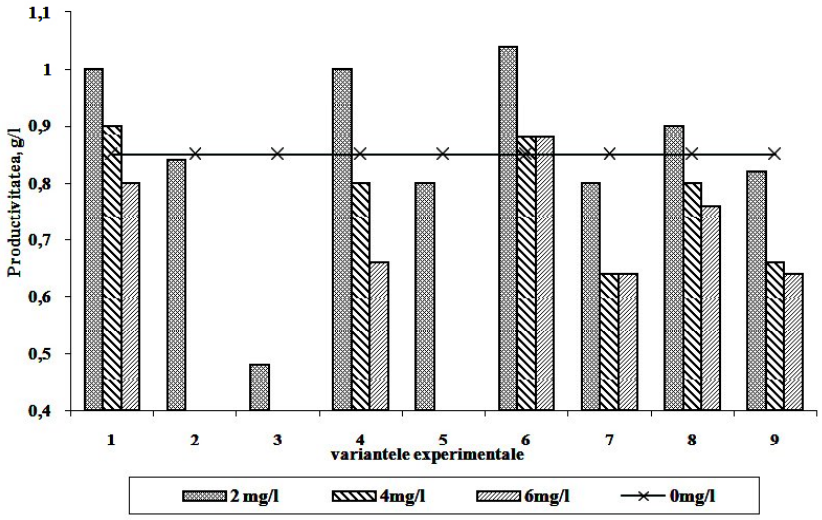


Figura 1. Productivitatea spirulinei la cultivare în prezența compușilor coordinativi ai Cu(II)

1 - [Cu (L1-H)H2O(NO3)] **4 - CuL(NO3)2** **7 - Cu L1(Sfz)*H2O**
2 - [Cu (L2-H)H2O(NO3)] **5 - Cu(L-H)NO3** **8 - Cu L2(Sfz)*H2O**
3 - [Cu (L3-H)H2O(NO3)] **6 - CuL32(NO3)2** **9 - Cu(L-2H)**

Compușii $[Cu(L^1\text{-}H)H_2O(NO_3)]$, $CuL(NO_3)_2$, și $CuL^3{}_2(NO_3)_2$, fiind administrați în concentrații de 2,00 mg/l, sporesc cu 17,64-22,35% productivtatea spirulinei atingînd în a 6-a zi de cultivare valori de 1,00-1,04g/l. Odată cu creșterea concentrației de compus coordinativ are loc descreșterea valorilor productivității, dar care totuși nu sunt cu mult mai diminuate decît valorile probei martor, cu excepția $CuL(NO_3)_2$ care în concentrații de 6,00 mg/l diminuează productivitatea cu 22,36%.

Astfel, în urma cercetărilor efectuate pot fi formulate următoarele concluzii:

Compușii coordinativi:$[CuL^3{}_2(NO_3)_2$ și $Cu(L^1\text{-}H)H_2O(NO_3)]$ în concentrații de pînă la 4,00 – 6,00 mg/l stimulează creșterea și dezvoltarea spirulinei, productivitatea fiind cu 17,64-22,35% mai mare ca în proba martor, atingînd în a 6-a zi de cultivare valori de 1,00-1,04g/l.

Odată cu creștere a concentrației compușilor coordinativi $CuL(NO_3)_2$, $CuL^1(Sfz)\cdot H_2O$, $CuL^2(Sfz)\cdot 3H_2O$ și Cu(L-2H) are loc descreșterea productivității cu peste 24,71% față de proba martor.

Compușii coordinativi $[Cu(L^2\text{-}H)H_2O(NO_3)]$, $[Cu(L^3\text{-}H)H_2O(NO_3)]$, și Cu(L-H) NO_3 manifesta o acțiune toxică mai pronunțată, astfel încît valorile productivității sunt cu pînă 44% mai mici față de proba martor chiar și la administrarea compusului în concentații minime (2,00 mg/l).

Bibliografie:

1. *Chiriac T.* Biotehnologia cultivării spirulinei și obținerii produselor cu conținut prognozat de zinc și principii bioactive valoroase. Autoreferatul tezei de doctor în biologie, 2003, 23 p.

2. *Ciumac D.* Studiul modificării componenței biochimice a cianobacteriei *Spirulina platensis* la cultivarea în prezența compușilor coordinativi ai Cr(III). Autoreferatul tezei de doctor în biologie, 2008, 26 p.

3. Jiunn-Tzong Wu, Ming-T. Hsieh, Lai-Chu Kow. Role of proline accumulation in response to toxic copper in C*hlorella* sp. (Chlorophyceae) cells.//Journal of Phycology. 1998. V. 34 p. 113-117.

4. Masatoshi Usui, Satoshi Tanaka, Hitoshi Miyasaka, Yoshimi Suzuki and Yuzo Shioi. Characterization of cysteine protease induced by oxidative stress in cells of Chlamydomonas sp. strain W80.// Physiologia Plantarum. 2007 V.131, N.4, p.519–526.

5. N. Ratkevicius,J. A. Correa A. Moenne. Copper accumulation, synthesis of ascorbate and activation of ascorbate peroxidase in *Enteromorpha compressa* from heavy metal-enriched environments in northern Chile.//Limnol. Oceanogr., 2003, *V.*48, Nr.1, p. 179–188.

6. Rudi L. Sinteza orientată a acizilor graşi de către cianobacteria *Spirulina platensis (Nordst.) Geitl. CNM-CB-01* şi microalga *Porphyridium cruentum (Nag) CNM-AR-01* şi procedee de obţinere a preparatelor lipidice. Autoreferatul tezei de doctor în biologie, 2006, 24 p.

7. Rudic V, Bulimaga V., Chiriac T., Ghelbet V., Turtă V., Şova V., Mereacre V., Prodius D., Ciumac D. Productivitatea şi activitatea biosintetică a tulpinii cianobacteria *Spirulina platensis* CNM-CB-03 la cultivarea în prezenţa unor compuşi coordinativi noi ai Fe (II) // Analele Ştiinţifice ale USM. Seria „Ştiinţe chimico-biologice". – Chişinău: CEP USM, 2005, p. 183-186.

8. Rudic V. Aspecte noi ale biotehnologiei. – Chişinău, 1993, 140 p.

9. Rudic V., Dencicov L. Optimizarea mediului nutritiv pentru cultivarea spirulinei. //Analele ştiinţifice ale Universităţii „Al.I. Cuza" din Iaşi, Seria Biologie, 1991, v. 37, p. 91-94.

10. Rudic V., Gudumac V., Bulimaga V., Dencicov L., Ghelbet V., Chiriac T. Metode de investigaţii în ficobiotehnologie. CE USM, 2002, 61p.

11. Rudic V., Gudumac V., Gulea A. Metoda de determinare a biomasei absolut uscate de spirulină. Brevet de invenţie, nr. 1078/92.08.788(RO).//Buletin de Invenţii şi Mărci. – 1997.- Nr.6.

12. Sowik J., Pawlaczyk-Szpilowa M. Interaction between Scenedesmus obliquus and the Heavy Metals Copper and Lead.//Acta hydrochimica et hydrobiologica,Vol.7, Nr.5 , p.503–509.

13. Stefanie Knauert, Katja Knauer. The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae, 2008. Vol.44, Nr. 2, p.311-319.

14. Zosim L. Biotehnologia cultivării spirulinei şi obţinerii produselor cu conţinut prognozat de fier şi alte substanţe bioactive valoroase. Autoreferatul tezei de doctor în biologie, 2007, 22 p.

15. Максакова С., Бульмага В., Санду М. Перспективы использования соединений селена для получения биомассы *Spirulina platensis,* обогащенной селеном и со сбалансированным биохимическим составом.// Analele ştiinţifice USM, Seria „Ştiinţe chimico-biologice", Chişinău, 2006, p. 163-165.

REGLAREA PROCESULUI DE BIOSINTEZĂ A STEROLILOR LA DROJDII PRIN ACŢIUNEA UNDELOR MILIMETRICE DE INTENSITATE JOASĂ

Agafia Usatîi, Elena Molodoi, Anatol Rotaru,
Taisia Moldoveanu, Tamara Borisova

Institutul de Microbiologie şi Biotehnologie al A.Ş.M

Introducere

Acţiunea undelor milimetrice de intensitate joasă asupra diferitor obiecte biologice se cercetează intens în ultimii 20-25 ani. Sinteza rezultatelor experimentale publicate, permite de a elucida unele aspecte fundamentale ale activităţii vitale şi a mecanismelor de interacţiune a undelor milimetrice de intensitate joasă cu celulele vegetale sau animale [6,8].

În baza studiilor efectuate au şi elucidate mecanismele de acţiune a undelor milimetrice de intensitate joasă asupra organismelor fotosintetizante şi formulate câteva principii de bază [7,14]. Totodată, elaborarea unei teorii faţă de problema modelării şi