

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

Valeriu RUDIC, Ludmila BATÎR, Aurelian GULEA*, Victor ȚAPCOV*

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

** Laboratorul de Cercetări Științifice „Chimia Coordinativă”*

The productivity of cyanobacteria *Spirulina platensis* at the cultivation in presence of coordinative compound of Cu(II) has been determined. The spirulina productivity depends on coordination compounds nature and concentrations. Coordinative compounds: $[\text{Cu}(\text{L}^1\text{-H})\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$, $\text{CuL}_2^3(\text{NO}_3)_2$ and $\text{CuL}(\text{NO}_3)_2$ had the most favorable effect for biomass accumulation

Introducere

În ultimii ani în calitate de obiecte biotehnologice tot mai intens sunt valorificate microorganismele fotosintetizante, precum sunt și cianobacteriile [6-8]. Cercetările de explorare biotehnologică a cianobacteriilor și microalgelor, desfășurate în Laboratorul de Cercetări Științifice „Ficobiotehnologie” (Universitatea de Stat din Moldova și Academia de Științe a Moldovei), de rând cu abordarea unor probleme legate de optimizarea mediilor, parametrilor și condițiilor de cultivare, sunt consacrate soluționării unor astfel de aspecte importante ca cercetarea noilor căi de reglare cantitativă și calitativă a metabolismului microalgal și cianobacterial întru sporirea eficacității producerii de biomasă și de intensificare a sintezei principiilor bioactive, componente ale acestora.

În ultimii ani, unul dintre cele mai explorate obiecte biotehnologice servește cianobacteria *Spirulina platensis*. Numeroase rezultate ale cercetărilor, publicate în literatura de specialitate, au demonstrat că cultivarea spirulinei în prezența unor compuși coordinativi permite obținerea unei biomase nu doar cu un conținut prognozat de principii bioactive, dar și 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 și biomedicale, mai rămân neexplorate și alte posibilități de modificare a potențialului ei biosintetic, fiind cercetate noi modele de producere a biomasei, evidențierea unor noi stimulatori, studierea condițiilor și parametrilor optimi de creștere și dezvoltare etc.

Scopul investigațiilor date a fost orientat spre cercetarea eficacității utilizării unor compuși coordinativi ai Cu(II) în calitate de reglatori ai creșterii și dezvoltării cianobacteriei *Spirulina platensis*.

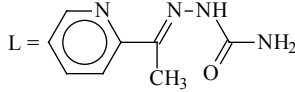
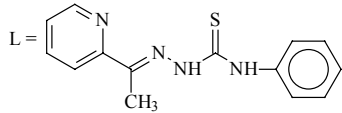
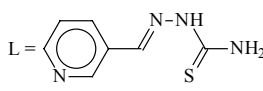
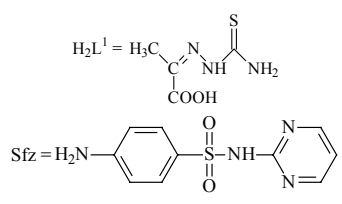
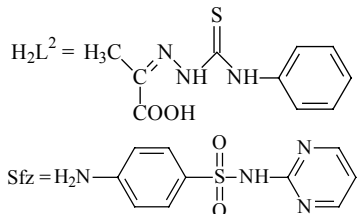
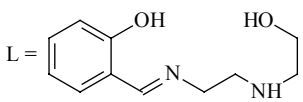
Material și metode

Obiectul cercetărilor a fost tulpina cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02 – sursă de substanțe bioactive, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene de pe lângă Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM. Cultura de *Spirulina platensis* a fost cultivată pe mediul lichid SP-1 cu o componentă echilibrată de macro- și microelemente [9]. Drept stimulatori ai creșterii și dezvoltării au fost utilizați compușii coordinativi ai Cu(II) care diferă după natura ligandului (Tab.1) supliniți la mediul de cultivare în concentrații de 2,00, 4,00 și 6,00 mg/l.

Tabelul 1

Compușii coordinativi ai Cu(II)

Compusul	Ligand
$[\text{Cu}(\text{L}^1\text{-H})\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$	
$[\text{Cu}(\text{L}^2\text{-H})\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$	
$[\text{Cu}(\text{L}^3\text{-H})\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$	

Compusul	Ligand
$\text{CuL}(\text{NO}_3)_2$	
$\text{Cu}(\text{L-H})\text{NO}_3$	
$\text{CuL}_2(\text{NO}_3)_2$	
$\text{Cu L}^1(\text{Sfz}) \cdot \text{H}_2\text{O}$	
$\text{Cu L}^2(\text{Sfz}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	
$\text{Cu}(\text{L-2H})$	

Cultivarea spirulinei a avut loc în baloane Erlenmeyer a câte 250 ml cu 100 ml suspensie de spirulină la o temperatură de 30°C și iluminarea de 2000 – 3000 luși în primele 2 zile și de 3000 – 4000 luși în următoarele zile ale cultivării.

Compușii coordinativi ai Cu(II) au fost sintetizați de către cercetătorii din Laboratorul „Chimia Coordinativă” al USM și oferiți cu amabilitate de prof. univ. A.Gulea.

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

Rezultate și discuții

Rezultatele cercetărilor descrise în literatura de specialitate privind influența unor compuși ai cuprului asupra creșterii și dezvoltării cianobacteriilor și microalgelor au scos în evidență faptul că drept răspuns la stresul provocat de prezența în mediul de cultivare a unor concentrații înalte de cupru, cianobacteriile și microalgele dezvoltă diferite mecanisme de protecție celulară, unele specii manifestând toleranță înaltă față de cupru [3,4,12,13].

Astfel, la expunerea culturii de *Scenedesmus sp.* timp de 48 ore la concentrații de la 2,5-10 microM de cupru s-a constatat o diminuare a creșterii și dezvoltării culturii, valorile productivității fiind direct proporționale cu concentrația utilizată. Odată cu diminuarea creșterii și dezvoltării s-a semnalat o micșorare a activității fotosintetice și a respirației. De asemenea, s-a observat o scădere a conținutului de proteine, carbohidrați și pigmenți fotosintetici, fapt datorat proprietăților toxice manifestate de cupru [12].

Alte cercetări întreprinse au fost axate pe studierea toxicității cuprului la diatomea *Thalassiosira weissflogii*, în a cărei biomasă s-a obținut un conținut mai înalt de tiol și cisteină cu implicare posibilă a lor în mecanismele de detoxi-

ficare. Iar la expunerea timp de 96 ore a microalgei *Tetraselmis Chuii* unor concentrații de 0,10-20,00 mg/l de cupru s-a observat o diminuare a creșterii și dezvoltării culturii, mai intens exprimată în primele 24 ore de cultivare [13].

La prezența în mediul de cultivare a microalgei *Chlamydomonas reinhardtii* a unor concentrații excesive de cupru s-a accelerat sinteza intracelulară a alfa - tocoferolului implicat în protecția membranelor celulare, fiind totodată semnalată o creștere a conținutului de superoxidismutază și de ciclin-dependent proteinchinază [4]. Creșterea peroxidării lipidice, a conținutului de carotenoizi și a activității superoxidismutazei a fost semnalată în cazul cultivării microalgei *Chlorella vulgaris* în prezența unei concentrații de 3,00 microg mL(-1) de cupru, fiind accelerată sinteza catalazei, ascorbat peroxidazei și a glutatonei reductazei, înregistrându-se un conținut mai sporit cu 35% de prolină [3,13].

Administrarea unor concentrații de 1mg/l de sulfat sau clorură de cupru în mediul de cultivare a algei *Scenedesmus obliquus* a dus la diminuarea semnificativă a productivității, precum și a conținutului de proteine, semnalându-se distrugerii ale legăturilor peptidice ale proteinelor histonice [12].

Alte cercetări întreprinse au demonstrat că, la cultivarea algelor verzi *Pseudokirchneriella subcapitata* și *Chlorella vulgaris*, prezența în mediul de cultivare a unor concentrații înalte de Cu au dus la apariția unui stres oxidativ, fiind urmat de diminuarea productivității și micșorarea cu 12% a activității fotosintetice [13].

La alga cianofită *E. compressa* a fost identificat că, odată cu creșterea concentrației de cupru, în mediul de cultivare are loc o creștere a activității ascorbat peroxidazei asociată și cu o sporire a conținutului de glutatonei [5].

Investigațiile întreprinse pe cianobacteria *Spirulina platensis* au demonstrat că la expunerea culturii unor concentrații de 0,05-0,2 mg/l de Cu(II) se modifică conținutul intracelular de prolină, malonildialdehid și superoxidismutază ca urmare a stresului oxidativ provocat de prezența în mediul de cultivare a unor concentrații sporite de cupru, fiind astfel activate mecanismele de protecție celulară.

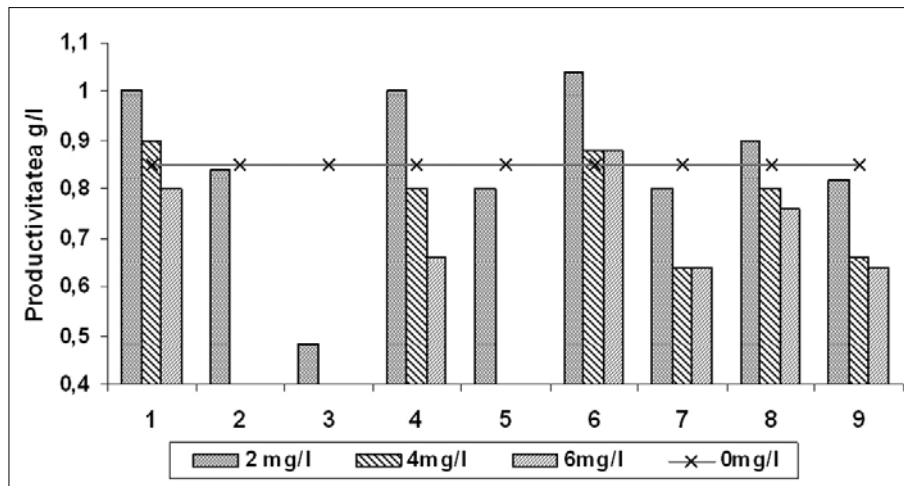
Rezultatele privind influența compușilor coordinativi ai Cu(II) asupra productivității cianobacteriei *Spirulina platensis* întreprinse de noi sunt prezentate în Tabelul 2 și în Figura 1.

Tabelul 2

Productivitatea spirulinei la cultivare în prezența unor compuși coordinativi ai Cu(II)

Compușul coordinativ	Concentrația, mg/l	Productivitatea X ± tSx	% M
[Cu (L ¹ -H)H ₂ O(NO ₃) ₂]	2	1,00±0,02	117,64
	4	0,90±0,02	105,88
	6	0,80±0,04	94,11
[Cu (L ² -H)H ₂ O(NO ₃) ₂]	2	0,84±0,04	98,82
	4	-	-
	6	-	-
[Cu (L ³ -H)H ₂ O(NO ₃) ₂]	2	0,48±0,02	56,47
	4	-	-
	6	-	-
CuL(NO ₃) ₂	2	1,00±0,02	117,64
	4	0,80±0,03	94,11
	6	0,66±0,04	77,64
Cu(L-H)NO ₃	2	0,80±0,02	94,11
	4	-	-
	6	-	-
CuL ³ (NO ₃) ₂	2	1,04±0,03	122,35
	4	0,88±0,04	103,52
	6	0,88±0,02	103,52
Cu L ¹ (Sfz) · H ₂ O	2	0,80±0,02	94,11
	4	0,64±0,02	75,29
	6	0,64±0,03	75,29
Cu L ² (Sfz) · 3H ₂ O	2	0,90±0,03	105,88
	4	0,80±0,02	94,11
	6	0,66±0,03	77,64
Cu(L-2H)	2	0,80±0,04	94,11
	4	0,66±0,03	77,64
	6	0,64±0,02	75,29
Martor		0,85±0,02	100

În urma cercetărilor efectuate s-a constatat că, odată cu creșterea concentrației de compuși coordinați în mediul de cultivare, productivitatea spirulinei scade. Astfel că cele mai mari valori ce întrec cu 5-22% proba martor s-au obținut în cazul administrării concentrației minime de compus (2,00 mg/l). Compușii $[\text{Cu}(\text{L}^2\text{-H})\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$, $[\text{Cu}(\text{L}^3\text{-H})\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$ și $\text{Cu}(\text{L-H})\text{NO}_3$ s-au dovedit a manifesta o acțiune toxică mai pronunțată, astfel încât valorile productivității sunt cu 2-44% mai mici față de proba martor, iar la concentrații ce întrec 2,00 mg/l manifestă proprietăți toxice pronunțate, cultura menținându-se viabilă doar primele 48 ore de cultivare.



- | | | |
|---|--|---|
| 1 – $[\text{Cu}(\text{L}^1\text{-H})\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$ | 4 – $\text{CuL}(\text{NO}_3)_2$ | 7 – $\text{Cu L}^1(\text{Sfz}) \cdot \text{H}_2\text{O}$ |
| 2 – $[\text{Cu}(\text{L}^2\text{-H})\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$ | 5 – $\text{Cu}(\text{L-H})\text{NO}_3$ | 8 – $\text{Cu L}^2(\text{Sfz}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ |
| 3 – $[\text{Cu}(\text{L}^3\text{-H})\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$ | 6 – $\text{CuL}^3_2(\text{NO}_3)_2$ | 9 – $\text{Cu}(\text{L-2H})$ |

Fig.1. Productivitatea spirulinei la cultivare în prezența compușilor coordinați ai Cu(II).

Toxicitatea acestor compuși poate fi determinată atât de atomul central de cupru, cât și de natura liganzilor în a căror componență intră radicalul fenil care, de rând cu cuprul, poate manifesta proprietăți toxice (*a se vedea* Material și metode). Spre deosebire de compusul $[\text{Cu}(\text{L}^2\text{-H})\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$, în structura ligandului compusului $[\text{Cu}(\text{L}^3\text{-H})\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$ este prezent și radicalul metoxi $-\text{OCH}_3$ care, de asemenea, poate manifesta o toxicitate înaltă, întrucât la administrarea concentrațiilor mai mari de 2,00 mg/l este nociv. În cazul administrării acestui compus productivitatea se menține la nivelul valorii experimentale inițiale, chiar și după 6 zile de cultivare, productivitatea fiind de doar 0,48 g/l.

Pentru compusul $\text{Cu L}^1(\text{Sfz}) \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu L}^2(\text{Sfz}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ și $\text{Cu}(\text{L-2H})$ productivitatea se menține la nivelul probei martor doar la administrarea concentrației de 2,00 mg/l, fiind în descreștere odată cu creșterea concentrației, încât la administrarea concentrației de 6,00 mg/l productivitatea coboară cu 24,71-22,36% față de proba martor.

Compușii $[\text{Cu}(\text{L}^1\text{-H})\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$, $\text{CuL}(\text{NO}_3)_2$ și $\text{CuL}^3_2(\text{NO}_3)_2$, fiind administrați în concentrații de 2,00 mg/l, sporesc cu 17,64-22,35% productivitatea spirulinei, atingând în a 6-a zi de cultivare valori de 1,00-1,04 g/l. Odată cu creșterea concentrației de compus coordinați, are loc descreșterea productivității, valorile nefiind totuși cu mult mai diminuate ca în proba martor, cu excepția $\text{CuL}(\text{NO}_3)_2$, care în concentrații de 6,00 mg/l diminuează productivitatea cu 22,36%.

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

1. Compușii coordinați $[\text{Cu}(\text{L}^1\text{-H})\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$ și $\text{CuL}^3_2(\text{NO}_3)_2$, fiind administrați în concentrații de până la 4,00 mg/l, stimulează creșterea și dezvoltarea spirulinei, productivitatea fiind cu 17,64-22,35% mai mare ca în proba martor, atingând în a 6-a zi de cultivare valori de 1,00-1,04 g/l.

2. Odată cu creșterea concentrației compușilor coordinați $[\text{Cu}(\text{L}^1\text{-H})\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$, $\text{CuL}(\text{NO}_3)_2$, $\text{CuL}^3_2(\text{NO}_3)_2$, $\text{CuL}^1(\text{Sfz}) \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu L}^2(\text{Sfz}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ și $\text{Cu}(\text{L-2H})$, are loc descreșterea productivității cu 5,89-24,71% față de proba martor.

3. Compușii coordinați $[\text{Cu}(\text{L}^2\text{-H})\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$, $[\text{Cu}(\text{L}^3\text{-H})\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$ și $\text{Cu}(\text{L-H})\text{NO}_3$ manifesta o acțiune toxică mai pronunțată, astfel încât valorile productivității sunt cu 2-44% mai mici față de proba martor, chiar și la administrarea compusului în concentrații minime (2,00 mg/l).

4. Compusul $[\text{Cu}(\text{L}^3\text{-H})\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$ manifestă proprietăți toxice și mai pronunțate, determinate de prezența în componența ligandului a radicalilor fenil și metoxi.

Referințe:

1. Chiriac T. Biotehnologia cultivării spirulinei și obținerii produselor cu conținut prognozat de zinc și principii bioactive valoroase: Autoreferat al tezei de doctor în biologie, 2003. - 23 p.
2. Ciurac D. Studiul modificării componenței biochimice a cianobacteriei *Spirulina platensis* la cultivarea în prezența compușilor coordinativi ai Cr(III): Autoreferat al 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 *Chlorella* sp. (Chlorophyceae) cells // Journal of Phycology. - 1998. - Vol.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. - Vol.131. - No4. - P.519-526.
5. Ratkevicius N., Correa J.A., Moenne A. Copper accumulation, synthesis of ascorbate and activation of ascorbate peroxidase in *Enteromorpha compressa* from heavy metal-enriched environments in northern Chile // Limnol. Oceanogr. - 2003. - Vol.48. - No1. - P.179-188.
6. Rudi L. Sinteza orientată a acizilor grași de către cianobacteria *Spirulina platensis* (Nordst.)Geitl. CNM-CB-01 și microalga *Porphyridium cruentum* (Nag) CNM-AR-01 și procedee de obținere a preparatelor lipidice: Autoreferat al tezei de doctor în biologie, 2006. - 24 p.
7. Rudic V., Bulimaga V., Chiriac T., Ghelbet V., Turtă V., Șova V., Mereacre V., Prodius D., Ciurac D. Productivitatea și activitatea biosintetică a tulpinii cianobacteria *Spirulina platensis* CNM-CB-03 la cultivarea în prezența unor compuși coordinativi noi ai Fe (II) // Analele Științifice ale USM. Seria „Științe chimico-biologice”. – Chișinău: CEP USM, 2005, p.183-186.
8. Rudic V. Aspecte noi ale biotehnologiei. - Chișinău, 1993. - 140 p.
9. Rudic V., Dencicov L. Optimizarea mediului nutritiv pentru cultivarea spirulinei // Anale Științifice ale Universității „Al.I. Cuza” din Iași. Seria „Biologie”. - 1991. - Vol.37. - P.91-94.
10. Rudic V., Gudumac V., Bulimaga V., Dencicov L., Ghelbet V., Chiriac T. Metode de investigații în ficobiotehnologie. - Chișinău: CE USM, 2002. - 61 p.
11. Rudic V., Gudumac V., Gulea A. Metoda de determinare a biomasei absolut uscate de spirulină. Brevet de invenție, nr.1078/92.08.788(RO) // Buletin de Invenții și Mărci. - 1997.- Nr.6.
12. Słowik J., Pawlaczyk-Szpilowa M. Interaction between *Scenedesmus obliquus* and the Heavy Metals // Copper and Lead Acta hydrochimica et hydrobiologica. -Vol.7. - No5. -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. - No2. - P.311-319.
14. Zosim L. Biotehnologia cultivării spirulinei și obținerii produselor cu conținut prognozat de fier și alte substanțe bioactive valoroase: Autoreferat al tezei de doctor în biologie, 2007. - 22 p.
15. Макасова С., Бульмага В., Санду М. Перспективы использования соединений селена для получения биомассы *Spirulina platensis*, обогащенной селеном и со сбалансированным биохимическим составом // Analele Științifice ale USM. Seria „Științe chimico-biologice”. - Chișinău, 2006, p.163-165.

Prezentat la 16.06.2008