

## MODIFICAREA CONȚINUTULUI DE PROTEINE ȘI PEPTIDE ÎN BIOMASA CIANOBACTERIEI *SPIRULINA PLATENSIS* LA CULTIVARE ÎN PREZENȚA UNOR COMPUȘI COORDINATIVI NOI AI Cu(II)

**Ludmila BATÎR**

*Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM*

The modification of protein and peptide contents in spirulina biomass at the cultivation in the presence of new coordination compounds of Cu(II) has been determined. The protein and peptide contents obtained from the spirulina biomass cultivated in the presence of coordination compounds of Cu(II) is modified significantly from the control and depends on the concentration and the nature of ligand of the compounds. The maximum content of peptides 12,33% ADB (absolutely dry biomass) was obtained by the administration of the coordinative compound 7.

### Introducere

Cianobacteriile reprezintă unele dintre cele mai arhaice grupuri de organisme de pe Pământ, iar pe parcursul evoluției și-au creat sisteme variate de utilizare a surselor energetice, contribuind considerabil la aportul oxigenului în atmosferă, devenind o parte componentă esențială a lanțului trofic, fiind în prezent utilizate pe larg în cercetările legate de elucidarea mecanismelor de fotosinteză, fixare a azotului molecular etc. [1,2].

Dat fiind faptul că au fost puțin studiate, cianobacteriile oferă posibilități vaste pentru cercetare. Acest grup de procariote a devenit un obiect de studiu important al microbiologiei și ficobiotehnologiei, datorită compoziției biochimice valoroase, metabolismului intens, vitezei mari de creștere, productivității sporite, posibilității de dirijare a procesului de cultivare.

Cianobacteriile servesc drept surse netradiționale de materie primă pentru industria alimentară, farmaceutică, zootehnie și fitotehnie, cosmetică și parfumerie, datorită conținutului de proteină, aminoacizi, lipide, acizi grași polinesaturați, vitamine, enzime, carotenoizi, clorofilă, ficobiliproteine, polizaharide, substanțe de natură hormonală, antibiotice și altor substanțe cu acțiune biologică pronunțată.

Una dintre speciile de cianobacterii care se află în atenția multor specialiști este *Spirulina platensis* [2,3,4]. *Spirulina* reprezintă o cianobacterie pluricelulară filamentoasă, având mai multe forme spiralate. Dacă inițial aceasta a fost catalogată de sistematicieni drept o algă albastră, în urmă cu câțiva ani s-a descoperit după vizualizări microelectronice că celula de spirulină nu are nucleu și a fost clasificată drept cianobacterie [2,8,9,10,11].

*Spirulina platensis* preferă bazinele cu apă alcalină din zonele tropicale și subtropicale din Africa și America Latină. S-a constatat că după valoarea componentilor chimici spirulina depășește toate speciile de plante studiate. Biomasa cianobacteriei conține în structura sa peste 100 de substanțe biologic active importante, până la 70% proteine de cea mai înaltă calitate cu aminoacizi esențiali, acizi grași polinesaturați o varietate bogată de vitamine (vitamine din complexul B, vitamina A și  $\beta$ -caroten) și minerale, grație cărui fapt este cu succes utilizată în industria farmaceutică și alimentară [2,3,4,9,12,13,14].

Atât spirulina, cât și produsele obținute din biomasa acestei cianobacterii s-au dovedit a fi deosebit de valoroase pentru menținerea unui regim alimentar echilibrat nu numai în macro-, dar și în micronutrienți, restabilind și normalizând funcțiile fiziologice celulare. Ea are o gamă largă de efecte pozitive asupra organismului, cum ar fi: compensarea deficitului de vitamine și minerale, restabilirea și normalizarea metabolismului ficatului, are efecte antitoxice, contribuie la eliminarea toxinelor, radionuclizilor și deșeurilor. Duce la creșterea rezistenței nespecifice a organismului și stimulează sistemul imunitar, reduce zahărul și colesterolul din sânge și servește ca mijloc de prevenire a arterosclerozei, bolilor coronariene și a diabetului zaharat, previne acumularea excesului de greutate [2,3,4,7,13].

Cercetările efectuate în ultimii ani au demonstrat că reglarea conținutului de substanțe bioactive în biomasa diverselor cianobacterii și microalge poate fi dirijată prin utilizarea unor agenți de natură fizică și chimică. Dintre compușii chimici, compușii coordinativi ai metalelor constituie un capitol aparte în reglarea creșterii și dezvoltării microorganismelor, precum și în stimularea proceselor biosintetice [5,6,15,16,17].

Sinteza principiilor bioactive poate fi prognozată spre obținerea conținutului maxim prin dirijarea unor căi metabolice aparte, modificând componența mediului nutritiv, parametrii cultivării: intensitatea luminii, durata cultivării, temperatura și pH-ul mediului sau utilizând unii compuși coordinativi [3,4,7,18].

Multiplele cercetări efectuate în ultimul deceniu au demonstrat posibilitatea utilizării unor compuși coordinați ai Zn(II), Co(II), Fe(II), Fe(III), Mn(II) la cultivarea unor tulpini de microorganisme (ciuperci, bacterii, drojdii). Ca rezultat, au fost obținute cantități sporite de diverse principii bioactive (acizi grași polinesaturați, enzime hidrolitice și lipolitice, cianocobalamină, porfirine, antibiotice etc.) și elaborate procedee și modele noi de producere a biomasei de microorganisme cu un conținut sporit de principii bioactive [12,20, 21,22,23,24].

Deficiența bioelementelor (Zn, Fe, I, Cr, Se) este una dintre cele mai răspândite cauze ale instalării unor afecțiuni grave, ca: osteoporoza, anemia fierodeficitară, maladii imunodeficitare, diabetul zaharat, cancerul etc. Pentru rezolvarea problemei date este important a se ține cont nu doar de asigurarea rației zilnice cu microelemente, dar și de forma în care acestea survin în organism. S-a constatat că elementele legate cu compuși organici nu manifestă toxicitate și se asimilează mai ușor, spre deosebire de sărurile lor anorganice. Din acest punct de vedere, prezintă interes perspectiva utilizării materialului biologic în calitate de biotransformator și sursă de acumulare a mineralelor necesare homeostaziei organismului uman [2,3,4,7,13,14,25,26,27].

Introducerea prin alimentație a unor produse ce conțin bioelemente metabolizate în complex cu alte substanțe bioactive va permite menținerea unui echilibru între acestea și radicalii liberi cu caracter prooxidant care se formează fiziologic nespecific sau accelerat în multe boli.

Este cunoscut că bioelementele, precum Zn, Cu, Cr, Fe, influențează asupra stabilității membranelor celulare, asupra sintezei acizilor nucleici, precum și asupra stabilizării dublului helix al ADN-ului, ținând sub control formarea legăturilor de hidrogen [3,4,7,31].

Metalele au un rol important în metabolismul celular, activând în calitate de co-factori redox în diferite enzime implicate în multiple căi metabolice. În special, fierul și cuprul participă la căile esențiale metabolice, și anume – la fotosinteză și respirație. Astfel, importanța homeostaziei metalelor în menținerea biodisponibilității intracelulare a ionilor metalelor esențiale este evidentă. Funcționarea normală a fotosintezei se datorează atât multiplelor complexe membranare, cât și proteinelor solubile care conțin în calitate de co-factori ioni de fier sau cupru [32,33,34,35].

Studiul rolului biologic al cuprului prezintă interes atât din punct de vedere structural, cât și funcțional, deoarece acest element intră în componența unor enzime ca citocromoxidaza, uricaza, aldolaza, catalaza, succidehidrogenaza, superoxidismutaza, ceruloplasmina, dopamina B-hidroxi-laza, lisyloxidaza, tirozinaza și monoaminoxidaza, ce influențează procesele de oxidoreducere celulare, intensificând acțiunea lor și condiționând procesele bioenergetice și fenomenele de sinteză la nivel celular [32,34]. El intervine în metabolismul glucidic, stimulează sinteza vitaminelor din complexe B și A atunci când se află în raport optim cu fierul, îmbunătățește fertilitatea și stimulează creșterea, inactivează toxinele, distrugând agenții patogeni și nepatogeni, având rol bactericid și miocid [35,36].

În cantități înalte cuprul, de rând cu zincul și fierul, este toxic, toxicitatea lui fiind influențată de astfel de factori cum ar fi pH-ul, potențialul redox, temperatura, umiditatea și interacțiunea cu alți ioni [2,37].

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 din ele manifestând toleranță înaltă față de cupru [38,39,40,41].

Astfel, la expunerea culturii de *Scenedesmus sp.* timp de 48 ore la concentrații de la 2,5-10 μM 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 diminuare 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 către cupru [40].

Alte cercetări întreprinse au fost axate pe studierea toxicității cuprului la diatomeea *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 detoxificare. 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 [41].

La prezența în mediul de cultivare a microalgei *Chlamydomonas reinhardtii* a unor concentrații excesive de cupru s-a accelerat sinteza intracelulară a α-tocoferolului implicat în protecția membranelor celulare, tot-

odată fiind semnalată o creștere a conținutului de superoxidismutază și ciclin-dependent proteinkinază [39]. 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  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de cupru, fiind accelerată sinteza catalazei, ascorbatperoxidazei și a glutationreductazei, înregistrându-se un conținut mai sporit cu 35% de prolină [38,40,42].

Administrarea unor concentrații de 1 mg/l de sulfat sau clorură de cupru în mediul de cultivare al 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 [40].

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(II) a provocat un stres oxidativ, urmat de diminuarea productivității și de micșorarea cu 12% a activității fotosintetice [41].

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 ascorbatperoxidazei asociată cu o sporire a conținutului de glutatoină [43].

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, malonildialdehidă 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.

Având în vedere rolul dublu al cuprului ca element esențial, dar, totodată, și toxic, microorganismele, inclusiv cianobacteria *Spirulina platensis*, dispun de mecanisme delicate de menținere a cuprului intracelular la un nivel ce nu interferează cu homeostazia normală și nu prezintă un risc de toxicitate [31].

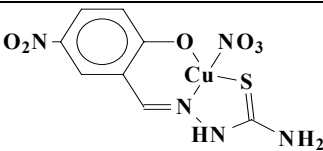
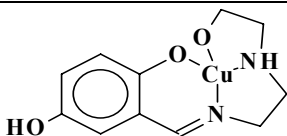
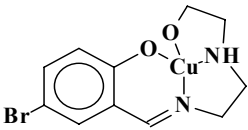
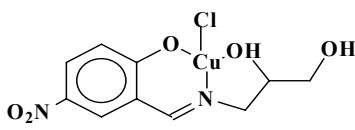
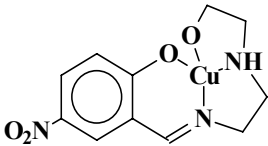
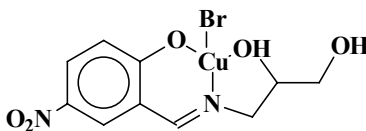
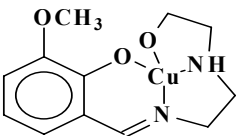
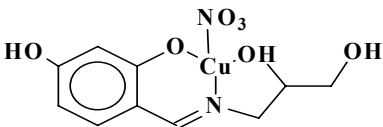
Astfel, **scopul** cercetărilor a fost studierea modificării conținutului de proteine și peptide în biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* la cultivare în prezența unor compuși coordinați noi ai Cu(II).

### 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* CNM-CB-02 a fost cultivată pe mediul lichid SP-1 cu o componență echilibrată de macro- și microelemente [10]. În calitate de stimulatori în vederea modificării dirijate a conținutului de proteine și peptide în biomasa de spirulină au fost utilizați compușii coordinați ai cuprului administrați în concentrații de 2, 4 și 6 mg/l (a se vedea Tabelul).

Tabel

Compușii coordinați ai Cu(II)

Nr.	Compușul coordinați	Nr.	Compușul coordinați
1		5	
2		6	
3		7	
4		8	

Cultivarea spirulinei a avut loc în retorte Erlenmeyer a câte 250 ml cu 100 ml suspensie de spirulină la o temperatură de 30-32°C și iluminarea de 2000-3000 luși pe parcursul a 7 zile de cultivare.

Compușii coordinativi au fost sintetizați de către colaboratorii Laboratorului „Chimia Coordinativă” al USM și oferiiți cu amabilitate de membrul corespondent al AȘM, profesorul universitar Aurelian Gulea.

**Conținutul de proteine** a fost determinat prin metoda Lowry [44].

**Determinarea cantității de oligopeptide (până la 10 kDa)** a fost precedată de extracția lor în acid tricloroacetic (ATA) [44].

### Rezultate și discuții

Conform datelor din literatură, conținutul de proteine din biomasa de spirulină este strict determinat de parametrii fizico-chimici de cultivare, precum și de starea fiziologică a culturii. O cantitate sporită de proteină este înregistrată în faza de creștere a culturii, iar odată cu îmbătrânirea ei calitatea și cantitatea proteinei scade [3,14].

Prezintă interes cercetările consacrate evaluării și stabilirii unor schimbări calitative și cantitative ale proteinelor în biomasa de spirulină, obținută la cultivare în prezența unor concentrații înalte ale cuprului. Acestea sunt importante în vederea furnizării de noi date asupra sintezei unor componente proteice noi, ca reacție de răspuns la stresul provocat de acțiunea cuprului în concentrații majorate.

Mecanismele de reglare a sintezei proteinelor sunt determinate de diverși factori, inclusiv de adaptabilitatea înaltă a cianobacteriilor la modificările componenței chimice a mediilor de cultivare. Un aspect important în fiziologia spirulinei constituie capacitatea acestei cianobacterii de a se adapta la condițiile variabile ale mediului ambiant. Astfel, în cazul unei concentrații sporite de microelemente, spirulina poate încorpora aceste metale intracelular, formând complexe metalorganice și intervenind în modificarea componenței biochimice [3,4,7].

La cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* în prezența unor compuși coordinativi noi ai Cu(II) s-a demonstrat că atât sinteza proteinelor, cât și a peptidelor este inhibată în prezența unor concentrații înalte de cupru (Fig.1).

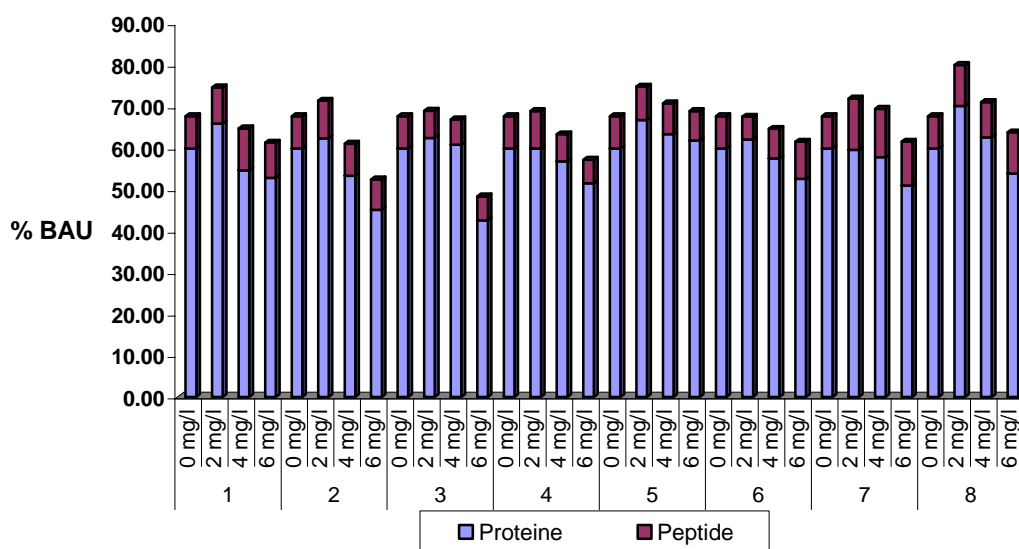


Fig.1. Conținutul de proteine și peptide în biomasa de spirulină la cultivare în prezența unor compuși coordinativi ai Cu(II).

Astfel, la administrarea compușilor coordinativi ai Cu(II) la mediul nutritiv în concentrație de 2, 4 și 6 mg/l conținutul de proteine scade concomitent cu majorarea concentrației compusului.

La administrarea concentrației de 2 mg/l conținutul proteinelor se menține practic la nivelul probei de referință sau îl depășesc neesențial cu 18% la administrarea compusului 8. Odată cu majorarea concentrației de compuși până la 6 mg/l are loc diminuarea conținutului de proteine din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*, conținutul lor fiind cu 28% mai mic decât în proba de referință. Scăderea conținutului de proteine în biomasă are loc, posibil, ca răspuns la stresul provocat de prezența în mediu a unor concentrații sporite de cupru.

Cercetările privind conținutul de peptide de asemenea denotă că conținutul lor în biomasă scade odată cu majorarea concentrației compusului administrat. Un conținut maxim de peptide se obține la administrarea compusului 7 în toate trei concentrații studiate. Astfel, la administrarea concentrației de 2 mg/l conținutul peptidelor în biomasă este cu 59% mai majorat față de proba martor, iar la administrarea a 6 mg/l de compus coordinativ conținutul de peptide este cu 37% mai mare. O inhibare a sintezei oligopeptidelor în biomasa de spirulină se observă în cazul cultivării spirulinei în prezența compusului coordinativ 3 în concentrație de 2-6 mg/l, unde conținutul de peptide atinge valori cantitative cu 16-25% sub nivelul probei de referință. Aceste rezultate ar putea fi influențate nu numai de atomul de Cu(II), dar și de natura ligandului care conține în interiorul său grupa NO<sub>2</sub>.

Astfel, analizând rezultatele obținute, putem concluziona următoarele:

1. Compușii coordinativi noi ai Cu(II) utilizați în studiu manifestă un efect moderat asupra sintezei proteinelor, iar conținutul acumulat depinde de natura compusului și de concentrația administrată.

2. Toți compușii coordinativi testați, administrați în concentrație de 2 mg/l, sporesc neesențial sinteza proteinelor, cele mai înalte valori fiind cu 18% mai mari față de proba de referință, iar odată cu creșterea concentrației conținutul de proteine scade cu 28% sub limita probei martor.

3. Un conținut maxim de peptide în biomasă se obține la cultivarea spirulinei în prezența compusului coordinativ 7, care conține în interiorul ligandului Br și în concentrație de 2 mg/l sporește sinteza oligopeptidelor cu 59%, iar în concentrație de 6 mg/l – cu 37%.

#### Referințe:

1. Pérez L., Abraham C.M., Leyva I. Efecto in vitro de la espirulina sobre la respuesta inmune // Review Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter, 2002, vol.18, no.2.
2. Rudic V. et al. Ficobiotehnologie. - Chișinău, 2007.
3. Chiriac T. Biotehnologia cultivării spirulinei și obținerii produselor cu conținut prognozată de zinc și principii bioactive valoroase: Autoreferat al tezei de doctor în științe biologice. - Chișinău, 2003.
4. Ciumac D. Studiul modificării componenței biochimice a cianobacteriei *Spirulina platensis* la cultivarea în prezența compușilor coordinativi ai Cr(III): Autoreferat al tezei de doctor în științe biologice. - Chișinău, 2008.
5. Burtsev S. Substanțe biologice active ale streptomycetelor (Biosinteza și perspectivele utilizării): Autoreferat al tezei de doctor habilitat în științe biologice. - Chișinău, 2002.
6. Clapco S., Deseatnic A. Studiul influenței unor compuși coordinativi asupra procesului de sinteză a pectinazelor la tulpina *Penicillium viride* // Analele Științifice ale USM, 2005, p.232-237.
7. Zosim L. Biotehnologia cultivării spirulinei și obținerii produselor cu conținut prognozată de fier și alte substanțe bioactive valoroase: Autoreferat al tezei de doctor în științe biologice. - Chișinău, 2007.
8. Hernandes E., Olguin E. Biosordition of heavy metals influenced by the chemical composition of *Spirulina sp. (Arthrospira)* biomass // Environmental Technology, 2002, vol.23, p.1369-1377.
9. Mazo G., Savvin S., Pronina N. Chemical speciation of Zn, Cu and Cr in *Spirulina platensis* microalgae // ICP Information Newsletter, 2002, vol.27, p.138.
10. Rudic V. Aspecte noi ale biotehnologiei. - Chișinău, 1993.
11. Алешко-Ожевский Ю., Зилова И., Мазо В. *Spirulina platensis* – перспективный пищевой источник эссенциальных микроэлементов // Вестник новых медицинских технологий, 2002, том 9, №1, с.3-10.
12. David S., Bivol C., Rudic V., Ciapurina L. Productivitatea și componența biochimică a microalgei verzi *Dunaliella salina* CALU-834 la cultivare în prezența compușilor coordinativi ai Zn (II) // Analele Științifice ale USM, 2005, p.241-243.
13. Рудик В., Чапурина Л., Дьякон И., Кайряк Л. Стимулирующее действие координационных соединений переходных металлов с α-аминокислотами на рост и продуктивность микроводорослей // Известия Академии наук Республики Молдова. Биологические и химические науки, 1993, №3, с.21-24.
14. Шнюкова Е., Мушак П., Тупик Н. Продуктивность и биохимический состав микроводорослей *Spirulina platensis* Turp. (Cyanophyta) // Альгология, 1994, №4(4), с.17-23.
15. Boortseva S., Rudic V., Gulea A., Ciapurina L., Rastimesina I. The influence of metal coordination compounds on the growth and lipid synthesis of the variant *Streptomyces canosus* // The 4<sup>th</sup> International Symposium „Metal elements in environment, medicine and biology. - Timișoara, 2000, p.44.
16. Deseatnic A., Tiurin J. Clapco S., Pasa L., Condruș V., Labliuc S., Stratan M. Procedee de sporire a capacității biosintetice a unor tulpini de fungi miceliali producătoare de hidrolaze // Genetica și ameliorarea plantelor, animalelor și microorganismelor, 2005, p.490-495.
17. Usatâi A. Particularități de cultivare a drojdiilor oleogene și perspectiva utilizării lor în economia națională // Analele Științifice ale USM, 2001, p.115-118.

18. Deseatnic A., Tiurin J., Labliuc S. Effect of coordinative compounds of Zn(II) on biosynthesis capacity of microscopic fungi-hidrolases producers // Materialele Congresului II al Societății de Fiziologie și Biochimie vegetală din Republica Moldova, 2002, p.228-231.
19. Zaretskaia E., Gmshinskii I., Mazo V., Zorin S., Aleshko-Ozhevskii I. Essential trace elements distribution in food micro algae *Spirulina platensis* biomass fractions // Вопросы Питания, 2004, том 73, №1, с.45-53.
20. Rudic V., Bulimaga V., Zosim L., Chiriac T., Turtă C., Lăzărescu A. Nanobiotechnology of iron rich spirulina cultivation as a source of antianemic products // 4-th Intern. conf. on „Microelectronics and Computer Science”, 2005, p.288-291.
21. Dudnicenco T. Directed synthesis of carotenoids by green microalga *Haematococcus pluvialis* // Abstracts of 4th European Workshop Biotechnology of Microalgae, 2000.
22. Dudnicenco T. Particularitățile morfofiziologice, biochimice și biotehnologice ale microalgei verzi *Haematococcus pluvialis* flotox-CNM-AV-05: Autoreferatul tezei de doctor în științe biologice. - Chișinău, 2001.
23. Usatâi A., Topală L., Calcatiniuc A. Effects of Fe(II) metallocomplexes upon yeasts carotenoids biosynthesis // 5-th International Symposium on „Metal Elements in Environment, Medicine and Biology”, 2002, p.111-114.
24. Usatâi A., Topală L., Calcatiniuc A., Chirița E., Borisova T. Productivitatea, lipidogeneza și carotenogeneza drojdiei *Rhodotorula gracilis* CNM-YS-III/20 la cultivarea în prezența compușilor coordinativi ai Mo(IV), Cr(III), Co(III), V(V) // Buletinul AȘM, 2003, nr.1(290), p.99-103.
25. Cases J., Vacchina V., Napolitano A. Selenium from selenium-rich *Spirulina* is less bioavailable than selenium from sodium selenite and selenomethionine in selenium deficient rats // J. Nutr., 2001, vol.131, no.8, p.2343-2350.
26. Cases J., Wysocka I., Caporiccio B. Assesment of selenium bioavailability from high selenium *Spirulina* subfractions in selenium deficient rats // J. Agric. Food Chem., 2002, vol.50, nr.13, p.3867-3873.
27. Уильямс Д. Металлы жизни. - Москва: Мир, 1975.
28. Puyfoulhoux G., Rouanet J., Besancon P. Iron availability from iron-fortified spirulina by an in vitro digestion with Caco-2 cell culture model // J. Agric. Food Chem., 2001, vol. 49, no.3, p.1625-1629.
29. Skalny A. Chemical elements in human physiology and ecology. - Moscow: Mir, 2004.
30. Skalny A., Trukhanov I. Modern methods to diagnose elemental balance and their role in restoration medicine // Modern technologies of resoration medicine. Ed. Trukhanov A.I. - Moscow: Medica, 2004.
31. Deng L., Zhu X., Wang X. Biosorption of copper(II) from aqueous solutions by green alga *Cladophora fascicularis* // Biodegradation, 2007, vol.18, p.393-402.
32. Abdel-Monem M., Anderson M. Copper complexes of alfa-amino acids that contain terminal amino groups, and their use as nutritional supplements. 1990, US Patent № 4948594.
33. Berta De la Cerda, Castielli Ornella. A proteomic approach to iron and copper homeostasis in cyanobacteria // Briefings in Functional Genomics, 2008, vol.9, no.2.
34. David L., Watts D. The Nutritional Relationships of Copper // J. of Orthomolecular Medicine, 1989, vol.4, no.2, p.99-108.
35. Beard J. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal function // J. Nutr., 2001, no.131, p.568-579.
36. Agajanian N., Skalny A. Chemical elements in environment and human ecological portrait. M.: KMK Press, 2001.
37. Harris E.D. Cellular copper transport and metabolism // Annual Review of Nutrition, 2000, vol.20, p.291-310.
38. Jiunn-Tzong W., 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.
39. Masatoshi U., Satoshi T., Hitoshi M., Yoshimi S., Yuzo S. Characterization of cysteine protease induced by oxidative stress in cells of *Chlamydomonas* sp. strain W80 // Physiologia Plantarum, 2007, vol.131, no.4, p.519-526.
40. Sowik J., Pawlaczyk-Szpiłowa M. Interaction between *Scenedesmus obliquus* and the Heavy Metals Copper and Lead // Acta hydrochimica et hydrobiologica, vol.7, no.5, p.503-509.
41. Stefanie K., Knauer K. The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae // Journal of Phycology, 2008, vol.44, no.2, p.311-319.
42. Wilde K. L., Stauber J. L., Markich S. J., Franklin N. M., Brown P. L. The Effect of pH on the Uptake and Toxicity of Copper and Zinc in a Tropical Freshwater Alga (*Chlorella* sp.) // Arch. Environ. Contam. Toxicol., 2006, vol.51, p.174-185.
43. Nratkevicius 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, vol.48, no.1, p.179-188.
44. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall J.P. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent // J. Biol. Chem., 1951, vol.193, no.1, p.265.