

STUDIUL ACUMULĂRII CUPRULUI LA CULTIVAREA CIANOBACTERIEI *SPIRULINA PLATENSIS* ÎN PREZENȚA COMPUȘILOR COORDINATIVI AI Cu(II)

Valeriu RUDIC, Ludmila BATÎR, Valentina BULIMAGA*, Liliana ZOSIM*, Daniela ELENCIUC, Aurelian GULEA**, Victor ȚAPCOV**

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

*Laboratorul „Ficobiotehnologie”

**Laboratorul „Chimia Coordinativă”

The accumulation of copper in biomass of cyanobacteria *Spirulina platensis* CNM - CB - 02 at the cultivation in the presence of coordination compounds of Cu (II) has been determined. Bioaccumulation of copper depends on the nature of ligands of the compounds. It was established that compounds $[CuL^2(Sfz) \cdot 3H_2O]$ and $[Cu(L-2H)]$ contribute to the increasing of copper content in the biomass of spirulina in 2,94 – 3,42 times compared to the reference sample.

Introducere

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 citocromooxidaza, uricaza, aldolaza, catalaza, succinatdehidrogenaza, care influențează procesele de oxidoreducere celulare, intensificând acțiunea lor și condiționând procesele bioenergetice și fenomenele de sinteză la nivel celular [1]. Cuprul are și rol de coenzimă în sistemul enzimatic, intră în componența proteinelor, mărește acțiunea hipoglicemică a insulinei și participă în metabolismul fierului, insuficiența lui provocând anemia [1,9].

Cuprul servește drept catalizator în formarea eritrocitelor și în sinteza hemoglobinei și ca anticoagulant al sângelui și laptelui [2,4]. El intervine în metabolismul glucidic, stimulează sinteza vitaminelor din complexul B și A atunci când se află în raport optim cu Fe, îmbunătățește fertilitatea și stimulează creșterea, inactivează toxinele distrugând agenții patogeni și nepatogeni, având rol bactericid și miocid [3,5,6]. 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 [14,15]. Cercetările efectuate arată că pH-ul afectează bioabsorbția metalelor grele, iar la *Chlorella sp* pentru a inhiba productivitatea odată cu scăderea pH-ului concentrația de cupru administrată a fost majorată. Având în vedere rolul dublu al cuprului ca element esențial, dar totodată și toxic, microorganismele 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 [7,13,14].

Dintre numeroasele specii de cianobacterii ce constituie un potențial biotehnologic prezent sau viitor doar câteva sunt valorificate în proporții industriale, dintre care un rol important revine cianobacteriei *Spirulina platensis*, datorită compoziției sale biochimice și capacității de a include diferite microelemente în biomasa sa. Totodată, cianobacteria *Spirulina platensis* poate fi caracterizată printr-o capacitate înaltă de convertire a ionilor de metale din componența sărurilor anorganice în bioelemente legate organic, care sunt mult mai accesibile și mai puțin toxice și cu o semnificație fiziologică evidentă pentru organismul uman [10,11].

Luând în considerație faptul că cuprul are acțiune bactericidă, miocidă și anticancerigenă, prezintă interes obținerea unor produse cupru-componente în baza biomasei de spirulină cu utilizarea unor compuși coordinați noi ai Cu(II).

Astfel, scopul lucrării rezidă în studierea influenței unor compuși coordinați ai Cu(II) asupra acumulării cuprului în biomasa de *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 Nepatogene 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 [12]. În calitate de stimulatori în vederea modificării dirijate a conținutului de cupru 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). 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 lux pe parcursul a 6 zile de cultivare.

Compușii coordinați au fost sintetizați de către specialiștii din Laboratorul „Chimia Coordinativă” al USM.

Metoda de determinare a Cu în biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02. Determinarea cuprului în biomasă a fost efectuată prin metoda fotocolorimetrică bazată pe formarea compusului

complex al cuprului cu reactivul dietilditiocarbamat de natriu de culoare galbenă. Densitatea optică se măsoară la 453 nm, iar intensitatea culorii este direct proporțională cu concentrația cuprului; cantitatea de cupru se determină după curba de calibrare [16]. Metoda de determinare a cuprului are o sensibilitate înaltă și permite a determina 1mg Cu/l.

Rezultate și discuții

În literatura de specialitate este puțin studiat conținutul de cupru acumulat de către alge și cianobacterii, cultivate în prezența compușilor cuprului. A fost studiată acțiunea sărurilor de cupru și zinc asupra acumulării lor la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. Toleranța spirulinei la aceste metale grele depinde de faza de creștere a culturii; în cazul fazei lag, concentrația letală este de 5 mg/l, iar în cazul fazei liniare, concentrația de 4 mg/l este deja letală [8].

La *Nostoc calcicola* a fost studiată acumularea cuprului și s-a dovedit că procesul este bifazic. La prima fază, ce decurge în primele 10 minute, are loc absorbția cationilor pe peretele celular al celulei urmată de metabolizarea intracelulară, unde acumularea are loc în cel puțin o oră [15]. Rezultatele efectuate asupra algei *Scenedesmus subspicatus* au demonstrat că acidul ethylendiamintetraacetic (EDTA) și acidul fulvic (FA) ar putea reduce toxicitatea cuprului la alge și ar preveni absorbția lui de către peretele celular. Rezultatele au scos în evidență că nivelul de concentrație extracelulară a Cu poate servi un bun indicator de măsurare a efectelor toxice ale cuprului asupra algelor [8].

În urma investigațiilor efectuate privind acumularea cuprului în biomasa de spirulină la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02 a fost testată acțiunea a 6 compuși coordinați ai Cu(II) derivați ai tiosemicarbazonelor. Rezultatele obținute sunt expuse în Figura 1 și în Tabelul 1. Analizând datele din Figură, putem constata că toți compușii au un efect pozitiv asupra acumulării cuprului în biomasă, îndeosebi compușii $[CuL^2(Sfz) \cdot 3H_2O]$ și $[Cu(L-2H)]$. În cazul compusului coordinați $[CuL^2(Sfz) \cdot 3H_2O]$, conținutul de cupru acumulat crește față de proba martor odată cu creșterea concentrației compusului, atingând valoarea maximă (11,07 mg%) în cazul administrării concentrației de 4 mg/l, după care are loc o scădere neesențială a Cu până la 9,77 mg% din biomasă.

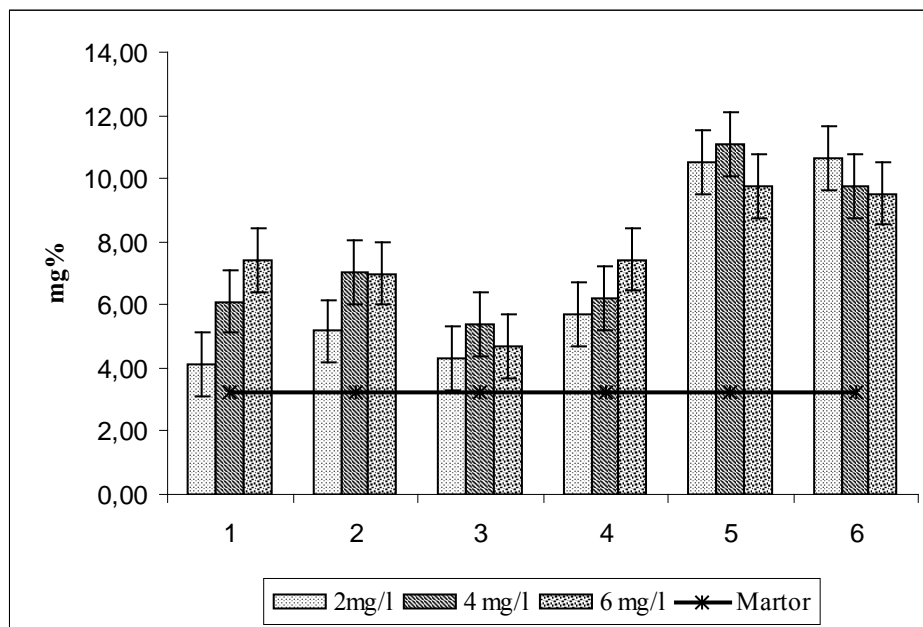
Tabel

Conținutul de cupru acumulat în biomasă la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02 în prezența unor compuși coordinați ai Cu(II)

Nr. crt.	Compusul coordinați	Concentrația, mg/l	Cupru, mg%±Sy·t	% Martor
1	$[Cu(L-H)H_2O(NO_3)]$	2	4,13±0,66	127,85
		4	6,10±0,64	188,68
		6	7,40±0,84	228,89
2	$CuL_1(NO_3)_2$	2	5,17±0,66	159,81
		4	7,03±0,49	217,55
		6	7,00±0,84	216,52
3	$CuL_2(NO_3)_2$	2	4,30±0,84	133,00
		4	5,37±0,97	166,00
		6	4,70±0,84	145,38
4	$CuL^1(Sfz) \cdot H_2O$	2	5,70±0,95	176,31
		4	6,20±0,55	191,77
		6	7,43 ±0,92	229,92
5	$CuL^2(Sfz) \cdot 3H_2O$	2	10,50±0,84	324,78
		4	11,07±0,73	342,30
		6	9,77±0,97	302,09
6	$Cu(L-2H)$	2	10,63±0,49	328,90
		4	9,77±0,8	302,09
		6	9,53±0,97	294,88
	Martor	0	3,23±0,8	100

Pentru compusul $[Cu(L-2H)]$ la administrarea a 2 mg/l se atestă un conținut de cupru de 10,63 mg%, după care scade neesențial, astfel încât la administrarea lui în concentrații de 4 și 6 mg/l cuprul acumulat variază în limitele 9,77-9,53 mg%.

Compușii coordinativi $[\text{Cu}(\text{L-H})\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$, $[\text{CuL}_1(\text{NO}_3)_2]$ și $[\text{CuL}^1(\text{Sfz})\cdot\text{H}_2\text{O}]$ manifestă un efect stimulator mai slab asupra acumulării cuprului în biomasă (de 1,42-1,49 ori) în comparație cu complexele $[\text{CuL}^2(\text{Sfz})\cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ și $[\text{Cu}(\text{L-2H})]$, iar în cazul compusului $[\text{CuL}_2(\text{NO}_3)_2]$ conținutul cuprului are valori minime în comparație cu ceilalți compuși testați, dar care întrec valoarea probei de referință de 1,3-1,7 ori.



1 – $[\text{Cu}(\text{L-H})\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$ 3 – $\text{CuL}_2(\text{NO}_3)_2$ 5 – $\text{CuL}^2(\text{Sfz})\cdot 3\text{H}_2\text{O}$
 2 – $\text{CuL}_1(\text{NO}_3)_2$ 4 – $\text{CuL}^1(\text{Sfz})\cdot\text{H}_2\text{O}$ 6 – $\text{Cu}(\text{L-2H})$

Fig.1. Conținutul de cupru acumulat în biomasă la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02 în prezența unor compuși coordinativi ai Cu(II).

Astfel, analizând rezultatele obținute, observăm că asupra acumulării cuprului în biomasă influențează natura ligandului. Compușii coordinativi testați ai Cu(II) au în calitate de liganzi derivați ai tiosemicarbazonelor, ce conțin grupe hidroxilice, aminice, carboxilice, sulfanilamidice și polialcoolice. Un conținut maxim de cupru în biomasă de spirulină, atestat la administrarea complexelor $[\text{CuL}^2(\text{Sfz})\cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ și $[\text{Cu}(\text{L-2H})]$, poate fi explicat prin prezența în componența lor a grupelor polialcoolice, carboxilice și sulfanilamidice din cadrul liganzilor. Utilizarea unor compuși de natură organică complexați cu Cu(II) la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02 este mai eficientă în comparație cu sărurile anorganice de cupru care au o acțiune toxică înaltă, deoarece ei sunt mai compatibili cu compoziția biochimică a spirulinei [8].

Concluzii

1. Toți compușii coordinativi testați au un efect pozitiv în acumularea cuprului în biomasă cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02, iar conținutul acumulat depinde de concentrațiile administrate și de natura liganzilor.

2. Compușii coordinativi $[\text{CuL}^2(\text{Sfz})\cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ și $[\text{Cu}(\text{L-2H})]$ asigură acumularea maximă a cuprului în biomasă de spirulină variind în limitele 9,77 - 11,07 mg% și 9,53 - 10,63 mg%, respectiv, administrați în concentrații de 2-6 mg/l, ceea ce explică prezența în componența liganzilor a grupelor polialcoolice, carboxilice și sulfanilamidice.

Referințe:

1. Abdel-Monem M.M., Anderson M.D. Copper complexes of alfa-amino acids that contain terminal amino groups, and their use as nutritional supplements. 1990. US Patent No 4948594.
2. Agajanian N.A., Skalny A.V. Chemical elements in environment and human ecological portrait. - Moscow: KMK Press, 2001. - 83 p.
3. Agajanian N.A., Veldanova M.V., Skalny A.V. Human ecological portrait and role of trace elements. - Moscow: KMK, 2001. - 236 p.
4. Berdanier C.D. Advanced nutrition and human metabolism. Ed. III. - Belmont, California: Wadsworth/Thomson Learning, 1999.
5. Caddell J.L. Hypothesis: the possible role of magnesium and copper deficiency in retinopathy of prematurity // Magnesium Research. - 1995. - No8. - P.261-270.

6. Ciofu C. Nutriție și alimentație. - In: Ciofu E. Pediatrie. Ed. I. 2001, p.90-92.
7. 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.
8. Ma M., Zhu W., Wang Z., Witkamp G. J. Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid // Aquat Toxicol. - 2003. - Vol.8. - No63(3). - P.221-228.
9. Nalimova A.A., Popova V.V., Tsoglin L.N., Pronina N.A. The effects of copper and zinc on *Spirulina platensis* growth and heavy metal accumulation in its cells // Russian Journal of Plant Physiology. - 2005. - Vol.52. - No2.- P.229-234.
10. Rosu T., Pasculescu S., Lazar V., Chifiriuc C., Cernat R. Copper(II) complexes with ligands derived from 4-Amino-2,3-dimethyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-one: synthesis and biological activity // Molecules. - 2006. - Vol.11. - P.904-914.
11. Rudic V., Bulimaga V. Tehnologii avansate în pragul secolului XXI. - Chișinău, 2000.
12. Rudic V., Cojocari A., Cepoi L., Chiriac T., Rudi L., Gudumac V., Macari V., Codreanu Sv., Bulimaga V., Dudnicenco T., Dencicov L., Ghelbet V., Crudu D., Miscu V., David Sv. Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale și realizări practice. - Chișinău: Elena VI SRL, 2007. - 365 p.
13. 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.
14. Savvaidis I., Hughes M.N., Poole R.K. Copper biosorption by *Pseudomonas cepacia* and other strains // World Journal of Microbiology & Biotechnology. - 2003. - Vol.19. - P.117-121.
15. Verma S.K., Sing S.P. Factors regulating copper uptake in a cyanobacterium // Current Microbiology. - 1990. - Vol.21. - No1. - P.33-37.
16. 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.74-185.
17. Zheng Y., Li X. K., Wang Y., Cai L. The role of zinc, copper and iron in the pathogenesis of diabetes and diabetic complications: therapeutic effects by chelators // Hemoglobin. - 2008. -Vol.32. - No1-2. - P.135-45.
18. Практикум по технологии косметических средств „биологически активные вещества в косметике” / Под редакцией Т.В. Пучковой и В.Е. Кима. - Москва: Школа косметических химиков, 2004, с.119.

Prezentat la 10.02.2009