

## RELEVANȚA TESTULUI TBARS ÎN DETERMINAREA STRESULUI OXIDATIV LA *ARTHROSPIRA PLATENSIS* PE DURATA CICLULUI DE CULTIVARE

Rudic Valeriu, Rudi Ludmila, Chiriac Tatiana, Cepoi Liliana, Miscu Vera, Djur Svetlana, Codreanu Svetlana, Dumbrăveanu Veronica, Sadovnic Daniela, Ghelbet Viorica, Chelmenciuc Viorica, Doni Veronica

*Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei*

### Rezumat

În articol sunt prezentate rezultatele cercetărilor modelelor de determinare a stresului oxidativ în biomasa spirulinei în condiții de stres pe durata ciclului de cultivare. Stresul a fost indus prin modificarea regimului de iluminare: de la cel continuu la regimul cu fotoperiodicitatea 4ore lumină /20ore întuneric și a temperaturii de cultivare de la valori mari de 40°C la valori mici de 20°C. În scopul aprecierii intensității stresului oxidativ se utilizează testul cu determinarea produselor degradării acidului tiobarbituric. Dar nu în toate cazurile un singur test poate fi relevant. Pentru a demonstra instalarea stresului pe durata ciclului de cultivare a spirulinei a fost monitorizat procesul de acumulare a proteinei în biomasă și concentrația malondialdehidei.

Pentru determinarea stresului oxidativ instalat în biomasa spirulinei pe durata ciclului de cultivare, testul de determinare a concentrației malondialdehidei nu este suficient. Valorile testului TBARS devin relevante prin determinarea raportului de corelare cu valorile conținutului de proteină în biomasă.

*Cuvinte cheie:* *Spirulina platensis*, stres oxidativ indus, proteină, malondialdehidă,  
*Depus la redacție* 10 octombrie 2016

-----  
*Adresa pentru corespondență:* Rudi Ludmila, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei, str. Academiei, 1, MD-2028 Chișinău, Republica Moldova; e-mail: rudiludmila@gmail.com

### Introducere

Explorarea comercială a cianobacteriilor genului *Arthrospira* (*Spirulina*) are la bază valoarea nutritivă, compoziția și siguranța chimică a biomasei care au făcut din ea unul dintre cele mai importante obiecte ficologice industriale [2, 5]. Tehnologiile aplicate în cultivarea acestei cianobacterii alcalinofile se bazează pe cunoașterea proceselor de creștere și dezvoltare. În condiții naturale de creștere spirulina prezintă unele cerințe față de parametri fizici de cultivare. Plasticitatea metabolică a spirulinei facilitează răspunsul la stimulatorii din mediul nutritiv și este bine utilizată în menținerea unei produceri sporite de biomasă în sisteme intensive de cultivare în aer liber [1, 8]. Cu toate acestea există unele limite biologice care duc la instalarea stresului oxidativ în biomasă pe durata cultivării spirulinei chiar și în condiții tehnologice determinate [6, 10].

În rezultatul proceselor biosintetice are loc producerea de radicali liberi, iar echilibrul dintre producerea și anihilarea radicalilor este factorul care asigură rezultatul final prognozat. Nu tot timpul acumularea biomasei și a componentelor constitutive și funcționale sunt indicatori siguri ai statutului oxidativ al culturii [3, 9]. Pentru a determina instalarea stresului oxidativ în celulele microalgale se utilizează testul de determinare a concentrației malondialdehidei care este produsul peroxidării lipidelor

(TBARS) [9]. Așa cum lipidele din componența celulei în majoritate sunt componente ale membranelor, afectarea lor este dovada acumulării radicalilor în biomasă. Cu toate acestea apare întrebarea dacă poate fi un singur test dovada predominării proceselor oxidative în celulă.

**Scopul** cercetărilor constă în determinarea relevanței testului TBARS în determinarea stresului oxidativ la *Arthrospira platensis* pe durata ciclului de cultivare.

### Materiale și metode

Tulpina cianobacteriei *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis* CNMN-CB-11) a fost cultivată pe mediul nutritiv mineral SP-1 [8]. Cultivarea a fost efectuată în baloane Erlenmeyer de 500 ml, cu volum de lucru de 300 ml. Durata ciclului de cultivare – 10 zile.

Pentru experiența cu inducere a stresului de iluminare cultura de spirulină a fost cultivată în condiții de iluminare continuă la 3000-4000 lx la temperatura de 28-30°C. Stresul de iluminare a fost indus prin modificarea regimului de iluminare continuă pe durata cultivării. În ziua a 3-a a ciclului de cultivare a fost redusă perioada luminoasă la 4 ore din 24 ore. Acest regim a fost respectat până în ziua a 7-a de cultivare, când a fost restabilit regimul de iluminare continuu, care a fost menținut până în ziua a 10-a a ciclului experimental.

Pentru experiența cu inducere a stresului termic, cultura de spirulină a fost cultivată în condiții de seră în regim de iluminare continuă la 3000-4000 lx și temperatura mediului de 38-40°C. Stresul termic a fost indus prin modificarea temperaturii de cultivare. În ziua a 3-a a ciclului de cultivare cultura de spirulină a fost expusă temperaturii de 20-22°C. Acest regim a fost respectat până în ziua a 7-a de cultivare, când a fost restabilită temperatura inițială care a fost menținută până în ziua a 10-a a ciclului experimental.

Prelevarea de probe a fost efectuată zilnic cu intervalul de 24 ore. Biomasă de spirulină a fost separată de mediul de cultură prin filtrare, a fost standardizată la concentrația de 10mg/ml și supusă procedurii repetate de congelare/decongelare. Conținutul de proteine în biomasă a fost determinat spectrofotometric în baza produselor degradării bazice a proteinelor cu utilizarea reagentului *Folin-Ciocalteu* [7]. Gradul de peroxidare a lipidelor a fost determinat în baza malondialdehidei (*testul TBARS, ThioBarbituric Acid Reactive Substances*) [4]. Valoarea malondialdehidei a fost exprimată în nM/g biomasă cu utilizarea coeficientului molar.

### Rezultate și discuții

Una din condițiile de cultivare a tulpinii de spirulină în laborator în scopuri de menținere sau experimentale este regimul de iluminare continuă. În condiții de reducere a perioadei de iluminare la doar 4 ore din 24 ore, în mod evident a suferit activitatea biosintetică a spirulinei.

Spirulina cultivată în regim de iluminare continuă acumulează proteina treptat atingând conținutul maximal de 58% biomasă în ziua a 6-a de creștere. În următoarele zile s-a constatat o scădere neînsemnată a conținutului de proteină de la 58% la 52% la ziua a 8-a a ciclului, valoare ce se menține până în ziua a 10-a de cultivare (Figura 1).

Prima zi de creștere în condiții de stres de iluminare coincide cu ziua a 3-a a ciclului de cultivare a spirulinei. Dacă în condiții optimale, în ziua a 3-a de cultivare, cultura de spirulină a marcat un salt în acumularea proteinei în biomasă, în condiții de reducere a perioadei de iluminare, conținutul de proteină în biomasă de spirulină a rămas la nivelul

primelor două zile de cultivare. Conținutul scăzut de proteină în biomasa spirulinei nu se modifică pe durata cultivării în regim de iluminare redusă și se menține la valorile de 50%. În ziua a 7-a de cultivare, în varianta experimentală de inducere a stresului, a fost restabilit regimul de iluminare continuă care a fost menținut până la sfârșitul cultivării spirulinei. Revenirea la regimul de iluminare continuă a culturii supuse stresului de iluminare nu a fost un factor de restabilire a procesului de sinteză a proteinelor. Conținutul lor a rămas la nivelul de 50-52%% că și în cazul probelor experimentale obținute din biomasa variantei de control spre sfârșitul perioadei ciclului de cultivare.

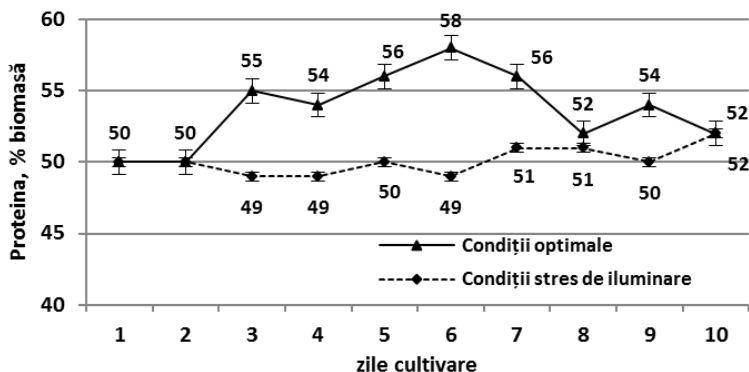


Figura 1. Modificarea conținutului de proteine în biomasa spirulinei pe durata cultivării în regim de iluminare continuă și în condiții de stres de iluminare.

Astfel, a fost stabilit că modificarea condițiilor de iluminare pe durata ciclului de cultivare a afectat sinteza proteinelor prin reducerea nivelului lor în biomasă pe durata creșterii exponențiale, care este cea mai relevantă din punct de vedere tehnologic.

Malondialdehida (MDA) este un marker recunoscut pentru evaluarea stresului oxidativ, concentrația sa fiind un indicator al gradului de peroxidare a lipidelor, proces care depinde de nivelul radicalilor liberi. În condițiile stresului de iluminare, reducerea fotosintezei, care a afectat deja procesele biosintetice, în mod sigur induce acumularea de MDA în membrane (Figura 2).

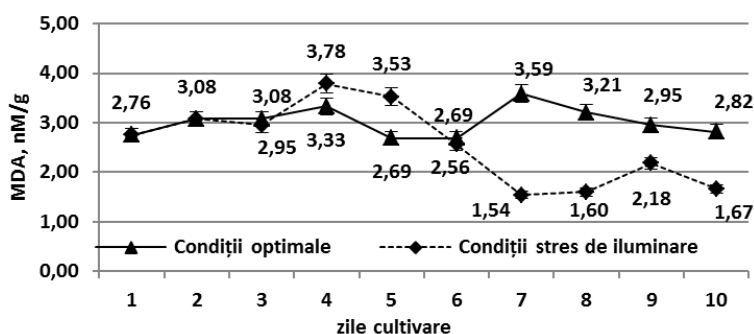


Figura 2. Modificarea valorilor MDA în biomasa spirulinei pe durata cultivării în regim de iluminare continuă și în condiții de stres de iluminare.

În condiții optimale de cultivare, valorile testului TBARS în primele 6 zile ale ciclului de cultivare nu prezintă oscilații majore (Figura 2). În ziua a 7-a a fost înregistrată o creștere a valorilor testului TBARS până la 3,59 nM/g, ceea ce este cu 19% mai mult

comparativ cu valoarea medie determinată în primele 6 zile de creștere. În următoarele trei zile de cultivare, conținutul malondialdehidei revine la valorile de 3,0 nM/g.

În condițiile regimului de iluminare redus are loc sporirea concentrației malondialgehidei determinate, ceea ce coincide cu reducerea conținutului de proteine în biomasa spirulinei. În probele experimentale, în a 2-a zi de stres (ziua a 4-a a ciclului de cultivare), concentrația MDA a crescut cu 12% comparativ cu valorile testului TBARS pentru spirulina crescută în condiții optimale de iluminare și este de 3,78 nM/g. În ziua a 3-a de stres, valoarea testului TBARS este deja cu 24% mai mare decât concentrația MDA determinată pentru spirulina crescută în condiții standard. În ziua a 4-a de stres indus care corespunde cu ziua a 6-a a ciclului de cultivare, concentrația MDA în biomasă rămâne crescută. Restabilirea, la ziua a 7-a a ciclului de cultivare, a regimului de iluminare pentru cultura de spirulină supusă stresului indus este marcată prin reducerea cu 43% a valorilor testului TBARS pentru biomasa de spirulină, comparativ cu ziua precedentă și cu 55% comparativ cu valorile determinate pentru spirulina cultivată în regim de iluminare continuă. Valoarea concentrației MDA, stabilite pentru spirulina cultivată în condiții de restabilire a regimului de iluminare, rămân a fi reduse pe durata următoarelor zilele 7 – 10 a ciclului de cultivare. Putem presupune că restartarea activității biosintetice în biomasa de spirulină prin restabilirea regimului de iluminare este orientată în primul rând spre restabilirea membranelor.

În condiții de stres de iluminare indus pe durata ciclului de cultivare a spirulinei s-a determinat creșterea valorilor concentrației MDA în biomasă din primele ore de stres și reducerea lor în condițiile de restabilire a regimului de iluminare.

Prin urmare, instalarea stresului oxidativ în celulele de spirulină a fost demonstrată prin testul de determinare a MDA.

În rezultatul cercetării, a fost stabilit că stresul indus prin modificarea condițiilor de iluminare pe durata unui ciclu de cultivare a spirulinei a afectat sinteza proteinelor și integritatea membranelor celulare. Pe de o parte există încetinirea proceselor biosintetice în celulă, iar pe de altă parte - acumularea radicalilor liberi care au indus peroxidarea lipidelor membranare. Existența unei dependențe dintre reducerea sintezei proteinelor și oxidarea lipidelor membranare ar fi o dovadă de instalare a unui stres oxidativ celular indus de condițiile de cultivare.

Corelarea dintre conținutul proteinelor și concentrația malondialdehidei determinate în biomasa spirulinei crescute în condițiile stresului de iluminare indus este inversă, coeficientul de corelare fiind considerat înalt  $r = 0,81$ . Coeficientul de determinare demonstrează că în 66% din cazuri, reducerea sintezei proteinelor în biomasa spirulinei, supusă stresului de iluminare pe durata perioadei de cultivare, este însoțită de valori crescute ale testului malondialdehidei (Figura 3A).

Prin urmare putem considera că în condițiile de impunere a regimului de iluminare redusă pe durata cultivării spirulinei în celula cianobacteriei se instalează stresul oxidativ care se manifestă prin reducerea sintezei proteinelor și creșterea valorilor concentrației MDA. Această afirmație este susținută de lipsa corelării dintre conținutul proteinelor și valorile testului TBARS, determinate pentru biomasa spirulinei crescute în condiții optimale de iluminare (Figura 3B).

Un alt tip de stres indus de modificarea condițiilor de cultivare este schimbarea temperaturii de cultivare. Au fost montate experiențele de inducere a stresului prin reducerea temperaturii de cultivare a spirulinei pe perioada unui ciclu de cultivare.

Pe durata experimentală, temperaturile considerate optimale procesului de cultivare au fost de 38-40°C. Regimul termic de 20°C grade este favorabil creșterii culturii de spirulină, dar afectează procesele biosintetice.

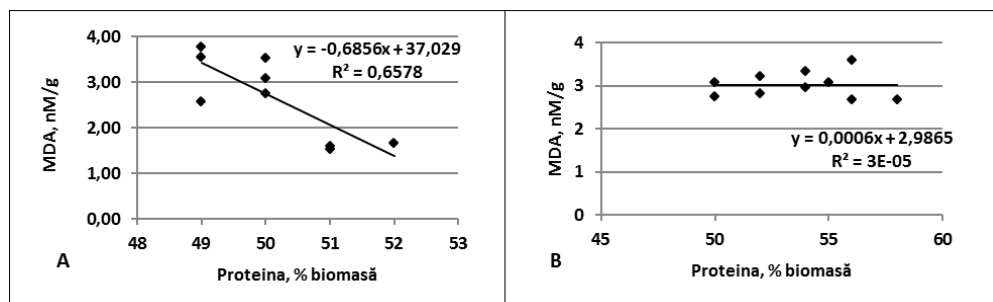


Figura 3. Corelarea dintre conținutul de proteine (% biomasa) și concentrația MDA (nM/g) în biomasa de spirulină. A - cultivată în condiții de stres de iluminare și B - condiții standard de iluminare pe durata ciclului de cultivare.

În regim de temperatură de 38-40°C spirulina acumulează proteine în cantități sporite, dar procesul de biosinteză a lor, de asemenea, este unul treptat cu maximumul de 67% biomasa, determinat în ziua a 6-a a ciclului de cultivare (Figura 4).

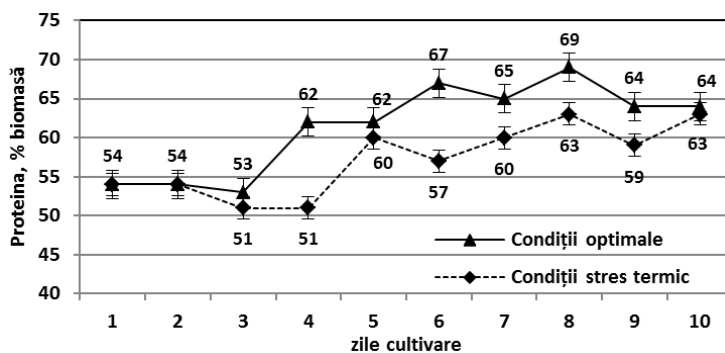


Figura 4. Modificarea conținutului de proteine în biomasa spirulinei pe durata cultivării în condiții termice optimale și în condiții de stres termic indus.

Primul salt cu 17% al conținutului de proteine a fost stabilit în ziua a 4-a de cultivare. Conținutul sporit de proteine, instalat în ziua a 6-a a ciclului de cultivare, se menține până la sfârșitul ciclului de cultivare, în ziua a 10-a fiind de 68% biomasa.

Reducerea temperaturii de cultivare cu 18-20°C induce modificări în procesele biosintetice în biomasa de spirulină. Astfel, în a 2-a zi de stres termic (ziua a 4-a de cultivare) conținutul de proteine în biomasa este de 51%, fiind cu 17% mai mic comparativ cu varianta experimentală control. Cantitatea proteinei în biomasa spirulinei în ziua a 3-a de stres indus (5-a de cultivare) a atins valorile probelor control și este de 60% biomasa. În continuare se determină o reținere nesemnificativă a procesului de acumulare a proteinei în biomasa în condiții de stres. În ziua a 7-a de cultivare cultura de spirulină revine la regimul termic inițial considerat optimal. Conținutul de proteine rămâne la nivelul de 60% biomasa, fiind cu 8-15% mai mic comparativ cu varianta control. Reabilitarea condițiilor termice de cultivare a culturii de spirulină decurge fără modificarea conținutului de proteine în biomasa.

Prin urmare cultura de spirulină crescută în condiții de stres termic indus produce proteine, spre sfârșitul perioadei de cultivare, în concentrații similare variantelor experimentale obținute în condiții termice considerate optimale de cultivare.

În varianta experimentală control, în condițiile unei activități biosintetice sporite, determinate de temperatura ridicată de cultivare, valorile testului TBARS, în primele 4 zile ale ciclului de cultivare sunt sporite și oscilează între 2,56-4,81 nM/g (Figura 5).

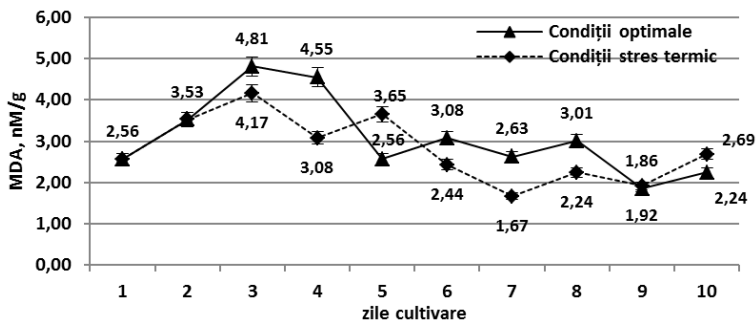


Figura 5. Modificarea valorilor MDA în biomasa spirulinei pe durata cultivării în regim termic optimal și în condiții de stres termic.

În ziua a 5-a de cultivare, concentrația malondialdehidei se reduce la valorile determinate în prima zi de cultivare de 2,56 nM/g iar valorile reduse ale testului TBARS se mențin până la sfârșitul ciclului de cultivare. Prin urmare, în varianta experimentală cu aplicarea temperaturilor sporite de cultivare care sunt considerate optimale, acumularea de proteine în biomasa spirulinei coincide cu maximumul de peroxidare a lipidelor. În faza staționară, când cultura de spirulină menține valorile crescute ale proteinelor în biomasă, activitatea de peroxidare a lipidelor este minimă.

În condițiile temperaturii reduse, concentrația MDA în biomasa spirulinei crește nesemnificativ, în ziua a 3-a a ciclului de cultivare care corespunde primei zile a perioadei de stres până la 4,17 nM/g. Dacă în cazul condițiilor optimale stabilizarea valorilor testului MDA a început cu ziua a 5-a de cultivare, în biomasa spirulinei cultivată în condiții de stres termic indus procesul de oxidare a lipidelor în această zi este practic maximal, iar reducerea nivelului de peroxidare are loc începând cu ziua a 6-a de cultivare.

În prima zi de cultivare cu regimul termic restabilit, valoarea MDA este minimală de 1,67 nM/g. Perioada de recuperare a culturii de spirulină în condiții de stres oxidativ indus de temperatura de cultivare este marcată prin valori reduse ale testului MDA.

Pe durata stresului indus în anumite perioade ale ciclului vital au fost stabilite următoarele combinații ale parametrilor monitorizați: 1) biomasa cu conținut proteic sporit și valori reduse ale testului TBARS și 2) biomasa cu conținut proteic redus și concentrația MDA crescută. Analiza corelațională pentru acești doi indicatori în condiții optimale și în cele de stres indus este prezentată în Figura 6A și 6B.

Pentru ambele variante experimentale corelarea dintre conținutul sporit sau redus de proteine cu concentrațiile de MDA este determinată ca fiind negativă și slabă ( $r=0,47$  și  $0,42$  respectiv). Cu toate că există un raport de corelare dintre sinteza proteinei și acumularea malondialdehidei și această corelare este una inversă, valoarea coeficientului de corelare, care este considerată a fi rezonabilă în cazul experienței cu modificarea

regimului termic de cultivare, nu demonstrează instalarea unui stres oxidativ dependent de condițiile temperaturii de cultivare în biomasa spirulinei. Inducerea unui stres termic prin reducerea temperaturii de cultivare pe durata ciclului de cultivare nu afectează orientarea spre acumulare a proceselor biosintetice în biomasa spirulinei.

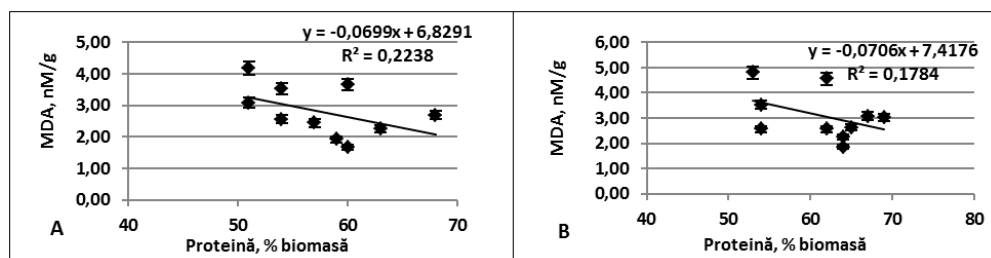


Figura 6. Corelarea dintre conținutul de proteine (% biomasă) și concentrația MDA (nM/g) în biomasa de spirulină (A - cultivată în condiții de stres termic și B - condiții termice optime pe durata ciclului de cultivare).

Pentru a stabili instalarea stresului oxidativ pe durata cultivării spirulinei testul de determinare a concentrației malondialdehidei nu a fost suficient. Valorile testului TBARS devin relevante prin determinarea raportului de corelare cu valorile conținutului de proteine în biomasă.

Prin urmare, valorile testului TBARS depind de condițiile de cultivare a spirulinei, iar relevanța lor trebuie confirmată prin utilizarea și altor indicatori.

### Bibliografie

1. Amos Richmond. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, 2004, Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing company. 566 p.
2. Belay A. The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. //J. Am. Nutraceut. Assoc., 2002, 5: 27-48.
3. Emad A. Shalaby, Sanaa M. M. Shanab and Vikramjit Singh. Salt stress enhancement of antioxidant and antiviral efficiency of *Spirulina platensis*. //Journal of Medicinal Plants Research, 2010, 4(24): 2622-2632.
4. Hodges M., Forney F., Prange R. Improving the thiobarbituric acid reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. //Planta, 1999, 207: 604-611.
5. Hoseini S.M., Khosravi-Darani K., Mozafari M.R. Nutritional and Medical Applications of *Spirulina* Microalgae. //Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2013, 13: 1231-1237.
6. Kemka H. Ogbonda, Rebecca E. Aminigo, Gideon O. Abu. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. //Bioresource Technology, 2007, 98(11): 2207-2211.
7. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. //J. Biol. Chem., 1951, 193:265-275.
8. Rudic V. ș.a. Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale și realizări practice. Chișinău: Știința, 2007. 364 p.
9. Sebastián E. Sabatini, Ángela B. Juárez, Maria R. Eppis, et all. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. //Ecotoxicology and Environmental Safety, 2009, 72:1200-1206.
10. Torzillo G., Pushparaj B., Masojidek J., Vonshak A. Biological constraints in algal biotechnology. //Biotech. Bioprocess Engineering, 2003, 8:338-348.