

CZU: 582.232:581.19

COMPONENȚA BIOCHIMICĂ ȘI PARTICULARITĂȚILE MORFOLOGICE ALE TULPINII DE CIANOBACTERIE *NOSTOC HALOPHILUM* HANSG. CNMN-CB-17

Alina TROFIM, Aurica BOROZAN*

Universitatea de Stat din Moldova

*Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară
a Banatului „Regele Mihai I al României” din Timișoara

Din solurile or. Cimișlia, R. Moldova, a fost izolată o tulpină originală de cianobacterie *Nostoc halophilum* Hansg. CNMN-CB-17 cu un conținut biochimic valoros, ce asigură o cantitate mai sporită de glucide și proteine. Sunt prezentate particularitățile morfologice și biochimice ale tulpinii. Analiza comparativă a componenței biochimice a trei specii autohtone de cianobacterii din genul *Nostoc* izolate din ecosistemele R. Moldova a scos în evidență prezența unui conținut înalt de polizaharide.

Cuvinte-cheie: cianobacterie, izolare, componență biochimică, proteine, glucide.

STUDY OF THE BIOCHEMICAL COMPOSITION OF THE CYANOBACTERIUM STRAIN *NOSTOC HALOPHILUM* HANSG. CNMN-CB-17

A strain of cyanobacteria – *Nostoc halophilum* Hansg. CNMN-CB-17, was obtained in pure culture from the soils of Cimișlia, Republic of Moldova. Its valuable biochemical content provides a higher amount of carbohydrates and proteins. The morphological and biochemical characteristics of the strain are presented. The biochemical composition of said strain was compared to 2 other cyanobacterial species belonging to the *Nostoc* genus isolated from Moldova ecosystems, revealing the presence of a relatively high content of polysaccharides.

Keywords: cyanobacteria, morphological study, isolation, biochemical composition, polysaccharides.

Introducere

Cercetările recente din domeniul biotehnologiei la nivel internațional și național demonstrează interesul sporit al savanților față de izolarea și studierea componenței biochimice a cianobacteriilor, care sunt surse de substanțe biologice active cu aplicare largă și pot fi utilizate în domeniul agriculturii ca biofertilizanți, stimulatori de creștere a plantelor de cultură, ca antibiotici naturali etc. [1-3]. Astfel, în ultimii ani în R. Moldova au fost izolate și brevetate un șir de cianobacterii cu un potențial biochimic valoros (proteine, glucide, lipide, pigmenți, vitamine, aminoacizi, fitohormoni etc.), care sunt în curs de investigație și în proces de valorificare [4,5]. Sunt elaborate procedee de obținere a biomasei valoroase de cianobacterii cu un conținut sporit de substanțe biologice active și diverse metode de extragere a lor [6-8].

Dintre cianobacteriile autohtone izolate pot fi menționate cele din genurile *Anabaena*, *Cylindrospermum*, *Anabaenopsis*, *Calothrix*, *Spirulina*, care servesc în calitate de obiect de studiu important în soluționarea problemelor ecologice, în special privind epurarea apelor, precum și în astfel de domenii ca: fitotehnia, zootehnia, farmaceutica, cosmetologia etc. [9-11].

La nivel internațional, un interes deosebit prezintă speciile genului *Nostoc* datorită faptului că sunt producători de antibiotice și substanțe cu efect anticancer: nostocina, criptoficina [12,13]. Pe lângă acestea, în componența biochimică a speciilor din genul *Nostoc* (de exemplu, în cianobacteria *Nostoc sphaeroides*) a fost înregistrată prezența pigmentilor de natură proteică – ficobiliproteinele: ficocianină – 6,6mg/g BAU; aloficocianină – 11,2 mg/g BAU, precum și ficoeritrină – 4,2 mg/g BAU [14]. O specie originală din genul *Nostoc*, și anume – *Nostoc linckia*, care vegetează în solurile R. Moldova, de asemenea poate fi utilizată în calitate de sursă de pigmenți, deoarece sintetizează 0,5-1,0% BAU ficocianină și 0,5-1,0% BAU aloficocianină [4].

Un interes sporit pentru biotehnologie prezintă capacitatea cianobacteriilor de a sintetiza cantități sporite de exopolizaharide care, în mod natural, au rol de protecție împotriva factorilor negativi ai mediului [15]. Polizaharidele cianobacteriene pot fi utilizate în diverse domenii: medicină, farmaceutică, cosmetologie – pentru producerea cosmeticii bio, ceea ce este foarte important pentru dezvoltarea economiei țării.

Având în vedere că în diversitatea biocenozelor algale și cianobacteriene din R. Moldova există un număr mare de specii valoroase nevalorificate până în prezent, izolarea și evaluarea componenței biochimice a unor tulpini de cianobacterii este foarte actuală.

Scopul lucrării este de a investiga particularitățile morfologice și componența biochimică a cianobacteriei izolate din solurile R. Moldova – *Nostoc halophilum* Hansg. – sursă de substanțe biologic active. Obiectivele realizate rezidă în: izolarea culturii; studierea particularităților morfologice; studiul particularităților biochimice ale cianobacteriei și determinarea specificului componenței biochimice a tulpinii obținute în comparație cu alte cianobacterii autohtone din genul *Nostoc*.

Material și metode

Materialul cercetărilor noastre prezintă tulpina de cianobacterie *Nostoc halophilum* Hansg. CNMN-CB-17 izolată de către dr. A.Trofim din solurile R. Moldova, or. Cimișlia, în anul 2017. Această cianobacterie face parte din colecția LCS „Ficobiotehnologie” și este inclusă în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie. Tehnologia de izolare a tulpinii corespunde metodelor moderne utilizate în microbiologie [16] și constă în obținerea tulpinii pure prin recultivarea repetată în cești Petri pe mediul agarizat Drew cu următoarea componență chimică: $K_2HPO_4 - 0,2g/l$; $Mg SO_4 \times 7H_2O - 0,2 g/l$; $CaCl_2 \times 2H_2O$ – urme; $FeCl_3$ – urme. După obținerea culturii pure de cianobacterie a fost efectuată creșterea biomasei pe mediul lichid Drew în colbe Erlenmeyer în decurs de 12-20 zile, la iluminare permanentă de 1500-2000 lx și la temperatura de 25°C.

Componența biochimică a tulpinii a fost determinată după metodele clasice [17], particularitățile morfologice au fost examinate la microscopul Krus înzestrat cu cameră foto, iar apartenența taxonomică a fost stabilită după determinatorul descris de Gollerbah și în www.algaebase.org.

Rezultate și discuții

Studiul probelor de sol colectate din sudul R. Moldova, lunca râului Cogâlnic, or. Cimișlia, anul 2017, au demonstrat dezvoltarea abundentă a cianobacteriilor din diferite genuri. De regulă, în biocenoză se dezvoltă speciile genurilor *Anabaena*, *Nostoc*, *Phormidium* și *Lynghya*, între trihomii cărora vegetează *Hantzschia amphioxys* Ehr. și diverse specii ale genurilor *Navicula* și *Nitzschia*.

În rezultatul multiplelor recultivări a fost izolată în cultură pură o specie autohtonă de cianobacterie *Nostoc halophilum*, care, cum am stabilit, se dezvoltă pe mediul de cultivare Drew. Potrivit literaturii de specialitate, această specie a fost depistată în solurile sărate ale Basarabiei încă din anii 1940, când în descrierile sale dr. Ion Tarnavski [18] a menționat dezvoltarea speciei *Nostoc halophilum* pe teritoriul țării noastre: totodată, există lucrări care demonstrează prezența speciei în lunca Dunării și în solurile României. Dezvoltarea speciei *Nostoc halophilum* a fost constatată și în ecosistemele din Cehia, cu toate că în ultimii 50 de ani această specie nu a fost identificată [19]; astfel, obținerea tulpinii date este o treaptă foarte importantă în conservarea acesteia. În baza internațională de date, care cuprinde informația despre cianobacterii și alge, este indicat sinonimul speciei *Nostoc halophilum* – *Nostoc passerinianum* var. *halophilum* (Hansgirg) Hansgirg [www.algaebase.org]. Taxonomic, specia *Nostoc halophilum* se caracterizează prin faptul că aparține Filumului Cyanobacteria, Clasa Cyanophyceae, Subclasa Nostocophycidae, ordinul Nostocales, familia Nostocaceae și genul *Nostoc*.

Prin microscopierea periodică a culturii au fost stabilite etapele de dezvoltare a cianobacteriei *Nostoc halophilum* (Fig.1 a)-e). Trihomii tineri apăruți din spor au câte un heterocist apical și celule vegetative, care, de regulă, sunt dreptunghiulare. Peste 5-7 zile în trihomi apar heterocistele intercalare, care au rol în fixarea azotului atmosferic, ceea ce permite culturii să se dezvolte pe medii culturale lipsite de azot. În perioada exponențială de creștere are loc dezvoltarea celulelor vegetative și creșterea trihomului în lungime. La a 18-a – 30-a zi, de regulă, celulele vegetative se transformă în spori, care se desprind și sunt solitari în mediul de cultivare. La a 30-a – 35-a zi de dezvoltare a fost observată mărirea de peste 3 ori a sporilor și crearea în ei a trihomilor tineri, care conțin 3-4 celule vegetative și heterocist apical.

Particularitățile morfologice ale tulpinii constau în faptul că trihomii sunt solitari dreپți sau încovoiați, de culoare cafenie sau castanie (Fig.1 a)-1), cu lățimea medie de de 5,0 μm. Trihomii sunt acoperiți de exopolizaharide, care au funcția de protecție.

Celulele vegetative sunt de diferită formă: butoiașe sau dreptunghiulare bine delimitate cu lățimea maximă de 5,0-7,5 μm și cu lungimea de 5,0-15,0 μm (Fig.1 a)-1,2, c)-3). Fiecare trihom conține mai multe heterociste apicale sau intercalare (Fig.1 a)-3), sferice sau ovale, cu diametrul de aproximativ 3,0-5,0 μm (Fig.1 b)-1,2). Sporii sunt sferici, ovali sau elipsoidali-ovalii, cu lățimea de 5,0-7,5 μm sau ajung până la maximum 10,0 μm și cu lungimea de până la 15,0 μm (Fig.1 c)-1,2, e)-1).

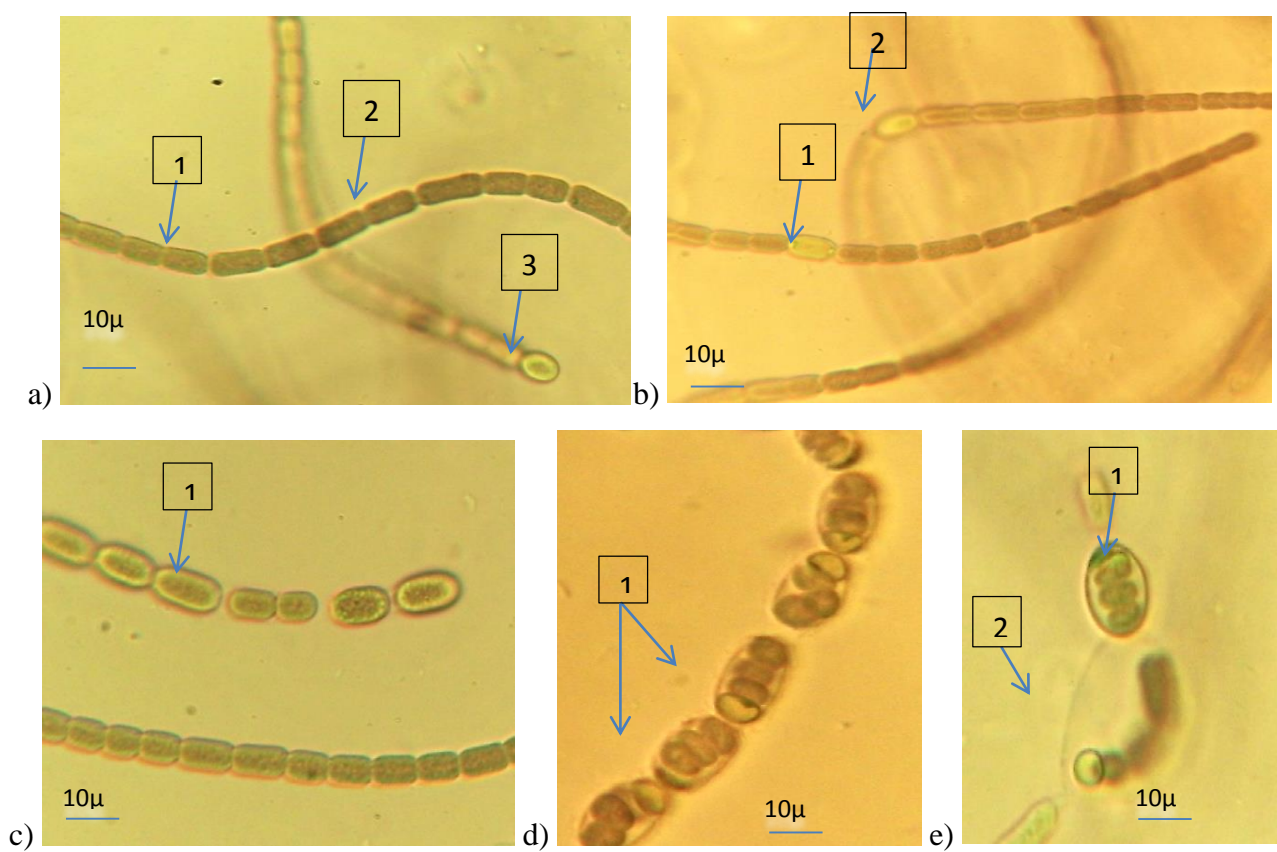


Fig.1. Microscopierea speciei *Nostoc halophilum*: a) Trihomii cu heterocista apicală: 1, 2 – celulele vegetale, 3 – heterocista apicală; b) Aspectul trihomilor cu heterociste alungite (1,2); c) Aspectul sporilor maturi (1); d) 1– Sporii cu trihomi noi creați în interiorul lor; e) Germinarea trihomului nou din spor: 1 – spor negerminat, 2 – spor care germinează.

Tabelul 1

Particularitățile morfologice ale cianobacteriei *Nostoc halophilum* (μm)

Celula		Heterocista		Sporul	
Lățimea	Lungimea	Lățimea	Lungimea	Lățimea	Lungimea
5,0±0,2	12,5±0,1	5,0±0,1	5,0±0,1	7,5±0,1	10,0±0,1
7,5±0,1	15,0±0,3	5,2±0,2	5,2±0,1	7,5±0,1	15,0±0,2
5,0±0,3	10,0±0,1	5,0±0,1	5,0±0,1	7,5±0,2	10,0±0,1
7,5±0,1	15,0±0,4	5,0±0,1	5,0±0,1	7,5±0,1	10,0±0,1
7,5±0,1	12,5±0,1	5,0±0,1	5,0±0,1	10,0±0,1	15,0±0,3

$p \leq 0,05$

De regulă, în componența biochimică a cianobacteriilor autohtone o pondere mai înaltă au glucidele, urmate de proteine și lipide, cu excepția cianobacteriei *Spirulina platensis* recunoscută ca sursă bogată de proteine (până la 70% BAU) [4,5,9]. Este de menționat că cianobacteriile sunt surse de pigmenți, precum: clorofila, ficocianina, ficoeritrina, mixoxantofila, carotenoizii, care au efect antiseptic, antiage, antioxidant și antiviral [20-22].

Rezultatele studiului componenței biochimice a cianobacteriei *Nostoc halophilum* denotă prezența unor cantități sporite de glucide, urmate de proteine, iar din pigmenți predomină ficoeritrina (Fig.2), care are efect anioxidant puternic.

Componența biochimică a cianobacteriei <i>Nostoc halophilum</i>:
Proteine 27,9-28,9%
Glucide 41,76%
Ficocianină 0,707%
Ficoeritrină 1,36%
Aloficocianină 0,42%
Clorofilă 12,16 μg/ml
Carotenoizi 2,45 μg/ml

Fig.2. Componența biochimică a cianobacteriei *Nostoc halophilum*.

A prezentat interes compararea rezultatelor componenței biochimice a speciei *Nostoc halophilum* izolate recent cu datele componenței biochimice ale altor două cianobacterii autohtone din genul *Nostoc* – *Nostoc gelatinosum* și *Nostoc linckia* izolate anterior (Tab.2). Componența biochimică a tulpinilor menționate se caracterizează prin ponderea mai înaltă a glucidelor, urmate de proteine [4,9].

Tabelul 2

Componența biochimică a cianobacteriilor obținute în cultură pură din ecosistemele R. Moldova

Denumirea speciilor autohtone de cianobacterii din genul <i>Nostoc</i>	Componența biochimică a cianobacteriilor (% din BAU)		
	proteine	glucide	lipide
<i>Nostoc halophilum</i>	27,90-28,90%	41,76%	19,00%
<i>Nostoc gelatinosum</i> [9]	31,15%	44,54%	13,88%
<i>Nostoc linckia</i> [4]	15,00-25,00%	35,00-50,00%	2,00%

Analiza comparativă a componenței biochimice a trei specii autohtone de cianobacterii din genul *Nostoc* izolate din ecosistemele R. Moldova a scos în evidență prezența unor cantități mai sporite de glucide la *Nostoc linckia* – 35,00-50,00%, urmat de *Nostoc halophilum* – 26,0-41,76% și *Nostoc gelatinosum* – 44,54%, iar cantitatea proteinelor nu depășește 31,15%.

Conform datelor din literatură, rezultatele componenței biochimice a biomasei de cianobacterii oscilează în strânsă dependență de condițiile de cultivare, variația iluminării și temperaturii, iar creșterea productivității depinde de suplimentarea mediului cultural cu diverse substanțe stimulente [23]. Investigațiile ulterioare includ elaborarea unor tehnologii efective de cultivare a tulpinii pentru implementare în cosmetologie și agricultură.

Pentru a evidenția prezența exopolizaharidelor atașate de trihomi a fost utilizată reacția de colorare a lor cu reagentul Alcian Blue (Fig.3).

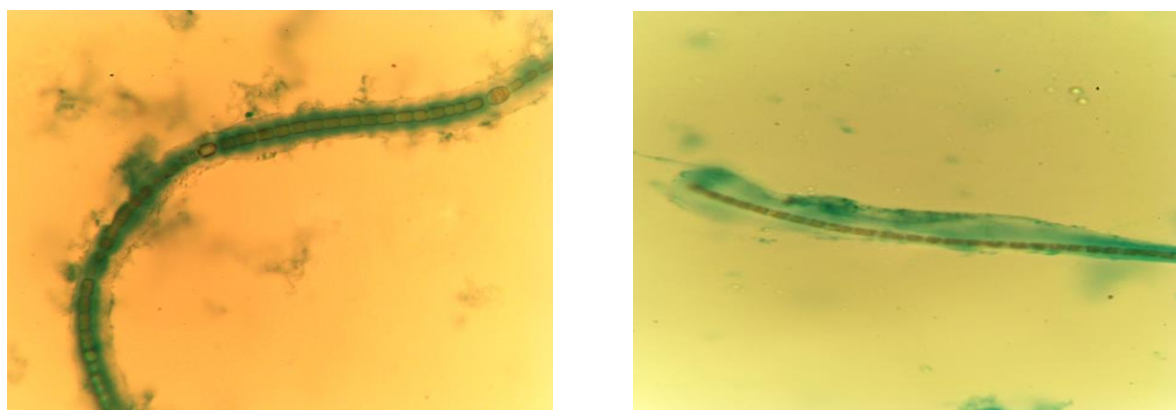


Fig.3. Vizualizarea la microscop a exopolizaharidelor la cianobacteria *Nostoc halophilum* prin colorare cu Alcian Blue.

Astfel, a fost demonstrată prezența abundentă a exopolizaharidelor la cianobacteria *Nostoc halophilum*, a căror valoare medie este de 217 mg/g. Prin urmare, valorificarea acestei specii poate fi direcționată spre obținerea substanțelor biologic active, care ulterior pot fi utilizate în cosmetologie, zootehnie, fitotehnie și dezvoltarea agriculturii ecologice.

Din cele expuse reiese că izolarea speciilor de cianobacterii autohtone și explorarea lor ca surse de substanțe biologic active este o direcție importantă atât pentru economie, cât și din perspectiva conservării biodiversității organismelor vii, deoarece unele specii de cianobacterii sunt incluse în Cartea Roșie a Republicii Moldova și necesită protecție la nivel național și internațional.

Concluzii

- Din probele de sol colectate din sudul Republicii Moldova, lunca râului Cogâlnic, or. Cimișlia, a fost obținută o tulpină de cianobacterie *Nostoc halophilum* Hansg. CNMN-CB-17. A fost efectuată caracteristica morfologică cu descrierea etapelor de dezvoltare și studiate modificările parametrilor morfologici ai sporilor, celulelor vegetative și ai heterocistelor.
- A fost stabilită componența biochimică a tulpinii *Nostoc halophilum* Hansg caracterizată prin conținut mai sporit de glucide (41,76%) și proteine (27,9-28,9%), inclusiv ficoeritrine (1,36%), ficocianine (0,707%), alofocianine (0,42%), precum și alți pigmenți.
- Analiza comparativă a componenței biochimice a trei specii autohtone de cianobacterii din genul *Nostoc* izolate din ecosistemele Republicii Moldova a scos în evidență prezența unor cantități mai sporite de glucide la *Nostoc linckia* – 35,00-50,00%, urmate de *Nostoc halophilum* – 26,0-30,15% și de *Nostoc gelatinosum* – 44,54%, iar cantitatea proteinelor nu depășește 31,15%.

Referințe:

1. BIONDI, N., PICCARDI, R., MARGHERI, C., RODOLFI, L., SMITH, G., TREDICI, M. Evaluation of *Nostoc* Strain ATCC 53789 as a Potential Source of Natural Pesticides. In: *Appl Environ Microbiol.*, 2004, no.70(6), p.3313-3320.
2. TROFIM, A. Importanța obținerii tulpinilor autohtone de cianobacterii și perspectiva de valorificare a acestora. În: *Intellectus*, 2018, no.1, p.107-109.
3. TROFIM, A. Utilizarea extractelor cianobacteriei *Cylindrospermum licheniforme* (Bory.) Kütz. în sporirea producției tomater. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Seria „Științe reale și ale naturii”*, 2016, nr.1(91), p.86-90.
4. RUDIC, V. et. al. Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale și realizări practice. Chișinău, S.n., 2007. 365 p.
5. TROFIM, A., et al. Cyanobacterium *Calothrix elenkinii* Kossinsk. – a promising source of bioactive compounds. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (3rd edition)*, Chișinău, 12-13 octombrie, 2016, p.159-160.
6. BULIMAGA, V., et al. Procedures of partial purification for phycobiliproteins from cyanobacteria isolated from soils of Republic of Moldova. In: *Studia Universitatis Babeș – Bolyai, Biologia* (Cluj-Napoca), 2018, LXIII, 1, p.5-14.
7. RUDIC, V., BATIR, L., GULEA, A. Procedee de obținere a biomasei de *Spirulina platensis* cu un conținut sporit de ficobiliproteine. În: *Intellectus*, 2011, nr.1, p.111-116.
8. BULIMAGA, V. Ei.al. Elaborarea schemei tehnologice de obținere a unor principii bioactive din biomasa de alge cianofite. În: *V International conference „Actual problems in modern phycology”*, Chișinău, 2014, p.20-22.
9. ТРОФИМ, А., и др. Значение и биохимическая характеристика некоторых почвенных сине-зелёных водорослей Республики Молдова. В: *Международная научная конференция «Физиология и биотехнология оксигенных фототрофных микроорганизмов: взгляд в будущее»*, 26-31 мая 2014, Москва (Россия), с.18.
10. TROFIM, A., ȘALARU, V., DOBROJAN, S. Rolul algelor *Cylindrospermum licheniforme* var. *alatosporum*, *Anabaenopsis* sp. în procesul de epurare a apelor reziduale de la complexele zootehnice. În: *Materialele Conferinței științifice naționale cu participare internațională consacrate celei de-a 50 aniversări de la fondarea Secției de Microbiologie „Probleme actuale ale microbiologiei și biotehnologiei”* Chișinău, 5-6 octombrie 2009, p.78-179.
11. VALUȚA, A. Biotehnologia cultivării sursei de antioxidanți – cianobacteria *Nostoc linckia*: Teză de doctor în științe biologice. Chișinău, 2015, p.1-160.
12. DING, Y. *Characterization and Analysis of Biosynthetic Systems from Nostoc sp. ATCC 53789 and Selected Fungal Natural Product Pathways*, 2010, Michigan. A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in The University of Michigan. 179 p.
13. NAVEEN BHARAT, I., MOSHAHID ALAM, R., TASNEEM, F. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Cyanobacteria. In: *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 2013, vol.2, no.9, p.4328-4343.

14. ZHONGYANG, D., HU, Q., LU, F., LIU, G., HU, Z. Colony development and physiological characterization of the edible blue-green alga, *Nostoc sphaeroides* (Nostocaceae, Cyanophyta). In: *J. Progress in Natural Science*, 2008, vol.18, no.12, p.1475-1483.
15. HAIFENG, YU. Effect of mixed carbon substrate on exopolysaccharide production of cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in mixotrophic cultures. In: *Journal of Applied Phycology*, 2012, vol.24, no.4, p.669-673.
16. ГАЙСИНА, Л., ФАЗЛУТДИНОВА, А., КАБИРОВ, Р. *Современные методы выделения и культивирования водорослей*. Уфа, 2008. 151-с.
17. RUDIC, V. și al. *Metode de investigații în ficobiotehnologie*. Chișinău, 2012. 60 p.
18. TARNAVSCHI I. *Analele Academiei Române, Memoriile secțiunii științifice, Seria III, Tomul XVI, 1940-1941*. București, 1941. 718 p.
19. KAŠTOVSKÝ, J., HAUER, T., MÁREK, J., SKÁCELOVÁ, O. The list of cyanobacterial species of the Czech Republic to the end of 2009. In: *J. Fottea*, vol.10, no.2, 2010, p.245-249.
20. BULIMAGA, V. și al. Algele cianofite (*Cyanophyta*) – surse de metaboliti secundari bioactivi. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Seria „Științe reale și ale naturii”*, vol.1, nr.71, 2016, p.96-107.
21. CENTENO-RAMOS, C., OLVERA-RAMIREZ, R. Extracción de ficobiliproteínas de cianobacterias. In: *Mat. of IV Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica y XV Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica*. <http://www.informatica.sip.ipn.mx>.
22. JAVIER, M., LLÓPIZ, A., PAVÓN, N., PENTÓN, G., PardoandreuIaplicaciones de la c-ficocianina: métodos de obtención y propiedades farmacológicas. In: *Revista de ciencias farmacéuticas y alimentarias*, 2015, vol.1, no.1, p.29-43.
23. EL BAKY, H., EL BAZ, K., EL-LATIFE, S. Induction of Sulfated Polysaccharides in *Spirulina platensis* as Response to Nitrogen Concentration and its Biological Evaluation. In: *J. c.s. Aquac Res Development*, 2013, vol.5, p.1-8.

Notă: Lucrarea a fost efectuată în cadrul Proiectului Instituțional 15.817.05.02F.

Date despre autori:

Alina TROFIM, doctor în științe biologice, cercetător științific superior în LCȘ *Ficobiotehnologie*, Universitatea de Stat din Moldova.

E-mail: alinatrofim@yahoo.com

ORCID: 0000-0003-4557-9602

Aurica BOROZAN, doctor în științe biologice, cercetător științific superior la Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului „Regele Mihai I al României” din Timișoara, Facultatea de Horticultură și Silvicultură,

E-mail: borozan_a@yahoo.com

Prezentat la 25.03.2019