

## ACTIVITATEA ANTIRADICALIC A EXTRACTELOR DIN CIANOBACTERIA *NOSTOC LINCKIA* PE DURATA CICLULUI VITAL

Valu a Ana

Institutul de Microbiologie i Biotehnologie al Academiei de tiin e a Moldovei

### Rezumat

Cercet rile actuale vizeaz utilizarea cianobacteriei *Nostoc linckia* în calitate de materie prim pentru producerea de antioxidan i. Determinarea capacit ii antiradicalice a extractelor din biomasa de *Nostoc linckia* s-a efectuat cu utilizarea radicalului DPPH i radicalului cation ABTS<sup>+</sup>. Rezultatele testelor DPPH i ABTS pentru extractele hidrice coreleaz cu fazele de cre tere a culturii sta ionare de *Nostoc linckia* i sunt reprezentative în studiul activit ii antioxidante pe parcursul ciclului vital.

*Cuvinte cheie:* cianobacterii, *Nostoc linckia*, substan e antioxidante, activitate antiradicalic

*Depus la redac ie* 19 noiembrie 2013

-----  
*Adresa pentru coresponden :* Valu a Ana, Institutul de Microbiologie i Biotehnologie al Academiei de tiin e a Moldovei, str. Academiei, 1, MD 2028 Chi in u, Republica Moldova; E-mail: annavaluta@yahoo.com, tel. (+37322) 72-53-06.

### Introducere

În ultima perioad interesul în ceea ce prive te alternativa natural în schimbul a tot ceea ce este ob inut prin sintez chimic este tot mai mare. Substan ele naturale cu propriet i antioxidante i antiradicalice cap t o aplicare tot mai larg în industria alimentar , cosmetic , i, în special, în cea farmaceutic în calitate de remedii eficiente în contracararea ac iunii nefaste a radicalilor liberi i în stoparea proceselor prooxidante, care genereaz diferite st ri patologice [1-5]. Remarc m c utilizarea antioxidan ilor sintetici este tot mai limitat datorit activit ii lor suspectate ca i promotori de carcinogenez , precum i de o respingere cert a consumatorilor a aditivilor alimentari sintetici. Astfel, administrarea de antioxidan i naturali are o importan major i perspective benefice pronun ate în men inerea statutului redox normal al organismului.

Cianobacteriile, printre care i speciile genului *Nostoc*, de rând cu faptul c sunt cunoscute ca biofertilizatori, posed un poten ial imens în calitate de surse pentru producerea de antioxidan i care însumeaz enzime antioxidante, pigmen i, polizaharide func ionale, vitamine, compu i fenolici, etc. [6-11]. Valoarea cianobacteriilor ca surs de antioxidan i naturali este în continuare consolidat prin u urin a relativ de purificare a compu ilor int . Totodat , activitatea antioxidant pronun at a cianobacteriilor este datorat i distribu iei lor cosmopolite, de unde evolutiv au fost înzestrate cu mult mai multe mecanisme de men inere a viabilit ii decât orice alte organisme biologice.

În condi ii metabolice normale, cianobacteriile ca unicele procariote capabile de fotosintez produc în mod constant oxigen molecular, iar în procesul respira iei necesit prezen a acestuia ca acceptor final de electroni. Aceste procese redox sunt corelate cu formarea speciilor reactive de oxigen SRO (superoxid anionul O<sub>2</sub><sup>-</sup>, peroxidul de hidrogen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radicalul OH<sup>·</sup> i oxigenul singlet <sup>1</sup>O<sub>2</sub>), considerate drept produ i

inevitabili ai prezen ei oxigenului molecular în celul . În consecin , principalele surse generatoare de SRO la cianobacterii sunt lan ul fotosintetic i cel respirator transportor de electroni, i însu i fotosistemul I i fotosistemul II la nivelul membranelor tilacoidale. Orice condi ie fiziologic (de ex. vârsta culturii, exigen ele de mediu) ce induce un dezechilibru în ansamblul de reac ii produc toare de putere redus (NADPH) i de energie (ATP) va genera specii reactive de oxigen, iar efectul lor cumulativ va determina instalarea unui stres oxidativ.

Din moment ce starea redox a celulei i lan ul transportor de electroni moduleaz multe procese celulare esen iale, i SRO sunt o parte integrant a unor re ele de semnalizare, nivelul celular al diferitelor specii reactive de oxigen trebuie s fie bine controlat. Pentru a men ine statutul antioxidant pe parcursul cre terii i dezvolt rii, cianobacteriile adopt numeroase mecanisme care î i g sesc expresia în modific ri în antenele lor colectoare, evolu ia în tranzi iile de stare, schimb ri în stoichiometria PS II la PS I, disiparea excesului de energie pe cale non-fotochimic de c tre pigmen ii accesorii ca ficobiliproteine i, drept bariere mai avansate, enzime pentru detoxifiere, activarea unor gene, respectiv apari ia unor noi produse de biosintez implicate în rezisten i asigurarea supravie uirii [12-14].

Nu în ultimul rând, caracterele morfologice ale cianobacteriilor filamentoase (teaca mucopolizaharidic , hormogonii, achinetele, heterocistele) intervin ca i factori de adaptabilitate la condi iile de mediu i determin ini ierea proceselor de migrare (evadare) i motilitate, precum i apari ia unor compartimente caracteristice ce preiau anumite func ii când este afectat integritatea celular . În consecin , multitudinea de strategii întreprinse de cianobacterii pentru a stopa formarea ori propagarea SRO se reflect în activitatea biosintetic a culturii. Astfel, intensitatea sintezei componentelor cu ac iune antioxidant i antiradicalic se modific esen ial pe parcursul ciclului de dezvoltare a culturii. Raportul cantitativ al acestor principii biologice active determin caracterul ac iunii antioxidante a biomasei i respectiv a extractelor sau a preparatelor complexe ob inute în baza acestei biomase. În scopuri biotehnologice este foarte important stabilirea perioadelor de recoltare optime pentru ob inerea unui complex antioxidant eficient.

**Scopul** cercetarilor reflectate în acest articol const în monitorizarea evolu iei statutului antioxidant al cianobacteriei *Nostoc linckia* pe parcursul ciclului vital cu aplicarea testelor nespecifice de determinare a activit ii antioxidante.

### Materiale i metode

**Obiect al studiului** a fost tulpina cianobacteriei *Nostoc linckia* (Roth) Born et Flah CNM-CB-03 depozitat în Colec ia Na ional de Microorganisme Neapatogene a R. Moldova.

Mediu de nutri ie Gromov 6 optimizat cu urm toarea componen [15]:

macroelemente (g/l) -  $\text{KNO}_3$ -0,5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -0,45;  $\text{NaHCO}_3$ -0,05;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,1;  $\text{CaCl}_2$ -0,11.

microelemente (mg/l) -  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,05;  $\text{MnSO}_4$  - 2;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 0,85;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -2,25;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 4;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - 0,009; EDTA - 4,75.

Cultivarea a fost efectuat în baloane Erlenmayer cu men inerea urm torilor parametri: pH-ul 6,8-7,2, temperatura 25-27 °C, intensitatea luminii de 2000-3000 lx, agitare periodic lent . Cantitatea de inoculum a fost de 0,2 g/l în recalcul la BAU.

**Ob inerea extractelor.** Extractul hidric i cel alcoolic au fost ob inute prin extragere în apă i, respectiv, în alcool de 96 % reie ind din raportul biomas (g): extractant (ml) de 1,0/10.

**Determinarea capacit ii antiradicalice cu utilizarea radicalului DPPH.**

Radicalul DPPH (1,1 difenil-2-picril hidrazil de culoare violet ), utilizat în calitate de substrat, este redus prin adi ionare de atomi de hidrogen cu ob inerea de 1,1 difenil-2-picril hidrazil de culoare galben [16]. Concentra ia radicalului DPPH în solu ia de lucru, precum i durata reac iei sunt individuale i se determin pentru fiecare caz în parte în dependen de natura substan ei antioxidante i a solventului utilizat.

Reducerea valorilor extinc iei (% inhibi ie) a solu iei DPPH se calculeaz conform ecua iei: **% Inhibi ie**  $(Abs_{DPPH} - Abs_{PROBA})/Abs_{DPPH} * 100$ .

**Determinarea capacit ii antiradicalice cu utilizarea radicalului cation ABTS<sup>+</sup>.**

Metoda de testare a capacit ii antiradicalice cu aplicarea ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolin -6-acid sulfonic) este cunoscut i utilizat pe larg pentru stabilirea activit ii antioxidante a substan elor indiferent de natura lor [17]. În baza metodei date se determin activitatea antioxidant atât a substan elor pure, cât i a complexelor antioxidante. Radicalul ABTS<sup>+</sup> este generat prin oxidarea ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolin -6- acid sulfonic) cu persulfat de potasiu i este redus prin adi ionare de atomi de hidrogen. Formula de calcul este identic cu cea pentru testul DPPH.

### Rezultate i discu ii

Culturile microbiene statice sunt caracterizate prin stabilitatea ciclului vital, care poate fi reflectat în forma unui grafic – curba de cre tere. Cunoa terea evolu iei popula iei microbiene are o deosebit importan pentru stabilirea perioadelor de recoltare industrial atât a biomas ei, cât i a metaboli ilor primari i secundari. Productivitatea este unul din parametrii principali ce caracterizeaz cre terea i dezvoltarea cianobacteriilor. Pe reprezentarea grafic a dinamicii acumuli rii de biomas în cultura static de *Nostoc linckia* pot fi eviden iate fazele specifice, cunoa terea c rora are o importan major pentru biotehnologie (fig. 1).



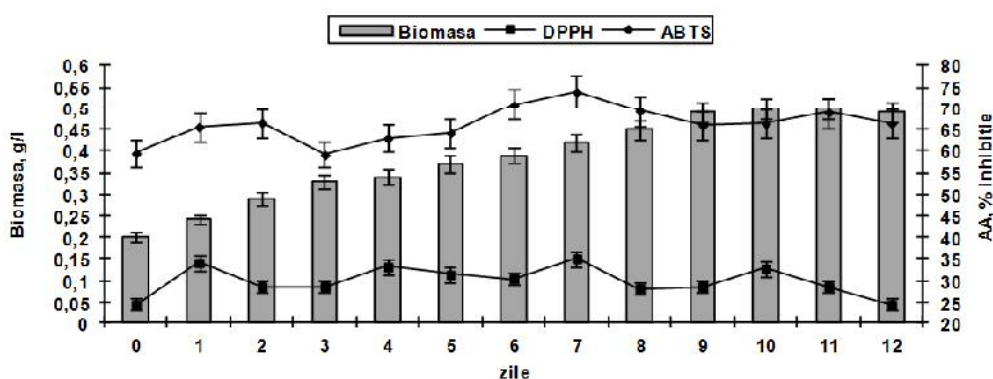
**Figura 1. Curba de cre tere la cianobacteria *Nostoc linckia*.**

Faza lag, în cursul cre iei are loc reprogramarea metabolic a culturii, este în cazul nostocului redus la limite imperceptibile, deoarece a fost utilizat un inoculum consistent, iar inocularea acestuia s-a facut în mediu de cultur identic cu cel în care a fost cultivat cultura din inoculum. Faza de laten , ca i faza de accelerare a ritmului de cre tere nu pot fi înregistrate ca fluctua ii a cantit ii de biomas .

Pentru cultura static de *Nostoc linckia* faza de multiplicare exponen ial este progresiv pîn la ziua 9 de cultivare, ceea ce presupune o cre tere a culturii la o rat constant pîn la epuizarea substan elor nutritive din mediu de cultivare. Pe curba de cre tere, la sfîr itul fazei exponen iale, se eviden iaz o perioad de încetinire a ritmului de cre tere a tulpinii, dup care cultura intr în faza sta ionar (rata de cre tere 0).

Ciclul vital al culturii statice de *Nostoc linckia* relev un model de cre tere caracteristic , iar durata optim din punct de vedere biotehnologic este de 12 zile. Modific rile cantitative ale biomasei pe parcursul ciclului vital sunt înso ite de schimb ri calitative importante. Pentru a monitoriza ce schimb ri intervin pe parcursul ciclului vital la nivelul activit ii biosintetice au fost efectuate testele nespecifice de determinare a activit ii antioxidante a extractelor etanolice i hidrice din biomasa de nostoc. Rezultatele testelor de activitate antioxidant reflect r spunsul antioxidant al culturii la cerin ele fiziologice pe parcursul ciclului vital.

Poten ialul antioxidant al extractelor din biomasa de nostoc a fost evaluat cu aplicarea a doi radicali nonbiologici DPPH<sup>•</sup> i ABTS<sup>•+</sup>. Reducerea radicalilor DPPH<sup>•</sup> i ABTS<sup>•+</sup>, care indic acumularea substan elor cu efect antioxidant, se face în baza mecanismului transferului de hidrogen (H<sup>•</sup>) i electroni (e<sup>-</sup>). Testul DPPH este aplicabil pentru a compara sau pentru a monitoriza evolu ia activit ii antioxidante în obiectele biologice ori pentru a determina eficien a tipului de solvent utilizat pentru a extrage componentele antioxidante. A fost stabilit c pe durata ciclului vital, valoarea activit ii antioxidante a frac iilor hidrosolubile din biomasa de nostoc oscileaz în limitele a 24-35 % inhibi ie radical DPPH<sup>•</sup> (fig. 2).



**Figura 2. Activitatea antiradicalic a extractelor hidrice din biomasa de *Nostoc linckia* pe parcursul ciclului vital.**

Activitatea antioxidant pentru extractele hidrice din biomasa de *Nostoc linckia* evaluat prin testul DPPH a înregistrat un nivel mediu de inhibi ie de aproximativ 28-30 % pe durata ciclului vital. Fluctua iile ce se produc pe parcursul perioadei de cultivare, determinate de o majorare sau o sc dere a procentului de inhibi ie de la aceste valori, eviden iaz necesitatea adapt rii culturii de nostoc în fazele de cre tere i, respectiv, r spunsul antioxidant al culturii la modific rile metabolice cauzate de procesele de cre tere i dezvoltare. Cele mai mari valori, de 33 - 35 % inhibi ie radical DPPH<sup>•</sup>, au fost înregistrate pentru extractele hidrice ob inute în zilele 4-7 ale ciclului de cultivare, ce caracterizeaz faza exponen ial de cre tere a nostocului considerat una

cu activitate biosintetic sporit . O reducere pronun at a radicalului DPPH în prima zi dup inocularea culturii (de la 24 % inhibi ie pân la 34 % inhibi ie), se explic prin activarea mecanismelor de adaptare metabolic la noile condi ii ale mediului. Faza de accelerare a ritmului de cre tere (ziua a 4-a) este marcat de o cre tere a inhibi iei radicalului DPPH de la 28,7 la 33 %, iar faza de încetinire a ritmului de cre tere care precede faza sta ionar (ziua a 8-a) se caracterizeaz prin sc derea nivelului de reducere a radicalului DPPH de la 35 % la 28,2 %. Totodat , la ziua a 10-a de cultivare, cînd cultura este pe platou, frac iile hidrosolubile au manifestat o inhibi ie de 32 % a radicalului DPPH. Modific rile produse în etapa de declin au influen at poten ialul antioxidant al biomasei i, ca rezultat, extractele hidrice ob inute la ziua a 12-a de cultivare au prezentat cele mai mici valori de 24 % inhibi ie radical DPPH.

A fost stabilit c rezultatele testului DPPH aplicat în studiul extractelor hidrice din biomasa de *Nostoc linckia* coreleaz cu fazele de cre tere. Valorile maxime ale testului DPPH au fost înregistrate în ziua 1 (faza lag), ziua 4 (faza de accelerare a ritmului de cre tere), ziua 7 (mijlocul fazei exponen iale) i ziua 10 (faza sta ionar ).

Astfel, prin salturi ale inhibi iei radicalului DPPH sunt marcate momentele cruciale în dezvoltarea culturii de nostoc – trecerea de la o condi ie fiziologic la alta. Rezultatele ob inute confirm faptul c testul DPPH reflect obiectiv modific rile statutului antioxidant a frac iilor hidrosolubile din biomasa nostocului.

Extractele hidrice ob inute în baza biomasei de nostoc au manifestat, de asemenea, o capacitate înalt de reducere a radicalului cation ABTS<sup>+</sup> pe durata întregului ciclul vital (fig. 2). Ca i în cazul testului DPPH, testul ABTS permite sesizarea fazei de laten la începutul ciclului vital. Astfel, extractele hidrice ob inute din biomasa de nostoc, colectat în prima i a doua zi de cultivare, au manifestat un nivel comparativ redus de inhibi ie a radicalului ABTS<sup>+</sup> (65 i 66 %, respectiv). Dup perioada de adaptare a culturii la condi iile noi de mediu se observ tendin a de sporire a activit ii antioxidante a extractelor hidrice din biomasa de nostoc, care atinge maximul în ziua 7 cu o valoare de 73,9 % inhibi ie radical ABTS<sup>+</sup>. De remarcat c valorile înregistrate în faza exponen ial de cre tere a cianobacteriei *Nostoc linckia* corespund cu rezultatele altor cercet tori, care au fost ob inute în screening-ul activit ii antioxidante a unor tulpini de cianobacterii i microalge. Astfel, a fost stabilit c extractele din *Nostoc muscorum* asigura un nivel de aproximativ 70 % inhibi ie radical ABTS<sup>+</sup> [1]. Cre terea activit ii antioxidante determinat prin testul ABTS, începînd cu ziua a 4-a de cultivare, este specific fazei de cre tere exponen ial , caracterizat prin intensificarea activit ii biosintetice i, respectiv, prin formarea de SRO, ceea ce intensific sinteza componentelor antioxidante. În faza sta ionar , extractele hidrice manifest o activitate antioxidant de 66-69 % inhibi ie radical ABTS. În continuare, a fost studiat activitatea antioxidant a extractelor etanolice ob inute din aceea i biomasa de nostoc pe durata ciclului vital. Testele DPPH i ABTS relev un nivel mai mic de reducere comparativ cu cel înregistrat de extractele hidrice, iar activitatea antioxidant nu este marcat de fluctua ii valorice importante pe parcursul fazelor de cre tere, cu excep ia cre terii activit ii în primele 24 h ce caracterizeaz momentul inocul rii culturii (Fig. 3).

În cazul testului DPPH, activitatea antioxidant a extractelor etanolice din biomasa de nostoc a înregistrat un procent mediu de inhibi ie de aproximativ 14-17 % pe durata ciclului vital.

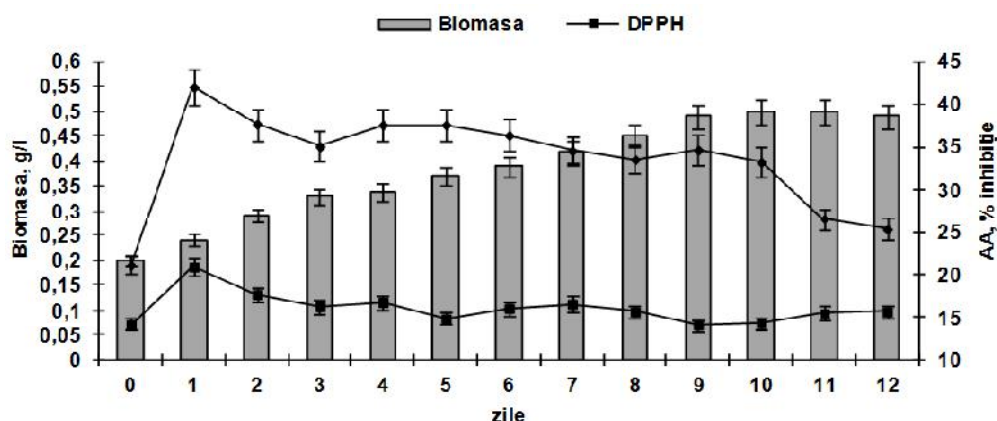


Figura 3. Activitatea antiradicalic a extractelor etanolice din biomasa de *Nostoc linckia* pe parcursul ciclului vital.

Valorile testului ABTS sunt cuprinse în limitele 33-37 % inhibiție în faza exponențial de creștere. Se observă o stabilitate a activității antioxidante prezentate de extractele etanolice din biomasa de *Nostoc linckia*. Prin urmare, ponderea componentelor antioxidante solubile în alcool poartă un caracter stabil și constant care nu ar depinde de etapa de dezvoltare a culturii statice. La etapa de inițiere a creșterii culturii, testele DPPH și ABTS reflectă o singură modificare evidentă pe parcursul creșterii are loc o creștere spectaculoasă în ziua 1 (cu 20 % în cazul testului ABTS), ce se explică prin aceleși mecanisme de adaptare metabolică ca urmare a inoculării culturii. Decalajul înregistrat în etapa de declin a culturii (26 % inhibiție radical ABTS) se explică prin activarea proceselor de deteriorare a componentelor celulare ca rezultat al îmbătrânirii culturii.

Rezultatele testelor pentru extractele etanolice nu sunt atât de informative, precum cele reflectate de aceste teste pentru extractele hidrice din biomasa de *Nostoc linckia*.

### Concluzii

Modificarea activității antioxidante a extractelor din biomasa de *Nostoc linckia* pe durata ciclului vital reflectă modificările fiziologice care au loc pe parcurs.

Rezultatele testelor DPPH și ABTS pentru extractele hidrice corelează cu fazele de creștere a culturii staționare de *Nostoc linckia*, sunt reprezentative în studiul activității antioxidante pe parcursul ciclului vital și permit evidențierea fazelor care nu pot fi depistate în mod evident prin modificări ale cantității de biomasă.

În scopul obținerii preparatelor cu efect antiradicalic din biomasa de *Nostoc linckia* este indicat de a efectua colectarea biomasei la etapele de trecere de la o fază la alta, când are loc o creștere a capacității de inhibiție a radicalilor liberi sau în faza de creștere exponențială când această activitate este constantă și stabilă.

Aplicarea testelor de reducere a radicalilor DPPH și ABTS<sup>+</sup> permite **explorarea eficientă** a potențialului antioxidant a obiectului biotehnologic în studiu, ca rezultat, propunerea unor scheme biotehnologice complexe de obținere a substanțelor bioactive cu efect antioxidant.

**Bibliografie**

1. Shanab SMM., Mostafa SSM., Shalaby EA., Mahmoud GI. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. //Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012, p. 608-615.
2. Ngo D.-H. et al. Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview. //Food Research International, 2011, V. 44, p. 523–529.
3. Plaza M., Cifuentes A., Ibanez E. In the search of new functional food ingredients from algae. //Trends in Food Science and Technology, 2008, V. 19, p. 31-39.
4. Cepoi L., Rudi L., Miscu V., Cojocari A., Chiriac T., Sadovnic D. Antioxidative activity of ethanol extracts from *Spirulina platensis* and *Nostoc linckia* measured by various methods. //Analele Universit ii din Oradea, 2009, V XVI/2, p. 43-48.
5. Li H. B., Cheng K. W., Wong C. C., Fan K. W., Chen F., Jiang Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. //Food Chemistry, 2007, V. 102, p. 771–776.
6. Gupta V., Ratha S. K., Sood A., Chaudhary V., Prasanna R. New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae) - Prospects and challenges. //Algal Research, 2013, V. 2, p. 79–97.
7. Desai S. H., Atsumi S. Photosynthetic approaches to chemical biotechnology. //Current Opinion in Biotechnology, 2013, V. 24, p. 81-86.
8. Gantar M., Simovic D., Djilas S., Gonzalez W. W., Miksovska J. Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycoyanin from *Limnothrix sp.* strain 37-2-1. //Journal of Biotechnology, 2012, V. 159, p. 21– 26.
9. Li H., Xu J., Liu Y., Ai S., Qin F., Li Z., Zhang H., Huang Z. Antioxidant and moisture-retention activities of the polysaccharide from *Nostoc commune*. //Carbohydrate Polymers, 2011, V. 83, p. 1821–1827.
10. Ji L. L., Cui G. Y., Zhao X. X. Antioxidant Activities of Phycobiliproteins Isolated from Wild *Nostoc Commune*. //Advances in Biomedical Engineering, 2011, Vol. 3-5, p. 34-43.
11. Pandey U., Pandey J. Enhanced production of biomass, pigments and antioxidant capacity of a nutritionally important cyanobacterium *Nostochopsis lobatus*. //Bioresource Technology, 2008, V. 99, p. 4520–4523.
12. Latifi A., Ruiz M., Zhang C. C. Oxidative stress in cyanobacteria. //FEMS Microbiology Reviews, 2009, V. 33, p. 258–278.
13. Foyer C. H., Noctor G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. //Plant, Cell and Environment, 2005, V. 28, p. 1056–1071.
14. Dietz K. J., Stork T., Finkemeier I., Lamkemeyer P., Li W. X., El-Tayeb M. A., Michel K. P., Pistorius E., Baier M. The Role of Peroxiredoxins in Oxygenic Photosynthesis of Cyanobacteria and Higher Plants: Peroxide Detoxification or Redox Sensing? Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment, 2008, Ch. 19, p. 303–319.
15. Cojocari A. Particularit ile fiziologo-biochimice i biotehnologice ale tulpinii *Nostoc linckia* (Roth) Born et Flah CNM-CB -03 surs de substan e bioactive. //Autoreferatul tezei de doctor în biologie, Chi in u, 2006, p. 1-26.
16. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. //Lebensmittel-Wissenschaft and Technologies, 1995, V. 28, p. 25-30.
17. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. //Free Radical Biology and Medicine, 1999, V. 26, p.1231-1237.