

## EFFECTUL STIMULATOR AL COMPUȘILOR COORDINATIVI AI CROMULUI(III) ASUPRA PRODUCTIVITĂȚII SPIRULINEI

Valeriu RUDIC<sup>\*\*</sup>, Aurelian GULEA<sup>\*</sup>, Valentina BULIMAGA, Daniela CIUMAC<sup>\*\*</sup>,  
Valeriu CIORNEA<sup>\*</sup>, Liliana ZOSIM, Alexei POPA

LCȘ „Fotomicrobiologie”

<sup>\*</sup>Catedra Chimie Anorganică și Fizică

<sup>\*\*</sup>Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

The action of some coordinative compounds of Cr(III) on *Spirulina* strain growth and development has been studied. High stimulation action of  $K_2[Cr(NTA)(C_2O_4)(H_2O)] \cdot 2H_2O$  and  $[K_2Cr_2(SO_4)_4] \cdot 12H_2O$  on *Spirulina* productivity has been established.

### Introducere

Cianobacteriile și microalgele prezintă interes din punct de vedere teoretico-aplicativ, constituind obiecte de studiu ideale pentru descifrarea mecanismelor moleculare ale fotosintezei, organizarea genomului procarior și analiza moleculară a aparatului de fixare a azotului molecular, eutrofizarea bazinelor acvatice, producerea toxinelor cianobacteriene, utilizarea lor ca sursă de azot, în agricultură, precum și ca sursă de substanțe valoroase pentru nutriția omului [6]. Fiind netoxică, *Spirulina platensis* este un reprezentat tipic al cianobacteriilor pe larg utilizată în diferite ramuri ale industriei alimentare, farmaceutice, cosmetologice, în zootehnie și în medicină. Numeroase cercetări au demonstrat capacitatea acestora de a se adapta la condițiile variabile ale mediului ambiant. Profitând de această adaptabilitate înaltă și de capacitatea înaltă de a acumula metalele biogene, spirulina este utilizată ca matrice în testarea diferiților compuși coordinativi. Astfel, a fost efectuată o serie întregă de cercetări care au demonstrat posibilitatea sporirii productivității acestei alge în cazul suplînirii mediului nutritiv cu unii compuși coordinativi și anorganici ai Fe, Zn, Co, Cu, Sn, Se, I [6-9]. Biomasa îmbogățită cu aceste microelemente esențiale poate fi utilizată în calitate de remediu nutraceutic. Carența microelementelor este tot mai des întâlnită și este pusă problema asigurării adecvate a populației cu microelemente esențiale. Microelementele trebuie să fie într-o stare ușor accesibilă pentru organismul uman [4,12].

În Republica Moldova se atestă o sporire a unor maladii, ca: diabet zaharat, cancer, anemie, osteoporoză, care apar ca urmare a acțiunii mediului ambiant poluat, a factorilor stresogeni, a alimentației incorecte ce induce schimbări în metabolism. Diabetul zaharat, cauzat de dereglări ale activității insulinei, provoacă patologii microvasculare, care preponderent atacă retina și rinichii. Este cunoscut că, datorită proprietăților multiple și complexe, cromul are un efect pozitiv asupra bolnavilor de diabet de tip II. Acest fenomen se datorează faptului că cromul (III) este cofactor al insulinei, sporindu-i activitatea. Testările unor preparate cu crom (de exemplu, cromul picolinat) asupra bolnavilor de diabet zaharat au demonstrat efectul lui benefic. Cromul duce la scăderea glicemiei [12,13].

S-a stabilit că cromul anorganic este toxic pentru plante și animale, iar investigațiile din ultimii ani au demonstrat că picolinatul de crom cauzează sterilitatea și poate induce formarea tumorilor cancerigene [13]. Sunt efectuate cercetări de obținere pe cale naturală a surselor alternative de crom legat în mod organic, prin convertirea compușilor anorganici ai Cr(III) în crom organic de către organismele vegetale (inclusiv microalge și cianobacterii) [2,3]. La etapele inițiale de testare a compușilor este necesar a stabili efectul acestor compuși asupra creșterii și dezvoltării organismelor testate (spirulina fiind unul dintre ele) pentru a stabili toxicitatea lor și posibilitatea de a le utiliza ca acumulatori de crom.

În legătură cu acest fapt a prezentat interes studiul acțiunii compușilor coordinativi ai cromului asupra procesului de acumulare a biomasei de spirulină cu conținut de crom.

### Material și metode

Obiectul cercetărilor expuse a fost tulpina cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-03(CYANOPHYTA), depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene de pe lângă Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM [5].

În calitate de reglatori ai creșterii și productivității, precum și ai activității biosintetice a *S. platensis* au fost utilizați 6 compuși coordinați ai Cr(III), care diferă după natura ligandului:  $[Cr(hedta)(H_2O)]^1$ ,  $[Cr(ur)_6](NO_3) \cdot 6H_2O$ ,  $[Cr(ur)_6]Cl_3 \cdot 3H_2O$ ,  $[Cr(adta)(H_2O_2)] \cdot 3H_2O$ ,  $[K_2Cr_2(SO_4)_4] \cdot 12H_2O$  sau  $K_2[Cr(NTA)(C_2O_4)(H_2O)] \cdot 2H_2O$ <sup>2</sup> în concentrații de 1,5,10,15,20,25 mg/l. Compușii au fost adăugați în trei moduri: în prima zi de cultivare, în a treia și pe rate  $-1/2$  din cantitate fiind administrată în prima zi de cultivare, iar restul în ziua a treia. Pentru cultivare s-a utilizat mediul nutritiv mineral Zarrouk. Cultivarea s-a efectuat în baloane Erlenmeyer a câte 250 ml cu 100 ml suspensie de spirulină, timp de 144 ore, respectându-se parametrii optimi ai cultivării pentru asigurarea biosintezei constituenților intracelulari ai spirulinei stabiliți în cercetările anterioare [6].

Compușii coordinați ai Cr(III) au fost sintetizați de către cercetătorii din laboratorul „Chimia Coordinativă” al USM, sub conducerea prof. univ. A. Gulea. Productivitatea spirulinei în a 6-a zi de cultivare s-a determinat fotocolorimetric cu recalculul masei celulare la biomasa absolut uscată (BAU) prin metoda descrisă [10].

### Rezultate și discuții

Interacțiunea metalelor cu celulele microorganismelor (drojdii, ciuperci, alge, bacterii) reprezintă o problemă complexă. Stabilirea căilor și a mecanismelor de absorbție a metalelor grele în mediul ambiant de către microorganisme reprezintă o prerogativă importantă ce ține de protejarea solului și apelor de poluarea cu metale grele [11]. Pe de altă parte, biomasa drojdiilor, clorelei și spirulinei este utilizată pe larg în calitate de matrice pentru obținerea biomasei îmbogățite cu metale bioactive, legate organic cu diferite componente celulare [2]. Biomasa obținută în așa mod este utilizată pe larg ca bioaditiv alimentar. *Spirulina platensis* este folosită cel mai frecvent datorită componenței sale biochimice valoroase, simplității cultivării, adaptabilității înalte și tehnologiilor avansate de prelucrare a biomasei [1]. În mod standard, spirulina este cultivată pe mediul Zarrouk cu o componență minerală balansată. Administrarea la mediul de cultivare a cantităților excesive de elemente chimice poate provoca dezechilibrul în: sistemul fotosintetic, diviziunea celulelor, procesele de creștere etc. Din cele menționate rezultă importanța selectării compușilor și a concentrațiilor utilizate în așa mod încât să nu fie perturbate procesele vitale.

Rezultatele influenței compușilor coordinați ai cromului (III) asupra productivității cianobacteriei *Spirulina platensis* sunt prezentate în figurile 1-3. În cazul utilizării compusului  $[Cr(hedta)(H_2O)]$  o acumulare maximă a bioamasei se observă la adăugarea a 5-10 mg/l în prima zi de cultivare (Fig.1). Productivitatea spirulinei în a 7-a zi de cultivare este de 1,22-1,24 ori mai mare față de proba de referință. Aproximativ aceleași rezultate vor fi obținute, dacă la mediul standard de cultivare a spirulinei se adaugă 10-15 mg/l de  $[Cr(ur)_6](NO_3) \cdot 6H_2O$  în prima zi de cultivare sau 10, 20 mg/l pe rate, sau 5mg/l de  $[Cr(ur)_6]Cl_3 \cdot 3H_2O$ ; astfel, productivitatea sporește în limitele de 122-126% față de proba de referință. Administrarea a 15 mg/l pe rate a  $[Cr(ur)_6](NO_3) \cdot 6H_2O$  a permis o majorare a productivității de 1,37 ori față de proba martor. Această majorare poate fi explicată de acțiunea complexă a mai multor factori. Sporirea productivității poate fi cauzată de sporirea intensității fotosintezei. Aparatul fotosintetic al cianobacteriilor este format preponderent din pigmenți ca clorofila, luteina,  $\beta$ -carotenul, aloficocianina și ficocianina. A fost demonstrată capacitatea spirulinei de a utiliza substratul organic; dar, în acest caz nu a fost atestată o sporire a productivității și a conținutului de pigmenți. Astfel, utilizarea mediului heterotrofic nu este binevenită pentru obținerea unor substanțe bioactive. Însă, culturile mixotrofe au putut fi aplicate pentru obținerea pigmenților bioactivi. Astfel încât utilizarea culturilor mixotrofe a condus la mărirea ratei productivității egală cu suma productivității obținute în cazul cultivării spirulinei pe medii autotrofe sau heterotrofe [14]. Conținutul de ficocianină și aloficocianină sporește la cultivarea spirulinei în prezența glucozei; totodată, utilizarea la acest mediu a seleniului permite obținerea unei biomase îmbogățite cu selen [16]. Cultivarea spirulinei pe medii ce conțin uree și cu intensitatea de 3500 lx duce la stabilirea unui raport optim între productivitate și conținutul de clorofilă. Totuși, a fost remarcată o relație direct proporțională între concentrația de uree și cea de clorofilă. Astfel încât, la administrarea a 500 mg/l de uree conținutul de clorofilă sporește în biomasă de spirulină [15]. Utilizarea clorurii de amoniu în calitate de sursă de azot limitează creșterea și dezvoltarea spirulinei la concentrații mici. Acest tip de inhibare nu a fost remarcat la administrarea ureei, posibil datorită hidrolizei enzimatică a acestui compus de către urează, care controlează concentrația de amoniu în celulă [17]. Majorarea productivității poate fi explicată prin faptul că în cadrul compușilor complecși testați un component de bază este ureea care, în urma metabolizării, duce la sporirea activității fotosintetice și, respectiv, a productivității.

<sup>1</sup> hedta – acid N-hidroxietyl-ethilenediamin-triacetic,

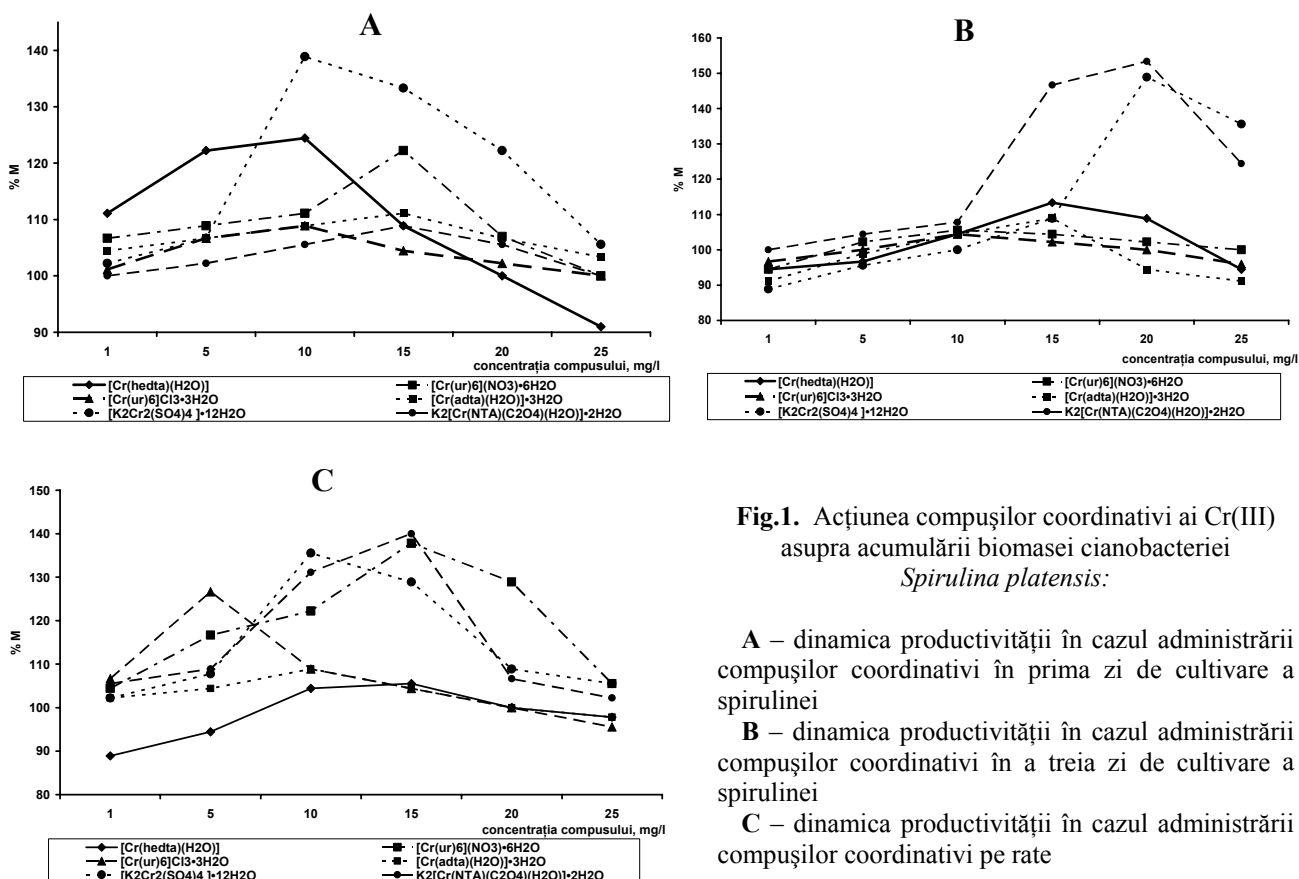
<sup>2</sup> NTA – acidul nitrilotriacetic

Rezultatele cele mai bune au fost obținute la cultivarea spirulinei în prezența compușilor  $[K_2Cr_2(SO_4)_4] \cdot 12H_2O$  și  $K_2[Cr(NTA)(C_2O_4)(H_2O)] \cdot 2H_2O$  (Fig.2-3). Astfel, la utilizarea a 20-25 mg/l  $[K_2Cr_2(SO_4)_4] \cdot 12H_2O$  în a treia zi de cultivare productivitatea sporește de aproximativ 1,35-1,48 ori față de proba de referință.

O valoare maximă a productivității, de 1,53 de ori mai mare decât proba martor, a fost obținută la inocularea a 20 mg/l  $K_2[Cr(NTA)(C_2O_4)(H_2O)] \cdot 2H_2O$  în a treia zi de cultivare. Presupunem că creșterea algei a fost indusă de cantitatea sporită de carbon organic cu masă moleculară mică din componența ligandului. Putem presupune că sporirea productivității la adăugarea compusului în a treia zi de cultivare se datorează faptului că tulpina se află în faza exponențială de creștere, compusul nu manifestă un efect toxic ca la adăugarea lui în prima zi de cultivare (când poate induce un stres pentru alga inoculată aflată în faza lag de creștere). Totodată natura ligandului determină sporirea productivității prin majorarea componentelor ce determină fotosinteza. O dată cu pătrunderea sferei interne în cadrul celulei, după acțiunea hidrolazelor, ionul de NTA este metabolizat până la nivel de glioxilat, glicină și, ulterior, serină. Aminoacizii, la rândul lor, în urma procesului de transaminare, sunt transformați în acid  $\delta$ -aminolevulonic – parte componentă a ciclului de sinteză a clorofilei și ficobiliproteinelor. Pe de altă parte, restul de oxalat participă la formarea cetoacizilor absolut necesari în procesul de sinteză a carotenoizilor și mixoxantofiei. Complexitatea compusului, precum și ziua suplínirii acestuia stau la baza majorării productivității.

### Concluzii

- Tulpina *Spirulina platensis*, datorită proprietăților sale, reprezintă un important obiect al studiului în microbiologia aplicativă și teoretică;
- Selectarea compușilor coordinați ai cromului (III) a permis determinarea compușilor coordinați ce sporesc rata acumulării proteinei, cu stabilirea efectului maxim pentru compușii coordinați testați ce crește în șirul următor:  $[Cr(adta)(H_2O)_2] \cdot 3H_2O < [Cr(hedta)(H_2O)] < [Cr(ur)_6]Cl \cdot 3H_2O < [Cr(ur)_6](NO_3) \cdot 6H_2O < [Cr(ur)_6]Cl_3 \cdot 3H_2O < [K_2Cr_2(SO_4)_4] \cdot 12H_2O < K_2[Cr(NTA)(C_2O_4)(H_2O)] \cdot 2H_2O$ ;
- Investigațiile efectuate au demonstrat eficacitatea compușilor  $K_2[Cr(NTA)(C_2O_4)(H_2O)] \cdot 2H_2O$  și  $[K_2Cr_2(SO_4)_4] \cdot 12H_2O$  în sporirea productivității.



**Fig.1.** Acțiunea compușilor coordinați ai Cr(III) asupra acumulării biomasei cianobacteriei *Spirulina platensis*:

A – dinamica productivității în cazul administrării compușilor coordinați în prima zi de cultivare a spirulinei

B – dinamica productivității în cazul administrării compușilor coordinați în a treia zi de cultivare a spirulinei

C – dinamica productivității în cazul administrării compușilor coordinați pe rate

## Referințe:

1. Cogne G., Lehmann B., Dussap C.-G., Gros J.-B. Uptake of macrominerals and trace elements by the cyanobacterium *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis* PCC8005) under photoautotrophic conditions: culture medium optimization // *Biotechnol. Bioeng.* - 2003. - No81(5). - P.588-593.
2. Cossich E.N., Tavares C.R., Ravagnani T.M. Biosorption of chromium (III) by *Sargassum sp.* Biomass // *EJB.* - 2002. - No5(2). - P.133-140.
3. Hamdy A.A. Biosorption of heavy metals by marine algae // *Curr Microbiol.* - 2000. - No41(4). - P.232-238.
4. Kahn Z., Bhadouria P., Bisen P. Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina platensis* // *Curr. Pharm. Biotechnol.* - 2005. - No6(5). - P.373-379.
5. Rudic V., Șalari V., Obuh P. Tulpina *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. Calu-835 - producător de biomasă. Brevet de invenție nr. 169(MD) // *BOPI.* - 1995. - Nr.3.
6. Rudic V. Aspecte noi ale biotehnologiei. - Chișinău, 1993, p.140.
7. 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 International conference on "Microelectronics and Computer Science". - Chisinau, 2005, p.288-291.
8. Rudic V., Bulimaga V., Chiriac T., Ghelbet V., Turtă V., Șova V., Mereacre V., Prodius D., Ciumac D. Productivitatea și activitatea biosintetică a tulpinii cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-03 la cultivarea în prezența unor compuși coordinați noi ai Fe(II) // *Analele Științifice ale USM. Seria „Științe chimico-biologice”.* - Chișinău: CEP USM, 2005, p.183-186.
9. Rudic V., Bulimaga V., Chiriac T., Gulea A., Șova S., Ciumac D., Levițchi A. Productivitatea și componența biochimică a cianobacteriei *Spirulina platensis* la cultivarea în prezența unor compuși ai Se(IV) // *Analele Științifice ale USM. Seria "Științe chimico-biologice".* - Chișinău: CEP USM, 2002, p.165-167.
10. Rudic V., Gudumac V., Gulea A. Metoda de determinare a biomasei absolut uscate de spirulină. Brevet de invenție, nr. 1078/92.08.788(RO) // *Buletin de Invenții și Mărci.* - 1997. - Nr.6.
11. Terry N. and Banuelos G. Phytoremediation of contaminated soil and water. - New York: Lewis publishers, 2000. - 389 p.
12. Trace elements in human nutrition and health. - Geneva: World Health Organization, 1996.
13. Vincent J.B. The biochemistry of chromium // *Nature.* - 2000. - No130. - P.715-718.
14. Katarzyna C., Andrzej N. Evaluation of spirulina growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures // *Enzyme Microbiol Technol.* - 2004. - No34. - P.461-465.
15. Rangel-Yagui C de O., Danesi E.D., de Carvalho J.C., Sato S. Chlorophyll production by *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process // *Bioresour Technol.* - 2004. - No92(2). - P.133-141.
16. Chen T., Zheng W., Wong YS., Yang F., Bai Y. // *Bioresour Technol.* - 2006. - No97(18). - P.2260-2265.
17. Converti A., Scapazoni S., Lodi A., Carvalho J. // *Ind. Microbiol. Biotechnol.* - 2006. - No33(1). - P.8-16.

Prezentat la 18.01.2007