

CZU: 582.232:581.19:546-31

**STUDIUL COMPARATIV ASUPRA ACUMULĂRII STRONȚIULUI, CUPRULUI ȘI
FIERULUI LA CULTIVAREA CIANOBACTERIEI *SPIRULINA PLATENSIS*
ÎN PREZENȚA UNOR HETEROCOMPUȘI COORDINATIVI**

Valentina BULIMAGA, Valeriu RUDIC*, Liliana ZOSIM, Vasile LOZAN,
Viorina GORINCIOI**, Maria-Bianca BULIMAGA, Maria MACARI**

*Universitatea de Stat din Moldova,
*Institutul de Microbiologie și Biotehnologie,
**Institutul de Chimie*

A fost studiată influența a doi heterocompuși coordinativi ai Sr(II) și Cu(II) – CuSr1 și CuSr2 asupra productivității spirulinei și acumulării stronțului, cuprului și fierului în biomasă. S-a stabilit că ambii compuși coordinativi în limitele de concentrații 1-7 mg/l manifestă un efect stimulator asupra productivității, cu o tendință de diminuare mai accentuată la concentrațiile de 7-9 mg/l în cazul utilizării compusului CuSr2 cu conținut de acid metil salicilic protonat. Cantitățile de Cu și Sr acumulate în biomasa de spirulină cresc cu majorarea concentrației, cu un conținut mai înalt al acestor elemente în cazul utilizării compusului CuSr1, atingând valori maxime de 1,59 mg% Cu și 1,66-1,70 mg% Sr, sau de cca 1,5 și 1,2 ori mai mult, respectiv, comparativ cu conținutul acestora înregistrat pentru compusul CuSr2. Ambii heterocompuși contribuie la acumularea mai eficientă în biomasă a fierului din mediul de cultivare (până la 25-26,3 mg%), comparativ cu proba de referință fără adaos de compuși (11,5 mg% Fe).

Cuvinte-cheie: *Spirulina platensis, heterocompuși coordinativi, stronțiu, cupru, acumulare.*

**COMPARATIVE STUDY ON THE ACCUMULATION OF STRONTIUM, COPPER,
AND IRON UPON CULTIVATION OF *SPIRULINA PLANTENSIS* IN PRESENCE
OF COORDINATIVE HETEROCOMPOUNDS**

The influence of two coordinative hetero-compounds of Sr(II) and Cu(II) – CuSr1 and CuSr2 – on the productivity and the accumulation of strontium, copper and iron in *Spirulina platensis* biomass was studied. It has been established that both hetero-complexes exhibit a stimulating effect on productivity within the concentration limits of 1-7 mg/l, whereas a more pronounced decreasing trend is observed at concentrations of 7-9 mg/l when using the CuSr2 hetero-compound, which contains protonated methyl salicylic acid. The quantity of Cu and Sr accumulated in spirulina biomass increases with the concentration of these elements for CuSr1, reaching maximum values of 1.59 mg% Cu and 1.66-1.70 mg% Sr, or about 1.5 and 1.2 times more, respectively, compared to their content for CuSr2. Both hetero-compounds contribute to the more efficient accumulation of iron from the growth medium (up to 25-26.3 mg%), compared to the reference sample (11.5 mg% Fe) without addition of compounds.

Keywords: *Spirulina platensis, coordinative heterocompounds, strontium, copper, accumulation.*

Introducere

Deficiența nutrițională și carența microelementelor în organismul uman au drept consecință instalarea unor afecțiuni, ca anemia, osteoporoza, multiple perturbări metabolice, dar și apariția defectelor în răspunsul imun. Rata de asimilare a microelementelor de către organismul uman este strâns legată de forma în care elementul este disponibil (dizolvată, complexată). Astfel, în ultimii ani se pune problema obținerii unor produse nutraceutice și preparate medicamentoase care ar conține microelemente complexate cu compuși organici. Numeroase studii efectuate în ultimele decenii au demonstrat că cianobacteria *Spirulina platensis* poate acumula microelemente intracelular, iar biomasa ei devine o sursă atractivă pentru producerea unor noi produse nutraceutice și remedii medicamentoase polivalente [1-4].

Interesul cercetătorilor față de stronțiu se datorează în special analogiei lui cu calciul. Deși stronțiu este considerat un oligoelement neesențial, el posedă numeroase beneficii pentru sănătatea omului. Unele studii au demonstrat că stronțiu poate îmbunătăți starea de sănătate a oaselor și a dinților determinată de prevenirea reabsorbției osoase și reducerea pierderii masei osoase în osteoporoză [5]. Stronțiu contribuie la reducerea intensității durerii în osteoartrite, stimulează formarea colagenului și a cartilajului în articulații și poate promova în ansamblu absorbția altor minerale [6-8]. Absorbția și incorporarea stronțului în masa osoasă este similară cu cea a calciului. S-a stabilit că 25-30% din Sr administrat este absorbit prin tractul gastrointestinal, iar 99,1%

din acesta este distribuit în țesuturile mineralizate (oase, cartilaje) [9,10]. Un studiu efectuat de Mirza și al. a demonstrat o creștere a densității minerale a oaselor (DMO) la trei pacienți cu osteoporoză care au administrat citrat de stronțiu [8].

Un alt element indispensabil formării țesutului conjunctiv, inclusiv a colagenului, este cuprul. S-a observat că fracturile oasoase, malformațiile de schelet și osteoporoza sunt mai frecvente atunci când există un deficit de cupru. Un rol important revine acestui element și în prevenirea anemiei. Deși se cunoaște că anemia este cauzată de carența de fier, s-a dovedit că și cuprul are un rol important în prevenția acestei afecțiuni. Cuprul ajută la trecerea fierului într-o formă pe care organismul o poate folosi (formă ferică) și intră în componența unor enzime care transportă fierul de la și către țesuturi [11,12].

Astfel, prezintă interes utilizarea cianobacteriilor la bioconversia stronțiului și a cuprului pentru obținerea biomasei îmbogățite cu aceste microelemente incluse în compuși organici. Suplimentele alimentare cu conținut de stronțiu și cupru obținute în baza biomasei de spirulină ar putea fi aplicate la tratarea osteoporozei, fără efecte adverse asupra organismului uman.

În șirul ideilor expuse, *scopul cercetărilor* efectuate rezidă în studierea acțiunii unor heterocompuși coordinați ai Sr(II) și Cu(II) asupra productivității cianobacteriei *Spirulina platensis* și a acumulării în biomasă a stronțiului, cuprului și fierului.

Material și metode de cercetare

Obiectul de studiu l-a constituit tulpina cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02 – sursă de substanțe bioactive depozitată în Colecția Națională de Organisme mepatogene din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM.

Cultivarea biomasei de spirulină. Cultivarea a fost efectuată în decurs de 6 zile la 3500 lucși pe mediul modificat Zarrouk cu următoarea compoziție (g/l):

NaNO ₃ – 2,5	MnCl ₂ ·4H ₂ O – 1,81
NaHCO ₃ – 8	CuSO ₄ 5H ₂ O – 0,08
K ₂ SO ₄ – 1	ZnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,22
NaCl – 1	MoO ₃ – 0,015
MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,2	H ₃ BO ₃ – 2,86
Na ₂ HPO ₄ – 0,2	Fe EDTA – 1 ml/l
CaCl ₂ – 0,04	

În fiecare zi au fost luate mostre de spirulină și măsurată productivitatea. A fost testată acțiunea asupra productivității cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02 a doi compuși coordinați heteronucleari ai Sr(II) cu Cu(II) – CuSr(C₆H₄(OH)COO)₄(C₄H₉NO)₄(H₂O)] și [CuSr(C₆H₃(OH)(CH₃)(COO)₄(C₄H₉NO)₄(H₂O)]. În calitate de liganzi au servit acidul salicilic mono-deprotonat (C₆H₄OHCOO⁻), acidul metil salicilic mono-deprotonat (C₆H₃(OH)(CH₃)COO⁻) și dimetilacetamida (C₄H₉NO). Compușii coordinați CuSr1 și CuSr2 au fost sintetizați după metoda descrisă în [13], în cazul compusului CuSr2 acidul salicilic a fost înlocuit cu acidul 5-metilsalicilic.

Compușii au fost suplimentați în a 2-a zi de cultivare în concentrații de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 și 9 mg/l. Determinarea stronțiului, cuprului și fierului în biomasă a fost efectuată cu ajutorul spectrometrului de emisie (Thermo Scientific iCAP 6200 ICP emission spectrometer).

Rezultate și discuții

Influența unor compuși ai stronțiului asupra creșterii microorganismelor a fost studiată de mai mulți autori. Astfel, conform datelor raportate la nivel internațional, a fost stabilit că unele plante, fungi și alge au proprietatea de a acumula stronțiu și alte metale grele, contribuind la depoluarea solurilor și apelor contaminate [14–20]. Rezultatele descrise de unii autori, utilizând ca model ciuperca filamentoasă *Neurospora crassa*, indică faptul că mecanismele implicate în procesul de absorbție a stronțiului depind de capacitatea biosorbivă și, de asemenea, de răspunsul fiziologic la condițiile externe. Există mai multe proteine cu capacitatea de a lega calciul raportate în cazul *N.crassa* și al altor ciuperci. Aceste proteine sunt activate de către calciu și au locuri specifice de legare pentru calciu [21,22]. Posibil că acumularea stronțiului are loc analogic.

A fost investigată influența administrării unor acizi grași la mediul de cultivare a drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* cu rol de modificare a compoziției membranei plasmatică asupra acumulării stronțiului în celule.

Cultivarea *S. cerevisiae* în prezența acidului linoleic cu concentrația de 1 mM a contribuit la o rată de acumulare intracelulară a stronțiului de circa două ori mai mare față de cea acumulată în cazul *S.cerevisiae* crescută fără supliment de acid gras [19].

Totuși, datele experimentale referitoare la efectul compușilor stronțiului asupra productivității și compoziției chimice a cianobacteriilor sunt într-un număr limitat [18]. În cazul cianobacteriei *Spirulina platensis* este raportat doar un studiu în care au fost testați unii compuși coordinați ai Sr(II) și Cu(II) [23].

Rezultatele cercetărilor noastre referitoare la efectul unor heterocompuși coordinați ai Sr(II) și Cu(II) asupra productivității și acumulării cuprului și stronțiului în biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* sunt prezentate mai jos (Fig.1 și Fig.2). Productivitatea este un indice important al stării fiziologice a cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02, care se modifică rapid în funcție de condițiile de cultivare. Astfel, pentru a testa efectul asupra creșterii și dezvoltării cianobacteriei *Spirulina platensis* a doi heterocompuși coordinați – CuSr1 și CuSr2, cu formulele $[\text{CuSr}(\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})\text{COO})_4(\text{C}_4\text{H}_9\text{NO})_4(\text{H}_2\text{O})]$ și $[\text{CuSr}(\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})(\text{CH}_3)(\text{COO})_4(\text{C}_4\text{H}_9\text{NO})_4(\text{H}_2\text{O})]$, au fost evaluate valorile productivității spirulinei la cultivare în prezența acestora în decurs de 6 zile (Fig.1 a, b).

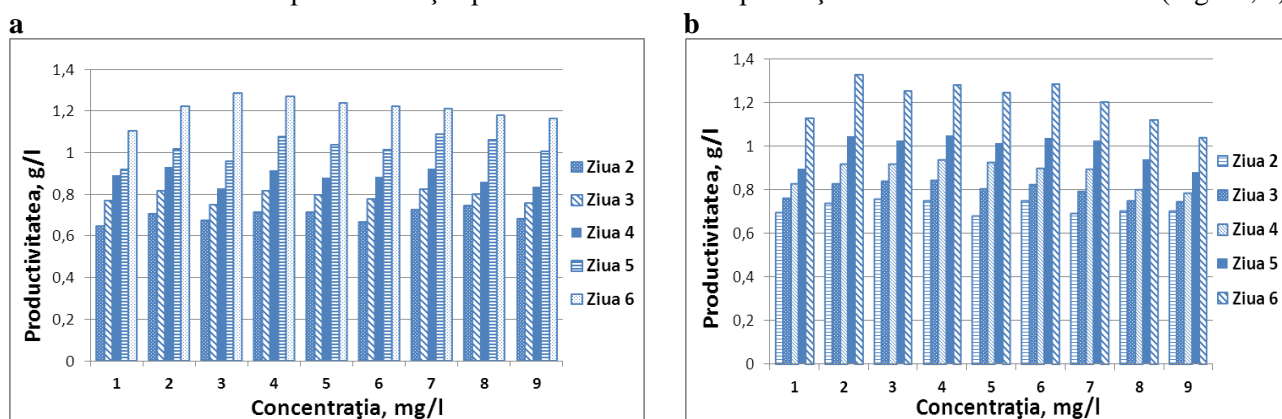


Fig.1. Dinamica productivității cianobacteriei *Spirulina platensis* la cultivare în prezența heterocompușilor coordinați ai Cu(II) și Sr(II): a) CuSr1 și b) CuSr2 ($p \leq 0,05$).

Analizând rezultatele obținute, observăm că valorile productivității variază în funcție de concentrația compusului coordinațiv și crește cu durata de cultivare. *Spirulina* a demonstrat o creștere diferită, atingând valori maxime în ziua a 6-a, iar cu majorarea concentrației compușilor coordinați Cu(II) și Sr(II) ce depășesc 6 mg/l productivitatea are tendința de diminuare pentru ambii compuși, cu un efect mai accentuat în cazul utilizării CuSr2.

În probele de spirulină obținute la cultivare în prezența compușilor menționați mai sus a fost determinat conținutul de stronțiu și de cupru acumulat în biomasa recoltată după a 6-a zi de cultivare (Fig.2 a, b).

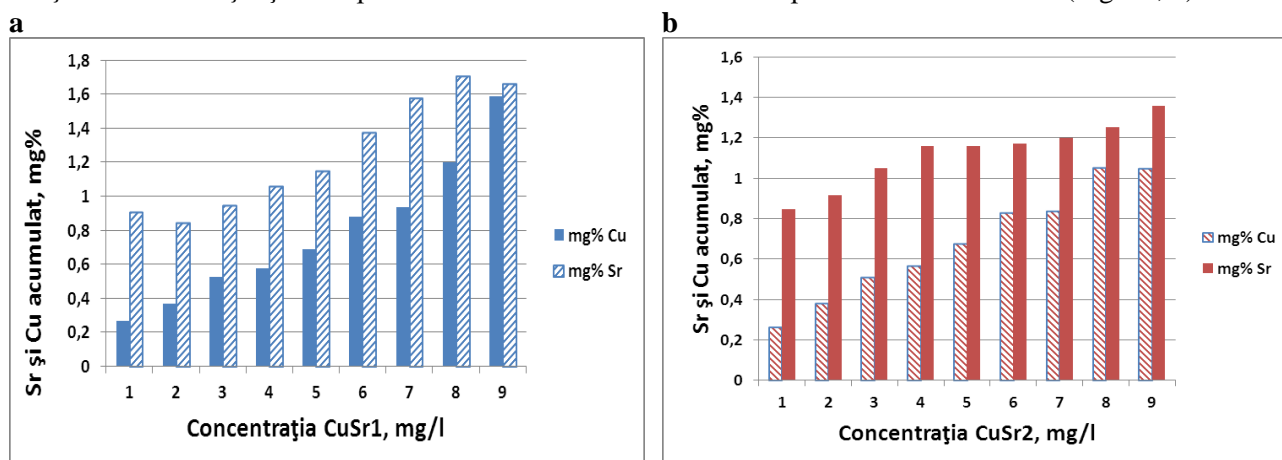


Fig.2. Conținutul de cupru și de stronțiu acumulat în biomasa de spirulină la cultivare în prezența compușilor coordinați micști: a) CuSr1 și b) CuSr2.

Se observă creșterea conținutului ambelor elemente cu majorarea concentrației compușilor în mediu, cu o acumulare mai accentuată a elementelor în cazul compusului CuSr1, atingând valori maxime de 1,59 mg% Cu

și de 1,66-1,70 mg% Sr, sau de 1,5 și 1,2 ori mai mult cupru și stronțiu, respectiv, comparativ cu cel înregistrat pentru compusul CuSr2.

Cu toate că compușii testați nu includ în componența lor fierul, care este un element strict necesar pentru creșterea și dezvoltarea cianobacteriei *Spirulina platensis*, a prezentat interes acumularea acestuia în biomasa de spirulină, întrucât, conform unor studii întreprinse anterior, se presupune că stronțiul ar putea facilita transportul membranelor și al altor metale. Acest fapt ar putea fi legat de hiperpolarizarea membranei plasmatică în prezența ionilor de Sr, fapt confirmat de cercetările unor autori [16].

Mediul modificat Zarrouk, în care a fost cultivată spirulina, include în componența sa fierul în formă complexată (FeEDTA – 15,14 mg/l sau 0,044 mmoli/l). Rezultatele cercetărilor noastre anterioare au scos în evidență faptul că la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* în prezența unor compuși coordinați ai Fe(III), precum și a citratului de fier, are loc acumularea fierului în biomasa în cantități sporite de până la 1,2% BAU. Cantitatea de fier acumulată în biomasa depinde de natura compusului coordinațiv administrat, de concentrația lui și termenul de administrare a acestuia, precum și de durata de cultivare [24, 3].

Rezultatele studiului influenței heterocomplexelor Cu (II) și Sr(II) asupra acumulării fierului în biomasa de spirulină demonstrează că în prezența ambilor compuși se acumulează o cantitate mai înaltă de fier în biomasa (Fig.3), comparativ cu proba de referință fără adaos de compuși. La concentrații de 1-3 mg/l conținutul fierului acumulat în cazul CuSr2 depășește de 1,17-1,34 ori valorile obținute la utilizarea compusului CuSr1, iar cu majorarea concentrației nivelului de fier acumulat în ambele cazuri diferă neesențial. Conținutul acestui element la concentrația de 7 mg/l atinge valorile maxime, egale cu 26,31 și 25,1 mg% din biomasa pentru CuSr1 și CuSr2, respectiv, iar la concentrații mai înalte rămâne la nivelul de cca 25-25,5 mg%, sau de cca 2,2- 2,4 ori mai mare față de proba de referință.

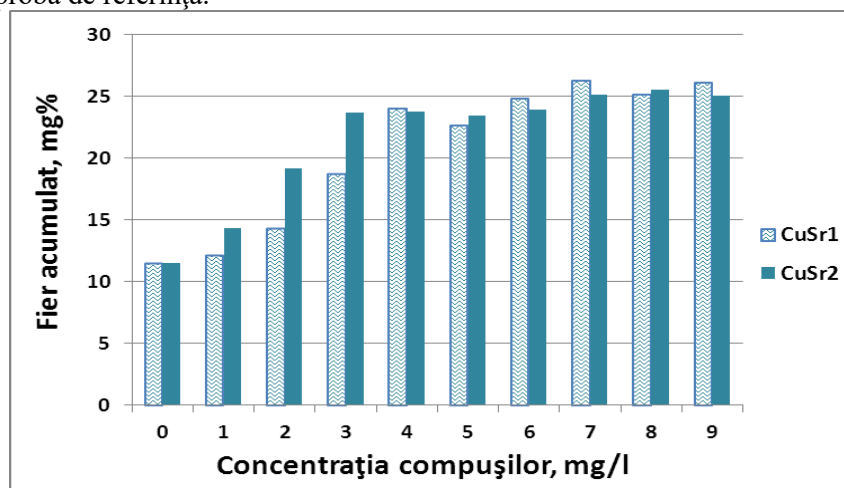


Fig.3. Conținutul de fier acumulat în biomasa de spirulină la cultivare în prezența compușilor coordinațivi micști:
a) CuSr1 și b) CuSr2.

Rezultatele obținute în urma studiului influenței a doi heterocompuși coordinațivi ai Sr(II) și Cu(II) – CuSr1 și CuSr2 – asupra productivității spirulinei și acumulării stronțiului, cuprului și fierului în biomasa permit a concluziona următoarele:

- Valorile productivității variază în funcție de concentrația heterocompusului coordinațiv și cresc cu durata de cultivare. S-a stabilit că compușii CuSr1 și CuSr2 în limitele de concentrații utilizate manifestă un efect pozitiv moderat asupra productivității cianobacteriei *Spirulina platensis*, care are o tendință de diminuare mai accentuată la concentrațiile de 7-9 mg/l în cazul utilizării CuSr2.
- Conținutul de Cu și Sr acumulat în biomasa de spirulină crește cu majorarea concentrației, cu un conținut mai înalt al acestor elemente în cazul compusului CuSr1, atingând valori maxime de 1,59 mg% Cu și de 1,66-1,70 mg% Sr, sau de cca 1,5 și 1,2 ori mai mult cupru și stronțiu, respectiv, comparativ cu conținutul acestora înregistrat pentru compusul CuSr2.
- La cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* în prezența compușilor coordinațivi CuSr1 și CuSr2 are loc acumularea mai eficientă a fierului din mediul de cultivare (până la 25-26,3 mg%), comparativ cu proba de referință (11,5 mg% Fe), fără adaos de compuși.

Referințe:

1. CEPOI, L., CHIRIAC, T., RUDI, L., DJUR, S., ZOSIM, L., BULIMAGA, V., BATIR, L., ELENCIUC, D., RUDIC, V. Spirulina as a raw material for products containing trace elements. In: CHOJNACKA, K., SAEID, A., eds. *Recent Advances in Trace Elements*, First Edition. John Wiley & Sons Ltd., 2018, p.403-420. doi:10.1002/9781119133780.
2. RUDIC, V. et al. *Ficobiotehnologie, cercetări fundamentale și realizări practice*. Chișinău: S.n., Tipogr. „Elena V.I.” SRL, 2007. 365 p. ISBN 978-9975-9892-5-1
3. ZOSIM, L. *Biotehnologia cultivării spirulinei și obținerii produselor cu conținut prognozat de fier și alte substanțe bioactive valoroase*: Autoref. tezei de dr. șt. biologice. Chișinău, 2007. 22 p.
4. АЛЕШКО-ОЖЕВСКИЙ, Ю., ЗИЛОВА, И., МАЗО, В. *Spirulina platensis* – перспективный пищевой источник эссенциальных микроэлементов. В: *Вестник новых медицинских технологий*, 2002, том 9, №1, с.3-10.
5. LEDUC, C. *Actualisation des traitements sur l'ostéoporose. Mise en place d'un programme d'éducation thérapeutique sur l'ostéoporose au CHR de Metz et de son suivi en milieu ambulatoire auprès des médecins traitants et des pharmaciens d'officine* : These de Docteur en Pharmacie, Université de Lorraine, 2013.
6. CASHMAN, K. Diet, nutrition, and bone health. In: *J. Nutr.*, 2007, vol.137, no.11, Suppl., p.2507-2512.
7. RODRIGUES, T., DE OLIVEIRA FREIRE, A., CARVALHO, H. et al. Prophylactic and therapeutic use of strontium ranelate reduces the progression of experimental osteoarthritis. In: *Front. Pharmacol.*, 2018, Article 975, p.1-9.
8. MIRZA, S., AZIM, S., BHARGAVA, A. Change in bone mineral density with strontium citrate: An illusion or reality. In: *Nutrition Health Food Science*, 2016, vol.4, no.3, p.1-3.
9. APOSTOAEI, A. Absorption of strontium from the gastrointestinal tract into plasma in healthy human adults. In: *Health Phys.*, 2002, vol.83, no.1, p.56-65.
10. BOIVIN, G, DOUBLIER, A, FARLAY D. Strontium ranelate – a promising therapeutic principle in osteoporosis. In: *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2012, vol.26, no.2, p.3153-3156.
11. CHITU, C. *Cuprul și rolul sau in organsim*, 2008 <https://healthy.kudika.ro/articol/healthy~medicina-alternativa/9498/cuprul-si-rolul-sau-in-organsim.html> [Accesat: 10.05.2019]
12. TAPIERO, H., TOWNSEND, D., TEW, K. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. In: *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2003, vol.57, no.9, p.386-398.
13. GORINCIOY V.V., SIMONOV Y.A., SHOVA S.G., SHOFRAISKII V.N., TURTA C.I. Crystal and molecular structures of binuclear complexes of salicylic acid {Cu-M} (M = Cu, Sr, Ba). In: *Journal of Structural Chemistry*, 2009, vol.50, p.1143–1148.
14. SASMAZ, M., SASMAZ, A. The accumulation of strontium by native plants grown on Gumuskoy mining soils. In: *J. of Geochemical Exploration*, 2017, vol.181, p.236-242.
15. BURGER, A., LICHTSCHEIDL, I. Strontium in the environment: Review about reactions of plants towards stable and radioactive strontium isotopes. In: *Science of The Total Environment*, 2019, p.1458-1512.
16. BAUER, C., PLIETH, C., BETHMANN, B., POPESCU, O. et al. Strontium-induced repetitive calcium spikes in a unicellular green alga. In: *Plant Physiol.*, 1998, vol.117, p.545–557.
17. ANUPAMA, M., ASHOK KUMAR, K., NAVEENA LAVANYA LATHA J. Role of strontium in biological systems. In: *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 2016, vol.3, no.12, p.177-184.
18. GOPESH, P. *A study of strontium accumulation and its effect on nitrogen metabolism in cyanobacteria*: Thesis submitted for the degree of doctor of philosophy. Shillong, 2013.
19. AVERY, S., SMITH, S., GHAZI, A., HOPTROFF, M. Stimulation of strontium accumulation in linoleate-enriched *Saccharomyces cerevisiae* is a result of reduced Sr²⁺ efflux. In: *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, vol.65, no.3, p.1191-1197.
20. MEI, L., XITAO, X., RENHAO, X., ZHILI, L. Effects of strontium-induced stress on marine microalgae *Platymonas subcordiformis* (Chlorophyta: Volvocales). In: *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2006, vol.24, no.2, p.154-160.
21. ANUPAMA, M., ASHOK KUMAR, K., NAVEENA LAVANYA LATHA J. Mechanism of strontium uptake and transport in *Neurospora crassa*. In: *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 2016, vol.3, no.5, p.379-386.
22. SOWJANYA, T., MARUTHI MOHAN, P. A calcium binding protein from cell wall of *Neurospora crassa*. In: *J. Basic Microbiol.*, 2009, vol. 49, p.371-376.
23. ТЕТЕРЯ, Н., РУДИК, В., ЛОЗАН, В., ЧАПУРИНА, Л. Исследование биохимического состава и продуктивности *Spirulina platensis* при ее культивировании в присутствии координационных соединений меди и стронция. В: *Тезисы докладов на IV Международной конференции «Актуальные проблемы современной альгологии»*, 23 мая 2012 г., с.300.
24. BULIMAGA, V., ZOSIM, L., PISOV, M., OLAN, O. Influența citratului de fier și a intensității luminii asupra productivității spirulinei și conținutului de carotenoizi și fier în biomasă. În: *Studia Universitatis Moldaviae*, 2013, nr.6(66), p.24-27.

Mulțumiri: Sincere mulțumiri dnei *E.Zubcov*, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător, șef al Laboratorului *Hidrobiologie și Ecotoxicologie*, Institutul de Zoologie, pentru ajutorul esențial acordat la efectuarea analizei elementelor chimice și la determinarea conținutului de Sr, Cu și Fe în biomasă.

Date despre autori:

Valentina BULIMAGA, cercetător științific coordonator în LCȘ *Ficobiotehnologie*, Universitatea de Stat din Moldova.

E-mail: valentina.bulimaga@gmail.com

ORCID: 0000-0002-5042-2952

Vasile LOZAN, șef LCȘ *Chimie Bioanorganică și Nanocompoziție*, Institutul de Chimie.

ORCID: 0000-0002-6951-6115

Viorina OLEDNIC-GOCINCIOI, cercetător științific în LCȘ *Chimie Bioanorganică și Nanocompoziție*, Institutul de Chimie.

ORCID: 0000-0001-6991-2241

Valeriu RUDIC, doctor habilitat în științe medicale, profesor universitar, academician al AȘM; șef Catedră de Microbiologie, Virusologie și Imunologie, USMF „N. Testemițanu”.

ORCID: 0000-0001-8090-3004

Liliana ZOSIM, cercetător științific superior în LCȘ *Ficobiotehnologie*, Universitatea de Stat din Moldova.

E-mail: zosim_liliana@yahoo.fr

ORCID: 0000-0002-6951-6115

Maria-Bianca BULIMAGA, cercetător științific în LCȘ *Ficobiotehnologie*, Universitatea de Stat din Moldova.

E-mail: bianca.bulimaga@gmail.com

ORCID: 0000-0002-2050-6098

Prezentat la 20.05.2019