

CIANOBACTERIA SPIRULINA PLATENSIS – MATRICE PENTRU PRODUCEREA COMPUȘILOR ORGANICI SELENOCOMPONENTI

Academician Valeriu RUDIC

Cerc. șt. Svetlana DJUR

Dr., conf. cercet. Liliana CEPOI

Dr., conf. cercet. Tatiana CHIRIAC

Dr., conf. cercet. Ludmila RUDI

Dr., conf. univ. Sergiu ȘOVA

Institutul de Microbiologie

și Biotehnologie al AȘM

CYANOBACTERIUM SPIRULINA PLATENSIS
– MATRIX FOR THE SYNTHESIS OF ORGANIC
COMPOUNDS CONTAINING SELENIUM

Summary. In recent years, an increasing use of trace elements is due to their deficiency into human and animal body, caused by the action of various external and internal risk factors. It is apparent that hidden trace element deficiencies are far more widespread than is generally estimated.

Selenium is one of the essential trace elements for human and animal body. Selenium has many medical effects, such as reducing cancer mortality, prevention of cardiovascular diseases, etc. The specific biological activity of selenium depends on its chemical forms, organic selenium being the form with the highest bioactivity. Cyanobacterium *Spirulina platensis* has been consumed as a dietary supplement for a long time, and in recent years this microbiological object is investigated as a matrix for the production of organic compounds with Se, thus, representing a promising source for large scale production of organic selenium.

It has been shown that strain *Spirulina platensis* CNMN-CB-11 accumulates selenium in its process of growth and development and can be used as a matrix for the production of organic compounds with selenium. Iron selenite in concentration of 30,00 mg/l can be used to obtain spirulina biomass containing selenium biotransformed into organic form (79,8%) by its integrating into intracellular bioligands of spirulina, such as free amino acids, oligopeptides, etc. compounds with low and medium molecular weight (27,7%) and proteins (30,3%).

Keywords: *Spirulina platensis*, selenium, bioaccumulation, selenium distribution.

Introducere

Seleniul este unul din microelementele indispensabile pentru organismul uman și animal [4,7, 9-11]. Component esențial al selenocompușilor celulari – selenoenzime și selenoproteine, seleniul joacă un rol important în menținerea integrității membranelor celulare, protejând lipidele, lipoproteinele și ADN-ul contra stresului oxidativ [7]. Seleniul prezintă, de asemenea, multe efecte medicinale, astfel ca reducerea mortalității prin cancer, prevenirea maladiilor cardiovasculare ș. a. [7,8]. Acțiunea lui biologică specifică se manifestă în funcție de formele chimice, seleniul organic fiind forma cu cea mai înaltă bioactivitate [5]. Din aceste considerente, formele organice ale seleniului sunt mai puțin toxice decât cele neorganice, actualmente comercializându-se diverse produse biologice cu conținut înalt de seleniu.

Utilizarea largă în ultimii ani a microelementelor este determinată de creșterea unor factori de risc al deficitului de microelemente în urma acțiunii asupra organismului uman și animal a diferitor factori interni și externi. Dezvoltarea acestora din urmă este generată de acțiunea ecopatogenilor mediului înconjurător, de stresurile psihoemoționale, alimentația și nutriția industrială contemporană, utilizarea necontrolată și nefundamentată a preparatelor medicamentoase ș. a.

În prezent, în circa 60 de țări ale lumii se efectuează studii active consacrate perfecționării tehnologiei de obținere a diverselor tipuri de cianobacterii și alge, precum și a macro- și microelementelor legate cu acestea. Este creată Asociația Internațională a Algologilor care soluționează probleme complexe cu privire la asigurarea populației de pe Terra cu produse valoroase rezultate din biotehnologii algale. Activitatea cea mai intensă în această direcție este desfășurată de astfel de țări ca Japonia, SUA, Italia, Germania, Israel, China, India, Birma, Ungaria, Republica Moldova [1, 2, 8, 12-13].

Un șir de reprezentante ale Cyanophyta, în special reprezentantele genului *Spirulina*, sunt explorate în interes comercial nu numai datorită valorii lor nutritive, ci și pentru că sunt surse de compuși biologic activi, inclusiv capabili să transforme seleniul din forma anorganică în cea organică cu o biodisponibilitate înaltă pentru organism.

Cianobacteria *Spirulina platensis* este consumată ca supliment alimentar de foarte mult timp, iar în ultimii ani este investigată și în calitate de matrice pentru producerea compușilor organici selenocomponenți, reprezentând, astfel, o sursă promițătoare pentru producerea pe scară largă a seleniului organic, în comparație cu alte surse, precum planta de

ceai (*Camellia sinensis* (L.)) sau orez (*Oryza sativa*) [2, 6, 8, 14].

Spirulina platensis posedă mecanisme de acumulare a metalelor, inclusiv a seleniului, din mediul înconjurător. Unul din mecanisme este legarea metalelor de către elementele structurale ale celulei. În special, metalele care pătrund în celulele spirulinei se încorporează în proteine și într-o măsură mai mică în compoziția lipidelor și a polizaharidelor.

Pornind de la toate acestea, noi presupunem că este real a determina condițiile optime care provoacă acumularea maximală a seleniului în biomasa de spirulină. Seleniul legat organic este forma preferențială de includere în compoziția suplimentelor alimentare și premixelor furajere datorită toxicității scăzute și, respectiv, a biodisponibilității lui înalte.

În cercetările expuse ne-am propus drept scop stabilirea dinamicii acumulării seleniului în procesul de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, repartizarea lui în diverse fracții bioactive ale biomasei și elaborarea modelului de obținere a biomasei de spirulină – materie primă pentru obținerea selenocompușilor bioorganici.

Efectul biologic al seleniului asupra creșterii *Spirulinei platensis* și nivelul de acumulare al acestui bioelement în biomasă

La prima etapă a studiului, a fost urmărit efectul biologic al seleniului asupra creșterii tulpinii cianobacteriei *Spirulina platensis* CNMN-CB-11 și stabilit nivelul de acumulare a acestui bioelement în biomasă în raport cu nivelul de creștere a culturii. În calitate de surse de seleniu, în procesul de cultivare a spirulinei au fost utilizați unii compuși chimici ai seleniului: selenitul de sodiu – Na_2SeO_3 , selenitul de amoniu – $(\text{NH}_4)_2\text{SeO}_3$, selenitul de zinc – ZnSeO_3 , selenitul de germaniu – GeSe_2 și selenitul de fier hexahidrat – $\text{Fe}_3\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

S-a stabilit că efectul compușilor testați asupra culturii de spirulină se manifestă în funcție de doza

introdusă în mediul nutritiv și poate fi caracterizat ca: stimulator; unul care nu provoacă modificări esențiale în creșterea culturii de spirulină; toxic. Acumularea seleniului în biomasa de spirulină prezintă niveluri înalte și foarte înalte în toate variantele experimentale analizate, comparativ cu biomasa de spirulină crescută în lipsa seleniților și selenidului utilizați în experiențe. Acestea cresc în biomasă odată cu mărirea concentrației compusului introdus în mediul de cultură.

Efectul biologic al seleniului de sodiu asupra creșterii spirulinei s-a dovedit a fi de la unul care nu influențează creșterea spirulinei la un efect biologic pozitiv asupra procesului de creștere a culturii de spirulină (figura 1).

Nivelul de creștere cel mai înalt al productivității spirulinei – cu 22,65% și cu 25,44%, s-a înregistrat la concentrațiile de 50 și 70 mg/l, introduse în mediul de cultivare. Odată cu depășirea concentrației de 200 mg/l, productivitatea spirulinei a scăzut, concentrația de 500 mg/l provocând un efect toxic pronunțat asupra creșterii culturii de spirulină – cu circa 23% sub nivelul spirulinei cultivate în lipsă de selenit de sodiu. Acumularea seleniului în biomasa de spirulină cultivată în prezența seleniului de sodiu s-a dovedit a fi un proces lent și cu niveluri mult mai mici, care nu se deosebesc unul de altul, prezentând aceleași cote valorice acumulate ale seleniului în biomasă, la concentrațiile mici ale seleniului de sodiu: de la 10,00 la 100 mg/l, pe fondul unui proces de creștere normală sau chiar de stimulare a creșterii culturii de spirulină. Nivelul acumulat al seleniului a crescut brusc odată cu introducerea concentrațiilor mari de selenit de sodiu, pe fonul descreșterii productivității spirulinei: de la 100 mg/l la 500 mg/l.

Selenitul de amoniu nu a influențat practic creșterea culturii de spirulină în prezența concentrațiilor lui mici prezente în mediul de cultivare: de la 10,00 mg/l la 40 mg/l. La concentrațiile de la 50 mg/l la 100 mg/l, compusul a manifestat un efect

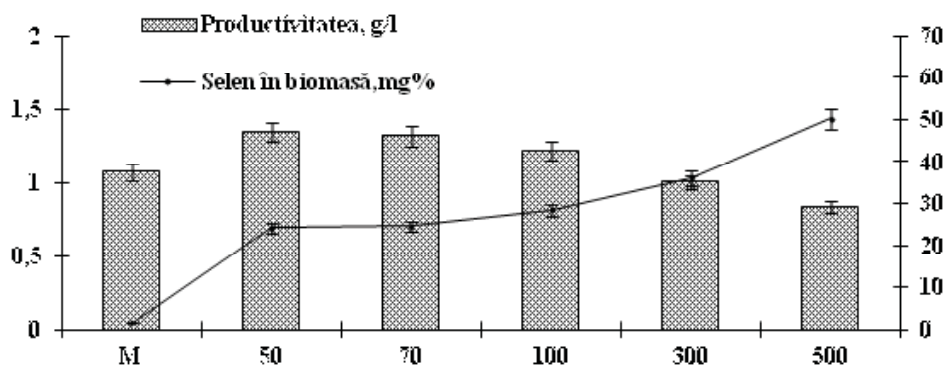


Figura 1. Productivitatea *Spirulinei platensis* și nivelul acumulării seleniului în biomasă la cultivarea ei în prezența seleniului de sodiu - Na_2SeO_3

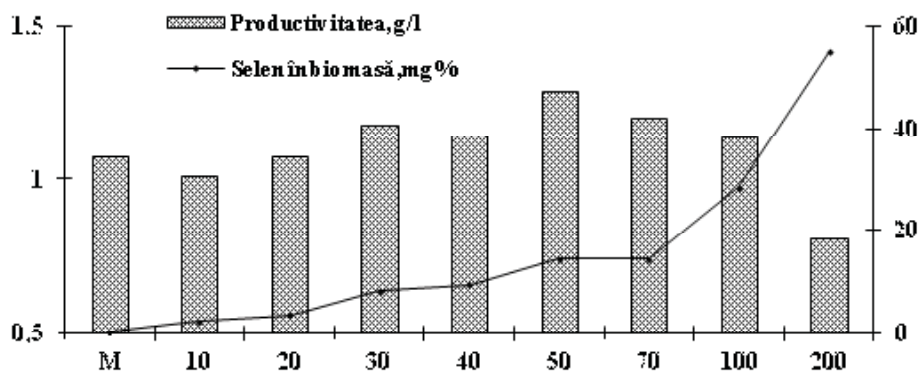


Figura 2. Productivitatea *S. platensis* și nivelul acumulării seleniului în biomasă la cultivarea ei în prezența selenitului de amoniu $(\text{NH}_4)_2\text{SeO}_3$

biologic pozitiv variat asupra creșterii spirulinei – cel mai pronunțat la concentrația de 50 mg/l (productivitatea crește cu circa 20%) și cu tendințe de descreștere spre concentrația de 100 mg/l. Concentrația de 200 mg/l a selenitului de amoniu poate fi considerată drept una toxică asupra culturii de spirulină, deoarece induce scăderea drastică a nivelului de biomasă produsă – cu circa 25% față de nivelul biomasei obținute în condiții standard de cultivare (figura 2).

Respectiv, la concentrațiile selenitului de amoniu de la 10,00 mg/l la 40 mg/l, s-au acumulat niveluri relativ scăzute ale acestui element în biomasă. Acumularea de seleniu s-a intensificat în biomasa de spirulină cultivată în prezența concentrațiilor mai mari ale selenitului de amoniu în mediul de cultivare: de la 50 mg/l la 200 mg/l (figura 2).

Potrivit rezultatelor obținute, efectul exercitat de către selenitul de zinc asupra creșterii spirulinei poate fi considerat unul moderat toxic: în intervalul de concentrații selectate pentru testare de la 5,00 mg/l la 30 mg/l, valorile productivității s-au diminuat mai moderat, în limita valorilor normale de creștere a spirulinei. Nivelul de acumulare a seleniului în biomasă a crescut odată cu mărirea concentrației de selenit de zinc în mediul de cultivare.

La concentrația de 30 mg/l, se determină conținutul cel mai înalt de seleniu în biomasă – circa 52 mg % seleniu acumulat (figura 3).

La aceiași interval de concentrații, efecte biologice mult mai pronunțate s-au stabilit pentru următorul compus al seleniului utilizat la cultivarea experimentală a spirulinei – selenidul de germaniu. Efectul biologic al selenidului de germaniu asupra creșterii culturii de spirulină poate fi caracterizat ca stimulator și se manifestă în intervalul de concentrații de la 10,00 mg/l la 25 mg/l, interval în care se asigură obținerea unui conținut de biomasă cu circa 20%-25% mai înalt față de biomasa obținută la cultivarea spirulinei în lipsa selenidului de germaniu. Astfel, acest compus, în concentrațiile stabilite experimental ca stimulatoare, poate fi considerat util în procesele de cultivare a spirulinei pentru producerea biomasei. Comparativ cu compuşii analizați anterior, în prezența selenidului de germaniu se acumulează niveluri mult mai înalte de seleniu și la concentrații mult mai mici ale compusului în mediul de cultivare (figura 4).

Un alt compus al seleniului introdus în mediul de cultivare a spirulinei, selenitul de fier, a exercitat un efect biologic caracterizat ca stimulator moderat

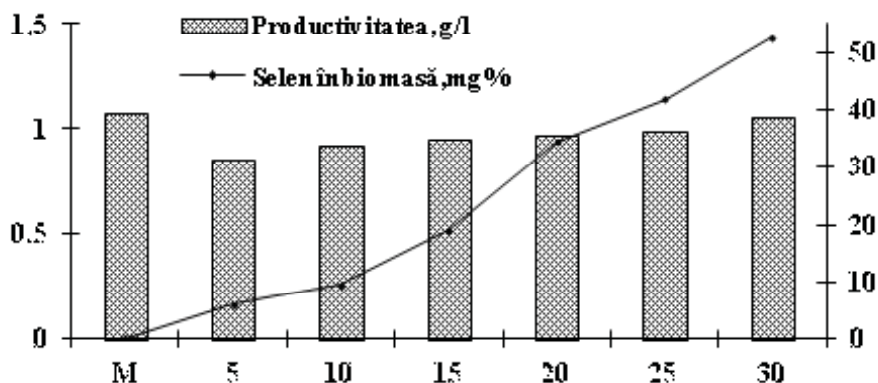


Figura 3. Productivitatea *S. platensis* și nivelul acumulării seleniului în biomasă la cultivarea ei în prezența selenitului de zinc - ZnSeO_3

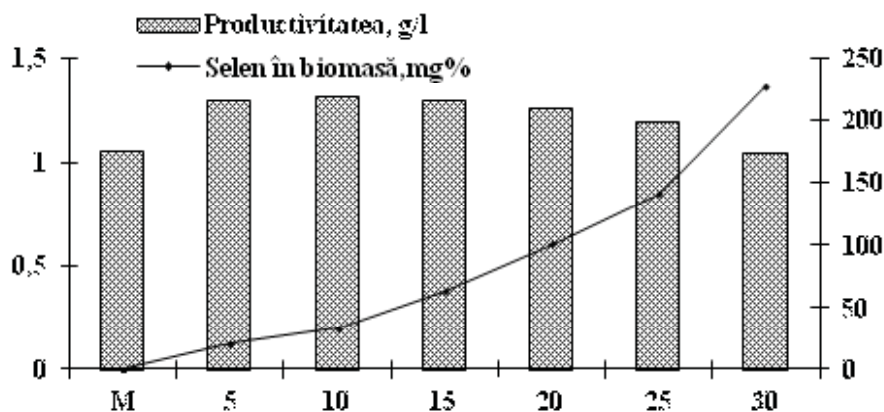


Figura 4. Productivitatea *S. platensis* și nivelul acumulării seleniului în biomasă la cultivarea ei în prezența selenidului de germaniu - GeSe₂

asupra creșterii culturii de spirulină (figura 5).

Astfel, selenitul de fier exercită un efect biologic caracterizat ca stimulator moderat asupra creșterii culturii de spirulină. La creșterea spirulinei în prezența acestei surse de seleniu, productivitatea culturii cianobacteriene nu diferă de productivitatea spirulinei cultivate în lipsa compusului – 10-13% peste nivelul productivității probei martor.

În ceea ce privește procesul de acumulare, seleniul prezintă o dinamică mult mai activă de acumulare în biomasă, comparativ cu compușii analizați anterior. Pe fondul păstrării unui nivel bun de producere a biomasei de spirulină, conținutul seleniului a crescut de la o concentrație la alta a seleniului de fier în mediul de cultivare și a atins cotele maxime la concentrația de 50 mg/l, la care s-au acumulat circa 300 mg % seleniu în biomasă, ceea ce denotă perspectiva utilizării acestui compus la producerea pe scară largă a spirulinei îmbogățită cu seleniu.

Distribuția seleniului în diferite fracții bioactive ale biomasei de spirulină

Studii centrate pe elucidarea mecanismelor de bioacumulare a metalelor în biomasa algală și cianobacteriană indică implicarea în procesul de acumula-

re a membranei și peretelui celular, precum și formarea legăturilor între metal și liganzii citoplasmatici, fitochelatinele și metaloproteinele și altor molecule intracelulare. Grupurile funcționale implicate, așa ca -OH(hidroxil); -PO₃O₂(fosforic); -NH₂(aminic); -COOH(carboxilic); -SH(sulfhidric) nu numai că au fiecare în parte o constantă specifică de disociere, dar și sunt repartizate în diferite clase de substanțe organice – proteine, glicolipide, peptidoglicani, polizaharide ș.a. Cianobacteriile și microalgele, în special *Spirulina platensis*, oferă prin biomasa sa aceste componente bioactive, considerate donore de grupări funcționale active prin care sunt implicate în procesele de bioacumulare și biotransformare a formelor anorganice în cele organice ale metalelor.

Pentru a determina care dintre compușii bioactivi ai spirulinei sunt implicați în acest proces, biomasa de spirulină cultivată în prezența seleniului de fier a fost supusă fracționării. S-au obținut, astfel, fracțiile de compuși cu masa moleculară mică și medie – aminoacizi liberi și oligopeptide, hidrați de carbon ș.a. compuși similari; proteine; polizaharide și lipide. Rezultatele care reflectă distribuția seleniului în acestea sunt reproduse în figura 6.

Astfel, seleniul organic constituie 79,8% din con-

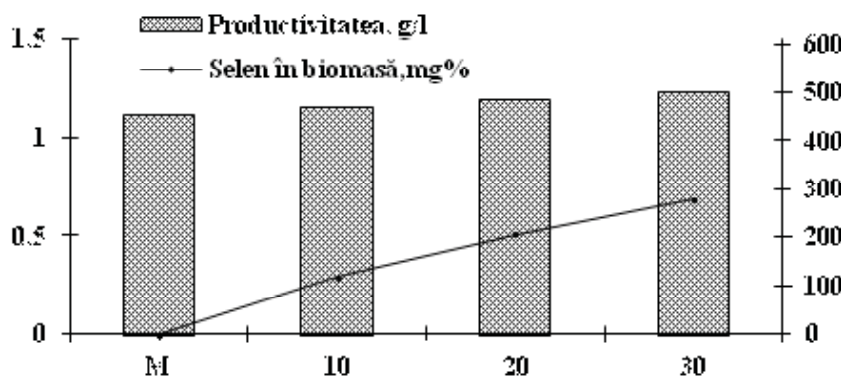


Figura 5. Productivitatea *S. platensis* și nivelul acumulării seleniului în biomasă la cultivarea ei în prezența selenitului de fier - Fe₃Se₃O₉·6H₂O.

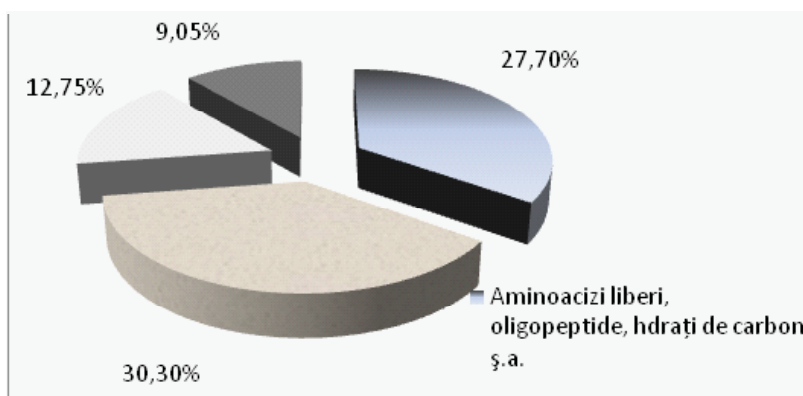


Figura 6. Distribuția seleniului în diferite fracții ale biomasei de spirulină

ținutul total de seleniu acumulat în biomasa de spirulină cultivată în prezența a 30 mg/l selenit de fier hexahidrat, ceea ce și în cercetările noastre demonstrează biotransformarea eficientă a seleniului din anorganic în organic. Dintre toate fracțiile biomasei obținute, proteinele au arătat cea mai înaltă capacitate de a lega seleniul (30,3%), constituind forma majoră a seleniului organic. Totodată, și în extractul care conține aminoacizi liberi, oligopeptide ș.a. compuși similari a fost determinat un conținut înalt al seleniului – 27,7% din seleniul organic acumulat în biomasa de spirulină. Un conținut considerat apreciabil de seleniu a fost determinat în fracția lipidelor – 12,75% și în fracția polizaharidelor – 9,05%.

Așadar, la analiza rezultatelor obținute se pot rezuma următoarele. Având în calitate de suport rezultatele acestui studiu, seleniul poate fi considerat drept microelement de necesitate vitală pentru tulpina cianobacteriei *Spirulina platensis* CNMN-CB-11 în concentrațiile mici și drept toxicant în concentrațiile lui înalte. Compușii seleniului: selenitul de sodiu (50 mg/l și 70 mg/l) și selenitul de germaniu (5,00 mg/l și 10 mg/l) prezintă perspectivă și pot fi utilizați pentru stimularea creșterii spirulinei. Efectul de stimulare a creșterii spirulinei poate deriva din creșterea nivelului de enzime selenco componente angajate în contracararea radicalilor liberi, prevenind astfel declinul culturii de spirulină. În cazul manifestării toxicității, concentrațiile înalte ale seleniului pot cauza schimbări în interiorul celulelor: modificări ale nucleului, vacuolelor, lipidelor, conținutului de nitrogen și carbon. Potrivit unor autori, și sistemele energetice de transducție pot fi de asemenea afectate sever de toxicitatea seleniului, care pot duce la descreșterea substanțială sau chiar la eliminarea substanțelor de rezervă și reducerea majoră a productivității [12].

Tulpina cianobacteriei *Spirulina platensis* CNMN - CB-11 acumulează în procesul său de creștere și dezvoltare seleniul, nivelul de acumulare

sporind odată cu majorarea concentrației lui în mediul de cultivare. Selenitul de fier în concentrație de 30,00 mg/l poate fi utilizat pentru obținerea pe scară largă a selenobiomasei de spirulină.

Rezultatele cercetărilor noastre demonstrează că cea mai mare parte a seleniului anorganic se biotransformă în organic (79,8%) prin integrarea în bioliganzii intracelulari ai spirulinei, astfel ca aminoacizii liberi, oligopeptidele ș.a. compuși cu masa moleculară mică și medie (27,7%) și proteinele (30,3%). Seleniul se poate include în metabolismul aminoacizilor și proteinelor ce conțin sulf prin substituirea sulfurii din aceștia, fapt demonstrat prin prezența seleno-analogilor pe parcursul acumulării seleniului în biomasă [13]. În paralel cu aminoacizii liberi, oligopeptidele și proteinele, în acumularea seleniului sunt implicate lipidele (12,75% seleniu organic) și polizaharidele (9,05% seleniu organic). Unii autori sugerează că seleniul în lipide nu este incorporat metabolic, fiind legat noncovalent de acestea [3]. În cazul polizaharidelor, seleniul este incorporat în peptidoglicanii peretelui celular.

În baza rezultatelor cercetărilor realizate, a fost elaborat modelul de acumulare a seleniului în procesul de cultivare a tulpinii cianobacteriei *Spirulina platensis* CNMN CB 11, care prevede cultivarea acesteia pe un mediu nutritiv ce conține: (în g/l mediu) NaNO_3 -2,5; NaHCO_3 -2,0; NaCl -1,0; K_2SO_4 -0,6; Na_2HPO_4 -0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2; CaCl_2 -0,024; 1ml/l soluție de microelemente ce conține (mg/l mediu): H_3BO_3 -2,86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -1,81; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,08; MoO_3 -0,015); FeEDTA -1ml/l; suplimentarea după 24 ore la cultura de spirulină a 30 mg/l selenit de fier; cultivarea spirulinei în prezența sursei de seleniu pe durata a 144 ore cu respectarea parametrilor de cultivare: primele 48 ore temperatura de 25-28°C; pH-ul optim al mediului 8,0-9,0 și pentru următoarele 96 ore temperatura de 30-32°C; pH-ul-9-10; intensitatea iluminării până la 4000 lx. Modelul asigură producerea a 1,24 g/l biomasă ce

conține 2799,0 mcg (179,9 mg%) seleniu, dintre care 79, 8% constituie seleniul organic.

În **încheiere** vom menționa, că tulpina cianobacteriei *Spirulina platensis* CNMN CB II poate fi utilizată în calitate de matrice pentru producerea pe scară largă a compușilor organici selenocompenți (incorporat în aminoacizi liberi, oligopeptide, hidrați de carbon, polizaharide, lipide selenocompenente).

Bibliografie

1. Bertrand M., Poirier I., *Photosynthetic organisms and excess of metals*, In: *Photosynthetica*, 2005, vol.43, no.3, p.345-353.
2. Cases J., Wysocka, I. A., & Caporiccio B., *Assessment of selenium bioavailability from high-selenium Spirulina subfractions in selenium deficient rats*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2002), vol. 50, p.3867-3873.
3. Genitty J.M., et al., *The binding of selenium to the lipids of two unicellular marine algae*, *Biochem. Bioph. Res. Commun.*, 1986, vol. 118, p.176-182.
4. Hamilton S. J., *Review of selenium toxicity in the aquatic food chain*, In: *Science of the Total Environment*, 2004, vol. 326, p. 1-31.
5. Hogberg Johan and Alexander Jan, *Selenium. Handbook on the Toxicology of metals 3E*, 2007, p.783-807.
6. Li Z. Y., Guo, S. Y., & Li L., *Bioeffects of selenite on the growth of Spirulina platensis and its biotransformation*, *Bioresource Technology*, 2003, vol. 89, p.171-176.
7. Margaret, P. R., *The importance of selenium to human health*, In: *The Lancet*, 2000, no. 356, p. 233-241.
8. Mosulishvili, L. M., Kirkesali, E. I., & Belokobylsky, A. I., *Experimental substantiation of the possibility*

of developing selenium and iodine-containing pharmaceuticals based on blue-green algae Spirulina platensis. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, vol. 30, p.87-97.

9. Navarro-Alarcon M., Cabrera-Vique C., *Selenium in food and the human body*, A review. In: *Science of the total environment*. 2008, no. 400, p.115-141.

10. Thiry C. A., Temmerman Ruttens L., Schneider D. Y.J., Pussemier L., *Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food*, In: *Food Chemistry*. 2012, no. 130, p. 767-784.

11. Thomson C.D. *Selenium.*, In: *Encyclopedia of Human Nutrition*, 2013, vol.4., p. 186-192.

12. Wong D., Oliveira L., *Effects of selenite and selenate on the growth and motility of seven species of marine microalgae*, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1991, vol. 48, no. 7, p. 1193 - 1200.

13. Wrench J.J. „*Selenium metabolism in the marine phytoplankters Tetraselmus tetraele and Dunaliella minuta*”, *Mar. Biol.* 1978, vol.49, p.231-236.

14. Xu, J., Yang, F. M., Chen, L. C., Hu, Y., & Hu, Q. H., *Effect of selenium on increasing the antioxidant activity of tea leaves harvested during the early spring tea producing season*. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, vol. 51, p. 1081-1084.

15. Xu, J., Yang, F. M., Chen, L. C., Hu, Y., & Hu, Q. H., *Effect of selenium on increasing the antioxidant activity of tea leaves harvested during the early spring tea producing season*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, vol. 51, p. 1081-1084.

Cercetările expuse în acest articol au fost realizate în cadrul proiectului bilateral moldo-belorus 13.820.18.01/BA „Elaborarea și implementarea tehnologiei de obținere a premixelor selenocompenente în baza biomasei de spirulină”.



Antoine Irise. *Portretul soției*. 1938, u/p, 61×50 cm