

**INFLUENȚA UNOR COMPUȘI COORDINATIVI AI Cu(II) ASUPRA
PRODUCTIVITĂȚII ȘI CONȚINUTULUI DE PIGMENȚI FOTOSINTETICI LA
MICROALGA *DUNALIELLA SALINA* CNM-AV-02**

Liliana ZOSIM, Cezara BIVOL, Ludmila BATÎR,
Daniela ELENCIUC**, Svetlana DJUR*, Olga OLAN*

Universitatea de Stat din Moldova

**Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei*

***Universitatea Academiei de Științe a Moldovei*

A fost studiată influența compușilor coordinativi ai Cu(II) și a intensității luminii asupra productivității și conținutului de carotenoizi și clorofilă *a* în biomasa de dunaliele. S-a constatat că intensitatea luminii, temperatura și adaptarea prealabilă la noul mediu de nutriție folosit (mediul organo-mineral MD, preparat în baza lichidului cultural al spirulinei) joacă un rol determinant în inițierea și parcurgerea fazei exponențiale de dezvoltare a dunalielei.

Cuvinte-cheie: *Dunaliella salina*, mediu organo-mineral, biomasă, productivitate, pigmenți fotosintetici, compuși coordinativi ai Cu(II), sinteză orientată.

**THE INFLUENCE OF SOME COORDINATION COMPOUNDS OF Cu (II) ON PRODUCTIVITY AND
PHOTOSYNTHETIC PIGMENT CONTENT IN MICROALGA *DUNALIELLA SALINA* CNM-AV-02**

The dunalie productivity, content of carotenoids and chlorophyll *a* in the dunalie biomass at cultivation in the presence of some Cu(II) coordination compounds at the different light intensity was determined. The light intensity, temperature and prior adaptation to the new nutrition medium (the organic-mineral medium MD, prepared on the basis of spirulina cultural liquid) plays a determinant factor in the initiation and crossing of dunalie's exponential grown phase.

Keywords: *Dunaliella salina*, organic-mineral medium, biomass, productivity, photosynthetic pigments, coordination compounds of Cu(II), directed synthesis.

Introducere

Dintre toate speciile genului *Dunaliella*, microalga *Dunaliella salina* prezintă interes și avantaj practic în cultivarea industrială a microalgelor datorită conținutului sporit de carotenoizi, care depășește conținutul acestora din plantele superioare și poate constitui până la 10% din biomasă. Pigmenții carotenoizii sunt pe larg utilizați în industria alimentară în calitate de coloranți naturali, în industria farmaceutică, în practica medicală, dar și în alimentația terapeutic-profilactică la tratarea diferitelor maladii. De asemenea, dunaliele este considerată a fi potențial producător de glicerol, care poate depăși 30% din substanța uscată a celulei, proprietate valoroasă pentru sursele alternative de carburanți în industria energetică [3,10,11,17].

D. salina prezintă interes atât sub aspect evolutiv, cât și fiziologic, ca obiect-model de cercetare a mecanismelor de osmoreglare, manifestând și rezistență la factori limitanți de mediu (iradiere puternică, deshidratare, prezența substanțelor toxice sau a metalelor grele etc.) [1,2,7,9].

Investigațiile precedente întreprinse în cadrul LCS „Ficobiotehnologie” (USM și AȘM) demonstrează că condițiile de stres (absența sau excesul unor nutrienți, modificarea regimului de temperatură, iluminare și iradiere, salinitate înaltă, modificarea valorii pH), precum și administrarea unor compuși coordinativi ai metalelor de tranziție joacă un rol determinant în procesele de creștere, dezvoltare și de acumulare a substanțelor bioactive în biomasa dunalielei. Iar datorită metabolizării de către *D. salina* a microelementelor din structura compușilor coordinativi biomasa microalgei capătă proprietăți calitative noi (imunostimulatoare, regeneratoare, citoprotectoare etc.), proprietăți valoroase în obținerea unor produse polifuncționale ecologice, cu proprietăți unice [5,6,13,14].

Tendențele biotehnologiei moderne impune obținerea produselor în ciclu închis prin reutilizarea deșeurilor industriale [12,16,21]. În acest context, dunaliele reprezintă un obiect atractiv de studiu în vederea cultivării pe deșeuri lichide de la producerea în special a biomasei altor microalge.

Scopul lucrării constă în evaluarea productivității și conținutului de pigmenți fotosintetici în biomasa microalgei *D. salina* cultivate în prezența unor compuși coordinativi ai Cu(II).

Material și metode

Obiect de studiu a servit tulpina microalgei *Dunaliella salina* CNM-AV-02, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neputogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM. Cultivarea s-a realizat în retorte Erlenmeyer a câte 250 ml cu 100 ml suspensie de dunalielă, pe mediul nutritiv MD, elaborat anterior în baza lichidului cultural al spirulinei și suplimentat cu 100 g/l NaCl [18]. Au fost utilizate 2 variante de inocul: obținut din cultura menținută pe mediul mineral Ben-Amotz (1) și din cultura cultivată pe mediul organo-mineral MD (2).

Temperaturile de cultivare testate au fost 22-23°C și 27-29°C, în prezența iluminării normale (3500 lx) și intense (5000 lx).

Durata optimă de cultivare a microalgei ce asigură acumularea unei cantități sporite de biomasă a fost stabilită prin cultivarea tulpinii timp de 10 zile, cu prelevarea zilnică a probelor și determinarea productivității microagale.

Compușii coordinațivi ai cuprului cu fenolați substituiți (cifrați RGT-23, RGT-24, RGT-25, RGT-28), oferiți cu amabilitate de acad. A.Gulea, șeful Catedrei Chimie Anorganică și Fizică a USM, au fost introduși în mediul nutritiv în a 2-a zi de cultivare, în concentrație de 2, 4, 6 mg/l. Probele crescute în lipsa compușilor coordinațivi, cu respectarea celorlalți parametri de cultivare, au fost considerate drept martor. Biomasă algală a fost separată de mediul nutritiv prin centrifugare timp de 5 minute la 5000 rpm.

Productivitatea dunaliei a fost determinată fotocolorimetric cu recalculul masei celulare la biomasa absolut uscată (BAU) [15].

Concentrația pigmentilor în soluții alcoolice a fost determinată prin metoda spectrometrică propusă de H.Lichtenthaler și C.Buschmann (2001) [8].

Cercetările au fost realizate în trei serii de repetări, datele prezentate constituind media aritmetică a determinărilor, veridicitatea – conform criteriului Student $p \leq 0,05$ [19,20].

Rezultate și discuții

Inițial, pentru a aprecia importanța temperaturii în procesele de biosinteză algală, *D. salina* a fost cultivată la temperatura de 22-23°C. Cultura utilizată pentru inoculare a fost menținută pe mediul mineral standard Ben-Amotz, cultivarea propriu-zisă realizându-se pe mediul organo-mineral MD (Fig.1).

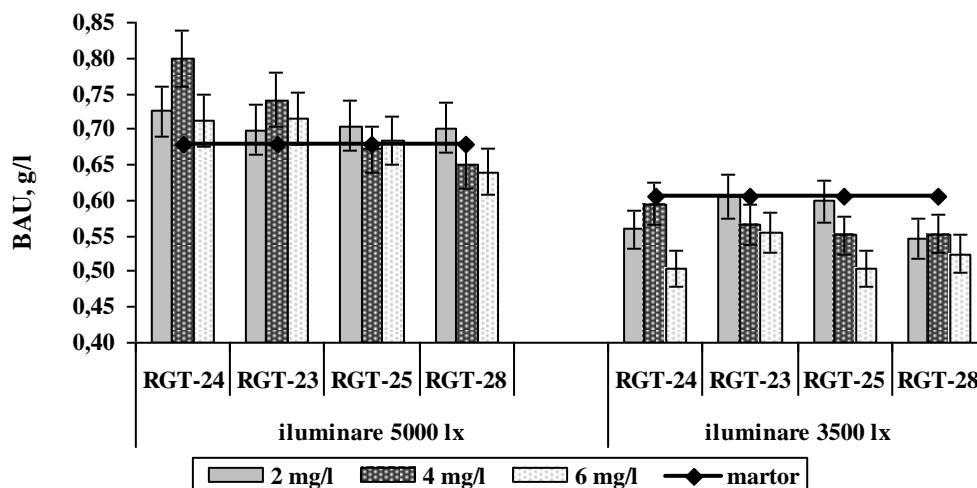


Fig.1. Productivitatea microalgei *D. salina* la cultivare în regim variat de iluminare, temperatură scăzută și în prezența compușilor coordinațivi ai Cu(II).

Conform rezultatelor obținute, în cazul cultivării dunaliei în regim de iluminare intens, cu administrarea compușilor coordinațivi RGT-23, RGT-24, RGT-25, productivitatea a sporit în medie cu 3-17% față de proba martor în a 10-a zi de creștere. Compusul RGT-28 a manifestat un efect stimulatv mai slab pronunțat; odată cu mărirea concentrației de compus administrat în mediul de cultivare productivitatea dunaliei s-a redus. Astfel, la administrarea concentrației maxime de compus (6 mg/l) nivelul productivității a fost cu 8% mai scăzut decât în proba-martor. La cultivarea *D. salina* în aceleași condiții, dar la iluminare normală, indicii productivității nu au întrecut valoarea martorului. Mai mult, odată cu mărirea concentrației de compus, productivitatea

dunaliei a scăzut în medie cu 6-16% sub nivelul matorului. Cel mai semnificativ efect stimulator asupra productivității l-a manifestat compusul RGT-24, la a cărui administrare în concentrație de 4 mg/l, în regim de iluminare intensă, productivitatea a fost cu 17,8% mai înaltă decât în proba-martor.

Evaluarea în dinamică a creșterii culturii de dunaliela pe mediul organo-mineral suplimentat cu compusul coordonativ RGT-24 timp de 10 zile a evidențiat faptul că durata Lag-fazei de creștere este prelungită și durează 72 ore (Fig.2). Fenomenul dat este caracteristic culturilor ce se află în proces de adaptare la condițiile nespecifice sau noi de viață. În cazul experienței efectuate, celulele de dunaliela au fost inoculate pe mediul organo-mineral MD direct din mediul lor tradițional de cultivare (mediul Ben-Amotz), ceea ce presupune inițial adaptarea culturii la condițiile nespecifice de existență. Plus la aceasta, suplimentarea compusului coordonativ a putut favoriza instalarea unui stres determinat de prezența în mediul de cultivare a unor concentrații înalte de cupru.

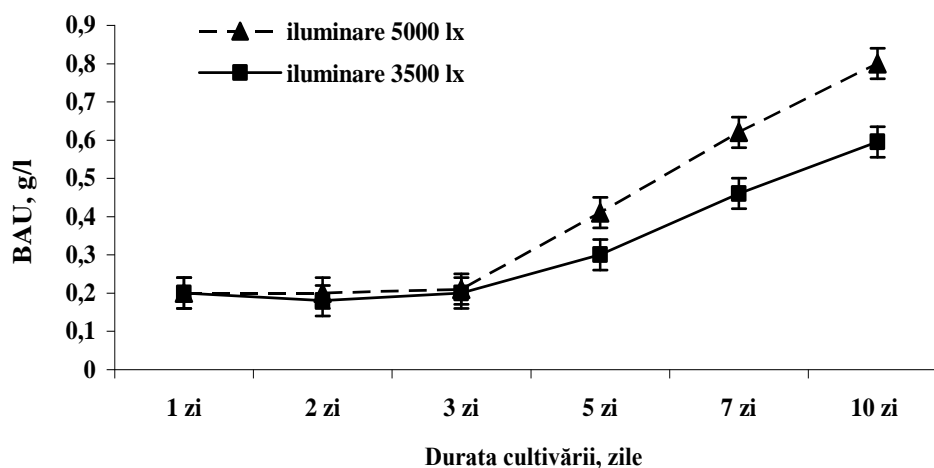


Fig.2. Dinamica productivității dunaliei cultivate pe mediul organo-mineral suplimentat cu RGT-24 în concentrație de 4 mg/l.

Intensitatea luminii joacă un rol determinant în inițierea și parcurgerea fazei exponențiale de dezvoltare a dunaliei. Odată intrată în faza exponențială, cultura intens iluminată evoluează mai rapid, cantitatea de biomasă sporește pe parcursul a 10 zile de creștere de 4 ori (de la 0,20 g/l la 0,8 g/l), ceea ce este de 1,34 ori mai mult decât în cazul cultivării dunaliei pe același mediu, în prezența aceluiași compus, dar în regim de iluminare obișnuit.

Cercetările au continuat cu studiul efectului aceluiași compus coordonativ ai Cu(II) asupra productivității și duratei de cultivare a dunaliei la temperatură înaltă de 27-29°C și utilizarea inoculului crescut prealabil 10 zile pe mediul organo-mineral MD. Rezultatele obținute au indicat influența temperaturii sporite, de 27-29°C, asupra productivității dunaliei cultivate atât în prezența compușilor coordonativi, cât și în lipsa lor (Fig.3 și 4).

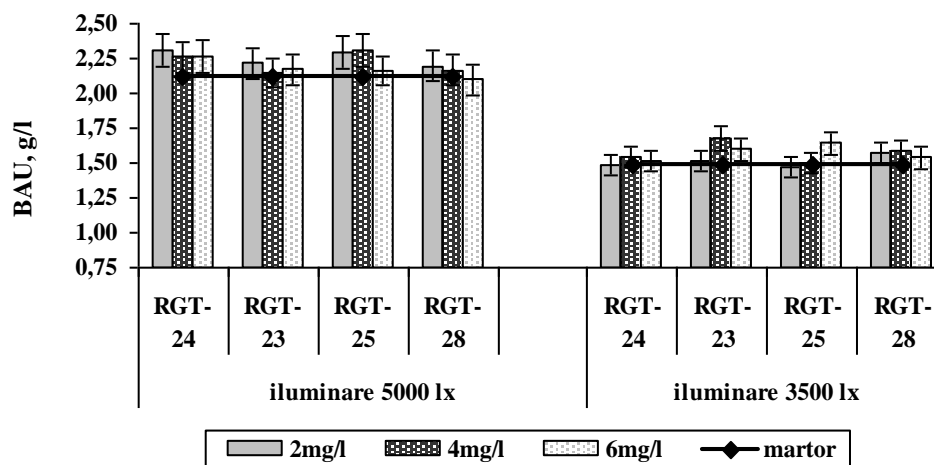


Fig.3. Productivitatea microalgei *D. salina* la cultivare în regim variat de iluminare, temperatură înaltă și în prezența compușilor coordonativi ai Cu(II).

Cantitatea de biomasă a crescut considerabil, atingând valori de 1,49 g/l în cazul iluminării normale și de 2,11 g/l la o iluminare intensă și doar în decurs de 8 zile de cultivare. Astfel, productivitatea matorului a sporit de 2,46 ori la iradierea de 3500 lx și de 3,10 ori la iradierea de 5000 lx față de cultura cultivată anterior la temperatură joasă, de 22-23°C, și fără adaptare prealabilă la noul mediu de nutriție folosit în cercetări (Fig.1 și 3).

Temperaturile sporite și utilizarea inoculului adaptat mediului de cultivare au demonstrat efect pozitiv și în cazul administrării compușilor coordinați ai Cu(II). Dacă în experimentul precedent la iluminarea 3500 lx (Fig.1) compușii coordinați au inhibat dezvoltarea culturii, cele mai ridicate valori fiind la nivelul matorului, în experimentul prezent (Fig.3) fenomenul este diferit. Cele mai joase valori s-au situat la nivelul matorului, iar productivitatea majoră s-a înregistrat pentru compusul RGT-23, în concentrație de 4 mg/l, fiind cu 12,7% mai înaltă decât proba cultivată în lipsa compușilor coordinați.

La iluminarea intensă 5000 lx efectul stimulator al compușilor diminuează. Complexul metalic RGT-24, în concentrația cu spor maxim în experimentul precedent 4 mg/l (Fig.1), a stimulat productivitatea dunaliei doar cu 7,1% față de mator (Fig.3), ceea ce este cu 10% mai puțin decât anterior. De asemenea, concentrația mai joasă a RGT-24 de 2 mg/l a determinat o acumulare mai semnificativă a biomasei algale, cu 9,4% față de mator. Același spor asupra productivității (9,4%) s-a observat și în cazul suplimentării a 4 mg/l compus RGT-25.

Dinamica productivității dunaliei cultivate în condiții de temperatură maximă și inocul adaptat mediului MD s-a realizat pe exemplul probei suplimentate cu 2 mg/l RGT-24 (Fig.4). Rezultatele au prezentat dispariția completă a Lag-fazei de dezvoltare a culturii, care anterior a durat 72 de ore (Fig.2). S-a evidențiat și faptul că rata de acumulare a biomasei în cultura iluminată intens din start se deosebește de cea iluminată normal, care a fost mai scăzută pe tot parcursul cultivării. Astfel, productivitatea dunaliei cultivate timp de 8 zile la iluminare intensă a crescut de 11,5 ori, iar la iluminare normală – de 7,4 ori.

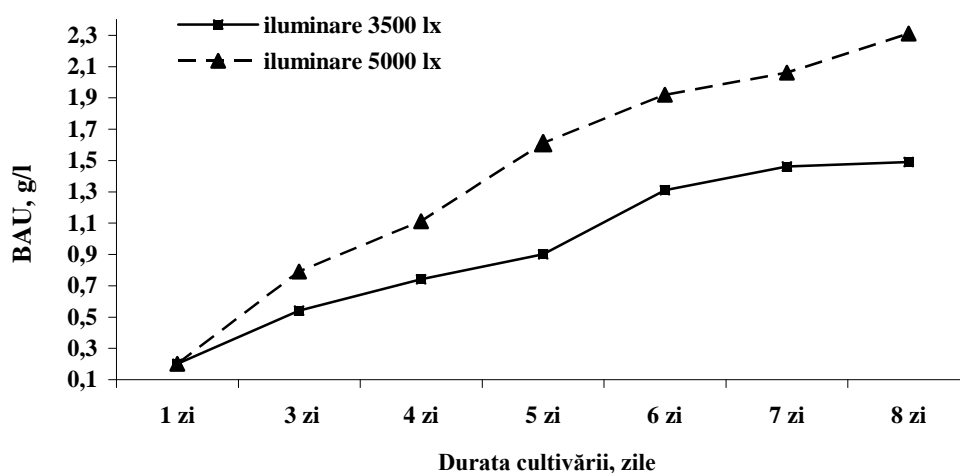


Fig.4. Dinamica productivității dunaliei cultivate pe mediul organo-mineral suplimentat cu RGT-24 în concentrație de 2 mg/l.

Obținerea unei cantități impresionante de biomasă microalgală într-un interval de timp mai redus (8 zile în loc de 10 zile) este unul dintre factorii determinanți pentru ficobiotehnologia modernă, fenomen cu avantaje evidente în explorare.

Studiul conținutului de pigmenți carotenoizi în biomasa dunaliei cultivate în prezența compușilor coordinați ai Cu(II) a prezentat un efect stimulator mai accentuat la iluminare normală – 3500 lx (Fig.5). Cel mai semnificativ spor s-a observat pentru 4 mg/l compus RGT-23, constituind 37,7%. Iluminarea intensă, 5000 lx, a manifestat un efect diferențiat al compușilor coordinați studiați asupra carotenogenezei dunaliei.

Valorile în cele mai bune cazuri s-au menținut la nivelul matorului, excepție servind compusul RGT-28 în concentrație de 4 mg/l, care a determinat un spor al carotenoizilor de doar 5,4%, și compusul RGT-24 în concentrație de 2 mg/l, care a stimulat acumularea carotenoizilor cu 8,7%.

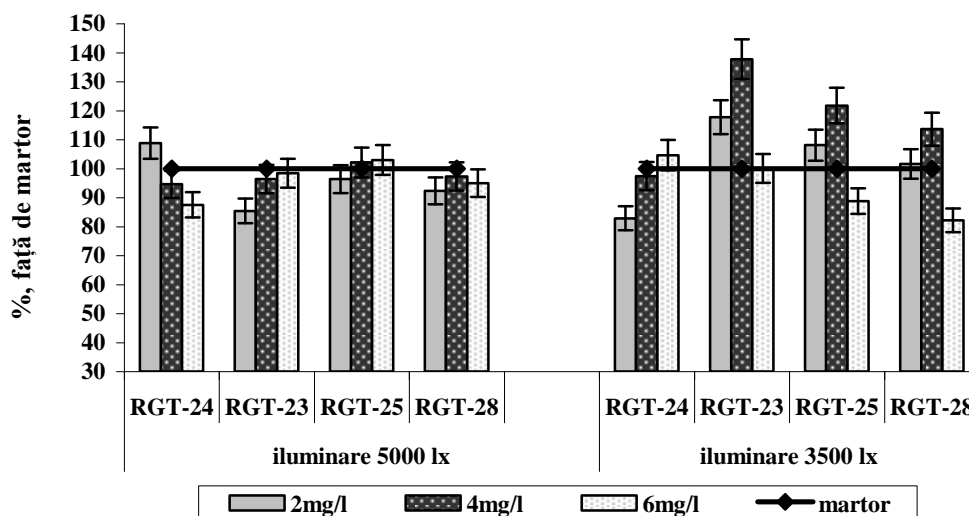


Fig.5. Conținutul de carotenoizi în biomasa dunaliei cultivate în prezența compușilor coordinativi ai Cu(II).

Dat fiind că sinteza carotenoizilor este condiționată de instalarea factorilor nespecifici, stresanți de mediu [4], putem afirma că în cazul iradierii 3500 lx microalga *D. salina* se află în condiții mai nefavorabile decât la iradierea 5000 lx, administrarea compușilor coordinativi ai Cu(II) amplificând efectul negativ al iluminării scăzute. Evident, iluminarea intensă a redus efectul negativ al metalocomplecșilor, fenomen confirmat și de productivitatea înaltă înregistrată (Fig.3).

Evaluarea raportului clorofilă *a*/ carotenoizi confirmă datele obținute (Fig.6). La iluminare normală raportul clorofilă *a*/carotenoizi pentru toate probele a înregistrat valori mai scăzute decât martorul, fapt ce confirmă sporirea conținutului de carotenoizi în prezența compușilor Cu(II) studiați. La iradiere intensă a culturii (5000 lx) raportul dintre pigmentul clorofilian și carotenoizi a căpătat valori mai înalte decât în primul caz, apropiate de martor și, în unele cazuri, chiar mai înalte decât acesta (compusul RGT-23 în concentrație de 6 mg/l). În rezultat, putem afirma că compușii coordinativi investigați stimulează sinteza clorofilei *a* în biomasa dunaliei la iluminare intensă a culturii, susținând datele prezentate anterior.

Raportul clorofilă *a*/carotenoizi în probele-martor a fost identic atât la iradiere normală, cât și la cea intensă.

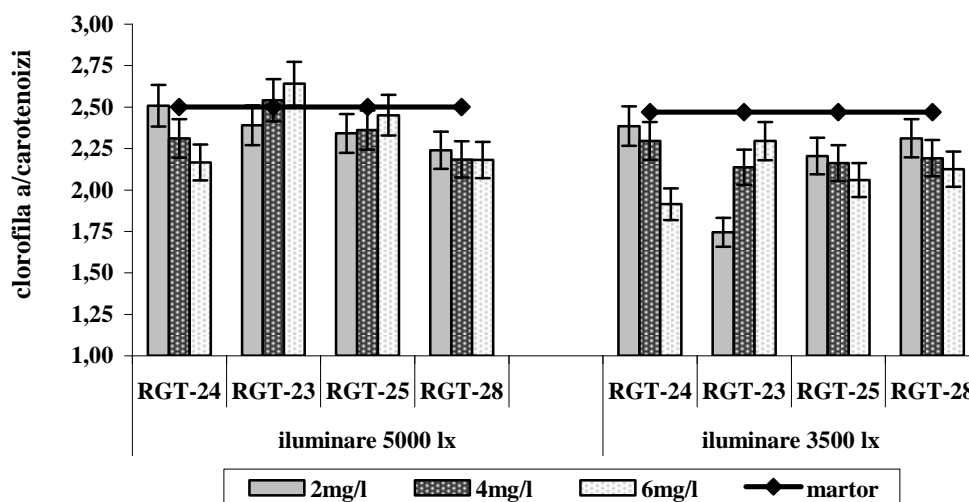


Fig.6. Raportul clorofilă *a*/carotenoizi în biomasa dunaliei cultivate în prezența compușilor coordinativi ai Cu(II).

Astfel, în urma cercetărilor întreprinse s-a stabilit că temperatura ridicată (27-28°C), inoculumul adaptat preventiv pe mediul de nutriție organo-mineral MD și iluminarea intensă (5000 lx) asigură o productivitate

mai sporită la microalga *D. salina* decât în prezența temperaturii 22-23°C, inoculului neadaptat și la iluminare de 3500 lx. Acești factori determină și adaptarea culturii la prezența compușilor coordinativi ai Cu(II) în mediu, diminuând efectul lor inhibitor. S-a evidențiat compusul RGT-24 în concentrație de 2 mg/l, asigurând un spor al biomasei de 9,4% și de carotenoizi de 8,7%.

Concluzii

1. Intensitatea luminii, temperatura și adaptarea prealabilă la noul mediu de nutriție folosit (mediul organo-mineral MD, preparat în baza lichidului cultural al spirulinei) joacă un rol determinant în inițierea și parcurgerea fazei exponențiale de dezvoltare a dunaliei.
2. Dintre compușii coordinativi ai Cu(II) cercetați productivitate majoră s-a înregistrat la iluminarea intensă (5000 lx) pentru compusul RGT-24, în concentrație de 2 mg/l, fiind cu 9,4% mai înaltă decât proba cultivată în lipsa compușilor coordinativi.
3. Conținutul de pigmenți carotenoizi în biomasa dunaliei cultivate în prezența compușilor coordinativi ai Cu(II) a prezentat un efect stimulat mai accentuat față de proba-martor la iluminare normală (3500 lx). Cel mai semnificativ spor s-a observat pentru 4 mg/l compus RGT-23, constituind 37,7%.

Bibliografie:

1. ABD EL-BAKY, H., HUSSEIN, M., EL-BAROTY, G. Algal extracts improve antioxidant defense abilities on salt tolerance of wheat plant irrigated with sea water. In: *African Journal of Biochemistry Research*, 2008, no.2(7), p.151-164. ISSN 1996-0778
2. AVRON, M., BEN-AMOTZ, A. *Dunaliella: physiology, biochemistry and biotechnology*. Boca Raton: CRC Press, 1992. 240 p. ISBN 978-0849366475
3. BEN-AMOTZ, A. Industrial production of microalgae cell-mass and secondary products – major industrial species *Dunaliella*. In: A.RICHMOND, ed. *Handbook of microalgal culture*. Oxford: Blakwell, 2004, p.273-280.
4. BHOSALE, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, no.63(4), p.351-361. ISSN 0175-7598
5. BIVOL, C. Parametri morfologici și biochimici ai microalgei verzi *Dunaliella salina* la cultivare pe medii minerale și organo-minerale. În: *Studia Universitatis. Seria „Științe ale naturii”*, 2008, nr.2(12), p.32-35. ISSN 1857-1735
6. BIVOL, C. ș.a. Acțiunea unor compuși coordinativi ai Fe(III) cu α -aminoacizi asupra conținutului pigmentilor fotosintetici ai microalgei *Dunaliella salina* CNM-AV-02. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Seria „Științele vieții”*, 2012, nr.2(317), p.149-154. ISSN 1857-064X
7. BOROWITZKA, M., SIVA, C. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (*Chlorophyta*, *Dunaliellales*) with emphasis on the marine and halophilic species. In: *Journal of Applied Phycology*, 2007, no.19(5), p.567-590. ISSN 0921-8971
8. LIHTENTHALER, H.K., BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 2001. F4.3.1-F4.3.8. ISBN 978-0471142911
9. PASQUALETTI, M. et al. Salinity and nitrate concentration on the growth and carotenoids accumulation in a strain of *Dunaliella salina* (*Chlorophyta*) cultivated under laboratory conditions. In: *Transitional Waters Bulletin*, 2010, no.4(2), p.94-104. ISSN 1825-229X
10. PRASANNA, R. et al. Potentials and applications of algal pigments in biology and industry. In: *Acta Botanica Hungarica*, 2007, no.49(1-2), p.131-156. ISSN 0236-6495
11. RAJA, R. et al. Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, no.74(3), p.517-523. ISSN 0175-7598
12. RICHMOND, A., HU, Q. *Handbook of microalgal culture*. In: *Applied phycology and biotechnology*. Oxford: Blakwell, 2013. 736 p. ISBN 978-0470673898
13. RUDIC, V. *Aspecte noi ale biotehnologiei moderne*. Chișinău: Știința, 1993. 139 p. ISBN 978-5376018293
14. RUDIC, V. *Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale și realizări practice*. Chișinău: Elena V.I., 2007. 364 p. ISBN 978-9975989251
15. RUDIC, V. ș. a. *Metode de investigație în ficobiotehnologie*. Chișinău: CE USM, 2002. 61 p. ISBN 9975-70-254-6
16. ȘALARU, V. ș. a. Biomasa algală – sursă alternativă de energie, produse alimentare nonpoluante și substanțe biologice active. În: *Studia Universitatis. Seria „Științe ale naturii”*, 2007, no.7, p.196-200. ISSN 1857-1735
17. TAFRESHI, A., SHARIATI, M. Pilot culture of three strains of *Dunaliella salina* for β -carotene production in open ponds in the central region of Iran. In: *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, no.22(9), p.1003-1006. ISSN 1017-7825

18. UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA. *Procedeu de cultivare a microalgei verzi Dunaliella salina*: brevet MD nr.3780, Inventatori RUDIC, V., BULIMAGA, V., BIVOL, C. CIB A01G33/00. Publ. 31.12.2008, BOPI nr.12/08.
19. ДОСПЕХОВ, Б. *Методика полевого опыта*. Москва: Агропромиздат, 1985. 351 с.
20. МАКСИМОВ, В. *Многофакторный эксперимент в биологии*. Москва: МГУ, 1980. 278 с.
21. ТРЕНКЕНШУ, Р., ГЕВОРГИЗ, Р., БОРОВКОВ, А. *Основы промышленного культивирования дуналиеллы солоноводной (Dunaliella salina Teod.)*. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2005. 103 с.

Notă: Cercetările au fost întreprinse în cadrul Proiectului independent pentru tinerii cercetători 13.819.18.07A, 2013-2014, finanțat de către Consiliul Suprem pentru Știință și Dezvoltare Tehnologică al AȘM.

Prezentat la 15.09.2013