

**MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI CERCETĂRII AL REPUBLICII  
MOLDOVA  
UNIVERSITATEA TEHNICĂ A MOLDOVEI**

Cu titlu de manuscris

C.Z.U 573.6:581.143.6:582.26/.27(043)

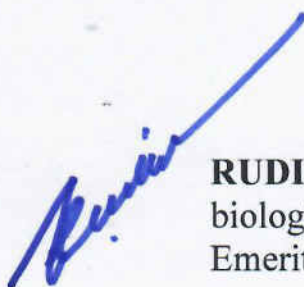
**CEPOI LILIANA**

**STRESUL OXIDATIV ÎN FICOBIOTEHNOLOGIE -  
MECANISME ȘI PROCEDEE DE REGLARE**

**167.01 – BIOTEHNOLOGIE, BIONANOTEHNOLOGIE**

**Teză de doctor habilitat în științe biologice**

Consultant științific:



**RUDIC Valeriu**, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, academician, Om Emerit al R. Moldova

Autor:



**CEPOI Liliana**, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

**CHIȘINĂU, 2024**

**© Cepoi Liliana, 2024**

## CUPRINS

ADNOTĂRI (în limbile română, rusă și engleză)	5
LISTA FIGURILOR	8
LISTA TABELELOR	13
LISTA ABREVIERILOR	14
INTRODUCERE	16
1. STRESUL OXIDATIV LA MICROALGE ȘI CIANOBACTERII	26
1.1. Mecanismele de apariție și dezvoltare a stresului oxidativ la cianobacterii și microalge	28
1.2. Rolul biologic al speciilor reactive ale oxigenului	42
1.3. Protecția antioxidantă la microalge și cianobacterii	46
1.4. Stresul de mediu și stresul indus la cianobacterii și microalge	54
1.5. Concluzii la capitolul 1	62
2. DESIGNUL EXPERIMENTAL, OBIECTELE DE STUDIU ȘI METODELE DE CERCETARE	64
2.1. Designul studiului experimental	64
2.2. Tulpinile de microalge și cianobacterii	68
2.3. Metodele aplicate în studiu	72
2.4. Concluzii la capitolul 2	79
3. DINAMICA MODIFICĂRILOR ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A BIOMASEI CULTURILOR FICOLOGICE PE DURATA CICLULUI DE CREȘTERE ÎN CONDIȚII OPTIME	81
3.1. Ciclurile de creștere a culturilor ficologice în condiții optime ale sistemelor închise	82
3.2. Activitatea antioxidantă a biomasei de <i>Nostoc linckia</i> CNMN-CB-03 pe durata ciclului vital	85
3.3. Modificarea activității antioxidante a biomasei de <i>Arthrospira platensis</i> CNMN-CB-11 pe durata unui ciclu de cultivare	90
3.4. Capacitatea antioxidantă a biomasei de <i>Porphyridium cruentum</i> CNMN-AR-01 pe parcursul ciclului vital în sistem închis	95
3.5. Dinamica parametrilor activității antioxidante a biomasei de <i>Haematococcus pluvialis</i> CNMN-AV-05 pe parcursul ciclului vital	100
3.6. Concluzii la capitolul 3	103
4. STRESUL TEHNOLOGIC LA CIANOBACTERIILE ȘI MICROALGELE DE INTERES INDUSTRIAL	105
4.1. Influența stresului termic asupra tulpinii tehnologice <i>Arthrospira platensis</i> CNMN-CB-11	105
4.2. Influența stresului de lumină asupra culturii de <i>Arthrospira platensis</i> CNMN-CB-11 în condiții de laborator și de producere	112
4.3. Influența stresului salin asupra tulpinilor <i>Arthrospira platensis</i> CNMN-CB-11 și <i>Nostoc linckia</i> CNMN-CB-03 în condiții de laborator	121
4.4. Influența ionilor metalici asupra <i>Arthrospira platensis</i> CNMN-CB-11, <i>Nostoc linckia</i> CNMN-CB-03 și <i>Porphyridium cruentum</i> CNMN-AR-01	127
4.5. Concluzii la capitolul 4	135

5. STRESUL OXIDATIV ÎN NANOBIOTEHNOLOGIA CIANOBACTERIILOR ȘI MICROALGELOR	139
5.1 Stresul oxidativ la cianobacterii și microalge în procesul de bionanosinteză	139
5.2 Stresul oxidativ provocat de diferite nanoparticule la microalge și cianobacterii	151
5.3 Stresul oxidativ pe durata biofuncționalizării nanoparticulelor de aur și argint de către microalge și cianobacterii	168
5.4 Concluzii la capitolul 5	180
6. STRESUL OXIDATIV ÎN PROCESELE DE BIOREMEDIERE A APELOR CONTAMINATE CU METALE	183
6.1 Particularitățile răspunsului culturii de spirulină la stresul oxidativ în condiții de tratare a efluenților contaminați cu metale grele și cicluri repetate de cultivare	184
6.2 Particularitățile răspunsului cianobacteriei <i>Nostoc linckia</i> și acumularea de metale grele din sistemele multimetalice care conțin cupru și crom în cicluri iterative	201
6.3 Capacitatea de bioacumulare a metalelor grele și pământurilor rare de către <i>Arthrospira platensis</i>	216
6.4 Concluzii la capitolul 6	219
7. MANAGEMENTUL STRESULUI OXIDATIV ÎN CADRUL TEHNOLOGIILOR DE CULTIVARE A OBIECTELOR FICOLOGICE DE INTERES INDUSTRIAL. GENERALITĂȚI, MECANISME, APLICAȚII	221
7.1 Mecanisme comune de instalare a stresului oxidativ de diferită etiologie	221
7.2 Identificarea și caracterizarea stării de stres în baza intensității proceselor oxidative	231
7.3 Aplicații ale stresului oxidativ în ficobiotehnologie	240
7.4 Concluzii la capitolul 7	261
CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI	263
BIBLIOGRAFIE	269
ANEXE	302
Anexa 1. Acte de implementare	303
Anexa 2. Brevete de invenție	307
Anexa 3. Diplome la Saloane de Invenții și Expoziții Internaționale	315
Anexa 4. Parametrii productivi și biochimici ai cianobacteriilor și microalgelor în condiții de stres tehnologic	331
Anexa 5. Dovezi ale procesului de nanobiosinteză cu utilizarea microalgelor și cianobacteriilor	338
Anexa 6. Acumularea metalelor în biomasa cianobacteriilor pe durata ciclurilor iterative de cultivare	345
Anexa 7. Ultrastructura spirulinei în condiții de stres	351
Anexa 8. Procedee biotehnologice noi	354
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	358
CV-ul AUTORULUI	359



## ADNOTARE

**Cepoi Liliana, „Stresul oxidativ în ficobiotehnologie – mecanisme și procedee de reglare”, teză de doctor habilitat în științe biologice, specialitatea 167.01 – Biotehnologie, bionanotehnologie, Chișinău, 2023**

**Structura tezei:** Teza conține introducere, 7 capitole, concluzii și recomandări, bibliografie cu 502 titluri, 8 anexe, 268 pagini text de bază, 98 figuri, 16 tabele. Rezultatele sunt reflectate în 75 publicații științifice.

**Cuvintele cheie:** stres oxidativ, microalge, cianobacterii, biomasă, markeri ai stresului, componentă biochimică, ultrastructură, expresia genelor asociate stresului, intensitatea stresului.

**Scopul lucrării:** elucidarea elementelor comune ale răspunsului microalgelor și cianobacteriilor la diferite tipuri de stres oxidativ indus, fundamentarea posibilității aplicării stresului în calitate de instrument biotehnologic în ficobiotehnologie și elaborarea tehnologiilor ficologice bazate pe răspunsul la stres indus.

**Obiectivele lucrării:** Evidențierea particularităților de manifestare a stresului oxidativ indus de factorii fizici și chimici la cianobacterii și microalge de interes biotehnologic; Elucidarea posibilității de aplicare a răspunsului la stresul oxidativ indus în scopul obținerii biomasei ficologice cu componentă prognozată; Estimarea implicării stresului oxidativ în procesele de bioremediere de către microalge și cianobacterii a apelor contaminate cu metale, în sisteme iterative; Conturarea principiilor de realizare a nanobiosintezei și biofuncționalizării nanoparticulelor cu ajutorul microalgelor și cianobacteriilor, în baza mecanismelor de protecție contra stresului oxidativ; Fundamentarea posibilității și a limitelor de aplicare a răspunsului la stresul oxidativ în calitate de instrument în ficobiotehnologie; Elaborarea procedeelelor ficologice, bazate pe aplicarea răspunsului la stresul oxidativ indus.

**Noutatea și originalitatea științifică:** În această lucrare răspunsul la stresul oxidativ în ficobiotehnologie a fost abordat în calitate de instrument util în dirijarea proceselor biosintetice la microalge și cianobacterii de interes biotehnologic, precum și în aplicarea microalgelor și cianobacteriilor în procesele de biosinteză și biofuncționalizare a nanoparticulelor și de bioremediere a mediului ambiant. Au fost identificate mecanismele și procedeele de reglare a proceselor generate de stresul oxidativ indus în scopuri biotehnologice.

**Rezultatele obținute, care contribuie la soluționarea problemei științifice importante** constau în fundamentarea prin dovezi a posibilității aplicării răspunsului microalgelor și cianobacteriilor la stresul oxidativ indus în calitate de instrument biotehnologic, ceea ce a condus la elaborarea procedeelelor originale de biosinteză a nanoparticulelor, inclusiv a celor biofuncționalizate; de obținere a biomasei ficologice calitative și sigure, cu un conținut dirijat de compuși bioactivi; de bioremediere a efluenților contaminați cu metale grele, ceea ce a conturat o direcție nouă de cercetare: *stresul ca instrument în ficobiotehnologie*.

**Semnificația teoretică:** au fost identificate mecanismele de instalare a stresului oxidativ indus, precum și elementele comune ale reacțiilor de răspuns a microalgelor și cianobacteriilor la starea de stres; au fost evidențiate componentele lanțului reacțiilor de răspuns a microalgelor și cianobacteriilor, acționarea cărora asigură reglarea proceselor de interes la obiectele ficologice; au fost evidențiați indicatorii siguri ai stresului oxidativ și parametrii de control ai proceselor biotehnologice.

**Valoarea aplicativă a lucrării:** În baza cunoștințelor noi acumulate au fost elaborate tehnologii bazate pe răspunsul microalgelor și cianobacteriilor la stres oxidativ indus, orientate spre obținerea de biomasă ficologică prețioasă, spre îndepărtarea/acumularea metalelor grele din mediul contaminat; spre biosinteza și biofuncționalizarea nanomaterialelor.

**Implementarea rezultatelor științifice:** Tehnologiile elaborate au fost implementate la întreprinderea de producere cu profil biotehnologic și farmaceutic FICOTEHFARM (3 acte de implementare).

## АДНОТАЦИЯ

**Чепой Лилиана, „Окислительный стресс в фикобиотехнологии – механизмы и способы его регуляции”, диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук, специальность 167.01 – Биотехнология, бионанотехнология, Кишинев, 2023**

**Структура диссертации:** Диссертация состоит из введения, 7 глав, выводов и рекомендаций, библиографического списка из 502 названия, 8 приложений, 268 страниц основного текста, 98 рисунка, 16 таблиц. Результаты изложены в 75 научных работах.

**Ключевые слова:** окислительный стресс, микроводоросли, цианобактерии, биомасса, маркеры стресса, биохимический состав, ультраструктура, экспрессия генов, ассоциированных со стрессом, интенсивность стресса.

**Цель работы:** выявление общих элементов ответа микроводорослей и цианобактерий на различные виды индуцированного окислительного стресса, обоснование возможности использования стресса как биотехнологического инструмента в фикобиотехнологии и разработка фикологических технологий, основанных на ответ микроводорослей и цианобактерий на индуцированный окислительный стресс.

**Задачи работы:** Выявление особенностей проявления окислительного стресса, индуцированного физическими и химическими факторами, у цианобактерий и микроводорослей, представляющих биотехнологический интерес; Выяснение возможности применения реакции на индуцированный окислительный стресс для получения фикологической биомассы прогнозируемого состава; Оценка участия окислительного стресса в процессах биоремедиации микроводорослями и цианобактериями вод, загрязненных металлами, в итеративных системах; Выявить принципы нанобиосинтеза и биофункционализации наночастиц с помощью микроводорослей и цианобактерий, основанные на механизмах защиты от окислительного стресса; Обоснование возможности и границ применения реакции на окислительный стресс как инструмента в фикобиотехнологии; Разработка фикобиотехнологических процедур, основанных на применении ответа на индуцированный окислительный стресс.

**Научная новизна и оригинальность:** В этой работе ответ микроводорослей и цианобактерий на окислительный стресс рассматривается в качестве полезного инструмента для управления биосинтетическими процессами, а также для осуществления микроводорослями и цианобактериями процессов биосинтеза и биофункционализации наночастиц и биоремедиации окружающей среды. Были выявлены механизмы и способы управления процессами, вызванными окислительным стрессом, в фикобиотехнологии.

**Полученные результаты, способствующие решению важной научной проблемы,** заключаются в доказательном обосновании возможности применения реакции на индуцированный окислительный стресс в качестве биотехнологического инструмента, что привело к разработке оригинальных способов биосинтеза наночастиц, в том числе биофункционализированных; получению качественной и безопасной биомассы с прогнозируемым содержанием биологически активных соединений; биоремедиации стоков, загрязненных тяжелыми металлами, что обозначило новое направление исследований: *стресс как инструмент в фикобиотехнологии.*

**Теоретическая значимость:** выявлены механизмы появления индуцированного окислительного стресса, а также общие элементы ответных реакций микроводорослей и цианобактерий на стрессовое состояние; определены звенья ответной реакционной цепи микроводорослей и цианобактерий, воздействие на которые обеспечивает регуляцию различных процессов; выявлены надежные индикаторы окислительного стресса и параметры контроля качества биотехнологических процессов.

**Прикладная значимость:** при помощи новых накопленных знаний были разработаны технологии получения ценной биомассы; удаления/накопления тяжелых металлов из загрязненной среды; биосинтеза и биофункционализации наноматериалов, основанные на применении индуцированного окислительного стресса.

**Внедрение научных результатов:** Разработанные технологии внедрены производственной компанией ФИКОТЕХФАРМ, специализированной на биотехнологической и фармацевтической продукции (3 акта о внедрении).

## ANNOTATION

Cepoi Liliana, “**Oxidative stress in phycobiotechnology – mechanisms and methods of its regulation**”, dissertation for the degree of Doctor habilitatus of Biological Sciences, specialty 167.01 – Biotechnology, bionanotechnology, Chisinau, 2023

Dissertation structure: The dissertation consists of an introduction, 7 chapters, conclusions and recommendations, a bibliographic list of 502 titles, 8 appendices, 268 pages of the main text, 98 figures, 16 tables. The results are presented in 75 published scientific papers.

**Keywords:** oxidative stress, microalgae, cyanobacteria, biomass, oxidative stress markers, biochemical composition, ultrastructure, stress-associated gene expression.

**Purpose of the work:** Elucidating the common elements of specific responses of microalgae and cyanobacteria to various types of induced oxidative stress, substantiating the potential application of stress as a biotechnological tool in phycobiotechnology, and developing phycological technologies based on induced stress responses.

**Objectives of the work:** Highlighting the specific characteristics of the manifestation of oxidative stress induced by physical and chemical factors in cyanobacteria and microalgae; elucidating the potential application of induced oxidative stress responses for the production of phycological biomass with predicted composition; assessing the involvement of oxidative stress in bioremediation processes of contaminated waters with metals by microalgae and cyanobacteria in iterative systems; outlining the principles of nanobiosynthesis and biofunctionalization of metallic nanoparticles using microalgae and cyanobacteria, based on oxidative stress protection mechanisms; substantiating the possibilities and limitations of applying oxidative stress response as a tool in phycobiotechnology; developing phycological procedures based on the application of induced oxidative stress.

**Scientific novelty and originality:** In this work, oxidative stress was considered as a useful tool for controlling biosynthetic processes in microalgae and cyanobacteria, as well as for the biosynthesis and biofunctionalization of nanoparticles and bioremediation of the environment by microalgae and cyanobacteria.

**The obtained results, which contribute to addressing the important scientific problem,** consist of providing evidence for the possibility of applying induced oxidative stress as a biotechnological tool, leading to the development of original procedures for the biosynthesis of nanoparticles, including biofunctionalized ones; production of high-quality and safe phycological biomass with a directed content of bioactive compounds; bioremediation of effluents contaminated with heavy metals. This has led to the emergence of a new research direction: *stress as a tool in phycobiotechnology*.

**Theoretical significance:** the mechanisms of induced oxidative stress, as well as general elements of the responses of microalgae and cyanobacteria to a stressful state, were revealed; the links of the response reaction chain of microalgae and cyanobacteria were determined, the impact on which ensures the regulation of various processes; reliable indicators of oxidative stress and quality control parameters of biotechnological processes have been identified.

**Applied significance:** technologies based on induced oxidative stress, focused on obtaining valuable biomass, on the removal/accumulation of heavy metals from a polluted environment; on the biosynthesis and biofunctionalization of nanomaterials have been developed.

**Implementation of scientific results:** The developed technologies were implemented by the production company FICOTECHPHARM, specialized in biotechnological and pharmaceutical products (3 acts of implementation).

## LISTA FIGURILOR

Figura 2.1.	Designul general al studiului realizat	64
Figura 2.2.	Schema cercetărilor orientate spre studiul stresului indus de factorii tehnologici la cianobacterii și microalge	65
Figura 2.3.	Schema studiul implicării stresului indus în procesele de biosinteză și biofuncționalizare a nanoparticulelor de către microalge și cianobacterii	66
Figura 2.4.	Schema studiul implicării stresului indus în procesele de bioremediere cu participarea microalgelor și cianobacteriilor	67
Figura 2.5.	Nivelurile de studiu a stresului oxidativ în calitate de instrument biotehnologic	67
Figura 3.1	Curbele de creștere a culturilor ficologice în condiții de sistem închis, în condiții optime	83
Figura 3.2.	Activitatea antiradicalică a fracției hidrosolubile a biomasei de <i>Nostoc linckia</i> în condiții de laborator (a) și în condiții de producere (b) pe durata ciclului vital	85
Figura 3.3	Activitatea antiradicalică a componentelor liposolubile din biomasa de <i>Nostoc linckia</i> în condiții de laborator (a) și în condiții de producere (b) pe durata ciclului vital	87
Figura 3.4	Capacitatea de reducere a reagentului fosfo-molibdenic a componentelor liposolubile din biomasa de <i>Nostoc linckia</i> în condiții de laborator (a) și de producere (b) pe parcursul ciclului de cultivare	88
Figura 3.5	Cantitatea de dialdehidă malonică în biomasa de <i>Nostoc linckia</i> în condiții de laborator (a) și de producere (b) pe parcursul ciclului de cultivare	89
Figura 3.6	Puterea de reducere a ionilor de fier (III) a biomasei de <i>Arthrospira platensis</i> pe durata ciclului vital în condiții de laborator și în condiții de producere industrială	91
Figura 3.7	Activitatea antiradicalică (testul ABTS) a extractelor hidrice și etanolice din biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> pe durata ciclului vital în condiții de laborator (a) și de producere (b)	92
Figura 3.8	Activitatea antiradicalică (testul DPPH) a extractelor hidrice și etanolice din biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> pe durata ciclului vital în condiții de laborator (a) și de producere (b)	93
Figura 3.9	Modificarea conținutului dialdehidei malonice în biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> pe durata ciclului vital	94
Figura 3.10	Activitatea antiradicalică față de radicalii DPPH <sup>•</sup> (a) și ABTS <sup>•+</sup> (b) a extractelor din biomasa de <i>Porphyridium cruentum</i> pe parcursul ciclului vital	96
Figura 3.11	Raportul valorilor testelor ABTS/DPPH pentru extractele din biomasa de <i>Porphyridium cruentum</i> pe durata ciclului vital	98
Figura 3.12	Activitatea antioxidantă stabilită în baza testului de reducere a reagentului Folin-Ciocalteu în extractele din biomasa de <i>Porphyridium cruentum</i>	99
Figura 3.13	Activitatea antioxidantă (teste DPPH, ABTS, % inhibiție) a extractului etanolic din biomasa de <i>Haematococcus pluvialis</i> , pe parcursul perioadei de cultivare	101

Figura 4.1	Activitatea antioxidantă și cantitatea de dialdehidă malonică în biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> în condiții de stres termic pe durata ciclului vital.	106
Figura 4.2	Activitatea enzimelor antioxidante în biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> în condiții de stres termic/laborator pe durata ciclului vital	108
Figura 4.3	Activitatea antioxidantă și cantitatea de dialdehidă malonică în biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> în condiții de stres de iluminare pe durata cilului vital.	113
Figura 4.4	Activitatea enzimelor antioxidante în biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> în condiții de stres de iluminare pe durata cilului vital.	116
Figura 4.5	Activitatea antioxidantă și cantitatea de dialdehidă malonică în biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> la diferite concentrații de NaCl în mediu.	122
Figura 4.6	Activitatea antioxidantă și cantitatea de dialdehidă malonică în biomasa de <i>Nostoc linckia</i> la diferite concentrații de NaCl în mediu.	123
Figura 4.7	Activitatea enzimelor antioxidante la <i>Arthrospira platensis</i> în condiții de nivel diferit de salinitate.	124
Figura 4.8	Activitatea enzimelor antioxidante la <i>Nostoc linckia</i> în condiții de nivel diferit de salinitate	125
Figura 4.9	Activitatea antioxidantă și conținutul de dialdehidă malonică în biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> în prezența cuprului și zincului.	128
Figura 4.10	Activitatea antioxidantă și conținutul de dialdehidă malonică în biomasa de <i>Nostoc linckia</i> în prezența cuprului și zincului.	129
Figura 4.11	Activitatea antioxidantă și conținutul de dialdehidă malonică în biomasa de <i>Porphyridium cruentum</i> în prezența cuprului și zincului.	130
Figura 4.12	Activitatea enzimelor antioxidante în biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> în prezența cuprului și zincului	131
Figura 4.13	Activitatea enzimelor antioxidante în biomasa de <i>Nostoc linckia</i> în prezența cuprului și zincului.	132
Figura 4.14	Activitatea enzimelor antioxidante în biomasa de <i>Porphyridium cruentum</i> în prezența cuprului și zincului.	133
Figura 5.1	Modificarea conținutului unor componente în biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> pe durata nanobiosintezei	141
Figura 5.2	Activitatea antiradicalică a extractelor din biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> în procesul de nanobiosinteză a AgNP	142
Figura 5.3	Modificarea conținutului unor componente în biomasa de <i>Nostoc linckia</i> și a activității antioxidante pe durata nanobiosintezei	143
Figura 5.4	Modificarea conținutului unor componente în biomasa de <i>Dunaliella salina</i> și a activității antioxidante pe durata nanobiosintezei	145
Figura 5.5	Modificarea conținutului unor componente în biomasa de <i>Porphyridium cruentum</i> și a activității antioxidante pe durata nanobiosintezei	147
Figura 5.6	Modificarea conținutului unor componente în biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> și a activității antioxidante pe durata biosintezei nanoparticulelor de seleniu	149
Figura 5.7	Modificarea conținutului unor componente în biomasa de <i>Nostoc linckia</i> și a activității antioxidante pe durata biosintezei nanoparticulelor de seleniu	151
Figura 5.8	Efectul nanoparticulelor CdSe asupra cantității de biomasă, activității antioxidante și conținutului de dialdehidă malonică la <i>Arthrospira platensis</i>	154
Figura 5.9	Efectul nanoparticulelor ZnSe asupra cantității de biomasă, activității antioxidante și conținutului de dialdehidă malonică la <i>Arthrospira platensis</i>	155
Figura 5.10	Efectul nanoparticulelor ZnS asupra cantității de biomasă, activității	156

	antioxidante și conținutului de dialdehidă malonică la <i>Arthrospira platensis</i>	
Figura 5.11	Biomasa de <i>Porphyridium cruentum</i> (% față de proba martor) crescută în prezența nanoparticulelor de CdSe	158
Figura 5.12	Dialdehida malonică (% față de martor) în biomasa de <i>Porphyridium cruentum</i> la cultivare în prezența nanoparticulelor de CdSe	158
Figura 5.13	Biomasa de <i>Porphyridium cruentum</i> (% față de martor) obținută la creștere în prezența nanoparticulelor de ZnSe	158
Figura 5.14	Dialdehida malonică (% față de martor) în biomasa de <i>Porphyridium cruentum</i> la cultivare în prezența nanoparticulelor de ZnSe	159
Figura 5.15	Biomasa de <i>Porphyridium cruentum</i> (% față martor) obținută în prezența nanoparticulelor de ZnS (0,01-0,6 mg/l)	159
Figura 5.16	Dialdehida malonică (% față de martor) în biomasa de <i>Porphyridium cruentum</i> la creștere în prezența nanoparticulelor de ZnS	160
Figura 5.17	Modificarea parametrilor biomasei de spirulină la introducerea AgNP în mediu de cultură	162
Figura 5.18	Modificarea parametrilor biomasei de spirulină la introducerea AuNP în mediu de cultură	163
Figura 5.19	Efectul diferitor concentrații ale nanoparticulelor de argint cu dimensiunea de 10 și 20 nm asupra conținutului de lipide și DAM în biomasa de <i>Porphyridium cruentum</i>	165
Figura 5.20	Efectul diferitor concentrații ale nanoparticulelor de aur cu dimensiunea de 10 și 20 nm asupra conținutului de lipide și DAM în biomasa de <i>Porphyridium cruentum</i>	166
Figura 5.21	Biomasă de spirulină pe durata procesului de biofuncționalizare a AgNP în dependență de vârsta culturii	169
Figura 5.22	Efectul diferitor concentrații ale nanoparticule de argint asupra componenței biomasei de spirulină în dependență de perioada de aplicare: a - proteine, b – carbohidrați, c – lipide, d - DAM	170
Figura 5.23	Capacitatea de reducere a radicalului oxidului nitric a extractelor din biomasa spirulinei, obținută în prezența a 10μM AgNP în dependență de vârsta culturii la momentul adăugării nanoparticulelor și conținutul de substanță uscată în extract	172
Figura 5.24	Biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> pe durata procesului de biofuncționalizare a AuNP în dependență de vârsta culturii la momentul contactului cu nanoparticulele	173
Figura 5.25	Conținutul (a) lipidelor și (b) dialdehidei malonice în biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> pe durata procesului de biofuncționalizare a AuNP în dependență de vârsta culturii la momentul contactului cu nanoparticulele	174
Figura 5.26	Capacitatea de reducere a oxidului nitric a extractelor din biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> , obținută în prezența AuNP în dependență de vârsta culturii la momentul contactului cu nanoparticulele și conținutului de substanță uscată în extract	174
Figura 5.27	Biomasa de <i>P. cruentum</i> la introducerea AgNP(PEG) și AuNP(PEG) în mediul de cultivare în intervalul concentrațiilor 1,0 – 20,0 μM pe durata ciclului de cultivare	176
Figura 5.28	Conținutul de carbohidrați în biomasa <i>P. cruentum</i> la introducerea nanoparticulelor de aur și argint în mediul de cultivare la începutul fazei de	177

	latență (a) și la trei etape diferite ale ciclului vital (b,c)	
Figura 5.29	Conținutul de lipide în biomasa de <i>P. cruentum</i> la introducerea nanoparticulelor de aur și argint în mediul de cultivare la începutul fazei de latență (a) și la trei etape diferite ale ciclului vital (b)	177
Figura 5.30	Conținutul de dialdehidă malonică în biomasa de <i>P. cruentum</i> la introducerea nanoparticulelor de aur și argint în mediul de cultivare la începutul fazei de latență (a) și la trei etape diferite ale ciclului vital (b)	178
Figura 5.31	Capacitatea de reducere a radicalului oxidul nitric de către extractele etanolice din biomasa de <i>P. cruentum</i> crescută în prezența nanoparticulelor de aur și argint	179
Figura 6.1.	Cantitatea de biomasă de spirulină și compoziția ei biochimică la creștere pe medii ce conțin sisteme polimetalice cu conținut de Cu, Fe, Zn, Ni.	187
Figura 6.2.	Biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> acumulată în trei cicluri de cultivare succesive în sisteme polimetalice	189
Figura 6.3.	Conținutul de proteine, carbohidrați și lipide din biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> cultivată în patru sisteme polimetalice cu cupru	191
Figura 6.4.	Conținutul de ficobiliproteine și $\beta$ -caroten în biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> crescută în condițiile a patru sisteme polimetalice	192
Figura 6.5.	Biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> în patru sisteme analizate la adăugarea de ioni metalici în mediul de cultură în faza creșterii exponențiale	195
Figura 6.6.	Conținutul de proteine, lipide și carbohidrați din biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> în patru sisteme analizate la adăugarea de ioni metalici în mediul de cultură în faza creșterii exponențiale	196
Figura 6.7.	Conținutul pigmentilor secundari în biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> în patru sisteme analizate la adăugarea de ioni metalici în mediul de cultură în faza creșterii exponențiale	197
Figura 6.8.	Biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> în patru sisteme analizate la adăugarea de ioni metalici în mediul de cultură în faza staționară	198
Figura 6.9.	Conținutul de proteine, lipide și carbohidrați din biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> în patru sisteme analizate la adăugarea de ioni metalici în mediul de cultură în faza staționară	199
Figura 6.10.	Conținutul pigmentilor secundari în biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> în patru sisteme analizate la adăugarea de ioni metalici în mediul de cultură în faza staționară	200
Figura 6.11.	Biomasa de <i>Nostoc linckia</i> acumulată la finalul a trei cicluri de cultivare în sisteme model polimetalice	203
Figura 6.12.	Proteinele totale, carbohidrații, lipidele și dialdehida malonică în biomasa de <i>Nostoc linckia</i> obținută în trei cicluri iterative de cultivare în sisteme polimetalice	205
Figura 6.13.	Conținutul de pigmenți și activitatea antioxidantă în biomasa de <i>Nostoc linckia</i> obținută în trei cicluri iterative de cultivare în sisteme polimetalice	207
Figura 6.14.	Biomasa de <i>Nostoc linckia</i> obținută în timpul a trei cicluri de cultivare pe medii, care conțin ioni metalici	209
Figura 6.15.	Compoziția biochimică (proteine totale, carbohidrați, lipide și malondialdehidă) a biomasei de <i>Nostoc linckia</i> la finalul a trei cicluri de cultivare pe medii, ce conțin sisteme multimetalice	212
Figura 6.16.	Conținutul de pigmenți (ficobiliproteine, clorofilă $\alpha$ , $\beta$ -caroten) în biomasa de <i>Nostoc linckia</i> la finalul a trei cicluri de cultivare pe medii, ce conțin	213

	sisteme multimetalice	
Figura 6.17.	Activitatea antioxidantă (% inhibiție ABTS <sup>++</sup> ) a extractelor hidrice și etanolice și conținutul fenolic din biomasa de <i>Nostoc linckia</i> la finalul a trei cicluri de cultivare pe medii, ce conțin sisteme multimetalice	215
Figura 7.1	Ultrastructura celulelor de <i>A. platensis</i> în proces de nanobiosinteză.	222
Figura 7.2	Ultrastructura celulelor de <i>A. platensis</i> în contact cu nanoparticule de aur și argint.	223
Figura 7.3	Diferența de expresie relativă a genelor asociate răspunsului la stresul oxidativ, între martor și situația de stres la <i>Arthrospira platensis</i>	227
Figura 7.4	Apariția și consecințele dezechilibrului activității enzimelor antioxidante primare la <i>Arthrospira platensis</i> (explicațiile sunt în text)	229
Figura 7.5	Modificările expresiei unor gene asociate cu stresul și efectele lor fiziologice la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i>	230
Figura 7.6	Relația dintre valorile DAM și valorile testului ABTS, extract hidro-etanolic, la contactul culturilor ficologice cu diferite concentrații de nanoparticule	237
Figura 7.7.	Paterne de derulare a stresului oxidativ la cianobacterii și microalge	239
Figura 7.8	Schema de derulare a procedurii de dirijare a conținutului de biomasă, ficobiliproteine și polizaharide în procesul de cultivare industrială a cianobacteriei <i>Arthrospira platensis</i> (spirulina)	241
Figura 7.9.	Procedee de biosinteză a nanoparticulelor de seleniu cu implicarea culturii vii de spirulină	243
Figura 7.10.	Schema generalizată a proceselor de biosinteză a nanoparticulelor de argint sau seleniu cu implicarea biomasei și fracțiilor biologic active din spirulina	244
Figura 7.11.	Etapele de derulare a proceselor de biosinteză a AgNP sau SeNP pe suport de biomasă și polizaharide din <i>Nostoc linckia</i>	245
Figura 7.12	Procedee de biosinteză a nanoparticulelor de argint cu utilizarea biomasei și fracției proteice a algei roșii <i>Porphyridium cruentum</i> și algei verzi <i>Dunaliella salina</i>	247
Figura 7.13.	Etapele procesului de biofuncționalizare a AgNP(PEG) de către cultura de <i>Arthrospira platensis</i>	250
Figura 7.14.	Procedee de stimulare a biosintezei lipidelor la cianobacteria <i>Arthrospira platensis</i> cu aplicarea nanoparticulelor de argint, nanoparticulelor de aur, sau nanoparticulelor de cupru	252
Figura 7.15	Etapele procedurii de stimulare a conținutului de lipide la cultivarea microalgei verzi <i>Dunaliella salina</i> cu nanoparticule de argint	253
Figura 7.16	Etapele procedurilor de cultivare microalgei roșii <i>Porphyridium cuentum</i> în scopul producerii de biomasă cu un conținut sporit de lipide omega-3	254
Figura 7.17	Etapele unor modele de procedee de recuperare a Cu(II), Cr(II), Fe(III), Ni(II) și Zn(II) din sisteme, ce conțin cantități moderate de aceste metale de către cianobacteriile <i>Arthrospira platensis</i> și <i>Nostoc linckia</i>	256
Figura 7.18	Etapele procedurii de apreciere a toxicității nanoparticulelor cu ajutorul microalgei roșii <i>Porphyridium cruentum</i>	259



## LISTA TABELELOR

Tabelul 2.1.	Lista primerilor utilizați pentru studiul expresiei relative a genelor asociate cu stresul	78
Tabelul 5.1	Coeficienții de corelație semnificativi între cantitatea de biomasă de spirulină și conținutul dialdehidei malonice în biomasă la acțiunea nanoparticulelor de CdSe și ZnSe	156
Tabelul 5.2	Coeficienții de corelație semnificativi între cantitatea de biomasă de <i>Porphyridium cruentum</i> și conținutul dialdehidei malonice în biomasă la acțiunea nanoparticulelor de CdSe, ZnSe și ZnS	160
Tabelul 5.3	Efectul nanoparticulelor asupra ratei clorofilă $\alpha/\beta$ -caroten la spirulină	164
Tabelul 6.1.	Compoziția chimică a sistemelor polimetalice cu conținut de cupru	186
Tabelul 6.2.	Compoziția chimică a sistemelor polimetalice diluate cu conținut de cupru	188
Tabelul 6.3.	Compoziția chimică a efluenților sintetici cu conținut de crom (VI)	193
Tabelul 6.4.	Concentrația metalelor în sistemele multimetalice, ce conțin cupru	202
Tabelul 6.5.	Concentrația metalelor în sistemele multimetalice, ce conțin crom (VI)	209
Tabelul 6.6.	Capacitatea cianobacteriei <i>Arthrospira platensis</i> de a acumula diferite elemente din efluenți mono- și policomponenți	217
Tabelul 7.1.	Frecvența modificărilor ultrastructurale la <i>Arthrospira platensis</i> în condiții de stres oxidativ	224
Tabelul 7.2	Expresia relativă a genelor asociate cu stresul în condițiile contactului cu pământuri rare	228
Tabelul 7.3	Corelațiile dintre valorile principalilor parametri monitorizați pe lotul total de probe martor în dinamică pe durata ciclului vital pentru tulpinile <i>Arthrospira platensis</i> CNMN-CB-11, <i>Nostoc linckia</i> CNMN-CB-03, <i>Porphyridium cruentum</i> CNMN-AR-01	233
Tabelul 7.4	Corelațiile dintre valorile principalilor parametri monitorizați pe lotul total de probe în experiențele cu stres termic și de fotoperiodism în dinamică pe durata ciclului vital în laborator și în producere pentru tulpinile <i>Arthrospira platensis</i> CNMN-CB-11 și <i>Nostoc linckia</i> CNMN-CB-03	234
Tabelul 7.5	Corelațiile dintre valorile principalilor parametri monitorizați pe eșantionul total de probe în experiențele cu stres termic și de fotoperiodism în dinamică pe durata ciclului vital în laborator pentru tulpinile <i>Arthrospira platensis</i> CNMN-CB-11, <i>Nostoc linckia</i> CNMN-CB-03, <i>Porphyridium cruentum</i> CNMN-AR-01	234
Tabelul 7.6	Corelațiile dintre valorile principalilor parametri monitorizați pe eșantionul total de probe stres provocat de prezența cuprului în dinamică pe durata ciclului vital pentru tulpinile <i>Arthrospira platensis</i> CNMN-CB-11, <i>Nostoc linckia</i> CNMN-CB-03, <i>Porphyridium cruentum</i> CNMN-AR-01	235

## LISTA ABREVIERILOR

A	Antioxidant
AAN	Analiză de activare cu neutroni
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-acidului 6-sulfonic)
AgNP	Nanoparticule de argint
APX	ascorbat peroxidaza
ATP	Adenozin-trifosfat
AuNP	Nanoparticule de aur
BAU	Biomasa absolut uscată
CAT	Catalaza
CIT	Citrat
CoQ	Coenzima Q, alternativ UQ -ubichinona
CRRFC	Capacitatea de reducere a reactivului Folin-Ciocalteu
CRRFM	Capacitatea de reducere a reactivului fosfo-molibdenic
CuNP	Nanoparticule de cupru
CYP	Citocrom P
DAM	Dialdehida malonică (alternativ MDA – Malondialdehida)
DPPH	1,1 difenil-2-picril hidrazil
EDAX	Spectroscopie de raze X cu dispersie de energie
FAD	Flavin-adenin-dinucleotidă
FD	Ferredoxina
<i>FeSOD</i>	Gena superoxiddismutazei fierice
FeSOD	Superoxiddismutaza fierică
FMN	Flavin-mononucleotidă
FUR	(Ferric Uptake Regulator proteine) Proteina reglatoare a aportului de fier
<i>fur</i>	Gena FUR
<i>GOGAT</i>	Gena glutamin – oxidoglutarat aminotransferazei
GOGAT	Glutamin – OxidoGlutarat AminoTransferaza (sinonim Glutamat Sintaza)
GPX	Glutation peroxidaza
GSH	Glutation redus
<i>hsp90</i>	Gena proteinei șocului termic, 90
HSPs	(Heat shock proteins) proteinele șocului termic

MOM	Monooxidaza microsomală
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotidă
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidă oxidată
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-fosfat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-fosfat oxidat
NBT	Tetrazoliu nitro blue
ORD	Oxidoreductaza
PDI	Protein-disulfid-izomeraza
PEG	Polietilenglicol
<i>per</i>	Gena peroxiredoxinei
PER	Peroxiredoxina
PGH	Prostaglandin sintaza H
PHA	Polihidroxiialcanoati
POAAN	Produsele oxidării avansate a acizilor nucleici
POAP	Produsele oxidării avansate a proteinelor
<i>pod</i>	Gena peroxidazei
POX	Peroxidaza
PP	Corpi polifosfați
PRFe	Puterea de reducere a fierului
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
<i>rbcL</i>	Gena subunității mari a ribulozo-1,5-bifosfat carboxilazei/oxigenazei
RE	Reticol endoplasmatic
RuBisCo	Ribulozo-1,5-bifosfat carboxilaza/oxigenaza
SEM	Microscopie electronică de scanare
SeNP	Nanoparticule de selenium
SOD	Superoxiddismutaza
SRO	Specii Reactive ale Oxigenului
TBA	Acid tiobarbituric
TBARS	Substanțe de reacție a acidului tiobarbituric (thiobarbituric acid reactive substance)
TEM	Microscopie electronică de transmisie
XRD	Difracția razelor X

## INTRODUCERE

**Actualitatea și importanța cercetărilor.** Datorită diversității, capacității de adaptare, componenței prețioase a biomasei, microalgele și cianobacteriile sunt obiecte atractive pentru diverse aplicații [147, 269]. Producerea de biomasă ficologică în diferite scopuri se înscrie perfect în reorientarea majoră a economiei mondiale spre bioeconomie prietenoasă atât mediului, cât și omului. Biomasa de microalge și cianobacterii prezintă o sursă valoroasă de proteine, vitamine, microelemente, lipide și carbohidrați [239]. Mai multe specii de microalge și cianobacterii, cum ar fi *Arthrospira platensis* Gomont 1892, *Nostoc linckia* Bornet ex Bornet & Flahault 1886, *Porphyridium cruentum* (S.F.Gray) Nägeli 1849, *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco 1905, *Haematococcus pluvialis* Flotow 1844, sunt recunoscute ca sigure pentru consum [65, 163, 266, 407, 460, 468]. Unele dintre acestea, de exemplu, *Arthrospira platensis*, cunoscută ca *spirulina*, sunt evaluate ca alimente complete din punct de vedere nutrițional [410].

Biomasa microalgelor și cianobacteriilor este o materie primă potrivită pentru obținerea diferitor produse alimentare și farmaceutice [197, 377, 412]. Productivitatea obiectelor ficologice o depășește esențial pe cea a plantelor de cultură, iar suprafețele utilizate pot fi reduse semnificativ. De asemenea, există numeroase instrumente biotehnologice (utilizarea diferitor stimulatori specifici, inclusiv nanomateriale, modelarea unui set de condiții fizice, ce determină răspunsuri specifice, instrumente avansate de inginerie genetică ș.a.) pentru a dezvolta ficobiotehnologii cu o eficiență înaltă [61, 181, 378]. Toate aceste intervenții orientate spre îmbunătățirea proprietăților biotehnologice ale microalgelor și cianobacteriilor, pe lângă efectele pozitive preconizate, pot provoca și anumite reacții adverse, primul dintre care este stresul oxidativ, generat de supraacumularea speciilor reactive ale oxigenului (SRO) [80, 349, 467]. Formarea de radicali liberi este un proces inevitabil și absolut necesar organismelor vii, atunci când este vorba despre radicalii primari. Aceștia joacă roluri importante în transducția de semnale, creșterea și diferențierea celulelor, realizării apoptozei ș.a [400]. Sistemele antioxidante ale celulelor sunt adaptate la un anumit nivel al speciilor reactive ale oxigenului, pe care le elimină eficient și asigură un echilibru redox perfect în condiții fiziologice normale [317, 342].

Condițiile tehnologice, inclusiv cele care asigură producerea de biomasă ficologică pot fi o sursă de stres și pot provoca un dezechilibru dintre radicalii liberi și antioxidanți în biomasa cianobacteriilor și microalgelor. În aceste circumstanțe, biomasa produsă poate fi o potențială sursă de pericol, conținând de rând cu diferiți compuși valoroși, radicali liberi și produse ale degradării oxidative ale compușilor organici [156, 170, 476]. Cunoașterea potențialelor pericole și managementul lor eficient este o condiție a siguranței biotehnologiilor aplicate și a produselor obținute.

În organismele fotosintetice SRO sunt generate inevitabil de transportul de electroni în procesul fotosintezei, mai ales atunci când intensitatea transportului de electroni condus de lumină depășește rata consumului de electroni în timpul fixării CO<sub>2</sub> [317]. Deoarece cianobacteriile și microalgele în habitatul lor natural sunt adesea expuse condițiilor externe în schimbare, cum ar fi fluctuațiile drastice ale intensității luminii, capacitatea lor de a percepe SRO și de a iniția rapid apărarea antioxidantă este crucială pentru supraviețuire. Mecanismele de contracarare a efectelor stresului oxidativ provocat de diferiți factori, inclusiv de condițiile tehnologice, pot fi aplicate în cadrul tehnologiilor intensive de producere a biomasei microalgale și cianobacteriene, astfel ca această biomasă să fie sigură pentru uzul uman și animal.

Contactul cianobacteriilor și microalgelor cu xenobioticele este asociat cu instalarea unei stări de stres de diferită intensitate. Reacțiile de răspuns inițiate de aceste organisme sunt orientate spre reducerea toxicității substanțelor străine prin diferite tactici cum ar fi transformarea ionilor agresivi în forme zerovalente, sechestrarea acestora în structuri specifice, efluxul celular, producerea de substanțe capabile să neutralizeze radicalii liberi și moleculele reactive produse ca rezultat al acțiunii factorilor de stres [37, 81, 274]. Cunoașterea mecanismelor de derulare a acestor procese poate sta la baza utilizării obiectelor ficologice în scopuri de bioremediere a mediilor poluate ori de nanobiosinteză.

**Scopul lucrării:** Fundamentarea aplicării stresului oxidativ în calitate de instrument în ficobiotehnologie prin elucidarea elementelor comune ale răspunsului microalgelor și cianobacteriilor la diferite tipuri de stres indus.

**Obiectivele lucrării:**

Evidențierea particularităților de manifestare a stresului oxidativ indus de factorii fizici și chimici la cianobacterii și microalge de interes biotehnologic;

Elucidarea posibilității de aplicare a răspunsului la stresul oxidativ indus în scopul obținerii biomasei ficologice cu componentă prognozată;

Estimarea implicării stresului oxidativ în procesele de bioremediere de către microalge și cianobacterii a apelor contaminate cu metale grele, în sisteme iterative;

Conturarea principiilor de realizare a nanobiosintezei și biofuncționalizării nanoparticulelor cu ajutorul microalgelor și cianobacteriilor, în baza mecanismelor de protecție contra stresului oxidativ;

Fundamentarea posibilității și a limitelor de aplicare a răspunsului la stresul oxidativ în calitate de instrument în ficobiotehnologie;

Elaborarea procedeelelor ficologice, bazate pe aplicarea răspunsului obiectelor ficologice la stresul oxidativ indus.

**Ipoteza de cercetare.** Răspunsul culturilor ficologice la stresul oxidativ indus poate fi un instrument util pentru obținerea biomasei prețioase cu conținut dirijat; pentru biosinteza și biofuncționalizarea nanoparticulelor și pentru bioremedierea mediului poluat. Aplicarea acestui instrument este condiționată de intensitatea proceselor de protecție antioxidantă, precum și de menținerea echilibrului între efectele benefice și acumularea speciilor reactive.

**Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese.** Pentru realizarea tezei în calitate de obiecte de studiu au fost utilizate 3 tulpini de cianobacterii și 3 tulpini de microalge eucariote, ceea ce a permis evidențierea elementelor comune de manifestare a stresului oxidativ la cele două domenii ale lumii vii. Tulpinile selectate posedă valoare biotehnologică; manifestă flexibilitate în cadrul fluxurilor tehnologice; sunt introduse în producere la nivel local/zonal în scopul transferului de elaborări tehnologice realizate în laborator.

În cercetare au fost aplicate metode standard pentru domeniul ficobiotehnologie, cu adaptările de rigoare pentru fiecare dintre tulpinile studiate. Metodele de studiu au fost selectate în baza argumentării științifice riguroase; corespunderii nivelului actual internațional în domeniu; corespunderii standardelor metodologice ale domeniului de cercetare.

**Noutatea și originalitatea științifică:** Originalitatea lucrării constă în abordarea răspunsului microalgelor și cianobacteriilor de interes biotehnologic la stresul oxidativ ca instrument eficient pentru dirijarea proceselor în ficobiotehnologie. Utilizând răspunsul specific al culturilor de microalge și cianobacterii la stres, au fost elaborate tehnologii de obținere a biomasei ficologice cu conținut valoros dirijat. În baza reacțiilor de protecție antioxidantă a culturilor de microalge și cianobacterii în condiții de stres a fost realizată biosinteza nanoparticulelor de argint și seleniu și biofuncționalizarea nanoparticulelor de aur și argint. Pentru prima dată a fost realizat procesul de decontaminare a apelor poluate cu metale grele în cicluri iterative de cultivare a cianobacteriilor, având drept reper eficiența sistemelor de protecție antioxidantă a acestora. Au fost identificați indicatori noi ai stresului oxidativ de intensitate joasă: raportul clorofilă  $\alpha/\beta$ -caroten și corelarea negativă puternică între capacitatea antiradicalică și nivelul dialdehidei malonice (DAM). Au fost formulate reguli de delimitare între stresul oxidativ de intensitate joasă de cel de intensitate medie în baza raportului dintre intensitatea factorului/timpul de acțiune a factorului și răspunsul culturilor ficologice. A fost confirmată ipoteza de cercetare conform căreia stresul oxidativ indus este un instrument eficient pentru modelarea proceselor în ficobiotehnologie.

**Rezultatele obținute, care contribuie la soluționarea problemei științifice importante:** constau în fundamentarea aplicării răspunsului cianobacteriilor și microalgelor la

stresul oxidativ indus în calitate de instrument biotehnologic, ce a condus la elaborarea procedurilor originale de: biosinteză și biofuncționalizare a nanoparticulelor, obținere a biomasei ficologice calitative și sigure, cu un conținut dirijat de compuși bioactivi; bioremediere a efluenților contaminați cu metale grele și alte elemente chimice, ceea ce a conturat o direcție nouă de cercetare: *stresul oxidativ ca instrument în ficobiotehnologie*

**Semnificația teoretică:** Au fost formulate reperetele conceptuale pentru utilizarea stresului oxidativ de diferită intensitate în calitate de mecanism de dirijare a proceselor ficobiotehnologice. Au fost argumentate principiile de aplicare a unor indicatori noi și regulile de delimitare a domeniilor de aplicare a stresului oxidativ în ficobiotehnologie. Au fost identificate mecanismele de instalare a stresului oxidativ indus, precum și elementele comune ale reacțiilor de răspuns a microalgelor și cianobacteriilor la starea de stres, cum ar fi dezechilibrul sistemului de protecție antioxidantă generată de activitatea necoordonată a enzimelor antioxidante din prima linie și modificarea expresiei genelor asociate cu stresul. Au fost identificați indicatori noi pentru controlul de siguranță și calitate în condițiile aplicării stresului oxidativ de intensitate joasă în calitate de instrument ficobiotehnologic.

**Valoarea aplicativă a lucrării:** În baza cunoștințelor conceptuale noi acumulate au fost elaborate procedee bazate pe răspunsul microalgelor și cianobacteriilor la stres oxidativ indus, orientate spre obținerea de biomasă ficologică prețioasă (8 procedee), spre biosinteza (14 procedee) și buifuncționalizarea nanoparticulelor (1 procedeu), spre îndepărtarea/acumularea metalelor grele și altor elemente din mediul contaminat (4 procedee). Elaborările prezintă interes pentru întreprinderile cu profil biotehnologic și farmaceutic de producere, iar 3 dintre acestea au fost implementate la SRL FICOTEHFARM (întreprindere cu profil farmaceutic și biotehnologic). Rezultatele fundamentale obținute în lucrare sunt utilizate în procesul de pregătire a cadrelor de înaltă calificare (ciclul III, doctorat) la specialitățile Ecologie, Microbiologie, Biotehnologie.

**Aprobarea rezultatelor științifice.** Rezultatele obținute pe durata realizării tezei au fost prezentate și aprobate la diferite manifestări științifice internaționale și naționale cu participare internațională, printre care: Conferința internațională *Advances in Modern Phycology*, ediția a 6-a, 2019, (Kyiv, Ukraine); Workshop-ul european în biologia moleculară a cianobacteriilor (*European Workshop on the molecular biology of cyanobacteria*), ediția a 10-a, 2017 (Cluj-Napoca, România); Simpozionul internațional *EuroAliment*, ediția a 8-a 2017 (Galați, România); Conferința Internațională în Nanotehnologii și Inginerie biomedicală (*International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering – ICNMBE*), ediția a 2-a, 2013 și ediția a 9-a, 2021 (Chișinău, Moldova); Congresul Internațional al Geneticienilor și

Amelioratorilor (International Congress of Geneticists and Breeders from the Republic of Moldova), ediția a 11-a, 2021 (Chișinău, Moldova); Conferința internațională în Biotehnologia Microbiană (International Scientific Conference on Microbial Biotechnology), ediția a doua, 2014; ediția a 3-a, 2016; ediția a 4-a, 2018; ediția a 5-a, 2022 (Chișinău, Moldova); Conferința Națională cu participare internațională Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community, ediția 2019; ediția 2022 (Chisinau, Moldova); Simpozionul national cu participare internațională Modern biotechnologies – Solutions to the challenges of the contemporary world, 2021 (Chisinau, Moldova).

**Publicațiile la tema tezei.** Rezultatele obținute pe durata elaborării acestei teze sunt reflectate în 75 lucrări științifice la tema acesteia dintre care: o monografie în monoautorat; o monografie colectivă; 3 capitole în monografiile editate peste hotare în editurile Springer și Elsevier, indexate WoS/Scopus; 36 articole în reviste științifice și culegeri, dintre care: 17 articole în reviste indexate WoS/Scopus, în 11 dintre ele - în calitate de prim autor; 2 articole în reviste recunoscute editate peste hotare; 14 articole în reviste din Registrul național (3 fără coautori); 3 articole în culegeri de lucrări științifice; 24 teze la conferințe, dintre care 21 la conferințe internaționale din țară și peste hotare; 4 prezentări în ședințele plenare ale conferințelor (2 internaționale), 7 brevete de invenții.

**Volumul și structura tezei.** Teza constă din introducere, șapte capitole, concluzii și recomandări, bibliografie cu 502 titluri, 8 anexe, 268 pagini text de bază, 98 figuri, 16 tabele.

#### **Sumarul compartimentelor tezei.**

**Capitolul 1. STRESUL OXIDATIV LA MICROALGE ȘI CIANOBACTERII** include analiza cunoștințelor și realizărilor în domeniul studiului surselor de generare a SRO la microalge și cianobacterii, precum și a sistemelor de protecție antioxidantă a acestor organisme. Capitolul reflectă evoluția cunoștințelor despre stres și situația actuală în domeniul studiului stresului oxidativ în celulele vii cu accent pe cianobacterii și microalge. Sunt analizate în plan evolutiv apariția mecanismelor de formare a radicalilor liberi și a sistemelor de protecție antioxidantă celulară. Sunt prezentate principalele site-uri celulare la organismele fotosintetizante eucariote și procariote, în care are loc formarea radicalilor liberi și a moleculelor reactive ale oxigenului. Sunt analizate rezultatele cercetărilor cu referire la identificarea mecanismelor de formare a speciilor reactive ale oxigenului sub influența factorilor de mediu și a xenobioticelor. Capitolul include, de asemenea concluzii, care reflectă nivelul actual atins de cercetători în domeniul prezentei lucrări, după care este formulată problema de cercetare și direcțiile de rezolvare a acesteia. În finalul capitolului sunt formulate scopul și sarcinile prezentei lucrări.



**Capitolul 2. OBIECTELE DE STUDIU ȘI METODELE DE CERCETARE** conține descrierea obiectelor de studiu și prezentarea principiului de lucru a metodelor de cercetare. Metodele de cercetare au fost selectate astfel, ca să asigure realizarea scopului și obiectivelor de cercetare. Sunt prezentate principiile, în baza cărora au fost selectate obiectele de studiu și metodele de cercetare incluse în lucrare.

**Capitolul 3. DINAMICA MODIFICĂRILOR ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A BIOMASEI CULTURILOR FICOLOGICE PE DURATA CICLULUI DE CREȘTERE ÎN CONDIȚII OPTIME** reflectă rezultatele obținute în procesul de monitorizare a ciclului vital tipic în condiții optime a patru obiecte ficologice, ce reprezintă două domene și trei filumuri diferite ale lumii vii. În pofida distanței evolutive enorme dintre aceste organisme, modul de manifestare a variațiilor statutului antioxidant pe durata unui ciclu de creștere a culturilor în sistem de tip închis are multe elemente comune. Pentru toate culturile ficologice studiate se observă un ciclu clasic de acumulare a biomasei, cu prezența vizibilă a fazelor specifice de creștere. Analiza activității antioxidante a biomasei, monitorizată cu aplicarea diferitor metode, relevante pentru cultura ficologică și pentru tipul de substanțe cu activitate antioxidantă, care predomină în biomasă, a permis identificarea unor puncte temporale sensibile, în care se produc modificări semnificative ale capacității de apărare a celulelor contra stresului oxidativ. Astfel, faza de latență la toate speciile studiate se evidențiază prin capacitate joasă de protecție antioxidantă la toate culturile. O altă particularitate, care se evidențiază din datele analizate constă în aceea că la trecerea culturii de la o fază de creștere la alta se produc anumite salturi ale valorilor parametrilor monitorizați, care, în opinia noastră, reflectă restructurări funcționale ale celulelor microalgelor și cianobacteriilor. Din punct de vedere tehnologic, aceste puncte pot fi potrivite pentru aplicarea manipulărilor în scop de dirijare a proceselor biosintetice în culturile ficologice. Capitolul finalizează cu concluzii ce reflectă viziunea autorului asupra subiectelor analizate, bazată pe date concludente și analiză riguroasă.

**Capitolul 4. STRESUL TEHNOLOGIC LA CIANOBACTERIILE DE INTERES INDUSTRIAL.** În acest capitol este prezentat efectul stresului termic și al fotoperiodismului asupra spirulinei (tulpina *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11) în condiții de laborator și de producere industrială. De asemenea, sunt descrise efectele stresului salin și stresului provocat de ioni metalici asupra spirulinei și nostocului (tulpinile *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 și *Nostoc linckia* CNMN-CB-03) și efectele stresului provocat de cupru asupra porfiridiumului (tulpina *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01) în condiții de laborator. Datele prezentate și analizate în capitol reflectă principalele modificări în componența biomasei, care sunt determinate de diferite procedee tehnologice orientate spre eficientizarea proceselor și reducerea

costurilor de producere. Sunt elucidate particularitățile reacțiilor de răspuns a culturilor ficologice la reducerea perioadei luminoase, scăderea temperaturii de cultivare, modificarea nivelului de salinitate a mediului, contactul cu metale cu potențial toxic și stimulatori ai proceselor biosintetice. În mod special, sunt analizate diferențele între răspunsul culturilor cianobacteriene în condiții de laborator și în condiții industriale și se atrage atenția asupra necesității de a ține cont de deosebirile identificate în procesul de transfer al tehnologiilor în condiții de producere. Capitolul finalizează cu concluzii ce reflectă principalele realizări la această etapă a cercetării.

Capitolul 5. **STRESUL OXIDATIV ÎN NANOBIOTEHNOLOGIA CIANOBACTERIILOR ȘI MICROALGELOR** este dedicat cercetărilor în domeniul nanobiotehnologiilor cu implicarea microalgelor și cianobacteriilor. Capitolul dat acoperă trei arii de interes, și anume: efectele produse de diferite tipuri de nanomateriale asupra organismelor acvatice; posibilitatea utilizării obiectelor ficologice în calitate de „fabrici verzi” pentru producerea de nanoparticule de interes tehnologic și medical în condiții prietenoase mediului; și posibilitatea biofuncționalizării nanomaterialelor de producere inginerescă în scopul atribuirii de noi proprietăți și de modificare a nivelului de toxicitate, biodisponibilitate și eficiență în raport cu celule, țesuturi și organisme vii.

În cadrul primei direcții, nanomaterialele au fost tratate la fel ca și alți factori de stres pentru culturile ficologice, fiind monitorizați parametrii productivi și de siguranță ai biomasei obținute în condiții de contact cu aceste materiale specifice. Concluzia despre nivelul de stres s-a făcut în baza unei analize ample a modificărilor produse în nivelul de producere a biomasei, în componența biomasei produse și în activitatea antioxidantă a acesteia. În studiu au fost luate nanoparticule cu o utilizare practică extinsă: nanoparticulele luminescente utilizate în multiple arii ingineresti și nanoparticulele metalelor nobile, utilizate în diferite industrii și medicină.

În cadrul celei de-a doua direcții, cercetările au fost orientate spre acoperirea unui domeniu caracterizat prin lipsă sau insuficiență de date cu referire la utilizarea culturilor vii de cianobacterii și microalge în calitate de matrice pentru nanosinteză. În prezent, marea majoritate a cercetărilor orientate spre realizarea biosintezei nanoparticulelor sunt bazate pe aplicarea diferitor tipuri de extracte și derivate celulare cu un potențial reducător pronunțat, care asigură derularea reacțiilor de oxidoreducere cu trecerea ionilor metalici în stare redusă și cu formare de nanoparticule. Scopul cercetărilor prezentate în acest capitol a fost de a evidenția posibilitatea de obținere a nanoparticulelor în celulele vii de microalge și cianobacterii și în condițiile păstrării calității și valorii biologice a acestor culturi. O asemenea abordare este prețioasă atunci când avem drept scop de a aplica o viziune integrată de utilizare a nanomaterialelor. Aceasta se referă

în special la domeniul de teranostică, când proprietățile nanoparticulelor de biosinteză și a matricei biologice în care acestea sunt incluse să fie valorificate pentru diagnosticare și tratament într-o singură procedură. În acest capitol a fost demonstrată posibilitatea de obținere a nanoparticulelor pornind de la forme chimice diferite ale elementelor de interes. În același timp se urmărește păstrarea unui echilibru între nanobiosinteză și calitatea biomasei.

Cea de-a treia direcție – biofuncționalizarea nanoparticulelor produse prin procedee ingineresti - a reieșit din limitările nanobiosintezei, și anume din faptul, că în cele mai multe cazuri studiate, concentrația de ioni ai elementelor de interes, necesară pentru a declanșa procesele spontane de nanobiosinteză în celulele de microalge și cianobacterii au efecte toxice nefaste asupra culturilor, provoacă degradarea pronunțată a calității biomasei și limitează serios posibilitatea de a valorifica integrat nanoparticulele încorporate în biomasă. Ideea pusă în practică a constat în utilizarea mecanismelor de protecție antioxidantă a microalgelor și cianobacteriilor, care se declanșează la contactul culturilor cu nanoparticulele, în scopul modificării proprietăților acestora prin atribuire de învelișuri funcționale suplimentare. În acest capitol sunt prezentate rezultatele, care demonstrează posibilitatea realizării procedurii de biofuncționalizare a nanoparticulelor ingineresti în condiții prietenoase mediului. Capitolul finalizează cu concluzii ce reflectă principalele realizări la această etapă a cercetării.

**Capitolul 6. STRESUL OXIDATIV ÎN PROCESELE DE BIOREMEDIERE A APELOR CONTAMINATE CU METALE.** Cercetările descrise în acest capitol vin să completeze lipsa datelor cu referire la posibilitatea de aplicare a culturilor vii de cianobacterii (*Arthrospira platensis* CNMN-CB-02 și *Nostoc linckia* CNMN-CB-03) în calitate de bioremediatori ai apelor reziduale cu conținut de metale grele în condiții de contact repetat cu efluenți contaminați. În acest scop au fost realizate experiențe, care au inclus diferite sisteme bi- și polimetalice și diferite regimuri de interacțiune a culturilor cianobacteriene cu metalele luate în studiu. De asemenea, pentru fiecare variantă experimentală studiată au fost realizate trei cicluri iterative de cultivare a cianobacteriilor. Rezultatele obținute susțin ipoteza că cianobacteriile adoptă diferite strategii de acumulare a metalelor din medii în funcție de componența efluenților contaminați și de faza de creștere a culturii la care are loc contactul celulelor cu efluenții contaminați. Astfel, cromul și fierul, de exemplu, sunt acumulate de cultura de spirulină în cantitate semnificativ mai mare când biomasa interacționează cu ionii metalici în faza de creștere exponențială, în timp ce nichelul, cuprul și zincul se acumulează mai activ atunci când contactul are loc în fază staționară. Rezultatele obținute arată clar că pentru a dezvolta o tehnologie eficientă de îndepărtare a metalelor din apele uzate este necesar să se țină cont atât de

compoziția chimică a efluenților, cât și de vârsta fiziologică a culturilor, care interacționează cu poluanții.

Cercetările realizate au evidențiat și unele particularități specifice celor două obiecte ficologice antrenate în studiu, cum ar fi toleranță foarte înaltă a culturii de *Nostoc linckia* la primul contact cu poluanții polimetalici ce conțin cupru și scăderea bruscă a acesteia la acțiunea repetată a poluanților; sau toleranța înaltă a culturii de *Arthrospira platensis* la contactul repetat cu efluenții contaminați cu cupru în asociere cu alte metale. Sunt aduse argumente consistente în favoarea utilizării nostocului preferențial în bioremedierea de urgență, iar a spirulinei - pentru bioremedierea sistemică a situsurilor poluate cu metale grele, inclusiv cupru.

Capitolul include rezultate cu referire la capacitatea de bioacumulare a metalelor din efluenți contaminați cu crom în asociere cu alte metale grele. Sunt arătate diferențele identificate în reacțiile de răspuns a culturilor de cianobacterii în raport cu efluenții contaminați, preponderent cu cupru. În special, a fost demonstrată capacitatea culturii de *Nostoc linckia* de a păstra un nivel înalt de toleranță față de stresul creat de metale pe durata a trei cicluri consecutive și o componentă nealterată în mod serios a biomasei. În acest capitol sunt aduse argumente în susținerea ipotezei că realizarea procesului de bioremediere cu ajutorul cianobacteriilor *Nostoc linckia* și *Arthrospira platensis* se bazează pe menținerea calității adecvate a biomasei de nostoc și spirulină în condiții de stres cauzat de prezența metalelor, asigurată de o creștere a conținutului de compuși cu acțiune antioxidantă și a menținerii unui echilibru redox acceptabil. Capitolul finalizează cu formularea concluziilor, care redau succint esența rezultatelor descrise.

## **Capitolul 7. MANAGEMENTUL STRESULUI OXIDATIV ÎN CADRUL TEHNOLOGIILOR DE CULTIVARE A OBIECTELOR FICOLOGICE DE INTERES INDUSTRIAL. GENERALITĂȚI, MECANISME, APLICAȚII**

Capitolul generalizează rezultatele descrise în capitolele 3-6, evidențiază mecanisme de derulare a stresului oxidativ, propune soluții ce permit gestionarea stării de stres indus la cianobacterii și microalge. În dependență de profunzimea modificărilor generate la nivel molecular și fiziologic, stresul oxidativ care poate fi aplicat în biotehnologie se clasifică în stres de intensitate joasă și stres de intensitate intermediară. În capitol este expusă viziunea autoarei cu referire la delimitarea stresului de intensitate joasă și celui de intensitate intermediară și despre cazurile în care se poate axa, în cadrul tehnologiilor ficologice, pe unul dintre aceste două tipuri de stres. Este demonstrat că în cazul aplicării stimulatorilor biologici pentru creșterea productivității culturilor de microalge și cianobacterii, linia de delimitare dintre stresul de intensitate joasă și cel de intensitate intermediară trece prin punctul echivalent zero, în care efectul de stimulare produs devine egal cu valoarea inițială a parametrului monitorizat. În acest

capitol sunt propuse condițiile, în care este acceptabilă aplicarea celor două tipuri de stres oxidativ indus (de intensitate joasă și intermediară) în calitate de instrumente biotehnologice. În cazul când procedeul biotehnologic este elaborat în scopul obținerii biomasei, care va fi utilizată integral, se aplică stresul de intensitate joasă. În cazul când biomasa este destinată extragerii unor componente specifice, sau pentru alte aplicații decât consumul uman, în condițiile unui control de calitate, procesele biotehnologice pot fi derulate în zona unui stres oxidativ de intensitate joasă sau intermediară.

Analiza generalizată a datelor acumulate a demonstrat că identificarea punctelor de aplicare a factorilor de stimulare/stres poate fi realizată empiric prin implementarea schemelor experimentale sau prin estimarea în baza unor corelații între valorile parametrilor de control, importante din punct de vedere a mecanismelor implicate în protecția antioxidantă. O confirmare a corectitudinii estimărilor făcute pot fi considerate procedeele biotehnologice elaborate pe baza lor (procedeele de obținere a biomasei ficologice cu conținut înalt de lipide), dar și implementarea acestor elaborări în condiții reale.

Capitolul include descrierea procedeelelor biotehnologice inovative elaborate, orientate spre obținerea biomasei ficologice cu un conținut biochimic dirijat, spre realizarea biosintezei nanoparticulelor, pornind de la formele ionice ale elementelor de interes, spre biofuncționalizarea nanoparticulelor produse industrial și spre bioremedierea situsurilor poluate cu metale grele. Toate aceste procedee au la bază reacții de răspuns ale culturilor ficologice la stresul oxidativ indus în condiții controlate. Capitolul finalizează cu concluzii în baza rezultatelor obținute.

Compartimentul **CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI** include prezentarea structurată a tuturor rezultatelor obținute, care confirmă ipoteza formulată la inițierea acestei cercetări, demonstrează atingerea scopului și obiectivelor tezei; reflectă contribuțiile personale, conține chintesența lucrării, exprimată concis valoarea fundamentală și aplicativă a rezultatelor obținute. Recomandările formulate au la bază rezultate inovative, confirmate prin brevete de invenție, numeroase aprecieri la saloane de cercetări și inovații, dar și prin implementare cu succes în condiții de producere industrială.

**BIBLIOGRAFIA** include descrierea bibliografică a celor 502 surse (articole, capitole în monografii, teze la foruri științifice, brevete de invenție) citate în teză.

Compartimentul **ANEXE** conține copiile brevetelor de invenție și a diplomelor obținute la diferite foruri de invenție, precum și actele de implementare a realizărilor incluse în teză. De asemenea, la compartimentul Anexe au fost incluse date care vin în suportul analizelor prezentate în capitolele 4-7.

## I. STRESUL OXIDATIV LA MICROALGE ȘI CIANOBACTERII

Microalgele și cianobacteriile sunt producători primari de importanță majoră, asigurând formarea accelerată de biomasă în baza utilizării energiei solare, dioxidului de carbon din atmosferă și nutrienților simpli și omniprezenți în apele, ce acoperă cea mai mare parte a suprafeței Pământului. În acest sens, ele asigură, în mare parte, sustenabilitatea ecosistemelor acvatice, dar și a celor terestre, în special prin activitatea speciilor edafice, dar și a celor de apă potabilă [308, 412]. Aceste organisme, îndeosebi cianobacteriile, în calitate de unele dintre cele mai ancestrale de pe Pământ, au jucat un rol esențial în evoluția vieții, fiind primii producători de oxigen în atmosfera planetei, dar, în același timp, și cauza așa-numitei Catastrofe a Oxigenului, care ulterior a determinat evoluția organismelor aerobe [43]. Cianobacteriile și microalgele au participat activ la formarea rocilor calcaroase, iar interacțiunile în sistemul actual ocean-atmosferă se produc și se mențin prin activitatea acestor organisme microscopice.

Mulți dintre reprezentanții cianobacteriilor posedă capacitatea de fixare a azotului atmosferic, contribuind o dată în plus, la formarea masei organice în ecosisteme. Este foarte important rolul cianobacteriilor și microalgelor în asigurarea fertilității solului [34, 308] și în protejarea solului de poluare prin înlocuirea îngrășămintelor organice ce conțin azot cu biomasa cianobacteriilor sau prin colonizarea solului cu aceste culturi [419].

Astfel, cianobacteriile și microalgele sunt organisme cu un impact major asupra vieții pe Pământ, fiind principalii producători de oxigen, fixatori de azot atmosferic, dar și principalii producători de masă organică. Datorită capacităților lor mari de adaptare, aceste organisme sunt omniprezente în nișele ecologice, fiind supuse acțiunii diferitor factori de stres. Cele între 200.000 și 800.000 de specii de microalge, după cum se speculează că ar exista, pot fi găsite în apele dulci și sărate, în ecosistemele terestre și acvatice de pe tot globul [170, 329, 422]. Evoluția cianobacteriilor și microalgelor s-a produs în condiții variabile și în permanentă modificare, ale mediului ambiant. Fluctuațiile diurne și sezoniere de temperatură și intensitate a luminii, diferite niveluri de salinitate ale mediului acvatic în care aceste specii se dezvoltă, componența elementală în continuă modificare a apei sau a solului în care aceste organisme abitează sunt surse constante de stres, căruia organismele sunt impuse să-i facă față pentru a supraviețui. Ca rezultat, atât cianobacteriile, cât și microalgele au format, dezvoltat și adaptat în permanență mecanisme de contracarare eficientă a urmărilor stresului oxidativ provocat [54, 60, 66, 201, 202, 232, 264, 460].

Ca urmare a capacității microalgelor și cianobacteriilor de a se adapta la o mare varietate de condiții de mediu, acestea au devenit extrem de versatile și capabile să sintetizeze diverși

compuși pentru asigurarea propriilor necesități. În același timp, acești compuși valoroși, care posedă activitate biologică înaltă, sunt utili și pentru diverse necesități umane. Ca rezultat, tot mai răspândite sunt biotehnologiile cu implicarea acestor microorganisme, care asigură atât cererea față de biomasă ficologică, cât și cererea față de produsele obținute din masa lor celulară [412]. Compușii bioactivi ai microalgelor și cianobacteriilor cuprind o piață vitală în care predomină antioxidanții, coloranții, lipidele, inclusiv acizii grași polinesaturați și polizaharidele [129, 233, 314]. Speciile cel mai des cultivate în scopuri comerciale pentru uz uman se referă, preferențial la genurile *Arthrospira (Spirulina)*, *Dunaliella*, *Chlorella* și *Haematococcus*. În același timp, multe alte specii de microalge și cianobacterii sunt cultivate la nivel industrial în scopuri de aplicare în acvacultură, agricultură, producere de bioenergie ș.a. Printre ultimele se numără reprezentanții genurilor *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Phaeodactylum*, *Schizochytrium*, *Chlamydomonas*, *Tetraselmis*, *Scenedesmus*, *Tisochrysis* ș.a. [143, 157, 274, 412]. În prezent producerea de microalge și cianobacterii este încă o activitate industrială la scară mică în comparație cu alte sectoare. Producția globală de microalge este de peste 20 kt/an; fiind utilizată preferențial pentru aplicații alimentare și ca premix pentru furaje. Prețurile standard de producere a biomasei ficologice variază de la 15 la 25 €/kg [157].

În dependență de tipul de cultivare, puritatea culturilor ficologice și scara la care acestea sunt valorificate aceste costuri pot fi mult mai mari. De exemplu, la creșterea în sisteme deschise a *Nannochloropsis* costurile pentru producerea unui kg de biomasă uscată poate ajunge la 53 €, iar la cultivarea concomitentă a *Tisochrysis* și *Phaeodactylum* – la 105 €/kg [448]. Cele mai mari investiții necesare pentru creșterea microalgelor și cianobacteriilor țin de asigurarea procesului cu bioreactoare moderne sau spații adecvate de cultivare în cazul producerii în sisteme deschise, și investițiile pentru asigurarea condițiilor optime de producere: niveluri adecvate ale temperaturii, intensității luminii și duratei de iluminare. De asemenea, calitatea mediului nutritiv este un factor determinant în obținerea unei cantități competitive de biomasă calitativă, care corespunde scopului în care această biomasă este obținută.

Prețul de producere a biomasei ficologice este unul dintre factorii, care limitează dezvoltarea acestui domeniu de importanță majoră pentru bioeconomia modernă. Este clar că anume aceste articole de cheltuieli sunt cel mai des considerate, atunci când se pune scopul de a reduce costurile de producere. Reducerea perioadei de iluminare sau reducerea temperaturii de creștere pot asigura o economie considerabilă pentru producători. Dar în același timp, modificarea condițiilor de cultivare în direcția micșorării prețurilor aferente producerii este o provocare pentru biotehnologie, deoarece orice deviere de la condițiile standard poate provoca stres pentru culturile de microalge și cianobacterii. Cunoașterea mecanismelor de apariție și

amplificare a stării de stres oxidativ, precum și a posibilităților de evitare a lui este condiția identificării soluțiilor pentru eliminarea efectelor negative ale acestui fenomen și obținerea produselor fiziologice de calitate înaltă și sigure pentru uzul uman.

### **1.1. Mecanismele de apariție și dezvoltare a stresului oxidativ la cianobacterii și microalge**

Bazele teoriei stresului au fost puse în 1936 de către Hans Selye care de asemenea, a formulat și principiile de bază ale răspunsurilor la stres [388]. Publicația cu un volum de jumătate de pagină descrie similitudinea răspunsului organismului la diferiți factori, cum ar fi substanțele toxice, medicamentele, frigul, extenuarea musculară, leziuni de diferită natură, care poate fi divizat în trei etape, prima dintre care este considerată o „alarmă generală”, iar următoarele două – etape de adaptare. Autorul sublinia apariția unui sindrom comun indiferent de factorul provocator iar cele trei etape de depășire a sindromului sunt elemente ale unui răspuns tipic al organismului la diferiți stimuli. Această lucrare este considerată punctul de pornire în teoria stresului, cu toate că în publicație cuvântul *stres* nu apare.

Conceptul de stres oxidativ a fost prezentat într-o formă definită în anul 1985 de către Helmut Sies și dezvoltat ulterior de acest autor, dar și de mulți alți cercetători [62, 401-406]. Noțiunea de stres oxidativ în formularea lui H.Sies este următoarea: stresul oxidativ este un dezechilibru între oxidanți și antioxidanți în favoarea oxidanților, ceea ce duce la o întrerupere a semnalizării și controlului redox, și la daune moleculare.

Stresul oxidativ este un fenomen universal pentru toate formele de viață, inclusiv pentru microorganismele fotosintetizante, cum sunt microalgele și cianobacteriile, iar păstrarea echilibrului redox la aceste organisme este o formă de exprimare a lor [317]. Originea acestui fenomen este strâns legată de evoluția vieții pe pământ și asociată cu apariția oxigenului, ca parte componentă a mediului ambiant [355].

Apariția procesului de fotosinteză oxică ca eveniment unic, produs în baza unui strămoș anoxic al cianobacteriilor, și evoluția lui ulterioară constituie unul dintre cele mai importante evenimente din istoria Pământului. Acest proces biologic a avut cel mai dramatic impact asupra schimbărilor planetare [395, 431, 458, 459]. Procesul include coordonarea a două fotosisteme distincte într-un singur proces fotoelectric, evoluția căilor de biosinteză a clorofilei și evoluția site-urilor active redox complexe care produc oxigen. Oxigenul la un moment dat, pentru prima dată, a fost eliberat în mediul ambiant de microorganismele ca un produs secundar al utilizării energiei luminii [432]. Acumularea de O<sub>2</sub> în mediu a remodelat complet biogeochimia planetei și a afectat dramatic traiectoria evoluției ulterioare a vieții în întregime. Organismele vii au fost



nevoite nu numai să se adapteze la viața în condiții oxice, ci și să utilizeze în scopuri proprii acest gaz ce poate prezenta multiple beneficii în paralel cu toxicitatea lui, astfel transformând o provocare în multiple oportunități de dezvoltare.

Speciile reactive ale oxigenului (SRO) prezintă paradoxul suprem în viață și evoluție. Creșterea conținutului de oxigen molecular în atmosferă la sfârșitul Proterozoicului a asigurat necesitățile de respirație ale animalelor. Reducerea enzimatică a oxigenului molecular a dus la o creștere semnificativă a producerii de energie. Cu toate acestea, utilizarea  $O_2$  a prezentat și provocări majore, deoarece acest gaz, cât și SRO sunt foarte toxice, producând o blocare sau cel puțin o încetinire a evoluției multicelulare după Marea Catastrofă a Oxigenului. Capacitatea de a detoxifica SRO nu a fost o trăsătură care a apărut ca răspuns la nivelurile crescute de  $O_2$ , ci mai degrabă a fost o adaptare crucială la micromediile slab oxice ale Pământului timpuriu. Analiza moleculară a sistemelor de reglare intrinseci pentru homeostazia celulară și biologia redox arată că aceste căi au fost păstrate de-a lungul timpului, iar adaptările ulterioare au coincis cu modificările importante în conținutul de  $O_2$  atmosferic [431]. Astfel, la organismele fotosintetice străvechi site-urile de formare a SRO s-au constituit și evoluat în paralel cu cele de asigurare a protecției antioxidante. În condiții normale, aceste două sisteme acționează în tandem, asigurând echilibrul stării oxidative a celulei, iar în cazul când speciile reactive sunt produse în exces și sistemul antioxidant nu reușește să anihileze SRO, survine starea de stres oxidativ.

Respirația celulară sau oxidarea oxică a compușilor organici prezintă mecanismul de bază, care asigură cu energie celulele organismului animal și bacteriile aerobe, dar și celulele organismelor fotosintetizante în perioada de întuneric. Dar, asemeni majorității proceselor biochimice, respirația celulară este polifuncțională, îndeplinind și alte funcții biologice. Una din aceste funcții este reducerea mono- și dielectronică a oxigenului până la superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) și peroxid de hidrogen corespunzător. De fapt, prin această funcție, respirația celulară devine un mecanism de formare a SRO – precursori ai radicalului hidroxil – practic cel mai puternic oxidant, care poate distruge orice componentă a celulelor vii. Formarea SRO este un proces care are loc în condiții strict controlate, ceea ce exclude presupunerea că speciile reactive de oxigen sunt doar o „taxă” achitată de organismele vii pentru aerobioză [216, 219, 500].

Formarea SRO are loc în toate compartimentele celulare și are legătură atât cu procesele enzimatic, cât și cu cele neenzimatic. Dintre cele mai importante procese enzimatic, care duc la formarea SRO este transportul de electroni prin lanțurile transportoare de electroni, care funcționează pe structurile membranare funcționale ale celulei. Lanțurile transportoare de electroni, formate din diferite enzime, cofactorii cărora participă în permanență în reacții reversibile de oxidoreducere, prezintă o contribuție esențială în apariția speciilor reactive în

celulă [281, 402, 479]. Cele mai semnificative procese neenzimatică, care soldează cu formarea SRO sunt reacțiile de oxido-reducere a fenolilor, chinonelor, flavonelor, autooxidarea compușilor ce conțin gruparea SH, hemurilor ș.a [285, 447].

Deosebiri care au fost observate în procesul de generare a speciilor reactive de oxigen la reprezentanții a diferiți taxoni sunt determinate, în special, de particularitățile structurale și metabolice ale lor. Eucariotele sunt caracterizate prin mecanisme asemănătoare, care duc la formarea SRO. În același timp, formele imobile, care sunt supuse acțiunii mai pronunțate a condițiilor mediului ambiant, cât și cele care realizează fotosinteza oxigenică, se caracterizează prin concentrații mult mai înalte ale oxigenului molecular în țesuturile lor. Astfel, concentrația oxigenului în mitocondriile celulelor animale este în mediu de 3-30 $\mu$ M [307, 439], în timp ce această concentrație în celulele plantelor constituie în jur de 250 $\mu$ M [494]. Aproximativ 1% din oxigenul molecular absorbit de plante se transformă în SRO în procesul de oxidare incompletă a lui [123,385].

În celulele animale sunt cunoscute mai multe site-uri de formare a SRO, așa ca: 1) *mitocondriile* (cu implicarea complexelor I și III ale lanțului respirator, dar, de asemenea, și monoaminoxidazei,  $\alpha$ -ketoglutarat - dehidrogenazei, glicerol - fosfat dehidrogenazei), 2) *reticulul endoplasmatic* (cu implicarea citocromului P-450 și enzimelor b5, diaminoxidazei, Ero1p ), 3) *peroxisomii* (cu implicarea aminoacid - oxidazei, L-2-hidroxiacid - oxidazei și uratoxidazei), 4) *citoplasmul* (NO - sintazele, lipoxigenazele și PGH - sintaza), 5) *membrana citoplasmatică* (NADPH oxidaza, lipoxigenaza) [71, 123, 188, 200, 257, 273, 424, 472, 492]. Spațiul extracelular la organisme pluricelulare este, de asemenea, unul din locurile de formare a speciilor reactive, în special din contul activității xantinoxidazei.

Pentru celulele vegetale, la lista de mai sus se mai adaugă încă o sursă foarte importantă de specii reactive de oxigen – *cloroplastele*, în care SRO apar în cadrul fotosistemelor I (cu participarea ferredoxinei) și II (în procesul de fotooxidare a apei) [162, 265, 285, 493, 494, 498, 499].

Producerea SRO și contribuția relativă a compartimentelor celulare diferă în dependență de specia reactivă a oxigenului, tipul de celule în care acestea se formează, specia la care aparține organismul și condiția lui fiziologică. Complexitatea acestor deosebiri este determinată și de prezența așa numiților „consumatori” de SRO (enzime ce utilizează în calitate de substrat radicalii liberi și moleculele reactive) în diferite părți ale celulei. Prezența enzimelor antioxidante în componența acelorași structuri, care sunt și surse de specii reactive, duce la subestimarea cantitativă a acestora. În același timp, anume rata netă de producere a speciilor reactive

determină faptul, dacă un anumit compartiment celular va elimina, ori din contra, va importa radicali și molecule reactive [293, 303, 417].

Organitele celulare pot produce specii reactive atât în interiorul lor, cât și în exterior. De exemplu, lanțul respirator al mitocondriilor poate produce radicalul superoxid în matrice, dar și alternativ, în spațiul intermembranar, unde poate fi utilizat ca substrat de către enzima superoxidismutaza (SOD) sau eliminat în exterior prin porine [71]. Radicalul superoxid nu traversează membranele în cantități apreciable din cauza sarcinii sale, de aceea rămâne, de obicei, la locul în care a fost generat. Cea mai mare parte a superoxidului generat în organitele celulare este convertit de către SOD în peroxid de hidrogen, care poate trece ușor prin membranele biologice.

Dintre organitele celulelor eucariote nefotosintetizante, în conformitate cu opinia majorității autorilor, cel mai considerabil aport în producerea speciilor reactive îl au mitocondriile [307, 319, 439, 447, 467, 492, 479]. În ultimul timp, însă, apar publicații, care propun opinii ce diferă de cea expusă mai sus. Astfel, se insistă asupra faptului că în realitate, din punct de vedere cantitativ, reticulul endoplasmatic și peroxizomii au o pondere mai mare în producerea speciilor reactive. Această afirmație este dovedită cel puțin pentru celulele ficatului, fiecare dintre care conține peste o mie de mitocondrii [71, 472]. Sunt sau nu mitocondriile principala sursă de SRO în celulele ce nu realizează fotosinteza, urmează a fi demonstrat, dar rămâne cert faptul că aceste organite produc o bună parte din speciile reactive. În același timp, nu poate fi neglijată nici contribuția altor compartimente celulare în aportul de SRO.

### **1.1.1. Formarea SRO în mitocondrii**

Mitocondriile, organitele celulare care realizează respirația, conțin mai multe enzime – componente ale lanțului respirator transportor de electroni. Potențialul redox al elementelor, care formează sectoarele incipiente și mediale ale lanțului, adesea are valori mai mici decât  $-0,3V$  (care este valoarea potențialului cuplului  $O_2/O_2^{\cdot-}$ ). Ca rezultat, interacțiunea aleatorie a acestor transportori cu molecula de oxigen poate provoca reducerea monoelectronică a  $O_2$  până la  $O_2^{\cdot-}$ . În mod normal, celula vie tinde să diminueze efectele acestui proces, iar în cazul în care reacția a avut loc – să prevină formarea radicalului hidroxil, cunoscut prin gradul înalt de agresivitate în raport cu macromoleculele celulare [44, 123, 500-502]. Lanțul transportor de electroni generează radicalul superoxid în calitate de produs inevitabil și specie reactivă primară. În prezent, sunt cunoscute cel puțin 9 site-uri de formare a speciilor reactive ale oxigenului în mitocondrii. Acestea sunt: *citocrom b5-reductaza*, care produce radicalul superoxid și *monoaminoxidaza*, care produce peroxidul de hidrogen în reacția de oxidare a aminelor biogene, ambele fiind situate

în membrana mitocondrială externă; *dihidroorotat-dehidrogenaza*, *α-glicerofosfat-dehidrogenaza*, *succinat-dehidrogenaza*, *complexul α-cetoglutarat dehidrogenazic*, *complexele I și III ale lanțului respirator*, care pot iniția formarea radicalului superoxid și a peroxidului de hidrogen, toate fiind localizate în membrana internă a mitocondriilor; *aconitaza*, care produce radicalul hidroxil și este localizată în matricea mitocondrială [44]. În calitate de sursă principală de formare a radicalului superoxid și a peroxidului de hidrogen în mitocondrii este recunoscut lanțul transportor de electroni de pe membrana internă a acestor organite.

Reducerea oxigenului până la apă cu participarea oxidazelor are loc cu o viteză destul de mare. Cu toate acestea, poate avea loc și reducerea monoelectronică spontană a oxigenului cu formarea superoxidului în complexe I, II și III ale lanțului transportor de electroni [67, 123, 141, 171, 212, 439]. Site-urile unde, potențial, poate avea loc capturarea electronilor de către oxigen sunt centrele redox, care conțin clusterelor proteice Fe-S, hemuri și chinone. Principalele site-uri în care are loc reducerea monoelectronică a oxigenului pe lanțul transportor de electroni sunt NADH-dehidrogenaza (din complexul I) și perechea ubiquinonă – citocrom *b* (complexul III) [123 224, 307].

Contribuția relativă a fiecăruia dintre complexe numite în procesul de generare a SRO poate să difere foarte puternic în dependență de condițiile fiziologice prezente în organism, dar și de tipul de țesut ori celulă. În complexul I, cofactorul flavinmononucleotidei (FMN) acceptă electronii de pe NADH și îi transferă pe coenzima Q prin câteva centre Fe-S. În condițiile în care lanțul transportor de electroni este blocat (de exemplu la distrugerea citocromului *c*, ori la deteriorarea lanțului transportor), iar raportul NADH/NAD are valori înalte, cea mai mare parte a superoxidului este generată de cofactorul FMN redus cu utilizarea electronilor proveniți de pe NADH [207, 307]. În cazul unui parcurs normal al respirației mitocondriale, când nivelul de NADH este relativ jos, în complexul I se formează doar o mică cantitate de superoxid.

Transportul invers de electroni (TIE) este un alt mecanism de formare a unei cantități semnificative de superoxid în complexul I. TIE apare atunci când în condiții de consum scăzut de ATP și potențial membranar înalt, substratul complexului II – succinatul – reduce coenzima Q și forțează electronii ca să se reîntoarcă pe complexul I, unde sunt transferați pe oxigen, iar în rezultatul acestui proces se formează superoxidul [192, 253].

În prezent, cele mai multe cunoștințe sunt acumulate în ceea ce privește contribuția complexului III la formarea radicalului superoxid în procesul de autooxidare a anionului radical semiubichinonă ( $UQ^{\cdot-}$ ). Pe parcursul acestui proces, în anumite condiții, reducerea monoelectronică a oxigenului soldează cu formarea  $O_2^{\cdot-}$ . Aparența unei cunoașteri clare a mecanismelor, care asigură formarea radicalului superoxid pe complexul III, lasă însă și multe

pete obscure, în special este absolut neclar de ce complexul III elimină radicalul format în proporții egale de ambele părți ale membranei mitocondriale interne [303].

Afară de lanțul respirator, în mitocondrii mai sunt și alte surse potențiale de SRO, dar relevanța lor nu este studiată îndeajuns. O excepție, în acest sens, este cetoglutarat - dehidrogenaza ce conține flavină, care poate reduce oxigenul în condiții de conținut înalt de NADH [423, 424, 434]. Cu toate acestea, în condiții de formare intensă a ATP și prezența unei cantități considerabile de NADH, formarea radicalului superoxid din diferite surse, chiar dacă în fiecare din ele acest proces are o intensitate mică, poate duce la starea de stres oxidativ pe termen lung, ceea ce, în final, duce la deteriorarea mitocondriilor. Concentrația oxigenului celular, la fel ca și statutul metabolic al celulei, poate afecta formarea SRO în mitocondriile, aflate în condiții de hiperoxigenare, în direcția sporirii formării SRO [207]. De asemenea, a fost constatat faptul că intensitatea generării  $O_2^{\cdot-}$  crește odată cu sporirea cantității de ubichinonă redusă și trece destul de activ pe complexe I și III. Astfel, transportul de electroni pe aceste complexe este cuplat cu formarea radicalilor semichinonei [224].

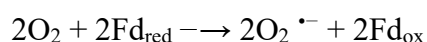
Având în vedere condițiile complexe și variabile în celulă, la momentul actual este destul de complicat de a monitoriza *in vivo* procesul de formare a radicalului superoxid. Deoarece acesta este generat în matricea mitocondrială, monitorizarea acestui proces, din afară este limitat de prezența peroxidului de hidrogen, care nu a fost detoxificat în mitocondrii. În plus, reacția de dismutație concurează cu formarea peroxinitritului în prezența NO. Cu toate că unii cercetători nu manifestă prea multă încredere față de cuantificările *in vivo*, este absolut clar că procesul de generare a SRO în mitocondrii are loc atât în condiții de normalitate a proceselor celulare, cât și în cazul stărilor patofiziologice.

SRO formate în mitocondrii pot cauza leziuni locale, care sunt determinate de interacțiunea  $H_2O_2$  cu  $Fe^{2+}$  din componența clusterelor 4Fe-4S. În rezultatul acestei interacțiuni din componența complexelor se eliberează ionii de fier bivalent, care inițiază reacția Fenton. Radicalul hidroxil ce se formează în rezultatul reacției numite este unul din cei mai agresivi radicali și poate afecta enzimele implicate în reacțiile ce au loc în matricea mitocondrială. Printre enzimele care sunt afectate în primul rând sunt: aconithidrataza (enzimă a ciclului tricarbonic); unele unități ale complexelor glicindecarboxilaza și piruvatdehidrogenaza, precum și unele unități structurale ale ATP-sintazei. Proteinele afectate de prezența SRO sunt distruse în continuare de către proteazele specifice prezente în matricea mitocondriilor. Deteriorării oxidative, de asemenea, sunt supuse membranele mitocondriale și ADN-ul mitocondrial.

### **1.1.2. Formarea radicalilor liberi în cloroplaste**

Deși cloroplastele nu sunt unicele surse de formare a speciilor reactive ale oxigenului, acestea totuși sunt cele mai puternice centre de producere a SRO în celulele, care realizează fotosinteza. În aceste organite celulare permanent are loc formarea oxigenului singlet, radicalului superoxid și, în continuare, a peroxidului de hidrogen – fenomene legate de procesele fotosintetice care au loc în membranele tilacoidale [162, 175, 265, 285, 392].

Centrele de reacție ale fotosistemelor I și II (PSI și PS II) în tilacoizii cloroplastelor sunt cele mai importante site-uri de producere a SRO. Formarea speciilor reactive pe aceste locații celulare sporește în condiții de limitare a procesului de fixare a CO<sub>2</sub>, care intervine sub influența diferitor factori, așa ca deshidratarea, hiper- și hiposalinitatea, stresul hiper- și hipotermic ș.a. În aceste condiții electronii de la centrele de reacție se deplasează spre NADP, care este redusă până la NADPH, ce intră în ciclul Calvin și reduce acceptorul final de electroni - molecula de CO<sub>2</sub>. În caz de supraîncărcare a lanțurilor transportoare de electroni din cauza scăderii cantității de NADH în condiții de stres, are loc scurgerea electronilor de pe fierredoxină pe O<sub>2</sub> cu reducerea acestuia din urmă până la radical superoxid:



Această reacție a fost numită reacția Mehler în cinstea savantului, care a descoperit fotoreducerea oxigenului până la peroxid de hidrogen în cloroplaste încă în anii 50 ai secolului trecut [50, 392].

Fluxul de electroni spre molecula de oxigen poate proveni de la clusterelor 2Fe-2S și 4Fe-4S ale fotosistemei I. Partea acceptoare a lanțului transportor de electroni în fotosistemele II conține QA și QB. Fluxul de electroni de la acestea la O<sub>2</sub> contribuie la producerea radicalului superoxid. Odată format, radicalul superoxid generează specii reactive de oxigen mult mai agresive. Astfel, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> poate adăuga un proton și forma HO<sub>2</sub><sup>•</sup> ori poate fi supus procesului de dismutație (prin intermediul SOD ori spontan) cu formarea peroxidului de hidrogen. În clusterelor Fe-S, unde este prezent Fe<sup>2+</sup>, peroxidul de hidrogen poate fi transformat în cadrul reacției Fenton în radicalul hidroxil, mult mai periculos ca peroxilul [392].

Astfel, formarea radicalului superoxid în cloroplaste are loc atât în fotosistemele I (cu participarea ferredoxinei), cât și în fotosistemele II (în procesul de fotooxidare a apei), precum și în rezultatul activității oxidazelor (în special a ribulozobifosfat carboxilazei). Radicalului superoxid format în reacția oxigenazică, se consumă în cadrul descompunerii ribulozobifosfatului în acid 3-fosfoglicerice și fosfoglicolat [50, 236]. Rolul biologic al acestui radical este cel de semnal celular de transducție. Cu toate că radicalul superoxid poate migra direct din cloroplaste către alte compartimente celulare, căile de semnalizare a SRO pot fi

declanșate numai dacă în locul unde a avut loc formarea SRO sunt prezente proteinele adecvate. Sistemele antioxidante din cloroplaste servesc fie la propagarea acestor semnale, fie la eliminarea excesului de SRO care nu poate fi valorificat eficient în semnalizare. Modificările redox asociate cu metabolismul carbohidraților stromali joacă, de asemenea, un rol cheie în căile de semnalizare a cloroplastelor [162].

Am menționat deja, că deși oxigenul molecular este un oxidant foarte puternic, acesta este caracterizat prin reactivitate joasă, fapt care este explicat prin configurația moleculei  $O_2$ . În atmosferă, oxigenul se află în stare tripletă – electronii de valență au spinii paraleli. Odată cu modificarea spinului, molecula  $O_2$  trece în starea de excitare singletă și se transformă în oxigen singlet,  $^1O_2$ , care are reactivitate înaltă, și deci, prezintă pericol. În cloroplaste, formarea oxigenului singlet are loc datorită contactului dintre molecula de oxigen și clorofila, care a asimilat energia luminii, trecând în starea tripletă. Durata de viață a clorofilei în stare tripletă este destul de mare, ceea ce determină posibilitatea transmiterii excesului de energie moleculelor de  $O_2$  cu formarea oxigenului singlet. Oxigenul singlet este capabil să producă oxidarea proteinelor componente ale aparatului fotosintetic, moleculelor de clorofilă, lipidelor membranelor tilacoidale. Astfel, eliminarea oxigenului singlet format, ori împiedicarea formării lui excesive este o necesitate vitală a oricărei celule, care realizează procesul de fotosinteză. În condiții fiziologice normale aceste funcții sunt îndeplinite de către carotenoizii, care sunt parte componentă ale complexelor de antene ale centrelor de reacție fotosintetice.

În cloroplaste acționează câteva sisteme de lichidare a formelor active ale oxigenului, dar acestea sunt capabile să asigure doar o stabilitate relativă a nivelului de SRO.

### ***1.1.3. Formarea radicalilor liberi în reticulul endoplasmatic***

Formarea speciilor reactive ale oxigenului în reticulul endoplasmatic (RE) are loc prin concursul citocromului  $P_{450}$  (CYP), a citocromului  $b_5$  și sistemului de monooxigenaze. Aceste reacții sunt studiate, în special, *in vitro* pe sisteme microzomale.

Noțiunea de citocrom  $P_{450}$  întrunește o familie de enzime hem-tiolate implicate în metabolizarea oxidativă a unei mari varietăți de compuși lipofili endogeni și exogeni. În calitate de produși intermediari ai acestor reacții apar radicalul superoxid și peroxidul de hidrogen. Formarea radicalului superoxid are loc în procesul de oxidare spontană a hemoglobinei, ferredoxinei, hidrochinonelor reduse de citocromul  $b_5$ , tetrahydropteridinelor, adrenalinei ș.a. [123, 130, 440, 501, 502]. Cuplarea slabă a ciclului catalitic al citocromului  $P_{450}$  generează producția continuă a speciilor reactive de oxigen, care afectează căile de semnalizare și alte funcții celulare. Generarea de SRO de către citocromul  $P_{450}$  este strict controlată prin

reglementarea procesului de transcripție genică, precum și prin modularea interacțiunii între constituenții proteici ai monooxigenazei care afectează activitatea, cuplarea și stabilitatea SRO. Funcționarea necorespunzătoare a acestor mecanisme poate duce la o producere exagerată de SRO, și ca urmare, la inducerea stresului oxidativ. La rândul său, stresul oxidativ reglează nivelul citocromului P<sub>450</sub> printr-o varietate de mecanisme de feedback.

Citocromul P<sub>450</sub> este inclus în sistemul membranal al monooxigenazei microzomiale (MOM), localizat în reticulul endoplasmatic, prezent în majoritatea celulelor eucariote. Sistemul MOM catalizează oxigenarea unei mari varietăți de compuși exogeni, precum și a unor substraturi endogene. Marea varietate de substraturi, care poate fi oxidată, se datorează existenței mai multor izoenzime CYP cu selectivitate largă de substrat. Reacțiile de monooxigenare, de obicei, necesită participarea a doi electroni, care sunt transferați spre CYP de către flavoprotein-NADPH-P<sub>450</sub>-reductaza. Toate proteinele constitutive ale MOM sunt ancorate de suprafața exterioară a membranei RE prin ancore transmembranare, interacționează prin difuzie laterală și formează complexe dinamice. Captarea electronilor de către CYP este necesară pentru a activa oxigenul și, în cele din urmă, pentru a insera un atom de oxigen într-o moleculă de substrat. Cu toate că sistemul format din citocromul P<sub>450</sub> și reductaza acestuia este pe deplin funcțional, MOM complet conține, de asemenea, citocromul b<sub>5</sub> care poate servi ca o sursă alternativă de electroni pentru CYP, dar este mult mai puțin eficace decât CYP - reductaza [470].

Aportul componentelor MOM și intensitatea proceselor transferului de electroni în membranele RE sunt adesea subestimate. Contrar opiniei că cele mai intense procese de transfer de electroni sunt localizate în mitocondrii, mai mult de 60% din hemoproteinele transportoare de electroni și aproximativ 20 - 30% din flavoproteinele membranare sunt localizate în RE. Cifrele indicate sunt valabile, în special, pentru celulele hepatice, dar și în cazul altor tipuri de celule, conținutul componentelor menționate în membrana RE este comparabil cu cel din membrana internă mitocondrială [130, 501, 502].

Așa dar, sistemul CYP catalizează reacțiile care introduc oxigenul în molecule. În proces este nevoie de specii parțial reduse de oxigen, care pot apărea prin disocierea CYP [216]. Este dovedit că microzomii izolați în prezența unui sistem de regenerare NADH ori NADPH generează radicali superoxid și peroxid de hidrogen. În același timp, formarea speciilor reactive de oxigen *in vivo* pe membranele RE este limitată și poate atinge un nivel periculos, doar în caz de expunere cronică a celulelor acțiunii factorilor toxici, sau în condiții de depreciere a sistemului antioxidant.

Ciclul catalitic al CYP poate fi descris în felul următor. În lipsa substratului izoformele P<sub>450</sub> au fierul hemic cu 6 legături considerate slabe. În cele mai multe cazuri, la cuplarea cu



substratul are loc schimbarea echilibrului de spin spre cinci legături coordinative. După acceptarea primului electron adițional, P<sub>450</sub> leagă o moleculă de oxigen. Oxi-complexul P<sub>450</sub> este în continuare redus cu formarea unui peroxi-complex. Acesta, la adiționarea de protoni, poate duce la scindarea heterolitică a legăturii O-O. Ca rezultat, se produce molecula de apă și complexul "oxinoid". Atomul de oxigen activat, legat cu hemul, este introdus în molecula de substrat. În prezența unei concentrații înalte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sau alți peroxizi organici, aceste molecule pot servi ca o sursă de oxigen pentru P<sub>450</sub> prin hidroxilarea H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- dependentă a substratului în ciclul catalitic. În cadrul acestor transformări există mai multe "scurgeri", adică situ-suri producătoare de SRO. Primul reflectă eliberarea anionului radical superoxid datorită descompunerii complexului ternar redus. Cea de-a doua „scurgere”, care duce la formarea SRO, reflectă reacția de protonare a peroxicitocromului P<sub>450</sub> cu formarea peroxidului de hidrogen. Cea de-a treia cale de formare a speciilor reactive în RE necesită adiționarea a doi electroni după dezintegrarea peroxicitocromului P<sub>450</sub> cu eliberarea unui atom de oxigen din componența unei molecule de apă [216, 470, 502].

Producerea continuă de SRO este un rezultat inevitabil al consumării NADPH de către CYP, atât în prezența, cât și în lipsa substratului. În același timp, rata de consum a NADPH și a oxigenului este dependentă într-o măsură extrem de joasă de substrat. Ca rezultat, chiar și în lipsa totală a substratului, lanțul transportor de electroni din membranele RE continuă să efectueze oxidarea NADPH și să producă SRO. Astfel, MOM contribuie semnificativ la formarea SRO în celulă, chiar în lipsa inducerii oxidazelor de prezența xenobioticelor [130].

În cazul depășirii limitei fiziologice a SRO produse de către RE, radicalii liberi și moleculele reactive pot provoca peroxidarea lipidelor, induce toxicitate celulară și chiar moartea celulelor. Anume din aceste considerente în celule sunt prezente mecanismele eficiente de control asupra procesului de generare a SRO de către MOM. Principalele dintre acestea sunt reglarea transcripțională, precum și modularea interacțiunii între componentele proteice ale monooxigenazei, care afectează activitatea, eficiența și stabilitatea ei. În cazul funcționării proaste a acestor mecanisme intervine starea de stres oxidativ, iar acesta, la rândul lui, reglează nivelul P<sub>450</sub> prin diverse mecanisme feedback. Un rol important în procesul de reglare îi revine și citocromului b<sub>5</sub>, care acționează în calitate de modulator al activității monooxidazei [130].

SRO sunt produse în reticulul endoplasmatic al microalgelor în timpul formării legăturilor disulfurice între substratul lanțului polipeptidic. Procesul de formare a SRO în reticulul endoplasmatic al microalgelor implică enzima protein-disulfid-izomerază (PDI). Această enzimă catalizează formarea și ruperea legăturilor disulfurice, care sunt prezente între resturile de cisteină ale proteinelor în timpul plierii moleculei în structură terțiară. Peroxidul de

hidrogen este produs în reticulul endoplasmatic atunci când doi electroni sunt transferați la reziduul de cisteină, ducând la reducerea situsului activ PDI, în timp ce substratul polipeptidic este oxidat, ducând la reducerea oxigenului molecular în oxidant  $H_2O_2$  [440].

Cu toate că în prezent multe din aspectele efectelor fiziologice și celulare ale generării SRO în componentele RE rămân încă neclare, cert este faptul, că RE în calitate de sursă de radicali liberi și molecule reactive un rol de importanță majoră.

#### **1.1.4. Formarea radicalilor liberi în peroxizomi**

Oxigenul este consumat în diverse reacții metabolice în diferite compartimente celulare, iar peroxizomii sunt unele dintre cele mai importante site-uri în acest sens, de rând cu cloroplastele, mitocondriile și reticulul endoplasmatic. Încă în anii 60 de către De Duve a fost descrisă pentru prima dată o cale respiratorie prezentă în peroxizomi, în care electronii, generați din diverși metaboliți reduc  $O_2$  până la  $H_2O_2$ , care este în continuare redus până la  $H_2O$  [386]. Transportul de electroni în peroxizomi nu este cuplat cu procesul de fosforilare și nu duce la producerea de ATP. Energia liberă este eliminată sub formă de căldură.

La momentul actual se consideră demonstrat rolul cheie al acestor organite omniprezente în procesul de producere, dar și în procesul de distrugere a SRO, în special a peroxidului de hidrogen. Acest rol reiese din consumul sporit de oxigen, formarea  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$  și  $NO^{\cdot}$  în peroxizomi, precum și descoperirea mai multor enzime ce metabolizează SRO [123, 425, 440].

Inițial, se considera că principala funcție a peroxizomilor este de a descompune  $H_2O_2$ , generat de diferite oxidaze peroxizomale (în special de flavoproteine) prin concursul catalazei, enzima considerată drept marker clasic peroxizomal. În prezent, este clar că peroxizomii sunt implicați în numeroase funcții celulare. Principalele procese metabolice care contribuie la generarea de  $H_2O_2$  în peroxizomi sunt  $\beta$ -oxidarea acizilor grași, reacțiile enzimatice ale flavinoxidazelor, disproporționarea radicalilor superoxid, iar în peroxizomii plantelor - reacțiile de fotorespirație ale glicolatoxidazei [440]. Peroxizomii microalgelor sunt locul producției intracelulare majore de  $H_2O_2$  datorită prezenței oxidazelor și a metabolismului lor oxidativ, iar  $O_2^{\cdot-}$  este un produs al activității lor metabolice normale. Superoxidradicalul se localizează în în matricea și membrana peroxizomilor [145, 381].

Principalele surse ale peroxidului de hidrogen în peroxizomi sunt oxidazele, care transferă hidrogenul de la substratul respectiv la oxigenul molecular.  $H_2O_2$  este descompus de enzimele catalaza și glutatión – peroxidaza (GPx) sau convertit în radicalul hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ). Radicalii hidroxil pot deteriora membrana peroxizomală prin peroxidarea acizilor grași nesaturați. Hidroperoxidii lipidici formați în acest proces pot fi descompuși de catalază și

glutation - peroxidază. Anionul superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) generat de oxidazele peroxizomale (de exemplu, de xantinoxidaza (XOx)) este eliminat de superoxid dismutazele MnSOD și CuZnSOD. Sintetaza oxidului nitric (NOS) catalizează oxidarea L-argininei (L-Arg) până la oxid nitric ( $NO^{\cdot}$ ).  $NO^{\cdot}$  poate reacționa cu radicalul superoxid  $O_2^{\cdot-}$  formând peroxinitrit ( $ONOO^{\cdot-}$ ), un oxidant extrem de puternic.  $H_2O_2$  și  $NO^{\cdot}$  penetrează membrana peroxizomală și acționează în procesul transducției de semnal [502].

Procesul de  $\beta$ -oxidare a acizilor grași, catalizat de enzima acetyl-CoA-oxidaza, este cel mai important proces metabolic în peroxizomi, care duce la formarea SRO. Deși substratul lipidic peroxizomal are o importanță neînsemnată în calitate de sursă de energie, acesta este foarte valoros din punct de vedere fiziologic funcțional. Diferite categorii de lipide sunt metabolizate de diferite forme ale acetyl-CoA-oxidazei, care se deosebesc prin specificitate de substrat. Astfel, palmitoil-CoA - oxidaza catalizează reacțiile de degradare a acizilor grași cu catenă lungă și a prostaglandinelor, pristanoil-CoA - oxidaza – a acizilor grași cu ramificația 2-metil a catenei, iar trihidroxiprostanol-CoA oxidaza – a intermediarilor acizilor biliari, ș.a. În aceste reacții are loc formarea unei cantități importante de peroxid de hidrogen [501, 502].

Astfel, în prezent peroxizomii sunt considerați ca locul major de formare și detoxifiere a speciilor reactive ale oxigenului și, prin urmare, au un rol important în menținerea homeostaziei redox celulare și în reglarea diferitelor cascade de semnalizare.

#### ***1.1.5. Formarea radicalilor liberi în citozol***

Spre deosebire de cantitatea mare de informație disponibilă cu referire la producerea SRO în diferite compartimente ale celulei, informația despre formarea speciilor reactive de oxigen în citozol se găsește mult mai rar. Din literatura de specialitate reiese că citozolul nu conține surse directe majore de formare a SRO. În același timp, aici se înregistrează circulația peroxidului de hidrogen între diferite compartimente celulare, în care acestea sunt produse.

Dacă inițial se credea că această mișcare este efectuată prin mecanismul difuziei pasive, atunci în prezent a fost stabilit că aceasta este facilitată de acvaporinele specifice pentru  $H_2O_2$ . Citozolul mai este implicat și în integrarea și transmiterea semnalelor SRO spre/ și de la alte structuri celulare, inclusiv de la / și spre membrana citoplasmatică.

În procesul normal al reacțiilor fiziologice, care au loc în citozol, permanent se produc și se consumă SRO. Cu toate că intensitatea acestui proces este mult mai joasă față de cea înregistrată în mitocondrii, cloroplaste, peroxizomi, reticul endoplasmatic, aceste procese merită a fi evidențiate în calitate de surse de radicali și specii reactive. Se consideră că formarea speciilor reactive de oxigen în citozol are loc preponderent cu participarea xantin-oxidazei și

aldehid-dehidrogenazei. Activitatea xantin-oxidazei a fost înregistrată în celulele endoteliale, celulele Kupffer și în hepatocite. De asemenea, formarea SRO în citozol poate fi determinată de activitatea oxidazelor flavinice. Formarea peroxidului de hidrogen are loc în procesul reacției de oxidare a aminoacizilor de către oxidazele respective [216]. Aceste enzime fiind prezente și în celulele microorganismelor fotosintetizante eucariote, putem presupune implicarea lor în baza unor mecanisme apropiate, în formarea speciilor reactive ale oxigenului.

#### ***1.1.6. Formarea radicalilor liberi în membrana citoplasmatică, peretele celular și apoplast***

Oxidoreductazele transportoare de electroni sunt omniprezente în structurile membranare, inclusiv în membrana plasmatică și sunt surse de generare a SRO. Producția de SRO a fost studiată prin metoda rezonanței electronice paramagnetice și a capcanelor de spin, precum și prin aplicarea tehnicilor specifice de colorare a membranelor plasmactice izolate. A fost demonstrat că NADPH mediază producția de  $O_2^{\cdot-}$  în aceste structuri. A fost sugerat faptul că în membranele plasmactice generarea  $O_2^{\cdot-}$  ar putea fi atribuită acțiunii a cel puțin două enzime: NADPH oxidazei, și, în prezența menadionei, chinon-reductazei. NADPH oxidaza catalizează transferul de electroni de la NADPH citoplasmatic la oxigen pentru a forma  $O_2^{\cdot-}$ . Superoxid radicalul este dismutat în  $H_2O_2$ , fie spontan, fie prin activitatea SOD. Se consideră că NADPH oxidaza joacă un rol-cheie în producția și acumularea de SRO în condiții de stres. Formarea  $O_2^{\cdot-}$  în membrana plasmatică și peretele celular al microalgelor este atribuită, de asemenea, prezenței a două enzime: nicotinamida adenin dinucleotid fosfat oxidaza (NADPH oxidaza) și chinon-reductaza, în timp ce  $H_2O_2$  se formează ca urmare a activității superoxid dismutazei [231, 440]. În condiții fiziologice normale, în peretele celular generarea SRO are loc într-o manieră reglementată și strict localizată, și în timp util, ceea ce duce la semnalizarea orientată spre modificarea gradului de rigidizare a peretelui celular determinată de SRO, care este un factor cheie în asigurarea stării de turgor. Având în vedere toxicitatea SRO, atât activitatea, cât și cantitatea diferitelor enzime care produc SRO sunt strâns reglementate [231].

A fost demonstrat rolul peroxidazelor asociate cu structurile peretelui celular în procesul de generare a peroxidului de hidrogen în prezența NADH. Această reacție este stimulată de prezența monofenolilor, așa ca alcoolul coniferilic. Generarea speciilor reactive de oxigen de către peroxidaza localizată în peretele celular a fost înregistrată doar în condiții specifice – de exemplu în condiții de hipersensibilizare cu agenți patogeni ori în condiții de deficit de ioni de potasiu [238, 292]. De asemenea, a fost stabilit și rolul diamin-oxidazei peretelui celular în formarea speciilor reactive ale oxigenului cu utilizarea diaminelor sau poliaminelor (ca de

exemplu putrescina, spermidina, cadaverina ș.a.) pentru a reduce chinonele, ce se autooxidează cu formarea peroxidului [392].

Enzimele localizate în peretele celular sunt responsabile și pentru producerea speciilor reactive ale oxigenului în apoplast [46, 206]. Enzima oxalat-oxidaza este implicată în procesul de acumulare a peroxidului de hidrogen în apoplast, în special în condiții de interacțiune a celulei vegetale cu agenții patogeni, inclusiv cei fungici. Enzimele de tipul amino-oxidazelor contribuie la producerea reacției de răspuns la stresul biotic prin formarea peroxidului de hidrogen în rezultatul dezaminării oxidative a poliaminelor cu participarea FAD [135]. Generarea radicalului hidroxil în apoplast este în întregime ori în cea mai mare parte determinată de peroxidaza peretelui celular [206, 392].

### ***1.1.7. Particularitățile de formare a SRO în celulele procariote fotosintetizatoare***

Cele mai bine cunoscute microorganisme fotosintetizatoare sunt cianobacteriile. Cianobacteriile au un sistem fotosintetic similar cu cel al plantelor superioare, iar membranele lor citoplasmatică și tilacoidale sunt similare cu cele ale cloroplastului plantelor superioare. Această asemănare se referă atât la compoziția lipidelor, cât și la planul de asamblare a membranelor. La cianobacterii, membrana tilacoidală este singurul loc al fotosintezei și, de asemenea, principalul loc în care este localizat lanțul transportor de electroni [304].

La cianobacterii, ca și la toate celelalte organisme aerobe, respirația este o sursă de SRO produse în celule. Oxigenul molecular pătrunde în celule prin difuziune pasivă și este redus până la anionul superoxid și peroxidul de hidrogen prin reacțiile de oxidare a flavoproteinelor, cum ar fi NADH-dehidrogenaza II. Aceste reacții sunt unele dintre cele mai importante surse naturale de SRO în celulele cianobacteriene.

Afară de SRO produse în procesul de respirație, organismele fotosintetice se confruntă cu radicali și molecule reactive generate de lanțul fotosintetic de transport al electronilor. Lumina, care este esențială pentru fotosinteză, induce fotosensibilizarea clorofilei, iar excesul de energie al acesteia este transmis oxigenului, care se transformă în oxigen singlet ( $^1\text{O}_2$ ). Se consideră că această formă reactivă a oxigenului inhibă procesul de reparare a fotosistemei II (PSII) inactivat de lumină. Dacă intensitatea luminii este mai mare decât cea care poate fi gestionată în mod normal de capacitatea fluxului de electroni fotosintetic, producția de  $^1\text{O}_2$  crește și se pot forma și alte SRO. Aceste fenomene pot inactiva ambele fotosisteme celulare. Fenomenul se produce din motivul că oxigenul este preferențial, comparativ cu ferredoxina, în calitate de acceptor de electroni, iar în rezultat se formează anionul superoxid în calitate de produs primar. Această reacție, cunoscută ca reacția Mehler, este totuși sub semnul întrebării atunci când se aplică la

cianobacterii. Unii autori consideră că reducerea oxigenului de către fluxul de electroni în PSI are loc la toate fototrofele oxigenice. Alții pun această reacție la cianobacterii sub semnul întrebării, pornind de la rata de cel puțin 3 ori mai mare de reducere a oxigenului și rata mică de producere a peroxidului de hidrogen comparativ cu plantele superioare și algele eucariote. Discrepanța dintre aceste date ar putea fi explicată prin faptul că anionul superoxid nu este principalul produs al fotoreducerii oxigenului. Concluzia dată se bazează totuși pe cazuri particulare și necesită a fi verificată pe mai multe obiecte biologice din acest grup sistematic [255].

Ce ține de alte compartimente prezente în celula procariotă, cum ar fi citozolul, membrana citoplasmatică, peretele celular, producerea de SRO în linii generale la cianobacterii are loc similar celor descrise mai sus.

## **1.2. Rolul biologic al speciilor reactive ale oxigenului**

Problema elucidării rolului biologic al speciilor reactive ale oxigenului de fiecare dată aduce la conștientizarea unui paradox care, pe de o parte, indică asupra rolului benefic al SRO, iar pe de altă parte – asupra rolului deteriorant al acestora [73, 175, 392, 495, 501, 502]. În linii generale, efectele SRO pot fi grupate în două categorii: efecte benefice și efecte distructive. Printre efectele benefice menționăm: semnalizarea intracelulară (SRO sunt mesageri secundari); protecția contra invaziilor microbiene (SRO realizează reacția de hipersensibilitate); implicarea în mecanismele de reglare intracelulară și dezvoltare embrionară. Printre efectele distructive ale SRO sunt: peroxidarea lipidelor, deteriorarea oxidativă a proteinelor, inducerea mutațiilor în structura ADN, activarea factorilor ce provoacă moartea celulară.

Doar radicalii primari (superoxid radicalul, radicalul oxidului nitric și radicalii semiubichinonici) au funcții biologice în celula vie. Rolul benefic este atribuit și unor molecule reactive, în special este vorba despre peroxidul de hidrogen. Deci, în continuare, atunci când vom vorbi despre rolul fiziologic normal al SRO, ne vom referi anume la categoriile nominalizate.

În prezent este recunoscut faptul, că generarea unei cantități moderate de SRO este un element indispensabil al stării fiziologice a celulelor de orice tip. În concentrații mici și moderate, SRO sunt implicate în calitate de mesageri secundari în funcționarea cascadelor intracelulare de semnalizare. În celulele plantelor acestea mediază un șir întreg de reacții de răspuns, inclusiv închiderea-deschiderea stomatelor [392, 466], manifestarea geotropismului la rădăcini, realizarea mecanismului de apoptoză [392], formarea toleranței față de stresul biotic și abiotic [291].

Modificarea intensității formării speciilor reactive de oxigen determină activarea reacțiilor implicate în morfogeneză la plante. De exemplu, anionul superoxid este implicat în procesul de alungire a frunzelor [494, 496]. De asemenea, SRO sunt un factor de control în reacțiile de hipersensibilitate și a celor de apoptoză. În cazul atacului patogenilor, datorită reacției de hipersensibilitate, în jurul agenților patogeni se formează zone de țesuturi moarte în care se conține o cantitate mare de substanțe cu efect antimicrobian [497]. Atât speciile reactive, cât și produsele degradării oxidative a biomoleculelor, ce apar în rezultatul acțiunii SRO, pot realiza funcțiile mesagerilor secundari în transducția de semnal, inclusiv în caz de stres. Acest lucru este determinat de modificarea potențialului redox al diferitor proteine sensitive. Mecanismul major prin care speciile reactive de oxigen realizează efectele lor biologice în reglarea redox constă în modificarea bazată pe tiol a proteinelor - țintă [473].

Speciile reactive oxidează proteinele redox-sensibile nemijlocit, ori prin intermediul moleculelor care realizează controlul stării redox în celulă, așa ca glutatationul și tioredoxina. Prin modificarea oxidativă a stării sulfurii din componența grupelor tiolice ori prin oxidarea clusterelor FeS, SRO modifică conformarea spațială a proteinelor și, implicit, activitatea lor fiziologică [494].

Pe lângă modificarea proteinelor redox-sensibile, SRO se implică în mecanismele de mobilizare a rezervelor de calciu, fosforilare a moleculelor proteice și expresie a genelor, în special prin modularea activității proteinfosfatazelor, proteinchinazelor și factorilor de transcripție [392].

În calitate de mesageri ai acidului salicilic, SRO determină reacțiile de răspuns ale plantei la stresul provocat de acțiunea patogenilor și cel osmotic; în calitate de mesageri ai acidului abscizic acestea dirijează procesul de închidere și deschidere a stomatelor; ca mesageri ai acidului giberilic SRO sunt implicate în procesul de germinare a semințelor și mecanismele de apoptoză; prin medierea producerii de auxine SRO asigură realizarea geotropismului pozitiv al rădăcinilor [392].

În organismul animal, formarea SRO este un mecanism important al imunității nespecifice. În cazul interacțiunii fagocitelor cu agenții patogeni ori particule și substanțe străine are loc activarea NADPH oxidazei membranare, în rezultatul căreia are loc formarea  $O_2^{\cdot-}$ . Acest proces duce la majorarea rapidă a conținutului radicalului anion superoxid și a peroxidului de hidrogen în celulele fagocitare. Cantitatea oxigenului consumat de aceste celule crește în aceste condiții de 20 ori și mai mult – fenomen numit *explozie respiratorie*. Peste 90% din oxigenul consumat este utilizat pentru formarea superoxid radicalului și a peroxidului de hidrogen. Cu participarea mieloperoxidazei are loc formarea hipoclorurii. SRO eliberate în timpul exploziei

respiratorii distrug celulele agenților patogeni, celulele bătrâne, precum și pe cele imunoincompatibile, cum ar fi cele maligne [495].

Radicalii semichinonici se referă de asemenea la grupul radicalilor primari. În condiții normale, aceștia nu sunt decât niște participanți ordinari ai lanțului transportor de electroni, asigurând prin activitatea lor coordonată, parcursul normal al proceselor fiziologice.

Radicalul oxidului de azot  $\cdot\text{NO}$  – așa numitul factor al relaxării endoteliale – a fost descoperit în 1980 de către Furchgott și Zawadski. Pe lângă funcția nominalizată s-a dovedit a fi un mediator al sistemului nervos și a celui imun. În prezent, a fost confirmat faptul că radicalul oxidului nitric participă în menținerea homeostaziei cardio-vasculare, reglarea procesului de respirație, fagocitoză, morfogeneză, este implicat în procesele ce formează memoria; eliberarea presinaptică a neuromediatorilor [238, 501, 502]. În patologie,  $\cdot\text{NO}$  are un rol primordial în mecanismele de dezvoltare a șocului toxic bacterian, a maladiilor de etiologie inflamatoare; deteriorările ischemice ale organelor și țesuturilor, epilepsie ș.a. În organismul omului și animalelor, acest compus activ se formează din L-arginină cu participarea NO-sintazei endoteliale, care produce oxidarea grupului guanidinic. În rezultat, se obține L-citrulina și radicalul liber al oxidului nitric. Efectul fiziologic al radicalului  $\cdot\text{NO}$  constă în vasodilatare prin intermediul creșterii nivelului GMPc și scăderea conținutului ionilor de calciu în celulele musculare netede. În același timp,  $\cdot\text{NO}$  scade sensibilitatea mușchilor netezi față de calciu din contul activării canalelor ATP-dependente și hiperpolarizării membranelor celulelor musculare netede.

Afară de cele expuse, efectele radicalului oxidului nitric influențează procesul de adeziune a trombocitelor și leucocitelor, sinteza endotelinei I, proliferarea celulelor musculare ale vaselor, procesele apoptotice. Radicalul oxidului nitric manifestă efect citoprotector și provoacă inițierea reacțiilor adaptive [383, 415, 501, 502].  $\cdot\text{NO}$  este un agent care, posibil, induce reticularea moleculelor care conțin gruparea sulfhidril. Procesul de S-tiolare parcurge inițial etapa de S-nitrozilare, prin aceasta fiind argumentată formarea radicalului dat în celulele de toate tipurile, la diferite nivele filogenetice.

La plante, radicalul oxidului nitric pare a fi implicat în mecanismele de senescență, în orice caz, pentru o mare varietate de specii a fost constatată diminuarea emisiei endogene de  $\cdot\text{NO}$  odată cu progresarea senescenței [345]. La concentrații joase, mai puțin de  $1\mu\text{M/L}$ , radicalul oxidului nitric se caracterizează printr-un timp de înjumătățire destul de mare - de la câteva minute la câteva ore. În acest timp acesta poate parcurge distanțe destul de mari, pătrunzând cu ușurință prin straturile celulare datorită hidrofobicității sale. În cazul creșterii concentrației de  $\cdot\text{NO}$ , durata de înjumătățire a acestuia scade până la părți de secundă.



Cu toate că în plante a fost depistată activitate L-arginin dependentă de tipul sintazei oxidului nitric, nici gena respectivă, nici proteina atare nu este prezentă în țesuturile plantei, ceea ce indică asupra faptului că producerea radicalului oxidului nitric este determinată de alte enzime. Printre acestea se numără nitrat reductaza, nitrit-NO reductaza, reductaza mitocondrială dependentă de transportul de electroni (în condiții de concentrație joasă de oxigen), xantinoxidaza ș.a. [297, 338, 345]. \*NO poate afecta sinteza etilenei, acestea fiind antagoniste după acțiunea lor fiziologică. Prezența radicalului oxidului nitric duce la inhibarea activității ATP-metionin S-adenoziltransferazei, ceea ce cauzează reducerea fluxului de S-adenozilmetionină, care este precursorul etilenei. Această proprietate fiziologică a radicalului \*NO poate avea și aplicare practică, prin mărirea duratei de păstrare după recoltare a plantelor horticole prin inhibarea biosintezei de etilenă [48].

O altă funcție biologică a radicalului oxidului nitric este asociată cu capacitatea lui de a întrerupe reacțiile în lanț, care duc la peroxidarea lipidică, de a proteja pigmentii fotosintetici prin sinteza directă a clorofilei sau prin modificarea post-translațională a proteinelor. Este cunoscut că \*NO poate împiedica derularea reacției Fenton, și, ca rezultat, generarea radicalului hidroxil [345].

Speciile reactive de oxigen au un rol dublu: sunt necesare pentru reacțiile de semnalizare, proliferarea și diferențierea celulară, realizarea apoptozei dar sunt și produse toxice ale metabolismului aerob [293]. Astfel, iar asigurarea unui echilibru perfect între formarea și eliminarea acestora este calea sigură de evitare a stresului oxidativ și efectelor lui nocive asupra tuturor structurilor biologice.

### **1.3. Protecția antioxidantă la microalge și cianobacterii**

Cauza de bază a stresului oxidativ este dezechilibrul care apare între procesul de formare a radicalilor liberi și activitatea sistemului de protecție contra acestora – sistemul antioxidant. Principalele componente ale acestui sistem sunt antioxidanții. Inițial, acest termen a fost introdus pentru a specifica substanțele, care sunt capabile de a inhiba reacțiile de oxidare radicalică din contul substituirii atomului de hidrogen al lor cu cel de oxigen al radicalilor liberi [501, 502]. Ulterior, semnificația acestui termen a fost extinsă considerabil, mai ales în domeniul biologiei. Conform concepției moderne, categoria de antioxidanți include sistemele de detoxifiere, cum ar fi, de exemplu, sistemul de eliminare a compușilor deteriorați în rezultatul oxidării lor spontane. Astfel, în această categorie se înscriu substanțele capabile să preîntâmpine formarea speciilor reactive de oxigen, să neutralizeze radicalii liberi, precum și să asigure protecția eficientă a

structurilor biologice. Pentru a realiza cu succes funcția lor în organismele vii, compușii antioxidanți sunt repartizați în diferite compartimente celulare.

Microalgele și cianobacteriile sunt caracterizate printr-o eficiență foarte înaltă în procesul de convertire a energiei solare în biomasă, în special datorită structurii celulare simple și suprafeței mari de contact cu mediul ambiant. Cele două avantaje majore determinate de structura specifică asigură accesul la apă, dioxid de carbon și alți nutrienți dizolvați în apele naturale ori în mediile nutritive lichide, în cazul speciilor de importanță industrială. Evoluția microalgelor și cianobacteriilor a dus la adaptarea lor la modificările pronunțate și rapide ale temperaturii, variațiile de intensitate ale iluminării, modificări de salinitate și pH, bioritmurile naturale și cele artificiale în cazul creșterii industriale. Datorită diversității sistematice a microalgelor și cianobacteriilor, există și o mare diversitate a mecanismelor de protecție contra stresului, dar și o varietate mare de componente ale celulelor care asigură protecția antioxidantă [39, 197, 271, 377, 440].

Microalgele și cianobacteriile, organisme fotosintetizante, dezvoltă mecanisme eficiente de protecție antioxidantă pentru a supraviețui în condiții de exces de radicali liberi. Concentrația ridicată de oxigen generată în timpul fotosintezei poate duce la formarea de specii reactive, cum ar fi anionul superoxid și peroxidul de hidrogen, din cauza reducerii incomplete a oxigenului. Lumina solară acționează asupra clorofilei, generând hidroperoxizi și alți compuși cu un potențial energetic mare. Atunci când producția de radicali liberi depășește capacitatea celulelor de neutralizare a acestora, apare autooxidarea activă a acizilor grași polinesaturați, în special a celor din membranele funcționale, inclusiv cele fotosintetice. Pentru a se apăra împotriva acestor efecte dăunătoare, microorganismele fotosintetice cresc sinteza de componente enzimatică și compuși macro și micromoleculari cu proprietăți antiradicalice. [39, 197, 271, 377, 440].

Substanțele antioxidante din microalge și cianobacterii îndeplinesc mai multe funcții importante: (1) Prevenirea oxidării: ele acționează ca antioxidanți de prevenție, inhibând reacțiile de oxidare, care conduc la formarea de radicali liberi, inclusiv radicali liberi lipidici; (2) Ruperea lanțului de autooxidare: antioxidanții pot rupe lanțul reacțiilor de autooxidare, prevenind astfel răspândirea acestora; (3) Stingerea oxigenului singlet: acționează și ca stingători ai oxigenului singlet, reducând riscul de daune cauzate de acest radical reactiv; (4) Reducerea hidroperoxizilor: antioxidanții convertesc hidroperoxizii în compuși stabili, contribuind la menținerea stabilității celulelor; (5) Chelarea metalelor: antioxidanții pot lega metalele cu valență variabilă și pot acționa ca prooxidanți, transformând ionii metalici reactivi în forme mai stabile; (6) Inhibarea substanțelor prooxidante: antioxidanții împiedică acțiunea altor substanțe cu potențial prooxidant, prevenind astfel daunele celulare [78, 228, 340].

### ***1.3.1. Antioxidanții microalgelor și cianobacteriilor***

Mecanismele de protecție împotriva stresului oxidativ la microalge și cianobacterii sunt similare cu cele identificate la alte organisme, în special la cele fotosintetice [134]. Aceste organisme pot fi supuse stresului oxidativ din cauza diversilor factori, cum ar fi variațiile de temperatură, salinitatea, aciditatea mediului acvatic, intensitatea luminii, lipsa nutrienților, expunerea la substanțe toxice, așa ca metalele, poluanții organici, coloranții textili, fertilizatorii artificiali și alte substanțe din apele reziduale sau solurile agricole. În condiții de creștere artificială a microalgelor și cianobacteriilor în cultivatoare de diferit tip, culturile de asemenea, sunt supuse diferitor factori de stres – componența mediului, densitatea celulelor, aplicarea stimulatorilor de creștere ș.a. În aceste condiții, producția suficientă și specifică de antioxidanți este crucială pentru asigurarea protecției antioxidante la aceste organisme, acoperind astfel cele trei niveluri de protecție celulară [51, 394].

Prima linie de apărare a celulelor de microalge și cianobacterii în condiții de stres oxidativ este reprezentată de substanțele cu rol de prevenire a formării radicalilor liberi și a moleculelor reactive. Aceste substanțe inhibă reacțiile de oxidare și, implicit, formarea radicalilor liberi. Ele acționează în calitate de compuși reactivi care previn oxidarea lipidelor și formarea radicalilor lipidici, producerea cărora este o reacție în lanț. Principalul mecanism prin care aceste substanțe acționează constă în capturarea electronilor impari ai radicalilor, neutralizându-i pe ultimii în acest mod. Multe dintre substanțele de prevenție au multiple legături duble în structura lor, care acționează în calitate de capcane de electroni. O altă linie importantă de protecție antioxidantă la microalge și cianobacterii este reprezentată de substanțele care „sting” lanțul reacțiilor de autooxidare. Cea mai răspândită reacție de „stingere” este cea de reducere a oxigenului singlet. Antioxidanții microalgelor și cianobacteriilor pot acționa în mod sinergic amplificând efectul protectiv. Aceste molecule pot realiza reacții de reducere, de chelare a metalelor, de inhibiție a enzimelor cu potențial prooxidant și alte funcții importante în protejarea celulelor împotriva stresului oxidativ [78, 228, 350, 351]. Astfel, diversitatea antioxidanților în celulele microalgelor și cianobacteriilor și a mecanismelor de acțiune a lor poate asigura un nivel adecvat de protecție atât în condiții naturale, cât și în condiții de producere industriale.

### ***1.3.2. Enzimele cu funcții antioxidante***

Enzimele antioxidante cheie în toate celulele vii includ superoxid-dismutaza (SOD), catalaza (CAT) și peroxidazele (POX). Aceste enzime joacă un rol esențial în eliminarea radicalilor liberi și a moleculelor reactive care se formează în cadrul proceselor metabolice

normale, contribuind astfel la menținerea homeostaziei celulelor vii. Tot aceste enzime sunt implicate în protecția antioxidantă în condițiile producerii excesive de radicali liberi și molecule reactive, adică în condiții de stres [152, 170, 263].

*SOD* este considerată prima linie de apărare împotriva speciilor reactive ale oxigenului și este responsabilă de eliminarea radicalului superoxid. Această enzimă are un rol protector deosebit în condiții de stres, cum ar fi fotooxidarea, disecarea, deficiențele de nutrienți sau expunerea la substanțe toxice. *SOD* catalizează reacția prin care doi radicali superoxid se transformă într-o moleculă de oxigen și o moleculă de peroxid de hidrogen. Această reacție este denumită reacție dismutazică, de unde derivă și numele enzimei. Molecula de peroxid de hidrogen formată în urma acestei reacții are un potențial distructiv mai mic în comparație cu radicalul superoxid. Superoxiddismutaza se caracterizează prin stabilitate și rezistență la temperaturi cuprinse între -20 și +80°C. Cu toate acestea, la temperaturi mai mari de 80°C, enzima își pierde doar parțial activitatea, și numai la aproximativ 130°C are loc inactivarea completă a enzimei. Chiar și la fierberea îndelungată enzima poate să-și păstreze parțial activitatea, demonstrând proprietăți unice ale acestei molecule proteice [312].

Există trei tipuri de *SOD*, în funcție de metalul care servește în calitate de cofactor în componența moleculei: Cu/Zn*SOD*, Mn*SOD* și Fe*SOD*. Aceste enzime se găsesc în diferite compartimente celulare, precum citoplasma și mitocondriile. În cianobacterii și alte celule procariote, se găsesc Fe*SOD* și Mn*SOD*, în timp ce la microalge pot fi întâlnite toate variantele. Sinteza activă a *SOD* și creșterea nivelului său asigură supraviețuirea organismului în condiții de stres oxidativ, oferind o mare rezistență organismelor aerobe în condiții diferite de mediul optim, precum și capacitatea de protejare împotriva mecanismelor de apărare ale gazdei în cazul microorganismelor patogene. [170, 175, 204, 246, 248, 271, 278, 363]. În același timp, atunci când cantitatea de radicali liberi este foarte mare, are loc inactivarea mecanismelor de sinteză a enzimei. Astfel, conținutul înalt al *SOD* în biomasă este un marker biologic al unei stări de stres oxidativ de intensitate medie, în timp ce stresul oxidativ puternic provoacă o inactivare semnificativă a activității *SOD*.

Produsul reacției dismutazice este peroxidul de hidrogen, care la rândul său poate fi substrat pentru producerea radicalului hidroxil - cel mai agresiv radical în raport cu moleculele organice. Ca rezultat, activitatea superoxidismutazei urmează a fi asistată de alte enzime care inactivează moleculele de peroxid. Această funcție este realizată de catalază și peroxidaze, enzime care, de asemenea, fac parte din sistemul de protecție antioxidantă de prima linie a cianobacteriilor și microalgelor.

*Catalaza* (CAT) – o altă enzimă din prima linie de protecție antioxidantă - descompune peroxidul de hidrogen în oxigen și apă. În reacție participă două molecule de peroxid de hidrogen, una acționând ca donator de electroni și cealaltă ca acceptor de electroni. În celulele microalgelor, catalaza se găsește preponderent în peroxizomi, unde sunt concentrate și alte enzime, precum enzimele flavoproteice și superoxidismutaza (SOD), care participă în reacții care generează peroxidul de hidrogen. În cazul cianobacteriilor această enzimă este localizată în citoplasmă și în apropierea derivatelor funcționale a membranei citoplasmatică. Coordonarea activității catalazei și a citocromului *c* creează condiții de sinteză a moleculelor de ATP în mitocondrii fiind parte a procesului de fosforilare oxidativă.

Enzima catalaza se caracterizează prin stabilitate înaltă și cerințe reduse față de energia de activare, iar activitatea ei este influențată de viteza difuziei peroxidului de hidrogen către centrul activ al enzimei și nu este inhibată după principiul feedback-ului negativ [230, 363, 433, 435].

Microalgele care manifestă o rezistență sporită la factorii fizici extremi se disting prin prezența înaltă a activității atât a superoxidismutazei, cât și a catalazei, lucru care le permite să acționeze în tandem. În situația în care SOD este activată, dar activitatea catalazei rămâne neschimbată, celulele își pierd capacitatea de a menține un echilibru redox adecvat. Prin urmare, numai acțiunea coordonată a ambelor enzime poate minimiza efectele dăunătoare ale stresului oxidativ în celulele microalgelor în faza inițială de apariție a speciilor reactive. [160]. Studiile efectuate de diverse echipe de cercetători asupra diferitelor microalge și cianobacterii au demonstrat o creștere semnificativă a activității enzimelor SOD și CAT în situații de stres oxidativ, indiferent de factorii care au generat acest stres [259, 267, 363].

Reacția de neutralizare a peroxidului de hidrogen poate fi realizată și de alte enzime, afară de catalaza. Mai mult ca atât, unele cianobacterii, cum este *Arthrospira platensis*, nu au această enzimă. În aceste condiții, funcția de reducere a  $H_2O_2$  este preluată de peroxidaze - o categorie de enzime care au ca grup prostetic fieroporfirina. Similar cu catalaza, aceste enzime degradează peroxidul de hidrogen format prin activitatea SOD. În contrast cu catalaza, peroxidazele pot utiliza ca substrat și alte tipuri de peroxizi, cum ar fi peroxizii acizilor grași, peroxizii carotenoizilor, peroxizii nucleotidelor, fenolilor și aminelor aromatice, care se formează în condiții de stres oxidativ de intensitate înaltă, în etapele avansate ale acestuia. Diverse peroxidaze, precum NADH-peroxidaza, NADPH-peroxidaza, glutation-peroxidaza, guaiacol-peroxidaza, ascorbat-peroxidaza, reduc peroxidul de hidrogen, producând apă ca produs final. În același timp, substratul este oxidat, devenind inofensiv și capabil să participe în diverse reacții

specifice ale căilor metabolice normale, cum ar fi implicarea în transferul de electroni.

*Ascorbatperoxidaza* (APX) este o altă enzimă implicată în reducerea peroxidului de hidrogen și utilizează ascorbatul ca donator de electroni. Această enzimă poate fi localizată nu doar în citosol, ci și în cloroplaste. Ascorbatul și dehidroascorbatul sunt produse spontan din monodehidroascorbat. Dehidroascorbat reductaza transformă dehidroascorbatul în ascorbat prin utilizarea glutaminei. NADPH-glutamin reductaza regenerează apoi glutamina oxidată. Acest lucru evidențiază importanța ciclului ascorbat-glutamină în răspunsul la stresul oxidativ în celulele fotosintezatoare. La *Nostoc muscorum* PCC 7119 și *Synechococcus* PCC 6311 a fost identificată activitatea ascorbat peroxidazei. La altă cultură de *Synechococcus* (*Synechococcus* PCC 7942) au fost identificate hidroascorbat reductaza și glutamin reductaza. Peroxiredoxinele (Prx-s), cunoscute și sub denumirea de alchil-hidroperoxidaze, sunt un alt grup larg răspândit de proteine care utilizează tioredoxina ca donator de electroni pentru a reduce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hidroperoxidii de alchil și peroxinitriții. Aceste enzime sunt cruciale pentru reducerea SRO endogene [190, 196].

*Glutationperoxidaza* (GPX) poate fi considerată o enzimă universală, fiind prezentă în diferite cantități în toate țesuturile și celulele. GPX conține seleniu, un element cunoscut pentru proprietățile sale antioxidante. La cianobacterii, GPX se găsește în citosol, în timp ce la microalge, se distribuie inegal între citosol (aproximativ două treimi) și mitocondrii (aproximativ o treime). GPX are o importanță deosebită, în special la organismele la care lipsește catalaza, precum unele specii de cianobacterii, devenind practic singura enzimă responsabilă de eliminarea peroxidului de hidrogen. De asemenea, GPX joacă un rol important în regenerarea vitaminei C și reactivarea altor enzime care pot fi afectate de oxidare și formarea legăturilor disulfidice în celule. Activitatea GPX este condiționată de prezența seleniului [165, 451].

Astfel, enzimele antioxidante primare din microalge și cianobacterii asigură eliminarea speciilor reactive ale oxigenului (SRO) generate în procesele metabolice normale, prevenind inițierea stresului oxidativ sau amplificarea lui în fazele incipiente. Activitatea acestor enzime poate varia în funcție de intensitatea stresului oxidativ cauzat de factorii externi sau interni, având tendința să crească sau să scadă. Scăderea activității lor apare, de obicei, în situații de stres sever, când celulele nu mai pot menține homeostazia și sunt predispuse la deteriorare și distrugere.

### ***1.3.3. Antioxidanții macromoleculari nonenzimatici***

Printre compușii macromoleculari care nu posedă activitate enzimatică, dar au proprietăți antioxidante, cele mai importante sunt *proteinele chelatoare*, care leagă metalele caracterizate prin valență variabilă. Mecanismul protecției antioxidante în cazul acestor substanțe este bazat pe

blocarea fierului și cuprului, mai rar a manganului și cobaltului, care datorită valenței variabile se includ în reacții de oxidoreducere. În aceste reacții, unul dintre cele patru metale numite acționează ca donator sau acceptor de electroni. În cadrul reacțiilor de acest tip se produce radicalul hidroxil, care prezintă pericol pentru celulele vii. Reacțiile clasice de acest tip includ reacțiile Fenton și Haber-Weiss, care au loc în prezența peroxidului de hidrogen și a formelor reduse ale ionilor de metale. Integrarea ionilor de metale cu valență variabilă în structura unor molecule stabile previne apariția stresului oxidativ. În componența învelișurilor celulare ale microalgelor și cianobacteriilor, preponderent în membrana citoplasmatică, se găsesc proteine specifice care asigură transportul activ de fier. Acest metal este deficitar în oceanul mondial, iar asimilarea lui în special în mediu salin este dificilă pentru celulele vii. Proteinele care realizează legarea metalului, blocând astfel reacțiile Fenton sau Haber-Weiss, sunt ransferinele [290].

Pe lângă proteinele respective în calitate de *agenți de chelare* a metalelor la microalge și cianobacterii sunt și exopolizaharidele, care leagă metalele cu valență variabilă în proximitatea celulei, prevenind astfel pătrunderea lor în interior și declanșarea reacțiilor de formare a radicalilor. În acest sens, exopolizaharidele ca agenți de chelare a metalelor au funcția de antioxidanți de prevenție [182, 465, 464].

*Ficobiliproteinele* sunt caracteristice unui număr restrâns de organisme fotosintezatoare. Printre acestea se numără cianobacteriile, algele roșii și cele aurii. Funcția principală a acestor substanțe este de a capta energia undelor luminii vizibile care pătrunde la adâncime în straturile de apă și transmiterea ei moleculelor de clorofilă. Cromoforul acestora - un tetrapiol - posedă potențial cuantic înalt, culoarea fiind roșie sau albastră, cu maximele de absorbție între 495 și 650 nm: ficoeritrina cu lungimi de undă de absorbție maximă ( $\lambda_{\max}$ ) cuprinse între 490 și 570 nm (cu trei vârfuri la 565, 539 și 498 nm); ficocianina ( $\lambda_{\max} = 610-620$  nm); aloficocianina ( $\lambda_{\max} = 650-655$  nm) și ficoeritrocianina ( $\lambda_{\max} = 560-600$  nm) [306]. În baza structurii și proprietăților lor, în special în baza capacității lor de absorbție a radiațiilor, ficobiliproteinele sunt divizate în patru tipuri principale, și anume ficoeritrina, ficocianina, ficoeritrocianina și aloficocianina [149, 243, 306, 330, 443].

Nucleul porfirinic al cromoforului ficobiliproteinelor este dotat cu mai multe legături duble, ceea ce determină capacitatea antioxidantă a acestor molecule. De asemenea, unele componente ale lanțului polipeptidic al apoproteinei din componența pigmentilor posedă proprietăți antioxidante. În așa fel, utilizând mai multe site-uri active, ficobiliproteinele pot neutraliza mai multe categorii de radicali liberi, inclusiv radicalii aloxil, hidroxil și peroxil. Rolul antioxidant al ficobiliproteinelor este crucial, deoarece aceste molecule protejează membranele fotosintetice pe care sunt poziționate, astfel asigurând eficiența procesului de fotosinteză [387].

Sub acțiunea diferitor factori de stres cantitatea de ficobiliproteine în biomasa cianobacteriilor și microalgelor se modifică semnificativ. În condițiile unei intensități moderate sau joase a stresului acest parametru crește, iar în condițiile unui stres sever – scade [28, 30].

#### ***1.3.4. Componentele antioxidante cu masa moleculară joasă la microalge și cianobacterii***

În celulele microalgelor și cianobacteriilor au fost identificate numeroase substanțe antioxidante cu masa moleculară mică, care pot fi localizate în citosol și stroma organelor celulare microalgale, sau pe membranele structurale și funcționale ale celulelor.

Carotenoizii microalgelor și cianobacteriilor sunt printre cei mai cunoscuți antioxidanți cu masă moleculară joasă. Elementul structural principal care asigură capacitatea de a anihila radicalii liberi de către carotenoizii este prezența multiplelor legături duble conjugate din structura lanțului izoprenoid. În afară de aceasta, moleculele carotenoizilor mai includ și 2 inele hexenice nesaturate care, de asemenea, oferă moleculei capacitate antioxidantă. În celulele microalgelor și cianobacteriilor există o varietate mare de carotenoizi asociați cu fotosistemele I și II, care au funcția de a capta lumina și a oferi fotoprotecție [205, 217, 426]. Diferiți carotenoizi sting superoxid radicalul și radicalii lipidici, clorofila excitată și oxigenul singlet [354, 429].

În biomasa unor specii valoroase din punct de vedere biotehnologic, așa ca *Dunaliella salina*, *Chlorella zofingiensis*, *Arthrospira platensis* ș.a predomină în special doi carotenoizi principali -  $\beta$ -carotenul și luteina [260]. Cantitatea de carotenoizi poate fi modificată prin schimbarea intensității luminii, dar și stresul de altă natură poate duce la oscilații serioase ale acestui parametru, de exemplu stresul osmotic sau cel provocat de diferite metale [9, 10, 137, 167, 223, 252, 258, 367]. Printre carotenoizii microalgelor se evidențiază în mod special astaxantina, considerată cel mai puternic antioxidant natural, lipsit integral de potențial prooxidant și cu proprietăți terapeutice unice.

*Compușii fenolici* constituie un alt grup valoros de antioxidanți, identificați în biomasa microalgelor și cianobacteriilor. În același timp este, probabil, și cel mai numeros și variat grup de antioxidanți. Fenolii își realizează acțiunea antioxidantă prin trei mecanisme distincte. Primul mecanism constă în interacțiunea directă a compusului fenolic cu radicalul. În rezultat are loc distrugerea radicalului, care se poate realiza prin transfer de electroni sau protoni [127, 225, 471]. Cel de-al doilea mecanism constă în participarea compușilor fenolici în chelarea ionilor metalelor cu valență variabilă, iar cel de-al treilea – în stabilizarea membranelor prin modificarea gradului de fluiditate a lor prin inserarea lor mecanică în stratul dublu lipidic. Compușii fenolici foarte des acționează printr-un model sinergic cu alți fenoli sau cu antioxidanți din alte categorii.



Radicalii fenolici sunt caracterizați printr-un grad mai înalt de stabilitate comparativ cu molecula integră, ceea ce duce la ruperea lanțurilor oxidative în celule.

Cei mai cunoscuți și intens studiați compuși fenolici ai obiectelor ficologice sunt flavonoizii [144, 148; 191, 205, 235, 247, 283]. Spre deosebire de alți fenoli, radicalii flavonoizilor manifestă efecte prooxidante. Flavonoizii cu mai mult de două grupuri funcționale OH au o activitate antioxidantă mai mare chiar decât cea a vitaminelor C și E. Diferite studii evidențiază prezența cantităților importante de fenoli în biomasa mai multor microalge și cianobacterii, inclusiv de importanță biotehnologică, inclusiv la *Spirulina platensis*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* ș.a. [39, 144, 178, 239]. În dependență de starea fiziologică a culturii de cianobacterii și microalge și factorul care provoacă stresul, între activitatea antioxidantă totală a biomasei și conținutul de fenoli pot fi observate diferite niveluri de corelație – de la puternică pozitivă la foarte slabă [178, 316]. Ca și alte componente cu acțiune antioxidantă, conținutul de fenoli în biomasa de microalge și cianobacterii se poate modifica esențial în dependență de condițiile la care sunt expuse aceste organisme sau poate fi mărit prin aplicarea diferitor procedee biotehnologice [235].

Unul dintre cei mai răspândiți antioxidanți cu masa moleculară joasă este *glutathionul* – o tripeptidă extrem de abundentă, prezentă la toate cianobacteriile și microalgele, care joacă un rol central în protecția împotriva stresului oxidativ [310]. Forma redusă, care este și majoră a glutathionului (denumită GSH) menține mediul intracelular într-o stare redusă. GSH servește ca donator de electroni pentru enzimele antioxidante. După oxidare, disulfura de glutathion rezultată (GSSG) este regenerată din nou în GSH de diverși factori, inclusiv de glutathion reductaza. GSH funcționează în calitate de antioxidant în condiții de stres, inclusiv de stres produs de metale. De asemenea, GSH este o componentă cheie a rezervei citoplasmice de fier labil (Fe), care apare ca parte a clusterului [Fe-S] al diferitor metaloenzime [80]. GSH este cofactorul glutathionperoxidazei, glutathiontransferazei și dehidroascorbatreductazei și participă la anihilarea a trei SRO: a radicalului hidroxil, a oxigenului singlet și a peroxizilor (de hidrogen și lipidici). Trecerea lui din formă redusă în formă oxidată și vice-versa asigură regenerarea tocoferolului, NADPH, iar împreună cu  $\alpha$ -tocoferolul inhibă peroxidarea lipidelor din componența membranelor pe care este localizat [151, 226]. În condiții de stres provocat de multipli factori, în celulele microalgelor și cianobacteriilor se observă modificarea conținutului de glutathion și dezechilibrul sistemului GSH/GSSG [169, 259, 337, 453].

La categoria de antioxidanți cu masa moleculară mică se referă și unele vitamine din componența celulelor microalgelor și cianobacteriilor, principalele fiind acidul ascorbic (vitamina C) și tocoferolul (vitamina E). De obicei, cantitatea lor în biomasa culturilor ficologice

este mai mică comparativ cu plantele superioare [70, 223]. Ambele vitamine au capacitatea de a neutraliza multipli radicali liberi și molecule reactive, inclusiv radicali ai lipidelor și proteinelor. Pe lângă acțiunea antiradicalică directă, aceste două vitamine participă la regenerarea altor antioxidanți importanți, așa ca glutathionul și asigură regenerarea lor reciprocă [151]. Cu toate acestea, radicalii acestor două vitamine, care se pot forma inclusiv în prezența metalelor, posedă potențial prooxidant pronunțat, ceea ce cere o atenție deosebită față de asemenea situații [78]. Printre microalgele și cianobacteriile valoroase și intens studiate, acidul ascorbic și tocoferolul au fost identificate la *Arthrospira platensis*, *Anabaena variabilis*, *Nostoc linckia*, *Porphyridium cruentum*, *Tetraselmis suecica*, *Phaeodactylum tricornutum*, ș.a. [33, 189, 223].

Un alt antioxidant cu masă moleculară mică asociat cu metabolismul radicalilor liberi și care face parte din sistemul succinat-dehidrogenazic este *Coenzima Q* (CoQ), cunoscută și ca *ubichinonă*. În cantități moderate înlătură radicalii liberi, iar în cantități mari, în special în mitocondrii, are rol de prooxidant. Forma redusă a ubichinonei este mai eficientă în reacțiile de neutralizare a radicalilor liberi [240]. De asemenea, CoQ participă la regenerarea vitaminei E, sau chiar îi preia funcțiile în caz de deficit de tocoferol. Cercetările referitoare la ubichinona din celulele microalgelor și cianobacteriilor sunt în principal concentrate pe înțelegerea mecanismelor de protecție antioxidantă. În unele studii, se investighează modurile prin care conținutul acestui compus în celule poate fi crescut sau modificat prin procedee precum ajustarea intensității iluminării [240].

Protecția antioxidantă la microalge și cianobacterii implică multiple substanțe, care se deosebesc prin structură, localizare și mod de acțiune. Funcționarea coordonată a acestor mecanisme de protecție antioxidantă în cazul speciilor cu importanță biotehnologică nu doar asigură supraviețuirea culturilor în condiții de stres, ci contribuie și la menținerea calității și siguranței biomasei obținute, precum și a produselor derivate destinate consumului uman și animal.

#### **1.4. Stresul de mediu și stresul indus la cianobacterii și microalge**

Evoluția cianobacteriilor și microalgelor a avut loc în condițiile unor modificări permanente ale mediului ambiant. Fluctuațiile de temperatură, intensitate a luminii, salinitate, componență a mediului sunt surse de stres pentru diferite specii de cianobacterii. Pe durata timpului aceste organisme și-au dezvoltat mecanisme eficiente, care asigură supraviețuirea lor în condițiile variației principalilor parametri fizici.

Influența iluminării asupra componentelor biochimice ale microalgelor este controlată de procesul de fotoadaptare, când celulele algale suferă schimbări biochimice, fiziologice, biofizice

și structurale pentru a intensifica procesul de fotosinteză și creștere [40, 318, 430]. O tendință comună a răspunsului celular la diminuarea intensității luminii este de a mări cantitatea pigmentilor fotosintetici: clorofila, ficobiliproteinele, carotenoizii primari. Intensificarea iluminării induce diminuarea cantitativă a pigmentilor implicați în procesul de fotosinteză și sporirea cantității carotenoizilor secundari cu rol fotoprotector. Intensitatea înaltă a luminii duce la mărirea cantității de polizaharide la cianobacterii și microalge. La cultivarea în bazine deschise a spirulinei, de exemplu, sinteza carbohidraților este mult mai înaltă în zile însorite comparativ cu cele noroase. Numeroase studii atestă o dependență invers proporțională a conținutului de lipide, în special a acizilor grași polinesaturați, de intensitatea luminii [184, 412].

Influența temperaturii asupra reacțiilor biochimice determină rolul ei important în dirijarea compoziției biochimice a cianobacteriilor și microalgelor. Este bine studiată acțiunea temperaturii asupra conținutului cantitativ și calitativ al lipidelor membranare. Temperaturile mai joase decât cele optime sporesc gradul de nesaturare a lipidelor din sistemele membranare, ceea ce duce la o stabilitate și fluiditate mai mare a lor și, prin urmare, asigură protecția aparatului fotosintetic contra fotoinhibării la temperaturi joase. De asemenea, s-a constatat că temperaturile mai joase decât cele optime pot duce la un nivel sporit de sinteză a enzimelor în calitate de mecanism adaptiv de menținere a fotosintezei și respirației [298]. Variațiile termice influențează esențial cantitatea totală de carotenoizi [446].

Fiind prezente în biotopurile cu variații semnificative ale salinității, cianobacteriile și microalgele pot servi drept model pentru studiul răspunsului organismelor fotosintetizante la stresul osmotic, în special acest lucru se referă la cianobacteria *Arthrospira platensis*. Diferite aspecte ale adaptării cianobacteriilor și microalgelor la salinitate înaltă au fost studiate de diferite grupuri de cercetători [322, 327]. Strategia lor de bază de aclimatizare la condiții de salinitate înaltă include două reacții principale, exportul activ de ioni și acumularea de soluții de compatibilitate [327].

Gama largă de răspunsuri ale celulelor cianobacteriene și microalgale la influența factorilor mediului (iluminare, temperatură, salinitate) este pe larg folosită în biotehnologie pentru obținerea componentei celulare prognozate. Condițiile industriale de producere a biomasei cianobacteriene și microalgale prezintă din start pericol de acumulare a radicalilor liberi. Însoși procesul de fotosinteză este însoțit de formarea inevitabilă a speciilor reactive ale oxigenului, în special în condițiile când fluxul de electroni generat de acțiunea luminii depășește consumul de electroni pe durata fixării CO<sub>2</sub> [255]. De asemenea, speciile reactive ale oxigenului se formează în exces și în condițiile deplasării parametrilor fizici de la optimul caracteristic

tulpinii utilizate. Ca rezultat al instalării stresului oxidativ au loc diferite modificări ale componenței biochimice a biomasei cianobacteriene, uneori în condițiile unei productivități mai înalte comparativ cu condițiile optime.

Cu toate că potențialul biotehnologic al cianobacteriilor este înalt apreciat la nivel global, exploatarea lor de către om este insuficientă. Cea mai mare parte din biomasa cianobacteriană utilizată în scopuri biotehnologice este produsă industrial, fie prin cultivare extensivă cu asigurarea unei iluminări adecvate și a unui schimb suficient de gaze (cultivare autotrofă), fie prin cultivare alternativă cu utilizarea substraturilor organice în calitate de sursă de carbon și energie (cultivare mixotrofă sau heterotrofă). Chiar dacă de la apariția sa în anii 1940, ficologia aplicată a marcat realizări importante în cultivarea și valorificarea microalgelor ca obiecte biotehnologice, nivelul producției globale a biomasei cianobacteriene este încă jos (9.000 - 10.000 t substanță uscată pe an), iar prețul biomasei este înalt, variind de la 10 la 300 EUR kg<sup>-1</sup> [158].

Varietatea și valoarea produselor obținute din biomasa cianobacteriilor, precum și utilizarea largă a lor în procesul de prelucrare a apelor reziduale, fertilizare a solului, obținerea de biocombustibili etc. dictează necesitatea perfecționării continue a tehnologiilor de cultivare [33, 118, 199, 256, 409]. Una din cerințele față de aceste tehnologii este asigurarea unei calități înalte a produsului finit. De asemenea, este foarte important de a avea la îndemână metode simple și markeri adecvați, care să permită aprecierea obiectivă și rapidă a gradului de siguranță a produsului ficologic.

*Arthrospira platensis* (spirulina), una dintre cele mai utilizate cianobacterii, sursă extrem de valoroasă de proteină și antioxidanți, este crescută în condiții industriale într-un număr mare de țări și în condiții foarte diferite. *Nostoc linckia* – o altă cianobacterie produsă industrial, care posedă capacitatea de fixare a azotului atmosferic - este utilizată în primul rând în calitate de fertilizant. Mai nou, această cianobacterie este o sursă importantă de antioxidanți. Producerea biomasei de spirulină și nostoc este în continuă creștere. În goana după o productivitate înaltă este foarte important de a păstra standardul de calitate neafectat.

Temperatura este unul din principalii parametri ai mediului, care influențează metabolismul, creșterea și reproducerea, răspândirea și supraviețuirea organismelor vii, inclusiv a cianobacteriilor. În contextul schimbărilor climatice, în special a încălzirii globale, cianobacteriile au anumite priorități, deoarece temperatura optimă pentru multe din ele este mai înaltă, comparativ cu alte specii de microalge și cianobacterii. În scenariul de viitor, în care temperatura mediului ambiant va înregistra creștere constantă, diferiți taxoni de cianobacterii vor domina în anumite regiuni, dar, în linii generale, cianobacteriile vor crește numeric pe întregul

Pământ [77]. Acest fapt are un impact pozitiv, multe dintre speciile de cianobacterii fiind utile omului. Astfel, specii de *Spirulina*, *Arthrospira*, *Nostoc* sunt folosite atât ca adaosuri alimentare, cât și în calitate de materie primă pentru obținerea preparatelor medicamentoase și cosmetice, fertilizanților, enzimelor, vitaminelor ș.a. [242, 252, 384]. În același timp, creșterea numerică a cianobacteriilor producătoare de toxine are un impact negativ asupra biocenozelor, dar și asupra omului prin contaminarea cu toxine a produselor de acvacultură [220].

În habitatele naturale în care se întâlnesc cianobacteriile, variațiile diurne și intersezoniere de temperatură sunt cele mai răspândite cauze ale stresului. Răspunsul fiziologic al celulelor cianobacteriene la acest tip de stres constă în modificări fiziologice și biochimice evidente. Cele mai importante dintre ele sunt modificarea conținutului de exopolizaharide, proteine și pigmenți și modificarea activității enzimelor antioxidante. Atât temperaturile suboptimale, cât și cele supraoptimale, au efecte vizibile asupra cianobacteriilor. Componenta biochimică a biomasei în condiții de temperaturi ce se deosebesc de cele optimale pentru fiecare specie se schimbă. Cantitatea de lipide în biomasa cianobacteriană este influențată de temperatura mediului ambiant [398, 411]. În cele mai multe cazuri, temperaturile joase provoacă o acumulare mai intensă a lipidelor, cu deplasarea raportului în favoarea acizilor polienici. Scăderea temperaturii mediului ambiant duce, de asemenea, la secreția sporită de exopolizaharide și la activarea superoxid-dismutazei. Creșterea semnificativă a cantității de dialdehidă malonică în celule, precum și scăderea intensității procesului de fotosinteză sunt o dovadă elocventă a stării de stres la cianobacterii în condiții de variații ale temperaturii mediului ambiant [453].

Variațiile temperaturii mediului ambiant provoacă nu numai modificări în componenta biochimică a celulelor cianobacteriene, ci și schimbarea strategiilor de răspândire a acestora, în special la speciile invazive. Astfel, la *Aphanizomenon ovalisporum* diferențierea achinetelor decurge cel mai intens la 20°C, iar odată cu creșterea temperaturii intensitatea procesului scade esențial. La această specie temperatura determină și caracterele morfometrice ale celulelor, fiind înregistrată o dependență invers proporțională între temperatură și dimensiunile celulare [133]. La alte specii de cianobacterii – de exemplu la *Cylindrospermopsis raciborskii* – din contra, la temperatura de 21°C achinetele nu se formează, iar trihoamele sunt caracterizate printr-o plasticitate morfologică foarte înaltă [63]. Temperaturile înalte sporesc activitatea fotosintetică la *Anabaena sp.* și *Nostoc sp.* dar nu și la *Microcystis sp.* și *A. platensis*. Temperatura mai mare decât cea optimală este asociată, de asemenea, cu o creștere a lungimii trihoamelor la *Anabaena sp.* și la *A. platensis* [177].

Faptul că cianobacteriile cresc în mod natural la temperaturi mai înalte decât alte specii de microalge poate fi utilizat pentru a evita infestarea lor în condițiile bioreactoarelor deschise ori a lacurilor. Astfel, la temperaturi înalte practic se evită contaminarea culturii de *Microcoleus vaginatus* crescută în aer deschis cu specii de diatomee, care abundă la temperaturi mai joase [254].

Cianobacteriile – organisme procariote fototrofe –sunt considerate a fi la baza evoluției cloroplastelor plantelor superioare. Reacțiile fotochimice primare și transportul fotosintetic de electroni la cianobacterii și în cloroplastele planetelor sunt foarte asemănătoare. Astfel, cianobacteriile sunt capabile să redirectioneze căile de transfer a energiei de excitație de la pigmentii colectori spre ambele sisteme fotosintetice. Cianobacteriile pot atinge 2 stări energetice diferite, care sunt definite ca "Starea 1" (care se atinge după excitația preferențială a fotosistemei I) și "Starea 2" (excitația preferențială a sistemului fotosintetic II). Cianobacteriile posedă un mecanism rapid de adaptare fiziologică la condițiile mediului, care reglează modul în care energia luminoasă absorbită este distribuită între sistemele fotosintetice I și II, care se numește "Stare de tranziție". În acest proces un rol foarte important revine labilității ficobiliproteinelor, care sunt într-un echilibru dinamic cu ambele fotosisteme [305, 444]. Anume prin aceasta se explică schimbările rapide care intervin în conținutul de ficobiliproteine în cazul modificării intensității luminii.

Lumina este sursa de energie pentru organismele fotosintetizatoare. De aceea, atât intensitatea luminii, cât și calitatea ei determină intensitatea tuturor proceselor vitale. Cantitatea de biomasă, dar și calitatea ei sunt influențate de acești parametri. Lumina de culoare verde și de intensitate de la 1200 lx asigură o acumulare accelerată de biomasă la spirulină, comparativ cu lumina roșie, albă și, în special, albastră de aceeași intensitate [356].

Lumina de intensitate foarte înaltă provoacă efecte de inhibare a proceselor biologice la cianobacterii, inclusiv la spirulină. Efectul dat poate fi diminuat prin mărirea esențială a cantității de carbon anorganic accesibil. În acest caz, inhibiția survine mult mai târziu, iar revenirea culturii de spirulină la starea normală are loc mai repede și cu urmări minime [418]. Scăderea intensității luminii de la 5 la 2 klx la spirulina este asociată cu o creștere considerabilă a cantității de clorofilă (cu aproximativ 30%) [139].

Efectele luminii asupra organismelor vii sunt determinate nu numai de parametrii fizici ai acesteia, ci și de durata de expunere, adică de prezența fenomenului de fotoperiodism. Variațiile circadiene cu perioada de aproximativ 24 ore sunt caracteristice practic pentru toate procesele fiziologice ale majorității organismelor cunoscute, inclusiv cele mai vechi, cum sunt cianobacteriile. Pentru ca aceste ritmuri biologice să funcționeze ca un "ceas" este necesar să fie

respectate 3 condiții de bază: ca aceste ritmuri să persiste în lipsa stimulilor externi; ca acestea să poată fi resetate prin acțiunea luminii sau întinericului și ca pe durata unui ciclu circadian să se producă compensarea de temperatură. Astfel, ceasul circadian care realizează controlul acestor ritmuri este o funcție fundamentală a celulelor vii, care asigură adaptarea la alternanța dintre zi și noapte [241]. Organismele fotosintetizatoare sunt considerate organisme cu un mecanism perfect de funcționare a ceasului biologic. Cu toate acestea, la moment nu putem spune cu siguranță dacă condițiile de fotoperiodism sunt mai favorabile pentru culturile de cianobacterii și microalge decât iluminarea continuă. Rezultatele sunt dependente de cultura studiată, precum și de condițiile experimentale. Astfel, de exemplu speciile de alge verzi *Botryococcus brauni* și *Scenedesmus obliquus* produc mai multă biomasă în condiții de iluminare continuă, în timp ce speciile *Neochloris conjuncta*, *Neochloris terrestris*, *Neochloris texensis* produc de 2-3 ori mai multă biomasă în condiții de fotoperiodism (12L:12D) [245]. O tulpină de *Spirulina platensis* izolată în Jaipur produce cea mai mare cantitate de biomasă, de asemenea, în condiții de fotoperiodism cu durata perioadei luminoase de 16 ore. Acest regim de lumină asigură și cel mai înalt conținut de clorofilă în biomasă [334]. Conform unor investigații, perioada de întineric este necesară în cultivarea spirulinei pentru a acumula o cantitate mai mare de proteine. Astfel, a fost stabilit că după perioada de întineric cantitatea de proteină este cu 8-10% mai mare, comparativ cu spirulina care a fost supusă luminii timp de mai multe ore [193].

În natură cianobacteriile populează multiple habitate, care se deosebesc esențial după nivelul de salinitate – de la apele freatică la solurile saline. Ca rezultat, diferite specii și variante au căpătat în calitate de adaptare o caracteristică fiziologică foarte valoroasă – toleranța la sare [268, 457]. În dependență de toleranța pe care o manifestă cianobacteriile față de acest factor, acestea pot fi grupate în trei categorii: (1) cianobacterii cu toleranță redusă la salinitate (acestea populează de obicei apele dulci); (2) cianobacterii cu toleranță moderată la sare; și (3) cianobacterii halotolerante, care pot popula apele marine, lacurile sărate, solurile saline și alte habitate cu condiții extreme. Strategia de aclimatizare la salinitate înaltă a cianobacteriilor include două reacții principale: exportul activ de ioni și acumularea de soluții de compatibilitate. Cele trei grupuri se deosebesc în principal după natura chimică a principalelor soluții de compatibilitate [327]. Situația de stres salin la cianobacterii este caracterizată ca extrem de complexă, fiind determinată atât de stresul ionic, cât și de cel osmotic. Adițional se instalează o situație de stres oxidativ. În aceste condiții este destul de greu de delimitat efectele stresului specific de cele ale unei stări de stres general. Din aceste motive, până în prezent încă nu sunt clarificate mecanismele concrete ale toleranței la săruri [327].

Stresul salin determină scăderea creșterii și productivității cianobacteriilor prin perturbarea proceselor fiziologice. Acumularea de ioni de sodiu intracelular în cazul stresului salin afectează procesele bioenergetice ale fotosintezei.

Pigmenții fotosintetici ai cianobacteriilor, și în special, clorofila și carotenoizii sunt afectați de stresul salin. La spirulină cantitatea de clorofilă în condiții de salinitate excesivă scade, iar carotenoizii, din contra, se acumulează în cantități mai mari, deoarece pe lângă funcția fotosintetică, aceștia au o importanță mare în calitate de antioxidanți, fiind considerați factori de protecție în diferite tipuri de stres, inclusiv în stresul salin [59, 289]. Și pentru speciile de *Nostoc* în condiții de stres salin a fost observată o scădere a cantității de clorofilă și o creștere cantitativă a carotenoizilor [420].

Salinitatea înaltă (0.8M NaCl) la spirulină inhibă transportul de electroni în cadrul fotosistemei II din contul degradării ficobilizomilor. Ca rezultat, energia de excitare este orientată spre fotosistemele I. În aceste condiții în biomasa de spirulină scade esențial cantitatea de ficobiliproteine, în special de ficocianină [273]. Și în cazul *Nostoc* a fost observată scăderea esențială a cantității de ficobiliproteine la concentrații înalte ale clorurii de sodiu, comparativ cu condițiile de salinitate normală [420].

Cu toate acestea, nu toate cianobacteriile reacționează la fel la stresul salin. Astfel, tulpinile cu toleranță înaltă față de stresul salin, de regulă, se caracterizează printr-un conținut mai înalt de carotenoizi, ficocianine, polizaharide, prolină, atunci când cresc pe medii cu salinitatea de 0.4-0.6 M NaCl, comparativ cu mediul standard cu salinitate mai joasă de 0.05M. De asemenea, în condiții de stres salin la speciile tolerante are loc creșterea activității SOD și POD [268]. Cantitatea și calitatea lipidelor și proteinelor, de asemenea, este puternic influențată de stresul salin la cianobacterii. Astfel, la spirulină, în condiții de stres salin are loc o creștere ușoară a cantității de lipide. În același timp, crește și cantitatea acizilor grași polinesaturați, în special a acidului  $\gamma$ -linolenic [154]. Cantitatea de proteine în biomasa de spirulină supusă stresului salin scade simțitor [452]. Pentru proteomul spirulinei în condiții de stres salin sunt caracteristice și schimbările calitative. Astfel, la salinitate de 0.5 și 1.0 M NaCl are loc modificarea nivelului de expresie a peste 140 proteine, implicate în fotosinteză și în metabolismul glucozei, aminoacizilor, acizilor grași, glutatationului. Se consideră că aceste proteine împreună cu complexul ARN-proteine, proteinele șocului termic și proteinele transportoare ABC asigură rezistența *Arthrospira (Spirulina) plantensis* la stresul salin [455].

După cum am menționat, unul din mecanismele care asigură adaptarea cianobacteriilor la condiții de salinitate înaltă este acumularea soluțiilor de compatibilitate. Carbohidrații sunt printre cele mai cunoscute substanțe cu efect de protecție în caz de stres salin. A fost demonstrat



că sinteza de carbohidrați în condiții de stres salin în mediu alcalin acționează în calitate de mecanism principal care asigură toleranța cianobacteriilor la salinitate înaltă [413]. Condițiile de stres salin de intensitate joasă ori moderată mobilizează componentele antioxidante enzimatică și nonenzimatică în scopul de a proteja celulele de deteriorările oxidative. Salinitatea de intensitate joasă (2.5 și 5.0 g/L NaCl) provoacă creșterea activității antioxidante a biomasei de spirulină. Aceasta este o reacție de protecție celulară care activează sinteza enzimelor antioxidante și a componentelor antioxidante cu greutate moleculară mică. O scădere semnificativă a activității antioxidante la spirulină se observă la concentrații mari de NaCl (>0.3M) în mediul nutritiv [59]. În cazul altor specii de cianobacterii - *Nostoc muscorum* – activitatea enzimelor antioxidante crește semnificativ în condiții de stres salin, iar cel mai mult se activează enzimele superoxidismutaza și peroxidaza [420].

Metalele grele, în dependență de gradul lor de oxidare, pot fi foarte reactive, iar în consecință, foarte toxice pentru organismele vii. Efectul toxic este asociat cu producerea de specii reactive de oxigen (SRO) și cu statutul redox celular dezechilibrat. Cianobacteriile răspund la acțiunea metalelor grele prin inducerea sintezei accelerate a mai multor antioxidanți, incluzând diverse enzime cum ar fi superoxidismutaza și peroxidazele. De asemenea, în condiții de stres oxidativ are loc intensificarea sintezei compușilor antioxidanți cu masă moleculară mică, cum ar fi carotenoizii, glutathionul, tocoferolul ș.a. [255].

La concentrații moderate de poluanți metalici, sistemele celulare sus-numite reușesc să readucă raportul SRO/antioxidanți la starea de echilibru, asigurând supraviețuirea celulelor. În condițiile cantităților ridicate sau acute ale metalelor grele, se produce deteriorarea celulelor, deoarece nivelurile SRO depășesc capacitatea antioxidantă a sistemelor de protecție [337]. Printre metalele de tranziție un impact mai pronunțat asupra sistemului redox celular îl are cuprul. Acest metal, de rând cu fierul, este implicat în ciclul Haber-Weiss, în care din oxigenul molecular și peroxidul de hidrogen se produce radicalul hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) – cel mai periculos dintre radicalii liberi pentru organismele vii. În special, pericol prezintă forma ionică a cuprului. Este cunoscut efectul nociv al ionilor de cupru asupra microalgelor și cianobacteriilor. De exemplu, sulfatul de cupru este utilizat cu succes în calitate de algicid în combaterea fenomenului de înflorire a apelor.  $\text{CuSO}_4$  blochează lanțul respirator de transport al electronilor, accentuează semnificativ acumularea de specii reactive de oxigen și dereglează funcționalitatea sistemului antioxidant. Creșterea cantității de SRO dereglează sinteza pigmentilor și distruge integritatea membranei celulare, ceea ce duce la moartea celulelor algelor și cianobacteriilor [348]. Chiar și în cantități foarte mici, de până la 0.2 mg/L, sulfatul de cupru duce la scăderea productivității la spirulină, la creșterea cantității produselor de degradare oxidativă a lipidelor și la activarea

sistemelor de protecție antioxidantă, exprimată în creșterea activității superoxid-dismutazei și a cantității de prolină [131]. Modificări de același fel se produc în biomasa de nostoc în prezența acestui metal. Cuprul reduce semnificativ cantitatea de biomasă, conținutul de clorofilă, carotenoizi, proteine totale și activitatea enzimelor antioxidante la nostoc. Pe de altă parte, cantitatea de carbohidrați acumulați în biomasa de nostoc crește puternic în cazul prezenței cuprului în mediul de cultură [185, 469].

Anume activarea sistemelor antioxidante ale celulelor cianobacteriilor asigură capacitatea uimitoare a acestor organisme străvechi de a opune rezistență și a repara eficient daunele cauzate de stresul oxidativ. Astfel, în caz de stres oxidativ moderat, spirulina revine la parametrii fotosintetici normali timp de 4-7 zile, iar metabolismul lipidic și viteza peroxidării lipidelor revine la valori obișnuite peste 7 zile de la inițierea stresului [201]. Acest lucru sugerează că mecanismele de adaptare a cianobacteriilor sunt în strânsă corelare și chiar inițiate de stresul oxidativ și deteriorările oxidative în celule. Cunoașterea detaliată a modificărilor care se produc în biomasa cianobacteriilor în condiții de stres oxidativ ar prezenta un instrument adecvat pentru elaborarea strategiei de înlăturare a toxicității acestora pentru mediul înconjurător, iar în cazul speciilor biotehnologice – pentru obținerea biomasei calitative cu un nivel adecvat de antioxidanți pentru uzul uman.

### **1.5. Concluzii la capitolul 1**

Problema stresului oxidativ și a răspunsului la acest fenomen este una din problemele de ordin general nu numai pentru științele biologice, ci și pentru cele agricole și medicale, stresul fiind generat și dezvoltându-se după aceleași principii comune pentru toate formele de viață și stări fiziologice sau patologice ale acestora. La toate nivelurile sistematice, formarea radicalilor liberi are loc în aceleași site-uri celulare și prin aceleași mecanisme. La fel, toate formele celulare de viață posedă sisteme eficiente de protecție contra speciilor reactive ale oxigenului, care funcționează în baza unor principii generale. În acest sens, studiul fenomenului în sine și a particularităților stresului oxidativ la cianobacterii și microalge contribuie la acumularea de date, orientate spre înțelegerea profundă a stresului oxidativ și a posibilității dirijării lui.

Formarea radicalilor liberi și a moleculelor reactive ale oxigenului constituie un fenomen normal pentru toate celulele vii. Mai mult ca atât, radicalii primari îndeplinesc funcții vitale esențiale, asigurând creșterea, diferențierea, adaptarea la condițiile de mediu și protecția integrității structurale și funcționale a tuturor organismelor vii. Capacitatea celulelor de a menține un echilibru dinamic între formarea și neutralizarea speciilor reactive este o

caracteristică fundamentală a viului. În același timp, reacțiile de răspuns la stresul oxidativ pot fi aplicate în scopuri practice pentru a obține anumite beneficii de pe urma dirijării lor inteligente.

Studiul critic al publicațiilor științifice la tema tezei a permis de a evidenția următoarele:

1. Principalele surse de formare a speciilor reactive ale oxigenului la cianobacterii și microalge sunt două procese vitale de bază – respirația și fotosinteza, la fel și influența factorilor fizici, chimici și biologici, care acționează asupra culturilor ficologice.
2. Accelerarea proceselor vitale prin aplicarea diferitor procedee de stimulare duc inevitabil la creșterea nivelului de radicali primari, care pot induce formarea de radicali secundari în condițiile ineficienței mecanismelor de protecție în celulele microalgelor și cianobacteriilor.
3. Atât procedeele de stimulare a proceselor biosintetice la microalge și cianobacterii, cât și condițiile de stres oxidativ generează modificări semnificative ale calității biomasei ficologice.
4. În anumite condiții, stresul oxidativ se asociază cu modificări pozitive din punct de vedere tehnologic și poate fi abordat în calitate de instrument de reglare a anumitor procese biosintetice la obiectele ficologice.

Reieșind din cele expuse, problema de cercetare care se pune în fața acestui studiu constă în identificarea unor condiții echilibrate în cadrul cărora stresul oxidativ indus poate fi utilizat în calitate de instrument biotehnologic.

**Scopul lucrării:** elucidarea elementelor comune și a particularităților răspunsului microalgelor și cianobacteriilor la diferite tipuri de stres oxidativ indus, fundamentarea posibilității aplicării stresului în calitate de instrument biotehnologic în ficobiotehnologie și elaborarea tehnologiilor ficologice bazate pe răspunsul la stres indus.

**Obiectivele lucrării:** Evidențierea particularităților de manifestare a stresului oxidativ indus de factorii fizici și chimici la cianobacterii și microalge de interes biotehnologic; Elucidarea posibilității de aplicare a răspunsului la stresul oxidativ indus în scopul obținerii biomasei ficologice cu componență prognozată; Estimarea implicării stresului oxidativ în procesele de bioremediere de către microalge și cianobacterii a apelor contaminate cu metale, în sisteme iterative; Conturarea principiilor de realizare a nanobiosintezei și biofuncționalizării nanoparticulelor cu ajutorul microalgelor și cianobacteriilor, în baza mecanismelor de protecție contra stresului oxidativ; Fundamentarea posibilității și a limitelor de aplicare a răspunsului la stresul oxidativ în calitate de instrument în ficobiotehnologie; Elaborarea procedeelelor ficologice, bazate pe aplicarea răspunsului la stresul oxidativ indus.

## 2. DESIGNUL EXPERIMENTAL, OBIECTELE DE STUDIU ȘI METODELE DE CERCETARE

Cercetările, rezultatele cărora sunt expuse în această lucrare au fost realizate în cadrul laboratorului Ficobiotehnologie al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Universității Tehnice a Moldovei pe durata anilor 2012-2022. În calitate de obiecte de studiu au servit 3 tulpini de cianobacterii (*Arthrospira platensis* CNMN-CB-02; *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11; *Nostoc linckia* CNMN-CB-03) și 3 tulpini de microalge (*Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01; *Dunaliella salina* CNMN-AV-02; *Haematococcus pluvialis* CNMN-AV-05) aparținerea sistematică a cărora va fi prezentată mai jos. Toate aceste obiecte se caracterizează prin importanță biotehnologică, parametri productivi și de siguranță stabili, se află în centrul atenției cercetătorilor din domeniul studiilor fundamentale și a transferului tehnologic al elaborărilor inovative în producerea industrială. Pentru cercetare a fost aplicat un set de metode acceptate în domeniul ficobiotehnologiei și cel al cercetărilor fundamentale.

### 2.1. Designul studiului experimental

Designul general a inclus 6 etape principale, structurate conform schemei din figura 2.1.

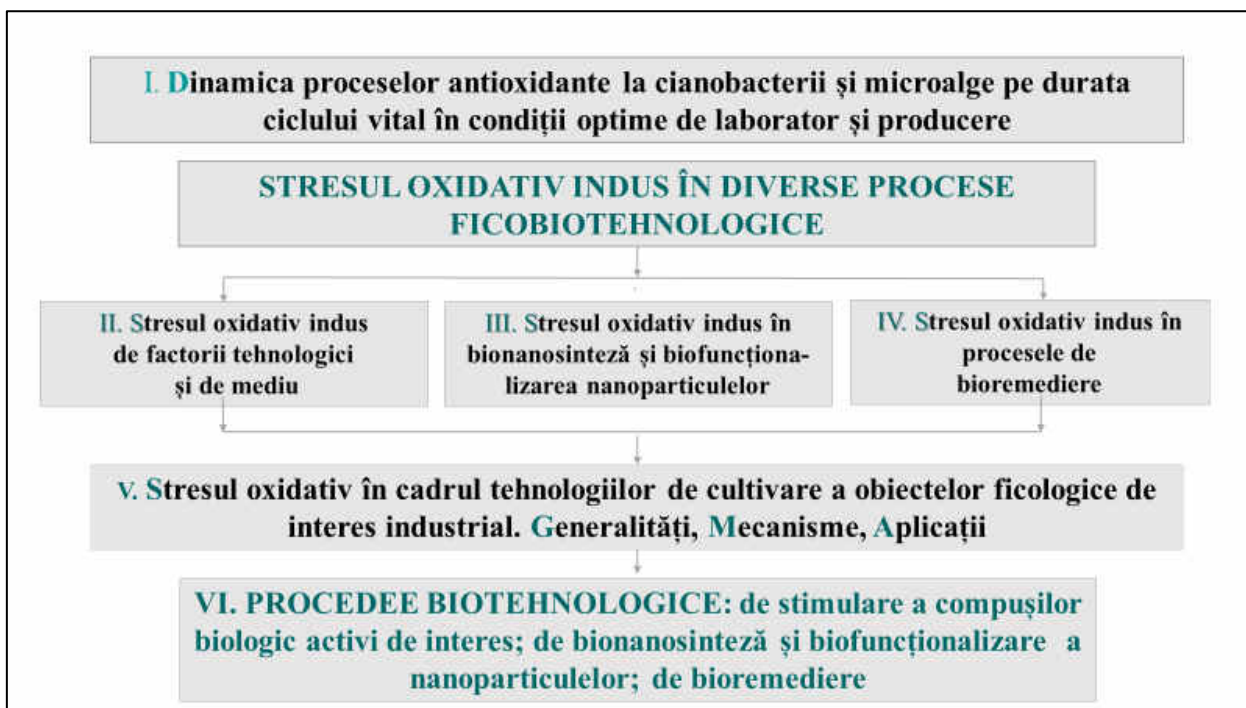
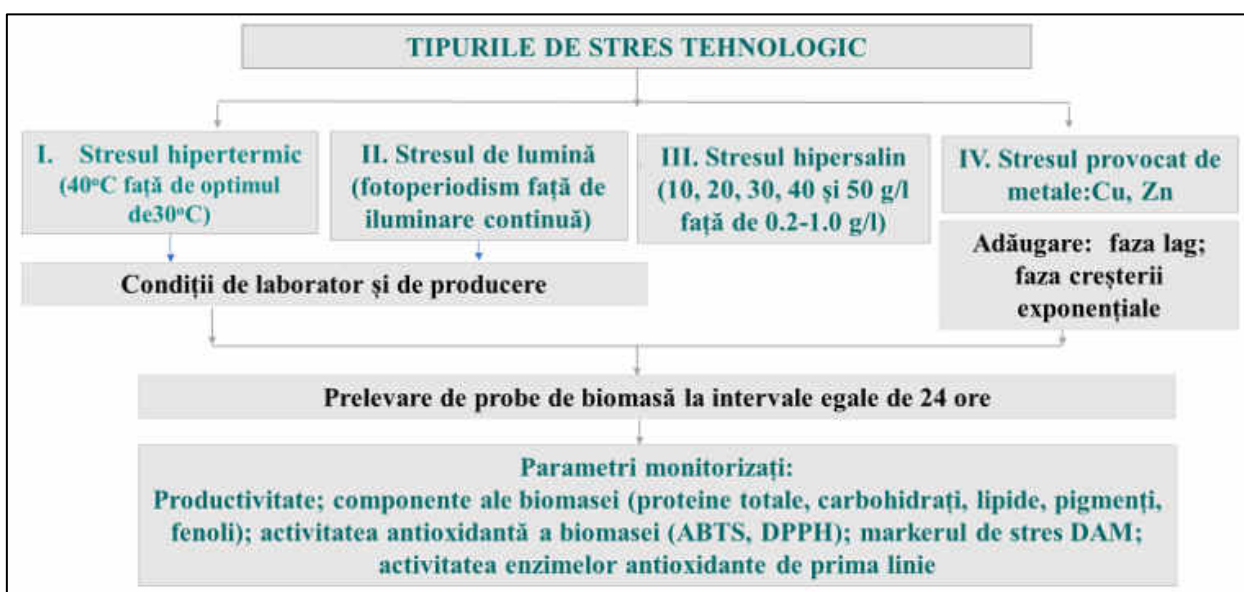


Fig.2.1. Designul general al studiului realizat

Prima etapă a constat în identificarea fluctuațiilor fiziologice ale parametrilor productivi, biochimici și de activitate antioxidantă la tulpinile de cianobacterii și microalge luate în studiu pe durata unui ciclu de creștere în sistem biotehnologic închis cu respectarea condițiilor optime

pentru fiecare dintre culturi. Probele de biomasă au fost prelevate la intervale de 24 ore, pe durata întregului ciclu. Etapele II, III și IV prezintă studii independente, care reflectă rezultatele cercetărilor pe trei domenii de aplicare a stresului în calitate de instrument biotehnologic: 1) stresul tehnologic în procesul de obținere a biomasei pentru consum direct sau pentru procesare ulterioară; 2) stresul în nanobiotehnologii; 3) stresul în procesele de bioremediere. Etapa a V-a a fost una integrativă, în cadrul căreia au fost identificate mecanismele generale de instalare și propagare a stresului oxidativ în culturile ficologice și evidențiate posibilitățile de aplicare practică a condițiilor de stres în calitate de instrument biotehnologic. Etapa a VI-a este consacrată tehnologiilor ficologice noi, elaborate în baza utilizării stresului în calitate de instrument biotehnologic.

Ținând cont de complexitatea cercetărilor realizate în cadrul etapelor II, III și IV, designul investigațiilor este prezentat separat în detalii pentru fiecare etapă. Figura 2.2. reflectă schema de realizare a etapei II – studiul stresului indus de factorii tehnologici la cianobacterii și microalge.



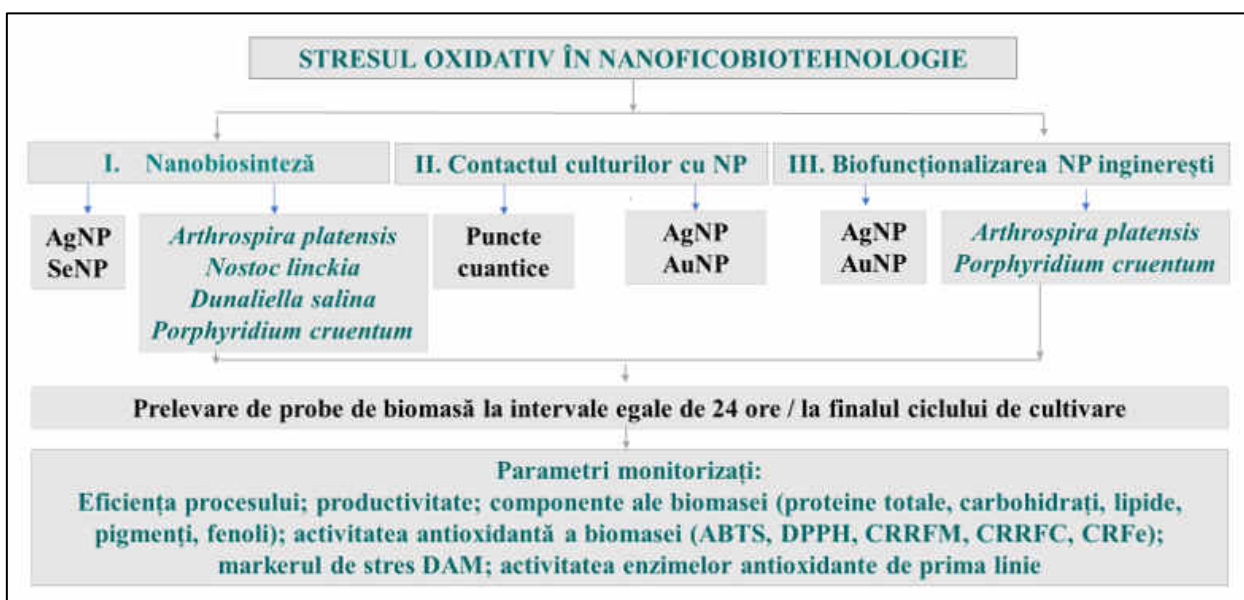
**Fig.2.2. Schema cercetărilor orientate spre studiul stresului indus de factorii tehnologici la cianobacterii și microalge**

La această etapă au fost studiate 4 tipuri de stres tehnologic: stresul hipertermic, stresul de lumină, stresul hipersalin și stresul provocat de prezența metalelor cu diferit rol. Stresul hipertermic și cel de lumină a fost studiat atât în condiții de laborator, cât și de producere industrială, iar stresul hipersalin și provocat de metale – în condiții de laborator. Stresul salin a fost indus în 5 variante de concentrații ale clorurii de sodiu, iar stresul provocat de metale a fost cercetat în baza a două aspecte: provocat de un metal cu rol de stimulator (Zn) și altul toxic (Cu). Pentru stresul provocat de cupru au fost modelate două variante de inducere a stresului la diferite

etape de dezvoltare a culturii (faza *lag* și faza creșterii exponențiale). La această etapă s-a urmărit dinamica modificărilor, astfel probele au fost prelevate la intervale de 24 ore pe durata întregului ciclu de creștere. Afară de parametrii productivi și biochimici ai culturilor ficologice, au fost realizate investigații ultrastructurale și de expresie a genelor asociate cu stresul în condiții experimentale și în condiții standard.

Schema cercetărilor realizate la cea de-a III-a etapă sunt prezentate în figura 2.3. La această etapă cercetările au fost orientate spre biosinteza nanoparticulelor de argint și seleniu de către culturile vii de microalge și cianobacterii. De asemenea, au fost studiate diferite aspecte ale interacțiunii nanoparticulelor ingineresti cu microalgele și cianobacteriile. În aspect de toxicitate au fost studiate interacțiunile dintre obiectele ficologice și diferite tipuri de nanoparticule (puncte cuantice și nanoparticule de Au și Ag). Biofuncționalizarea nanoparticulelor ca răspuns la starea de stres indusă de nanoparticule prezintă cel de-al treilea aspect investigat la această etapă. Probele au fost prelevate la intervale de 24 ore în cazul studiilor de bionanosinteză și biofuncționalizare și la finalul ciclului în cazul studiilor de toxicitate.

Parametrii monitorizați au fost: productivitatea culturilor, componența biomasei (indicatorii biochimici), activitatea antioxidantă (testele antiradicalice și markerii stresului oxidativ); ultrastructura celulelor; expresia genelor asociate cu stresul. De asemenea, procesele de biosinteză și biofuncționalizare au fost monitorizate prin identificarea directă și indirectă a nanoparticulelor sintetizate/biofuncționalizate.

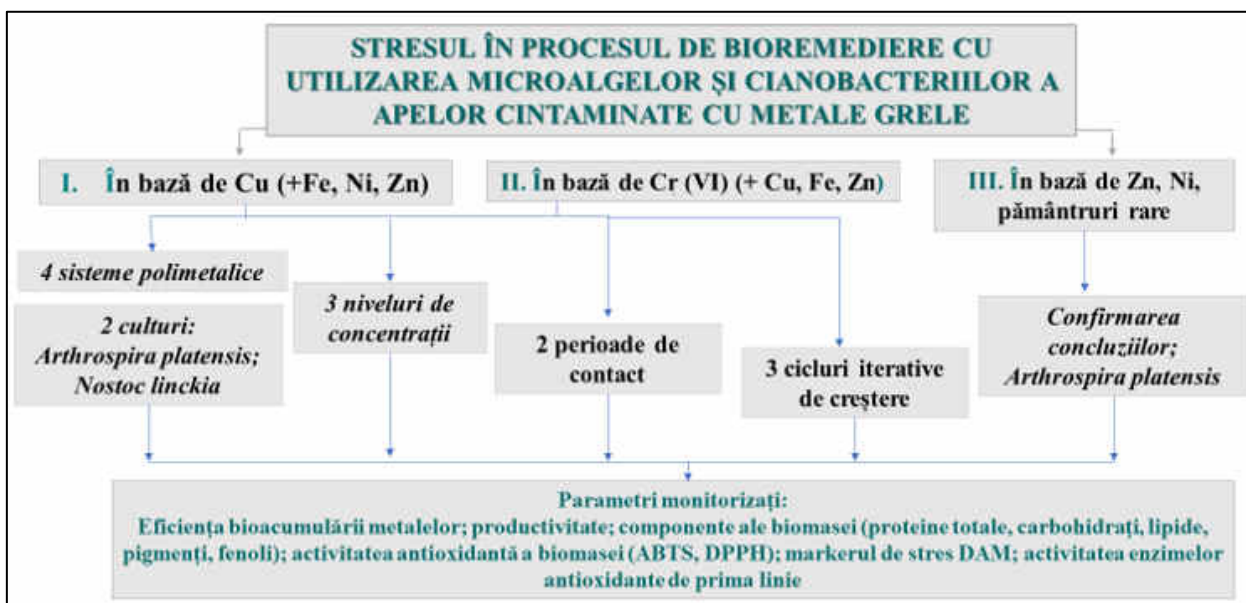


**Fig.2.3. Schema studiului implicării stresului indus în procesele de biosinteză și biofuncționalizare a nanoparticulelor de către microalge și cianobacterii**

Figura 2.4. reflectă schema experimentală aplicată pentru realizarea celei de-a IV-a etape. Cianobacteriile *Nostoc linckia* și *Arthrospira platensis* au fost aplicate pentru îndepărtarea



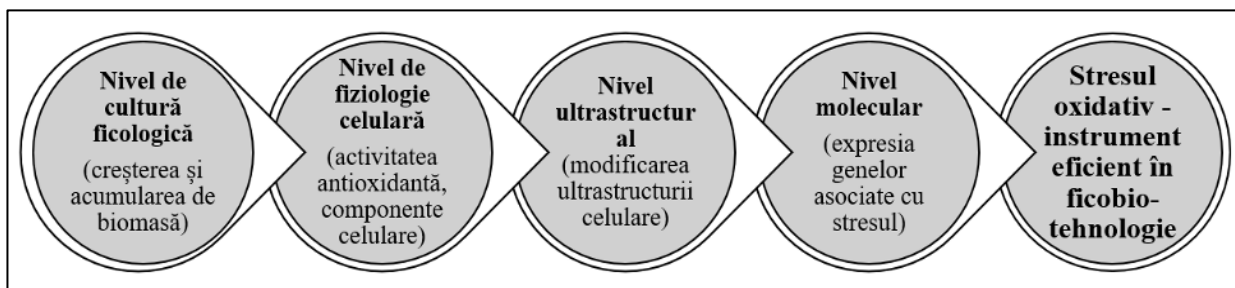
metalelor grele din efluenții contaminați. Au fost luate în cercetare două tipuri de efluenți sintetici cu componență polimetalică de bază – unul cu element dominant Cu(II) și altul - Cr(VI). Pentru fiecare tip de efluent au fost modelate 4 sisteme bi- și polimetalice, fiecare dintre ele aplicate în 3 concentrații diferite. Pentru toate variantele de efluenți, procesul de bioremediere s-a realizat pornind de la cultură în faza *lag* și în faza creșterii exponențiale. Pentru fiecare variantă experimentală bioremedierea a fost realizată pe durata a 3 cicluri iterative de creștere a cianobacteriilor.



**Fig.2.4. Schema studiului implicării stresului indus în procesele de bioremediere cu participarea microalgelor și cianobacteriilor**

Detaliile cu referire la modalitatea de implementare a schemelor experimentale prezentate mai sus sunt date în capitolele în care sunt descrise experiențele respective.

În această teză este expus un studiu multidimensional al fenomenului de stres oxidativ în culturile ficologice, axat pe nivelul supracelular de cultură ficologică, nivelul de fiziologie și biochimie celulară, nivelul ultrastructural și nivelul molecular (figura 2.5)



**Fig.2.5. Nivelurile de studiu a stresului oxidativ în calitate de instrument biotehologic**

Cunoștințele despre efectele stresului oxidativ, manifestate la toate nivelele menționate mai sus constituie baza de dovezi pentru concluzia cu referire la ipoteza de cercetare enunțată.

## 2.2. Tulpinile de microalge și cianobacterii

În calitate de obiecte de studiu în această lucrare au servit tulpinile de cianobacterii și microalge depozitate în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Universității Tehnice a Moldovei.

### 2.2.1. *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11

Cianobacteria *Arthrospira platensis* face parte din Genul *Arthrospira* (denumirea anterioară – *Spirulina*), care conform nomenclatorului sistematic bacteriologic, ține de categoria de microorganisme fotosintetizatoare aerobe, ce aparțin clasei *Cyanophyceae*. Aceste procariote sunt clasificate în grupul eubacteriilor. Numele de *Spirulina* acest organism l-a primit în anul 1844, când a fost numit *Spirulina jenneri f. platensis*. În taxonomia cianobacteriilor, specia *Arthrospira platensis* a fost inclusă de către E. Stizenberger în anul 1852. Poziția sistematică a spirulinei este următoarea: domeniul – *Bacteria*; filumul – *Cyanobacteria*; clasa – *Cyanophyceae*; ordinul – *Oscillatoriales*; familia – *Microcoleaceae*; genul – *Arthrospira*; specia – *Arthrospira platensis*; numele trivial al speciei este *spirulina*.

Biomasa de *Arthrospira platensis* conține 50-65% proteine, 9-12% glucide, 3,5-5,2% lipide, 12-15% ficobiliproteine. Tulpina *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 a fost identificată de către acad. V. Rudic. Tulpina prezintă forme filamentoase homocite de culoare verde închisă. Trihoamele sunt alcătuite din celule cilindrice (lungimea 8-10  $\mu\text{m}$ , lățimea 6-8  $\mu\text{m}$ ), absolut identice, cu excepția celulelor terminale, care se îngustează spre capătul trihomului și sunt ușor rotunjite. Trihoamele sunt separate, nu se ramifică și nu se răsucesc în spirală. Diametrul trihoamelor este de 6-8  $\mu\text{m}$ , iar lungimea de la 0,14 până la 1,30 mm. Ele nu formează teci mucozitare. În mediu lichid formează suspensie practic uniformă cu tendință neînsemnată de acumulare la hotarul lichid-aer. Tulpina se înmulțește vegetativ prin fragmentarea trihoamelor în hormogonii.

Tulpina are o productivitate de 1,5-1,6 g/l cu conținut de acid glutamic - 8,10-9,64%; acid  $\gamma$ -linolenic - 1,36-1,45%; polizaharide sulfatate - 4,03-5,01%, fosfatidilinozitol 0,70 -0,85% și fosfatidilcolină 1,86-2,00%. Cianobacteria este cultivată pe mediul nutritiv mineral cu următoarea componență chimică: macroelementele în g/l:  $\text{NaNO}_3$ -2,25;  $\text{NaHCO}_3$ -8,0;  $\text{NaCl}$ -1,01;  $\text{K}_2\text{SO}_4$ -0,3;  $\text{NaHPO}_4$ -0,20;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,20;  $\text{CaCl}_2$ -0,024; 1ml/l soluția de microelemente, ce conține în mg/l:  $\text{H}_3\text{BO}_3$ -2,86;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -1,81;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,22;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,08;  $\text{MoO}_3$ -0,015;  $\text{Fe-EDTA}$ -1,0 ml/l. Cultivarea spirulinei presupune condițiile: pH-ul 8-9, temperatura de 30-32°C și iluminare continuă cu intensitatea de  $\sim 37$ -55  $\mu\text{M}$  fotoni $\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , cantitatea de inoculum de 0,40-0,45 g/l în calcul pentru BAU. Cultura se agită periodic. Durata cultivării este de 6-10 zile [16].



### 2.2.2. *Arthrospira platensis* CNMN-CB-02

Tulpina a fost selectată de către acad. Valeriu Rudic din materialul colectat dintr-un bazin artificial din partea de sud-est a s. Nicolaevca, raionul Ungheni prin metoda însămânțării repetate pe medii lichide și solide. La cultivarea pe mediile lichide Zarrouk și Gromov, tulpina prezintă trihoame răsucite în spirală dreaptă de culoare verde închis. Trihoamele sunt alcătuite din celule cilindrice (lungimea 8,5 -13,5 μm, lățimea 3,5-7,0 μm). Lungimea trihoamelor este de la 0,10 până la 1,10 mm. Trihoamele nu formează teci mucozitare. În mediu lichid, tulpina formează suspensie uniformă cu tendință de acumulare la hotarul lichid-aer.

În condiții optime de cultivare, tulpina dezvoltă o productivitate de 0,9-1,0 g/l biomasă absolut uscată. Biomasă conține proteine – 55 - 60%; polizaharide sulfatate – 3,0 - 4,0%, acid γ-linolenic - 1,25 - 1,3%; fosfatidilinozitol 0,40 - 0,60% și fosfatidilcolină 1,55 - 1,65%. Tulpina prezintă caracteristici tehnologice productive bune pe mediul nutritiv mineral cu următoarea compoziție: macroelementele în g/l: NaNO<sub>3</sub>-2,5; NaHCO<sub>3</sub>-8,0; NaCl-1,0; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-1,0; NaHPO<sub>4</sub>-0,20; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O-0,20; CaCl<sub>2</sub>-0,024; 1 ml/l soluție de microelemente, ce conține în mg/l: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-2,86; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O-1,81; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O-0,22; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O-0,08; MoO<sub>3</sub>-0,015; Fe-EDTA-1,0 ml/l. Cultivarea se efectuează la temperatura de 25-30°C, iluminarea de 35-40 μM fotoni·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, pH-ul 9,0-10,0. Cantitatea de inocul este de 0,25-0,35 g/l biomasă absolut uscată. Cultura necesită agitare periodică. Durata optimă a cultivării – 6 zile [16].

### 2.2.3. *Nostoc linckia* (Roth) Born et Flah CNM-CB-03

Poziția sistematică a cianobacteriei *Nostoc linckia* este următoarea: domeniul – *Bacteria*; filumul – *Cyanobacteria*; clasa – *Cyanophyceae*; ordinul – *Nostocales*; familia – *Nostocaceae*; genul – *Nostoc*; specia – *Nostoc linckia*; numele trivial al speciei este *nostoc*.

Cianobacteria *Nostoc linckia* (Roth) Born. et Flah. CNM-CB-03 a fost izolată în cultură pură din solul cenușiu deschis colectat în rezervația „Codru” de către Victor Șalaru, profesor universitar, dr. hab. în biologie. Pe mediul lichid cultura de nostoc formează trihomi rectilinii sau curbați, solitari sau reuniți în mănunchiuri flotante, iar pe mediul agarizat formează colonii gelatinoase de trihomi dispuși dens sau lax. Cultura de nostoc în stadiile tinere formează de obicei colonii macroscopice, mucilaginoase de o culoare cafenie închisă, aproape neagră, apoi semisferice sau aplatizate, mai rar filamentoase. În mediul lichid coloniile tinere sunt alipite de substrat (de pereții vasului). Cu vârsta coloniile sferice în creștere se desprind de substrat și plutesc sub formă de fulgi. Pe substrat solid coloniile sferice se distribuie neregulat cu o tendință vădită de aplatizare ce se dezvoltă cu vârsta. Culoarea coloniilor devine mai deschisă, predomină nuanțele galbene. Cultura de *Nostoc linckia* (Roth) Born. et Flah. CNM-CB-03 se cultivă pe mediul mineral cu următoarea compoziție: macroelemente, g/l: KNO<sub>3</sub> – 1,0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,2,

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,2, CaCl<sub>2</sub> – 0,15, NaHCO<sub>3</sub> – 0,2; microelemente, mg/l: ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,22, MnSO<sub>4</sub> – 1,81, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O – 0,079, NaBO<sub>3</sub>·4H<sub>2</sub>O – 2,63, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O – 1,0, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 9,3, CaCl<sub>2</sub> – 1,2, Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O – 0,02, EDTA – 10,0. Cultivarea este efectuată în baloane Erlenmayer de 1000 ml cu volumul de lucru de 500 ml. Sunt respectați parametrii: pH-ul 6,8-7,2, temperatura de 25-27°C, intensitatea luminii de 37–55 μM fotoni·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>. Iluminare continuă, agitare periodică lentă. Cantitatea de inocul a fost de 0,4 g/l. Ciclul de cultivare este de 12 zile. Tulpina are o productivitate de 10-12 g/m<sup>2</sup> pe zi. Masa biologică: proteină – 15-25%, polizaharide – 35-50%, ficoeritrină – 2,0-4,0%, ficocianină – 0,5-1,0%, aloficocianina – 0,5-1,0%, lipide 2%, β-caroten – 0,2-0,4%, xantofile -0,4-0,7% [30].

#### 2.2.4. *Porphyridium cruentum* (Näg) CNM-AR-01

Microalga *Porphyridium cruentum*, denumită de Nägeli în 1849, face parte din domeniul – Eukariota; filumul – Rodophyta; clasa – porphyridiophyceae; ordinul – Porphyridiales; familia – Porphyridiaceae; genul – *Porphyridium*; specia – *Porphyridium cruentum*; numele trivial al speciei este *porfiridium*. La cultivare pe mediul lichid Goldberg celulele sunt solitare, iar la suprafața lichidului se formează pelicule și conglomerate neregulate. Celulele sunt sferice cu diametrul de 6 - 10 μm. Nucleul celular are forma rotundă, în celulă este prezent un pirenoid stelat, lamelele căruia formează o rețea. Peretele celular este integral, înconjurat de capsulă polizaharidică. Straturile externe ale capsulei treptat se dizolvă în mediul de cultură mărindu-i viscozitatea. Pe mediul agarizat formează colonii regulate de formă rotundă cu diametrul de 2,0 - 2,5 mm, înconjurate de o aureolă de polizaharide cu grosimea de 1,0 - 1,5 mm. Pe mediul lichid suspensia de alge are culoare roșie, cu nuanță galben-verzuie. Celulele aderă la pereții vasului, în special la granița dintre faza lichidă și cea gazoasă. La cultivare în mediul lichid, în condiții staționare, formează pelicule negre, mate.

Tulpina microalgală se caracterizează printr-o productivitate înaltă. Pe medii nutritive minerale lichide specifice, în ziua a 7-a, biomasa porfiridiumului atinge 4 g/l masă celulară și conține până la 2 g/l exopolizaharide. Pe mediul lichid microalga prezintă o suspensie uniformă de culoare roșie care spre sfârșitul ciclului formează pelicule ce se depun pe pereții vasului.

Microalga *Porphyridium cruentum* (Näg) CNM-AR-01 este cultivată pe mediul nutritiv mineral cu următoarea componență chimică: macroelemente în g/l - NaCl - 7; KCl - 7,5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 1,8; NaNO<sub>3</sub> - 5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,2; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O - 0,15; KBr - 0,4; KI - 0,05; microelementele în mg/l: FeCl<sub>3</sub> - 27; ZnSO<sub>4</sub> - 0,02; CuSO<sub>4</sub> - 0,05; MnSO<sub>4</sub> - 0,3; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - 0,6; MoO<sub>3</sub> - 0,02; NaVO<sub>3</sub> - 0,05. Cultivarea s-a efectuat în baloane Erlenmeyer de 100 ml, cu volumul de lucru de 50 ml. Au fost respectați parametrii de cultivare, specifici pentru cultura dată: cantitatea de inocul 0,5 - 0,55 g/l BAU; temperatura de 25 - 28°C, pH-ul 6,8 - 7,2,

iluminarea continuă de  $56 \mu\text{M fotoni}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Durata ciclului de cultivare – 14 zile.

Biomasa de porfiridium conține 25-35% proteine, 20-50% carbohidrați, în care cantitativ predomină polizaharidele, până la 10 % ficobiliproteine, dintre care partea majoritară o alcătuiește ficoeretrina, 9-10% lipide. În componența lipidelor *la Porphyridium cruentum* sunt menționați acidul arahidonic 20:4 $\omega$ 6 în cantitate de 1,5% și acidul eicosapentaenoic 20:5 $\omega$ 3 în cantitate de până la 1,3% [28].

### 2.2.5. *Dunaliella salina* CNM-AV-02

*Dunaliella salina* face parte din domeniul – *Eukariota*; filumul - *Chlorophyta*, clasa *Chlorophyceae*, ordinul *Chlamidomonadales*, familia *Dunaliellaceae*, genul *Dunaliella*.

Tulpina algei verzi *Dunaliella salina* CNM-AV-02 a fost colectată din zona limanului Sasâc, situat pe teritoriul regiunii Odessa. La cultivare pe mediul lichid celulele sunt solitare, se deplasează activ, au formă ovală sau alungită și dimensiunile  $4,4\times 11,0-6,7\times 18,7\mu\text{m}$ . Cloroplastul are formă de cupă și ocupă practic toată partea periferică a bazei celulei. Cei doi flageli, lungimea cărora depășește de 1,5 – 2,0 ori lungimea celulei, sunt încovoiați spre partea bazică a celulei. Pe mediile lichide suspensia de alge are o culoare verde, iar în cazul iluminării intense ori a unui stres de alt gen capătă o nuanță galbenă-portocalie. Celulele nu se fixează pe pereții vasului, iar în lipsa agitării suspensia se concentrează la fundul vasului, formând un sediment ușor resuspendabil. Pe mediile solide, *Dunaliella salina* formează colonii de culoare verde-aprins cu un diametru de 1-2 mm. Microalga *D. salina* a fost cultivată pe două medii minerale cu nivel diferit de salinitate. Mediul Ben-Amotz are următoarea componență: macroelementele în g/l: NaCl - 120; NaNO<sub>3</sub> – 0,5; NaHCO<sub>3</sub> - 2,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0,05; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,75; Fe-EDTA – 0,05 ml; 1ml/l soluție de microelemente cu componența minerală în mg/l: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-2,86; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O-1,81; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O-0,08; MoO<sub>3</sub>-0,015 [16]. Cel de-al doilea mediu, propus de El-Baky se caracterizează printr-un nivel mai jos de salinitate și are următoarea componență: macroelementele în g/l: NaCl - 80; NaNO<sub>3</sub> – 0,5; NaHCO<sub>3</sub> - 2,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0,05; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,75; Fe-EDTA – 0,05 ml; 1 ml/l soluție de microelemente ce conține în mg/l: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-2,86; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O-1,81; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O-0,08; MoO<sub>3</sub>-0,015 [16].

Temperatura optimală pentru această tulpină este de 27-29<sup>0</sup>C, pH-ul se înscrie în limitele de 8,0-8,5. Cantitatea de inocul care asigură un rezultat tehnologic convenabil este de 0,40-0,45 g/l biomasă absolut uscată. În experiențele de laborator volumul probelor experimentale a fost de 50 ml, pentru care s-au utilizat baloane conice cu volumul total de 100 ml. Cultura se agită periodic. Durata cultivării este de 10 zile. Productivitatea tulpinii constituie 1,2-1,6 g/l. Biomasa uscată de *Dunaliella salina* în dependență de condițiile de cultivare și mediul nutritiv utilizat conține 38-43% proteină, 25-30% glicerol, 5-8% lipide, 8-10% hidrați de carbon, 3,2-3,8% acizi

nucleici, 5-7%  $\beta$ -caroten, 80-90mg/100g acid ascorbic, 20-25mg/100 g BAU tocoferol, vitaminele grupei B, fitosteroli ș.a [9].

### **2.2.6. *Haematococcus pluvialis* Flotow CNM-AV-05**

Tulpina *Haematococcus pluvialis* Flotow CNM-AV-05 reprezintă tipic specia *Haematococcus pluvialis*, ce aparține genului *Haematococcus*, familiei *Haematococcaceae* ordinului *Chlamydomonadales* clasei *Chlorophyceae*, filumului *Chlorophyta*.

Tulpina algei verzi *Haematococcus pluvialis* Flotow CNM-AV-05 a fost colectată în anul 1997 dintr-un bazin acvatic artificial în zona orașului Chișinău și menținută pe mediile nutritive minerale Gromov-6 și Bristol. Microalga *Haematococcus pluvialis* are trei etape de dezvoltare care se deosebesc după forma și dimensiunile celulelor.

Etapa mobilă constă din celulele vegetative verzi cu formă sferică spre elipsoidală cu diametrul de 8-20  $\mu\text{m}$ , înconjurată de o membrană netedă, îndepărtată de protoplast și sunt acoperite de o structură extracelulară gelatinoasă de o grosime variabilă. Celula posedă 2 flageli izoconți de lungime egală cu cea a corpului celular. Pentru etapa a doua de dezvoltare, cultura algală reprezintă celule mobile aflagelate în formă palmeloidă care treptat acumulează caroten și devin de culoare brună. În condiții nefavorabile (iluminare excesivă, deficit de nutrienți, hipertermie), celulele vegetative se transformă în aplanospori. La etapa trei de dezvoltare, cultura microalgală constă din celule roșii cu diametru de până la 40-89  $\mu\text{m}$  cu un peretele celular rezistent. La această etapă celulele acumulează cantitatea maximală de astaxantină în structuri membranare lipidice din citoplasmă.

Microalga *H. pluvialis* a fost cultivată pe mediul mineral care conține elementele (în g/l):  $\text{NaNO}_3$  - 0.3;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0.02;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0.08;  $\text{NaCl}$  - 0.02;  $\text{CaCl}_2$  - 0.05;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0.01;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0.0001;  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 0.0015;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 0.00008;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 0.0003;  $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  - 0.0003;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - 0.0175;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - 0.0002; EDTA - 0.0075; la temperatura de 26°C, în regim de iluminare continuă cu intensitatea de 28  $\mu\text{M}$  fotoni  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , agitare lentă periodică în primele 10 zile de cultivare. Astaxantinogeneza este indusă prin iluminarea excesivă cu intensitatea de 150  $\mu\text{M}$  fotoni  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  pe durata a 72 ore. Durata ciclului de cultivare este de 14 zile. Biomasa de *Haematococcus pluvialis* conține 1,5-3% astaxantină, 17-25% proteine, 30-35% lipide, 32-36% carbohidrați [10].

## **2.3. Metode aplicate în studiu**

### **2.3.1. Metoda de determinare a biomasei de cianobacterii și microalge**

Principiul metodei spectrofotometrice de determinare a conținutului de biomasă în suspensia de cianobacterii și microalge constă în determinarea absorbției suspensiei colorate și

stabile. Stabilitatea suspensiei se obține prin diluții [16]. Metoda a fost propusă în 1993 de către academicianul V. Rudic. În prezent, metoda spectrofotometrică este tot mai frecvent utilizată în aprecierea cantității de biomasă cianobacteriană și microalgă. Metoda este rapidă și eficientă și are la bază câteva etape succesive: prepararea probelor de microorganisme de diferită concentrație (cel puțin 10 probe în 3-5 repetări); înregistrarea absorbției pentru fiecare probă (în 3-5 repetări), lungimea de undă este specifică pentru fiecare cultură în parte; separarea biomasei din fiecare probă de lichidul cultural; demineralizarea biomasei din fiecare probă; uscarea probelor de biomasă la  $105 \pm 2^\circ\text{C}$  timp de o oră; înregistrarea greutateii (masa) probelor; determinarea coeficientului de recalcul al biomasei native în biomasă absolut uscată în baza corelărilor dintre valorile absorbției și datele gravimetrice.

În testele biochimice și în procedurile de manipulare tehnologică se utilizează biomasa nativă, care se aduce la o anumită concentrație, numită standard (uzual în mg/ml). Etapele de standardizare a biomasei după concentrație sunt următoarele: 1) Măsurarea volumului și absorbției suspensiei de microorganisme; 2) Colectarea și standardizarea după concentrație a biomasei. Unele teste biochimice presupun pretratarea biomasei de microalge și cianobacterii în scopul asigurării distrugerii peretelui celular și sporirea accesibilității conținutului din masa celulară. Se aplică tehnica congelării/decongelării repetate.

### **2.3.2. Determinarea conținutului de proteine**

**Conținutul de proteine** în biomasa pretrată a fost determinat cu aplicarea metodei spectrofotometrice, ce constituie o adaptare a metodei Lowry [101, 272, 416]. La baza metodei stau două reacții cu implicarea ionilor bivalenți și monovalenți ai Cu. În cadrul primei reacții, în mediu alcalin, ionii bivalenți  $\text{Cu}^{2+}$  se cuplează la legăturile peptidice, fiind supuși reducerii la  $\text{Cu}^+$ . Produsul rezultat, cromofor biuret, este stabilizat prin adăugarea de tartrat. A doua reacție constă în reducerea reactivului Folin - Ciocalteu de către complexul cuprului redus (obținut în prima reacție) cu legături amidice, precum și cu reziduuri de aminoacizi tirozina și triptofanul. Ionii de cupru monovalenți reacționează cu reagentul Folin - Ciocalteu, care constituie un amestec de acid fosfomolibdenic cu fenol. În rezultatul reacției se formează un produs instabil, care trece în albastru de molibden cu o absorbție maximală la 750 nm. Reactivul Folin - Ciocalteu în formă redusă are o culoare albastră (violet), care este detectat spectrofotometric. Conform intensității culorii soluției, se determină concentrația proteinelor. Sensibilitatea metodei este de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Limitele concentrațiilor determinate sunt de la 5 la 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Creșterea absorbției amestecului reactant la 750 nm este proporțională cu concentrația de proteine în proba analizată.

Determinarea proteinelor în biomasa microalgelor și cianobacteriilor este precedată de extragerea proteinelor cu NaOH 0,1N. Calculul conținutului cantitativ de proteine în probe se realizează în baza curbei de calibrare construite pentru albumină.

### **2.3.3. Determinarea conținutului de carbohidrați**

Conținutul de glucide în biomasa microalgelor și cianobacteriilor a fost determinat cu aplicarea reagentului antron (9(10H)-antracenonă, C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>O). Metoda are la bază descompunerea carbohidraților în monozaharide într-un mediu puternic acid, urmată de deshidratarea lor și formarea de hidroximetilfurfural, care produce în reacția cu reagentul antron un compus complex verde – albastrui [125, 332]. Dependența corelațională a intensității culorii de conținutul de glucide din proba analizată a fost determinată în intervalul concentrației de monozaharide 0,02 - 0,10 mg/ml. Conținutul cantitativ de glucide în probe se realizează în baza curbei de calibrare construite pentru glucoză.

### **2.3.4. Determinarea cantitativă a lipidelor**

Metoda spectrofotometrică de determinare a lipidelor prevede utilizarea reagentului fosfovanilinic în calitate de alternativă atractivă pentru cuantificarea lipidelor și este înalt apreciată de către cercetători datorită simplității ei. Pentru biomasa algală, metoda dată se aplică tot mai frecvent, înlocuind metoda gravimetrică Folch. Avantajul metodei constă în rapiditatea efectuării, posibilitatea testelor repetate, sensibilitatea înaltă, adaptarea materialului biologic utilizat. Metoda este utilizată frecvent în cercetările ficologice [16, 335, 368].

La baza acestei metode se află reacția de culoare determinată de produsele degradării lipidelor în urma hidrolizei lor acide. Realizarea metodei presupune etapele: extragerea lipidelor dintr-o cantitate determinată de biomasă cu un volum de amestec organic extractant (cloroform/etanol); evaporarea solventului din extractul lipidic obținut; hidroliza rezidului lipidic cu acid sulfuric pe baie de apă la temperatura 90°C; interacțiunea hidrolizatului cu reagentul fosfo-vanilinic; înregistrarea absorbanței probelor. Calculul cantitativ al conținutului de lipide în biomasă se realizează în baza curbei de calibrare construite pentru acid oleic.

### **2.3.5. Determinarea conținutului de ficobiliproteine**

**Conținutul de ficobiliproteine** a fost determinat prin metoda spectrofotometrică care are la bază înregistrarea valorilor absorbantei, specifice pentru extractul hidric de C - ficocianină la lungimea de undă de 620 nm (610 - 620 nm); pentru extractul hidric de aloficocianină - la 650 nm (650 - 655 nm) și pentru extractul hidric de R - ficoeritrină - la 562 nm (540 - 570 nm). Calculul conținutului cantitativ de ficobiliproteine a fost efectuat în baza ecuațiilor [16, 208].

### **2.3.6. Determinarea $\beta$ -carotenului și clorofilei**

Metoda spectrofotometrică are la bază determinarea valorilor maxime ale absorbanței, specifice pentru extractul etanolic de pigmenți (clorofila, caroten) cu calculul cantitativ în baza formulelor [427] și cu aplicarea coeficientului de extincție [361] sau în baza curbei de calibrare.

### **2.3.7. Determinarea conținutului de fenoli**

Metoda spectrofotometrică Folin-Ciocalteu are la bază transferul de electroni produs în mediul alcalin cu reducerea complexului acid fosfomolibdenic/fosfovolframic. Rezultatele au fost evaluate în baza curbei de calibrare construite pentru acid galic. Conținutul fenolilor se exprimă în mg echivalent acid galic la ml extract sau mg(g) biomasă [414].

### **2.3.8. Determinarea activității antioxidante**

**Reducerea radicalului ABTS<sup>+</sup>.** Activitatea antioxidantă a fost determinată prin aplicarea radicalului non biologic ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid). Metoda are la bază principiul de reducere a radicalului de către substanțele cu activitate antioxidantă prin mecanismul donator de electroni și de hidrogen, și oferă un răspuns pozitiv în acea măsură, în care în extractele examinate sunt prezente substanțe cu asemenea proprietăți. Metoda este unificată pentru diferite tipuri de compuși după valoarea absorbantei reagentului (ABTS radical) și durata reacției de reducere (6 min). Valoarea activității antioxidante a fost exprimată în % inhibiție ABTS [280, 357, 368, 456].

### **Reducerea radicalului DPPH'**

Metoda de determinare a activității antioxidante cu aplicarea radicalului DPPH' (1,1 difenil-2-picril hidrazil) este un test rapid, simplu, precis și ieftin pentru a evalua capacitatea diferitor compuși de a acționa în calitate de captatori ai radicalilor liberi sau donatori de hidrogen [68, 456]. Metoda DPPH' este descrisă ca metodă antioxidantă, fiind simplă și convenabilă care nu depinde de polaritatea probelor. În scopul adaptării metodei date la conținutul de antioxidanți (în dependență de cultura microalgă) au fost elaborate un șir de variante care diferă după concentrația radicalului DPPH', solventul aplicat, conținutul amestecului reactant, durata reacției de reducere a radicalului. Metoda DPPH' a fost unificată pentru toate culturile în studiu: valoarea absorbantei de  $0,660 \pm 0,05$  la 515 nm și durata reacției de 30 min. Activitatea antioxidantă a fost exprimată în % inhibiție radical DPPH [16].

### **Reducerea reagentului fosfo-molibdenic**

Activitatea antioxidantă a probei se determină spectrofotometric, în baza reacției de oxido-reducere cu reducerea Mo(VI) în Mo(V) cu formarea complexului  $\text{PO}_4^{3-}/\text{Mo(V)}$  de culoare verde și are la bază transferul de electroni produs în mediul acid [344]. Valoarea activității antioxidante se exprimă în mg acid ascorbic/mg(g) biomasă. Calculul cantitativ s-a efectuat în baza curbei de calibrare construite pentru acid ascorbic[16].

**Determinarea capacității de reducere a radicalului oxidului nitric.** Principiul metodei constă în determinarea nivelului de producere a radicalului oxidului nitric generat de nitroprusitul de sodiu. Oxidul nitric interacționează cu oxigenul și formează nitriți care sunt determinați spectrofotometric cu utilizarea reagentul Griess. Formarea cromoforului are loc în rezultatul diazotizării nitritului cu sulfanilamidă și cuplarea lui cu naftiletlendiamină [136, 286].

Reducerea formării radicalului oxidului nitric se exprimă în % inhibiție  $\text{NO}^{\cdot}$  comparativ cu control negativ.

### **2.3.9. Determinarea puterii de reducere a fierului**

Metoda are la bază reducerea complexului ferocianurii ferice în ferocianura feroasă de albastru de Berlin  $\text{Fe}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)_3$  [45, 326]. Hexacianoferatul de potasiu formează anionul stabil  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  care poate detecta Fe(II). Reducerea Fe(III) se produce de către componentele biomasei cianobacteriene și microalgale și forma redusă a fierului este detectată de cationii stabili de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  cu formarea complexului  $\text{Fe}^3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$  de culoare verde-albastră. Evaluarea puterii de reducere a fierului a fost efectuată în baza curbei de calibrare pentru acid ascorbic. Puterea de reducere poate fi exprimată în valori relative (*absorbanta*) sau în echivalent acid ascorbic în  $\mu\text{g}(\text{mg})/\text{g}(\text{mg})$  biomasă.

### **2.3.10. Determinarea produselor oxidării lipidelor**

Produsele degradării oxidative a lipidelor în biomasa cianobacteriană și microalgă au fost determinate prin calculul conținutului de dialdehida malonică (DAM) în baza substanțelor reactive ale acidului tiobarbituric (TBA). Rezultatele testului conținutului de DAM sunt anunțate cu specificarea timpului de incubare și a lungimii de undă pentru produsele nespecifice colorate [40, 202, 368].

Metodele de determinare a statutului oxidativ al biomasei demonstrează, în mod indirect, deplasarea statutului redox în favoarea proceselor de reducere sau a proceselor de oxidare cu acumularea radicalilor liberi care induc oxidarea lipidelor. În cazul biomasei cianobacteriilor și microalgelor, culoarea produselor nespecifice (ficobiliproteinele) se exclude prin înregistrarea



absorbantei la 600 nm. Pentru compararea valorilor DAM a probelor poate fi aplicată valoarea absorbantei [16].

Conținutul cantitativ de dialdehidă malonică în probe se calculează cu utilizarea coeficientului de extincție a produsului complexului MDA-TBA.

### ***2.3.11. Determinarea activității superoxidismutazei***

Activitatea superoxidismutazei (SOD) a fost determinată prin metoda spectrofotometrică, principiul căreia constă în inhibarea reacției de reducere a tetrazoliului nitroblue (NBT) de către superoxidul generat în reacții enzimatiche. Metoda include câteva etape care prevăd generarea radicalilor superoxid în baza sistemului xantină-xantin oxidază (XOD). Acesta din urmă reacționează cu NBT formând formazanul. Superoxidismutaza inhibă această reacție, iar activitatea enzimei se măsoară după gradul de inhibare prin înregistrarea absorbanțelor. O unitate de activitate SOD a fost definită ca cantitatea corectată de enzimă (în raport cu controlul negativ) necesară pentru o inhibiție de 50% a reducerii de NBT în comparație cu controlul pozitiv [214].

### ***2.3.12. Determinarea activității peroxidazei***

Metoda are la bază evaluarea cantitativă a ratei la care enzima catalizează reacția de oxidare a substratului în prezența peroxidului de hidrogen. În calitate de substrat a fost aplicat reagentul 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolină-6-sulfonic acid) [367].

### ***2.3.13. Determinarea activității catalazei***

Metoda spectrofotometrică de determinare a activității catalazei se bazează pe identificarea peroxidului de hidrogen nedescompus în rezultatul interacțiunii lui cu probele cu activitate enzimatică specifică. În calitate de substrat se aplică amestecul peroxidului de hidrogen cu soluție tampon fosfat. Descompunerea peroxidului de hidrogen este stopată de molidatul de amoniu [194].

### ***2.3.14. Microscopia electronică***

#### ***Microscopia electronică cu transmisie (TEM)***

Morfologia celulelor cianobacteriene a fost caracterizată prin microscopie electronică de transmisie folosind un microscop JEM-1400 (Jeol, Japonia din dotarea JINR Dubna) la o tensiune de accelerare de 100 kV. Pentru analiza TEM, probele au fost fixate folosind 1% - dialdehidă glutarică în tamponul corespunzător la 4°C timp de 12 ore, apoi cu 1% OsO<sub>4</sub> timp de

1 oră. Ulterior probele au fost deshidratate folosind etanol (concentrație 30-96%) și apoi cu acetona. Probele fixate au fost încorporate în rășina Epon. Secțiuni ultrasubțiri seriale au fost obținute pe ultramicrotomul LKB III (LKB, Suedia).

### ***Microscopia electronică cu scanare (SEM)***

Principiul microscopiei SEM (Scanning Electron Microscopy) se bazează pe utilizarea unui fascicul de electroni în locul luminii pentru a obține imagini de înaltă rezoluție ale suprafețelor unor obiecte. Acest tip de microscopie permite obținerea de imagini tridimensionale și detaliate ale structurilor de suprafață ale diferitelor tipuri de mostre.

Microscopia electronică cu scanare (SEM) a fost realizată folosind Quanta 3D FEG (FEI, Hillsboro, OR, SUA din dotarea JINR Dubna). Caracteristicile de funcționare ale microscopului folosit în experimente au fost următoarele: mărire de 5000–150,000×, tensiune de 1–30 kV.

### ***2.3.15. Analiza de activare cu neutroni***

Conținutul de elemente acumulate de biomasa cianobacteriilor și microalgelor a fost determinat prin analiza instrumentală de activare a neutronilor (AAN) la instalația REGATA a reactorului IBR-2 (din dotarea IUCN Dubna). Procedura de iradiere a probelor biologice a fost realizată în conformitate cu protocoalele stabilite de instituție. Pentru a determina conținutul elemental al biomasei, probele au fost împachetate în cupe de aluminiu și iradiate timp de 3 zile la un flux de neutroni de  $1,2 \times 10^{11} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , reambalate și măsurate de două ori folosind detectoare de germaniu HP după 4 și, respectiv, 20 de zile de degradare. Conținutul fiecărui element a fost determinat în baza benzilor  $\gamma$  cu energie specifică izotopilor respectivi. Prelucrarea datelor AAN a fost efectuată folosind software-ul Genie 2000 și concentrațiile elementelor au fost calculate aplicând o metodă relativă, folosind software-ul dezvoltat de Frank Laboratory of Neutron Physics, JINR.

### ***2.3.16. Nivelul relativ de expresie a genelor asociate cu stresul***

ARN total a fost extras din sedimentul celular obținut la centrifugarea a 25 ml de cultură de *Arthrospira platensis*, în trei repetări pentru fiecare variantă experimentală utilizând reactivul TRIzol™ (Invitrogen™, USA). Procedura se realizează în conformitate cu protocolul producătorului. Integritatea ARN izolat a fost evaluată utilizând QIAxcel Advanced system (Qiagen, Germany). ADNc a fost obținut utilizând chitul Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, cu dsDNase (Thermo Scientific™, USA). Etapele procesului au fost realizate în conformitate cu instrucțiunile producătorului. RT-qPCR a fost realizat utilizând iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad, USA) în sistemul de detecție CFX96 Touch Real-

Time PCR (BioRad, USA) aplicând primerii pentru următoarele gene: *FeSOD*, *GOGAT*, *hsp90*, *rbcL*, *POD*, *per*, *fur* și *16S rARN* (în calitate de genă de referință) (Tabelul 2.1.). Nivelul relativ de expresie a genelor selectate a fost analizat aplicând metoda  $\Delta\Delta Ct$ .

**Tabelul 2.1. Lista primerilor utilizați pentru studiul expresiei relative a genelor asociate cu stresul**

<b>Gena</b>	<b>Primeri</b>
<i>rbcL</i>	CCTGTTGCTTCCGGTGGTAT CACACGGTTAGCAGTTGCAC
<i>GOGAT</i>	TCCTCCTCTTCCTGACCTGG CCGCCAGCGGAATATCATCT
<i>FeSOD</i>	GAAGTGCCTCAAGCCCAATG GCCCAACCACTACCGAACTG
<i>hsp90</i>	CAATTACACCCCGCAAAGGC CCAAGAAGAACCCCTGCTGT
<i>Pod</i>	CCGGATCTTTGAGGGAGGGA TTGCGGGTGATTGACTCCTT
<i>Per</i>	TTTTGGCGGATACCGATGGC ATCCTGAGCGTGGGTAGAGG
<i>Fur</i>	AATATCTGCGATCGCTTTACTG, CGGTATCTTCTCAGGCGACG
<i>16S rRNA</i>	CGTAAACCTCTCCTCAGTTCAG GAACGGATTACCGCAGTAT

### 2.3.17. Analiza statistică a rezultatelor

Toate experiențele au fost realizate în trei repetări. Pentru fiecare repetare și parametru au fost realizate trei măsurători paralele. Datele sunt prezentate ca media±deviația standard. Diferența dintre variantele experimentale și martor au fost apreciate în baza rezultatelor analizei variaționale (one-way ANOVA). Pentru calcularea nivelului de semnificație a diferențelor dintre variante a fost aplicat T-testul. Pentru analiza corelațională a fost aplicat Excel și SPSS Statistics 26 (analiza semnificației statistice a corelațiilor).

## 2.4. Concluzii la capitolul 2

În scopul realizării acestei lucrări au fost selectate obiecte de studiu și metode care satisfac următoarelor criterii:

*Pentru tulpinile ficologice:*

- Să posede valoare biotehlogică: caracterizate prin conținut prețios; solicitate la nivel mondial și local; studiate din punct de vedere fundamental și aplicativ; disponibile în colecții locale și internaționale.

- Să posede flexibilitate în cadrul fluxurilor tehnologice: să suporte anumite deviații de la parametrii optimi de cultivare; să ofere răspunsuri clare la manipulări biotehnologice.
- Să existe producere locală/zonală în scopul transferului de elaborări tehnologice realizate în laborator.

*Pentru metodele de studiu la nivel de flux tehnologic:*

- Să fie adecvate scopului și sarcinilor trasate;
- Să fie recunoscute de către comunitatea academică din domeniu;
- Să fie simple, precise, reproductibile, cost eficiente, ușor de aplicat în condiții tehnologice în calitate de metode de asigurare a controlului de calitate.

*Pentru metodele de studiu la nivel de identificare a unor mecanisme și reacții de răspuns specifice:*

- Să fie selectate în baza unei argumentări științifice riguroase;
- Să corespundă nivelului actual internațional în domeniu;
- Să fie aprobate de comunitatea academică prin publicații în reviste științifice indexate în principalele baze de date internaționale (în special WoS și Scopus);
- Să corespundă standardelor metodologice ale domeniului de cercetare.

Publicarea rezultatelor obținute în cadrul cercetărilor la tema tezei în ediții de valoare științifică, obținerea de brevete de invenții, aprecierea inovațiilor la expoziții și saloane de inventică și creativitate, confirmă alegerea corectă a obiectelor și metodelor de cercetare.

### **3. DINAMICA MODIFICĂRILOR ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A BIOMASEI CULTURILOR FICOLOGICE PE DURATA CICLULUI DE CREȘTERE ÎN CONDIȚII OPTIME**

Culturile de cianobacterii și microalge se dezvoltă în sisteme închise în conformitate cu legitățile generale comune pentru microorganismele, fiind prezente toate fazele de creștere: faza de latență, faza de accelerare a creșterii, faza creșterii exponențiale, faza de încetinire a creșterii, faza staționară și faza de declin. În dependență de specia studiată, condițiile fizico-chimice aplicate la cultivare, prezența unor substanțe cu efect stimulator sau inhibitor, intervenții biotehnologice de diferită natură, se poate modifica atât durata totală a unui ciclu tehnologic, cât și durata individuală a fiecărei faze și/sau raportul dintre acestea. Fiecare dintre fazele ciclului se caracterizează prin particularități distinse și prezintă diverse posibilități de a interveni în derularea fiziologică a proceselor vitale în scopul obținerii efectelor dorite în cadrul tehnologiilor de cultivare. Din punct de vedere biotehnologic, faza creșterii exponențiale și faza staționară sunt foarte semnificative, deoarece anume la aceste două etape cel mai des are loc colectarea de biomasă. În același timp, faza de latență este una crucială din punct de vedere al succesului implementării modificărilor în procesul tehnologic, culturile fiind deosebit de vulnerabile la etapa dată, iar răspunsurile generate fiind rapide, profund specifice și cu repercusiuni în dezvoltarea ulterioară a acestora. Astfel, în scopul elaborării unor tehnologii ficologice bazate pe elemente inovative de sinteză dirijată a elementelor de interes este important de a cunoaște particularitățile de dezvoltare a culturilor de cianobacterii și microalge în condiții cât mai apropiate de optimul lor specific.

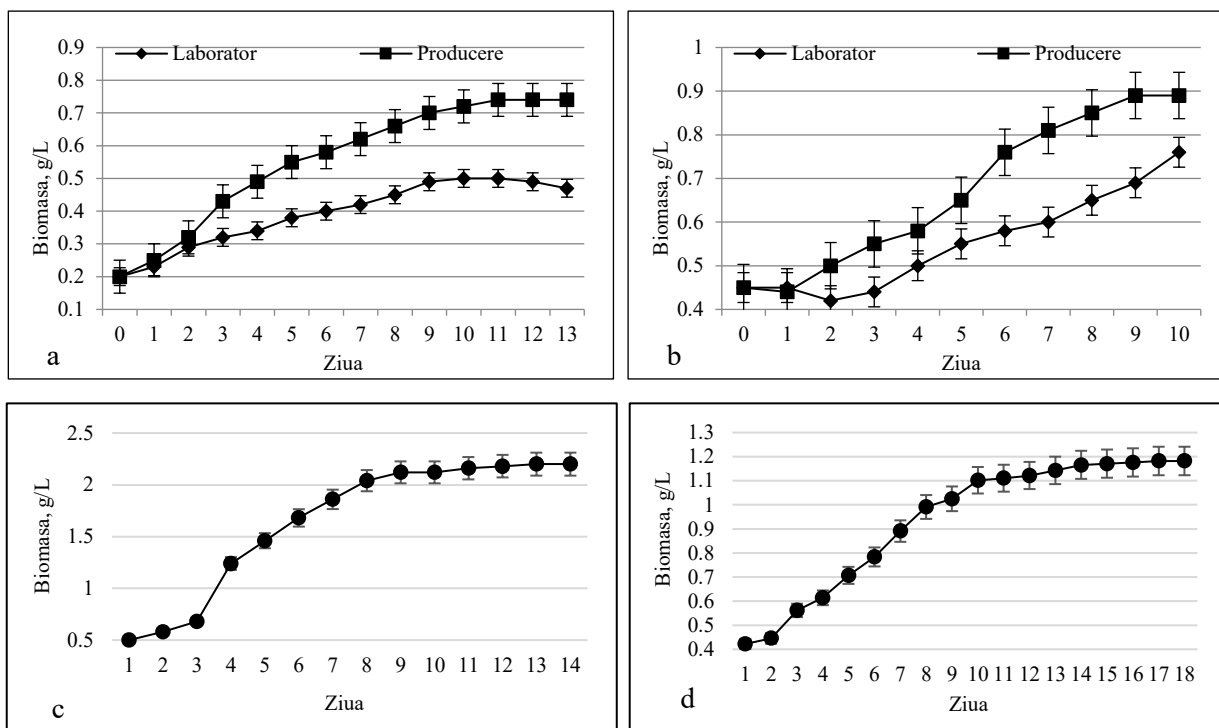
În marea majoritate a publicațiilor din domeniu, parametrul studiat pe durata ciclurilor de creștere este cantitatea de biomasă [42, 174, 477]. În același timp, alți parametri biochimici, de asemenea, se modifică pe durata cultivării culturilor ficologice. De exemplu, dacă cantitatea de proteine totale în biomasă este un parametru relativ constant, atunci cantitatea de lipide și glucide acumulate, precum și cantitatea, dar și raportul pigmentilor variază semnificativ în dependență de faza de dezvoltare [2, 5, 13, 14, 21]. De asemenea, pe durata ciclului de creștere se modifică semnificativ atât activitatea antioxidantă totală, cât și activitatea diferitor tipuri de extracte obținute din biomasa cianobacteriilor și microalgelor de interes biotehnologic. În anumite condiții s-a stabilit că activitatea antioxidantă a biomasei de cianobacterii și microalge corelează cu componența biochimică a acesteia, în special cu conținutul unor fracții specifice, cum ar fi pigmentii carotenoizi, ficobiliproteinele, proteinele hidrosolubile ș.a. [13, 14, 28]. Particularitățile menționate pot servi drept predicții pentru stabilirea duratei ciclurilor tehnologice în dependență de produsul care urmează a fi obținut. Din aceste motive ne-am trasat

drept scop evidențierea unor particularități ale modificărilor tipice ale activității antioxidante a culturilor de interes ficobiotehologic pe durata unui ciclu de creștere în sistem închis al culturii discontinue. Cele mai des aplicate metode de determinare a activității antiradicalice sunt cele bazate pe aplicarea radicalilor nonbiologici, în special DPPH<sup>•</sup> și ABTS<sup>•+</sup>. Reducerea radicalului DPPH<sup>•</sup> are loc în baza mecanismului transferului de hidrogen (H<sup>•</sup>), iar reducerea radicalului cation ABTS<sup>•+</sup> - în baza mecanismului transferului de electroni (e<sup>-</sup>). Aceste două metode în calitate de primă măsurare, care permit a evidenția activitatea antiradicalică nespecifică, iar rezultatele obținute prin aplicarea lor sunt un prim indicator al prezenței componentelor cu proprietăți antioxidante în biomasă. Un alt test care permite monitorizarea capacității antioxidante a substraturilor biologice este testul de determinare a capacității de reducere a reagentului fosfo-molibdenic (CRFM), care permite evidențierea activității antioxidante a componentelor lipofile ale biomasei. Capacitatea de a participa în reacții de oxidoreducere, care asigură anihilarea radicalilor liberi poate fi, de asemenea, monitorizată prin aplicarea metodei de determinare a puterii de reducere a ionilor de fier. În scopul aprecierii intensității proceselor oxidative în biomasa cianobacteriilor și microalgelor este utilă monitorizarea produselor finale ale degradării macromoleculilor organice. Unul dintre markerii recunoscuți pentru aceste scopuri este dialdehida malonică, care se determină prin aplicarea testului TBARS. Fiecare dintre testele de determinare a activității antioxidante a biomasei microalgelor și cianobacteriilor are un specific propriu de aplicare, de aceea au fost utilizate în dependență de scopul monitorizării, cultura ficologică și tipul de substrat cercetat. Rezultatele obținute în procesul de monitorizare a culturilor de *Nostoc linckia*, *Arthrospira platensis*, *Porphyridium cruentum* și *Haematococcus pluvialis* pe durata unui ciclu de cultivare în condiții optime pentru fiecare dintre ele sunt prezentate în acest capitol.

### **3.1. Ciclurile de creștere ale culturilor ficologice în condiții optime ale sistemelor închise**

În Figura 3.1. este prezentată acumularea de biomasă în cazul celor patru culturi ficologice studiate pe durata unui ciclu de creștere în condiții de sistem închis și condiții optimale, descrise pentru fiecare dintre ele în capitolul 2. Durata unui ciclu (examinat până la intrarea culturilor în faza staționară) diferă de la o cultură la alta și este între 10 și 18 zile. De menționat că pentru culturile ficologice, care se caracterizează printr-o rată de creștere mult mai redusă comparativ cu alte culturi microbiene, poate dura de la 10 la 30 de zile și chiar mai mult, în dependență de particularitățile culturii și condițiile aplicate. Din punct de vedere tehnologic, menținerea culturii în fază staționară o perioadă îndelungată în cultură discontinuă este

neargumentată din punct de vedere economic, din care cauză în această lucrare sunt analizate ciclurile de creștere ale culturilor ficologice până la intrarea acestora în faza staționară. Culturile cianobacteriilor *Nostoc linckia* și *Arthrospira platensis* au fost studiate atât în condiții de laborator, cât și în condiții de producere industrială, iar culturile microalgelor *Porphyridium cruentum* și *Haematococcus pluvialis* – doar în condiții de laborator.



**Fig. 3.1. Curbele de creștere ale culturilor ficologice în sistem închis, în condiții optime: (a) – *Nostoc linckia*; (b) – *Arthrospira platensis*; (c) – *Porphyridium cruentum*; (d) – *Haematococcus pluvialis***

Ambele culturi cianobacteriene se manifestă diferit pe durata unui ciclu vital în condiții de laborator și în condiții de producere. Cantitatea de biomasă acumulată în condiții industriale o depășește pe cea acumulată în laborator atât în cazul cianobacteriei *Nostoc linckia*, cât și în cazul *Arthrospira platensis*. În cazul culturii *Nostoc linckia*, faza lag este slab pronunțată în ambele variante de creștere, iar faza de creștere exponențială are o durată mai mare cu două zile în condiții de producere. Ascensiunea curbei de creștere a nostocului pe această porțiune este mai abruptă de asemenea în condiții industriale. Intrarea în faza staționară în condiții standard a culturii de nostoc are loc în laborator la cea de-a 9-a zi de cultivare, iar în condiții industriale – în cea de-a 11-a zi. În cazul nostocului, condițiile industriale prezintă avantaje evidente, oferind o

cantitate semnificativ mai mare de biomasă la finalul ciclului de cultivare, sporul fiind de aproximativ 50% comparativ cu varianta creșterii în condiții de laborator.

În cazul culturii de *Arthrospira platensis* în condiții de laborator, faza *lag* durează două zile, fiind prezentă și faza de moarte inițială a culturii, iar faza exponențială are o durată mai lungă comparativ cu condițiile de producere. Astfel, în laborator pe mediu standard și în condiții optime faza staționară se instalează la cea de-a 10-a zi de cultivare, în timp ce în condiții de producere industrială – la cea de-a 9-a zi. Ca și în cazul nostocului, cantitatea de spirulină obținută în cadrul unui ciclu de cultivare în condiții de producere este mai mare comparativ cu cea obținută în condiții de laborator, dar diferența este mai mică în acest caz și constituie aproximativ 15%.

Culturile celor două microalge prezintă o curbă de creștere clasică în condiții de sistem închis cu o durată de 14 zile pentru *Porphyridium cruentum* și de 18 zile pentru *Haematococcus pluvialis*. Cultura de *Porphyridium cruentum* se caracterizează printr-o adaptare rapidă la condițiile noi, faza *lag* fiind scurtă cu o durată de 2 zile, după care urmează faza creșterii exponențiale caracterizată prin ascensiune bruscă a cantității de biomasă acumulată. Faza de încetinire a creșterii în cazul porfiridiumului este bine pronunțată și are o durată de 3 zile, după care se instalează faza staționară, care poate să se mențină o perioadă de timp destul de lungă de peste 20 de zile.

Cultura de *Haematococcus pluvialis* are cel mai lung ciclu de creștere, fiind și unica cultură pleiomorfă dintre cele studiate în această lucrare. Inocularea se face pornind de la faza de ciști roșii, care germinează rapid în mediul nutritiv proaspăt, iar din cea de-a doua zi începe acumularea activă a biomasei în formă de celule mobile verzi. Creșterea exponențială a culturii în sistem închis durează până la ziua a 10-a inclusiv, după care începe o fază de încetinire a creșterii care este caracterizată, de rând cu evenimentele specifice acestei faze, și de trecerea culturii de hematococ în forma de ciști bruni.

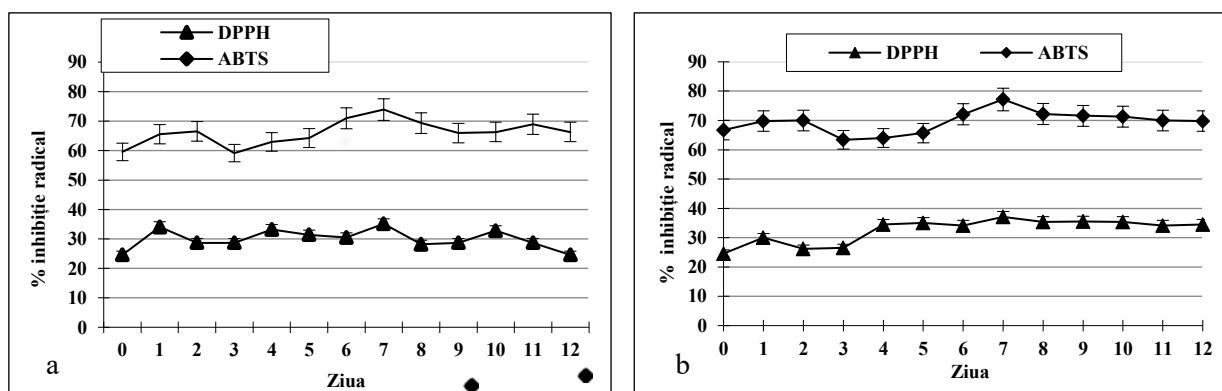
Parcursul diferitor faze este astfel o caracteristică specifică pentru fiecare cultură analizată și urmează un pattern de specie care, de rând cu creșterea cantității de biomasă, se caracterizează și prin particularități biochimice. Componenta biochimică a biomasei culturilor ficologice la fiecare etapă a ciclului de viață reflectă starea fiziologică a celulelor de microalge și cianobacterii. Este cunoscut faptul că caracteristicile de specie sunt pronunțate în special pe durata fazei de creștere exponențială. Pe durata acestei faze au loc cele mai intense procese metabolice, care asigură creșterea în ritm alert al numărului de celule în cultură. Faza staționară a ciclului de creștere a culturilor se caracterizează printr-o încetinire simțitoare a proceselor metabolice și prin acumularea compușilor de rezervă în celulă. Este evident că toate aceste



fenomene se reflectă și în capacitatea antioxidantă a biomasei cianobacteriilor și microalgelor, care oscilează pe durata ciclului vital, astfel, încât să asigure derularea normală a proceselor vitale. În compartimentele ce urmează vor fi analizate modificările activității antioxidante a biomasei culturilor cercetate pe durata unui ciclu de creștere în sistem închis.

### 3.2. Activitatea antioxidantă a biomasei de *Nostoc linckia* CNMN-CB-03 pe durata ciclului vital

Biomasa de *Nostoc linckia* se caracterizează prin componență biochimică foarte complexă, componentele antioxidante fiind reprezentate de proteine, printre care sunt și enzimele antioxidante; pigmenți, vitamine, minerale. Nici unul din grupurile de substanțe cu proprietăți antioxidante nu este determinant pentru capacitatea antioxidantă totală a biomasei, fiecare având rolul său specific în procesele de prevenire a formării radicalilor liberi și speciilor reactive și în inhibiția lor. În cadrul proceselor biotehnologie este important de a atinge un echilibru între producerea de biomasă și componența biochimică a acesteia, inclusiv activitatea ei antioxidantă totală. În continuare vor fi prezentate valorile activității antioxidante a unor extracte din biomasa de nostoc la diferite etape ale ciclului vital al culturii cianobacteriene. Rezultatele obținute pentru cultura crescută în condiții de laborator prin aplicarea testelor de inhibiție a radicalilor nonbiologici DPPH<sup>\*</sup> și ABTS<sup>+</sup> în extractele hidrice și etanolicе sunt prezentate în Figura 3.2.



**Fig. 3.2. Activitatea antiradicalică a fracției hidrosolubile a biomasei de *Nostoc linckia* în condiții de laborator (a) și în condiții de producere (b) pe durata ciclului vital**

Prin aplicarea testului de inhibiție a radicalului DPPH<sup>\*</sup> a fost stabilit că pe durata ciclului vital al cianobacteriei *Nostoc linckia* activitatea antiradicalică în extractele hidrice din biomasă variază între 24 și 35 % inhibiție a radicalului nominalizat, în funcție de faza ciclului vital. Variațiile înregistrate reflectă necesitățile culturii de nostoc în componente capabile să anihileze

radicalii liberi formați, dar și răspunsul culturii la modificările metabolice generate de procesele de creștere și dezvoltare (Figura 3.2.a).

Valori înalte ale parametrului dat se înregistrează la finalul primei zile a ciclului vital, inhibiția radicalului DPPH<sup>•</sup> fiind de 34,1%. La fel, valori înalte au fost obținute și pentru perioada dintre ziua a patra și a șaptea ale ciclului vital în sistem închis, când valorile testului DPPH<sup>•</sup> au fost între 30,5 și 35,1% inhibiție. Perioada respectivă corespunde fazei exponențiale de creștere a nostocului, care este caracterizată prin activitatea biosintetică cea mai înaltă din structura ciclului vital. La inocularea culturii pe mediu nutritiv standard complet valoarea testului DPPH<sup>•</sup> a fost de 24,6 %, iar timp de 24 ore această activitate a crescut cu aproape 10%, ceea ce se explică prin activarea mecanismelor de adaptare metabolică la noile condiții ale mediului. Faza de accelerare a creșterii (ziua a 3-a) este marcată de o majorare a inhibiției radicalului DPPH<sup>•</sup> de la 28,7 la 33,2 %, iar faza de încetinire a ritmului de creștere, care corespunde celei de-a 8-a zi a ciclului vital, se caracterizează prin scăderea valorii testului DPPH<sup>•</sup> la 28,2 %. În faza staționară, începând cu cea de a 10-a zi a ciclului vital, valorile testului DPPH<sup>•</sup> din nou cresc și în ziua a 10-a constituie peste 32 % inhibiție DPPH<sup>•</sup>. Odată cu intrarea culturii de nostoc în faza de declin activitatea antioxidantă a extractului hidric din biomasa de nostoc crescută în condiții de laborator din nou descrește, valorile testului fiind sub 25% inhibiție radical DPPH<sup>•</sup> (Figura 3.2.a).

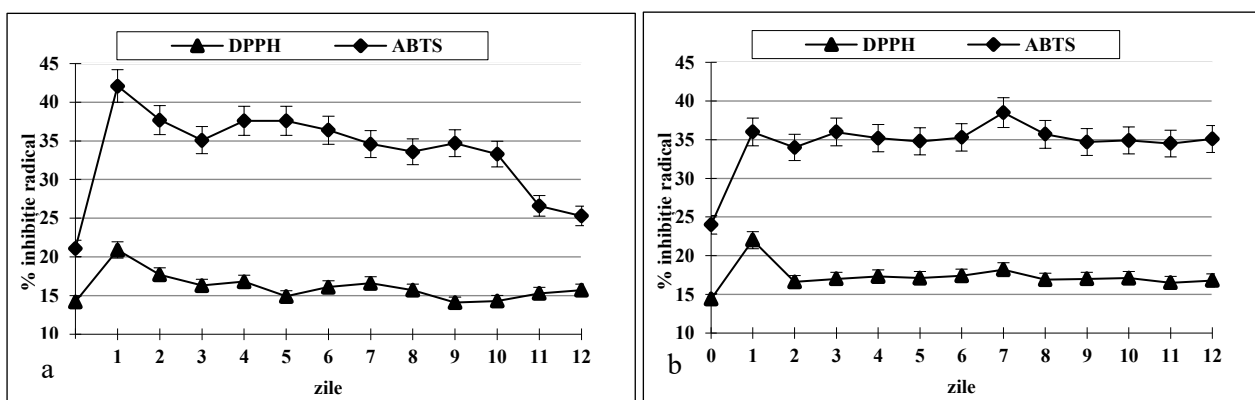
Astfel, putem confirma că capacitatea de reducere a radicalilor în baza mecanismului transferului de protoni se modifică odată cu trecerea culturii dintr-o fază a ciclului de creștere în alta: faza *lag* - primele 24 ore de la inoculare; trecerea din faza de accelerare a creșterii la cea de creștere exponențială; trecerea din faza de creștere exponențială la faza staționară. Valoarea minimală a testului DPPH a fost înregistrată în faza de declin a culturii, iar valorile maxime ale activității antiradicalice determinată prin aplicarea testului DPPH corespund intervalelor temporale în care cultura trece de la o condiție fiziologică la alta.

Capacitatea înaltă de reducere a radicalului cation ABTS<sup>•+</sup> reflectă activitatea antiradicalică a componentelor antioxidante, care acționează în baza mecanismului transferului de electroni. Valorile obținute pentru componentele hidrosolubile ale biomasei de nostoc crescută în condiții de laborator arată că aceste componente predomină în cultura respectivă, pe întreaga durată a ciclului vital (Figura 3.2. a). Activitatea antiradicalică a extractelor hidrice din biomasa de nostoc în primele două zile ale ciclului vital în raport cu radicalul ABTS<sup>•+</sup> a fost de 65 - 66 % inhibiție. Odată cu intrarea culturii în faza accelerării creșterii se observă o scădere a nivelului de inhibiție a radicalului până la 59%, ceea ce este egal cu valoarea testului ABTS<sup>•+</sup> caracteristică pentru faza de latență, când cultura se adaptează la noile condiții. Pe durata fazei de

creștere exponențială activitatea antioxidantă a extractului hidric din biomasa de nostoc crescută în condiții de laborator crește și atinge valoarea de 74% inhibiție ABTS<sup>+</sup>.

Majorarea capacității de inhibiție a radicalului ABTS<sup>+</sup> se produce pe durata fazei de creștere exponențială care se caracterizează și prin activitate vitală maximală a culturii. După cum am menționat în capitolul 1, procesul de fotosinteză și cel de respirație sunt principalele procese care în condiții normale generează specii reactive ale oxigenului, ceea ce solicită accelerarea proceselor de formare a antioxidantilor, care sunt destinați menținerii echilibrului redox în cultură. Pe durata fazei staționare, activitatea antiradicalică a componentelor hidrosolubile a biomasei de nostoc crescută în condiții de laborator se menține la nivelul între 65 și 70% inhibiție a radicalului cation ABTS<sup>+</sup> (Figura 3.2.a).

Testele DPPH și ABTS au fost aplicate și în cazul extractelor hidrice din biomasa de *Nostoc linckia* crescută în condiții de producere industrială, iar rezultatele pot fi urmărite pe Figura 3.2.b. Se observă păstrarea vectorului de modificare a valorilor testelor realizate ca și în cazul condițiilor de laborator, de asemenea, se evidențiază aceleași puncte critice. Valorile activității antioxidante a extractelor hidrice din biomasa de nostoc crescută în condiții de laborator sunt foarte apropiate de cele caracteristice extractelor din biomasa crescută în producere. Componentele liposolubile ale biomasei de nostoc au un aport substanțial în asigurarea echilibrului proceselor de oxido-reducere în celulele cianobacteriilor și microalgelor. Pentru a urmări evoluția activității antioxidante asigurată de componentele liposolubile, din biomasa de nostoc s-au obținut extracte etanolice, pentru care s-au făcut aceleași teste ca și în cazul extractelor hidrice. Rezultatele obținute sunt prezentate în Figura 3.3.

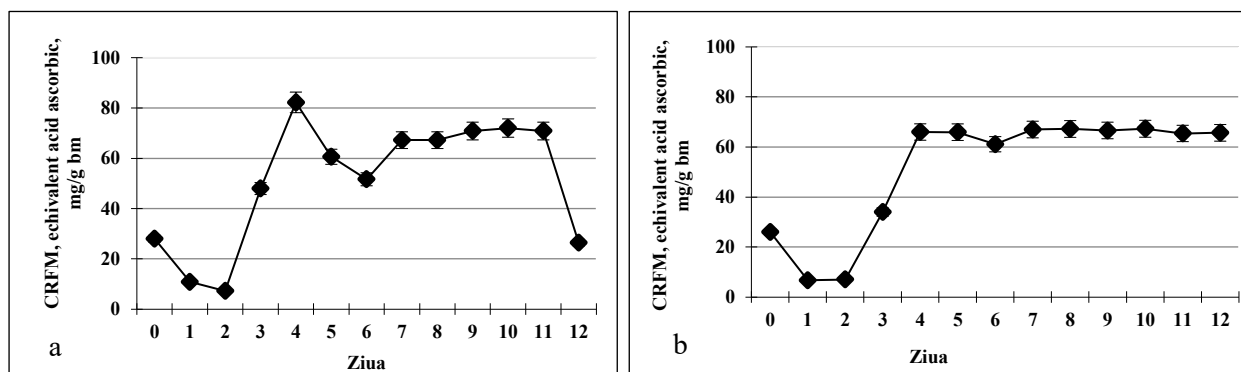


**Fig. 3.3. Activitatea antiradicalică a componentelor liposolubile din biomasa de *Nostoc linckia* în condiții de laborator (a) și în condiții de producere (b) pe durata ciclului vital.**

Extractele etanolice din biomasa de nostoc se caracterizează prin valori mai mici ale testelor DPPH și ABTS atât în cazul creșterii culturii în condiții de laborator, cât și în cazul condițiilor industriale. O altă particularitate a acestui tip de extracte constă în faptul că activitatea lor antioxidantă în raport cu radicalii ABTS<sup>+</sup> și DPPH<sup>·</sup> pe durata ciclului vital este destul de stabilă, cu excepția unui salt evident care se observă în faza de latență. De asemenea, în condiții de laborator testul ABTS evidențiază clar faza de declin printr-o scădere semnificativă a capacității de inhibiție a radicalului ABTS<sup>+</sup> comparativ cu ziua a 10-a a ciclului.

În condiții de producere, ca și în cele de laborator, se observă o deplasare a valorilor activității antiradicalice de la valorile medii pe ciclu în faza de latență, după care ambele teste înregistrează valori apropiate, dar mai joase decât în cazul componentelor hidrosolubile ale biomasei (Figura 3.3.b). Ca și în cazul componentelor hidrosolubile, menținerea parametrilor antiradicalici a extractelor etanolice la un nivel constant în fazele de creștere exponențială și staționară de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* în producere este utilă pentru obținerea unei biomase calitative.

Activitatea antioxidantă a componentelor lipofile ale biomasei de nostoc a fost monitorizată, de asemenea, aplicând testul capacității de reducere a reagentului fosfo-molibdenic (CRFM). Rezultatele obținute pentru cultura de nostoc crescută în condiții de laborator și de producere sunt prezentate în Figura 3.4



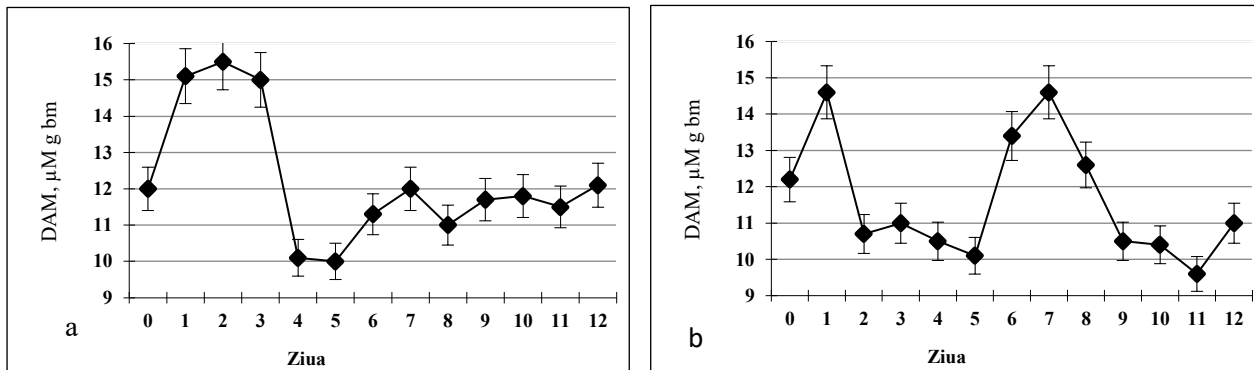
**Fig. 3.4. Capacitatea de reducere a reagentului fosfo-molibdenic a componentelor liposolubile din biomasa de *Nostoc linckia* în condiții de laborator (a) și de producere (b) pe parcursul ciclului de cultivare**

În condiții de laborator, CRFM a extractului etanolic este minimală în primele două zile ale ciclului vital, după care, începând cu ziua a 3-a de cultivare, acest parametru crește și se menține la valori de peste 50 mg echivalent al acidului ascorbic per gram de biomasă. Valoarea maximală de aproximativ 80 mg echivalent al acidului ascorbic per gram de biomasă se

înregistrează în ziua a 4-a a ciclului vital, după care urmează o reducere a CRFM timp de două zile, urmate de o stabilizare a valorilor testului. Ultima zi de creștere a culturii de nostoc în condiții de laborator, care corespunde perioadei de declin, se asociază iar cu o reducere a valorii CRFM de aproape 3 ori față de ziua precedentă (Figura 3.4.a).

Vectorul modificărilor valorilor testului CRFM în condiții de creștere industrială a nostocului este același ca și în condiții de laborator. Deosebiri de bază se referă la fenomenele din ziua a 4-a și a 12-a a ciclului vital. Astfel, valoarea CRFM a extractului etanolic în ziua a 4-a în condiții de producere este semnificativ mai mare comparativ cu faza anterioară (de latență), dar nu se deosebește de valorile obținute în zilele următoare. De asemenea, în ziua a 12-a, în condiții de producere, faza de declin nu se manifestă nici din punct de vedere al cantității de biomasă (subcapitolul 3.1.) și nici conform rezultatelor testului CRFM (Figura 3.4.b).

Siguranța biomasei ficologice poate fi apreciată în baza markerilor stresului oxidativ, dintre care a fost selectat testul TBARS – testul de determinare a produselor finale ale peroxidării lipidelor. Prin intermediul acestui test a fost determinată cantitatea de dialdehidă malonică în biomasa de nostoc crescută în condiții de laborator și de producere. Rezultatele pot fi urmărite în figura 3.5.



**Fig. 3.5. Cantitatea de dialdehidă malonică în biomasa de *Nostoc linckia* în condiții de laborator (a) și de producere (b) pe parcursul ciclului de cultivare**

Valorile testului TBARS se încadrează între 9 și 16  $\mu\text{M}$  dialdehidă malonică per gram de biomasă, atât în condiții de laborator, cât și în condiții de producere. În condiții de laborator, cantitățile maxime de DAM se observă în faza de latență și în a doua parte a fazei de creștere exponențială (Figura 3.5.a.), iar în condiții de producere – în faza de latență, faza de accelerare a creșterii și la începutul fazei de creștere exponențială (Figura 3.5.b.). În condiții industriale, zilele 2-5 se caracterizează prin valori scăzute ale nivelului markerului de stres, în timp ce în

condiții de laborator doar jumătate din această perioadă se caracterizează prin valori minime de DAM, și anume zilele 4 și 5 de cultivare.

În zilele 6 și 7 ale ciclului vital, cantitatea DAM atât în condiții de laborator, cât și în condiții industriale crește din nou și atinge un nou salt în ambele variante în cea de-a 7-a zi. Cu toate că vectorul modificărilor este același, amplitudinea acestora este semnificativ mai mare în condiții de laborator. Este important că în condiții industriale cea de-a doua parte a fazei de creștere exponențială și începutul fazei staționare se caracterizează prin fluctuații minime și nivel scăzut al markerului de stres, cantitatea DAM variind nesemnificativ între 11 și 12  $\mu\text{M/g}$  biomasă până la finalul ciclului vital (Figura 3.5.b.).

Astfel, atât în condiții de laborator, cât și în condiții industriale optime biomasa de *Nostoc linckia* se caracterizează prin activitate antioxidantă pronunțată, care variază în dependență de faza ciclului vital, iar markerul stresului oxidativ - dialdehida malonică, este la un nivel scăzut, ceea ce confirmă siguranța atât a biomasei obținute, cât și a derivatelor care pot fi obținute din această biomasă. În același timp, monitorizarea modificării cantității DAM permite evidențierea punctelor vulnerabile ale culturii pe durata unui ciclu de creștere, și anume perioada de latență și începutul fazei de creștere exponențială a culturii. Din punct de vedere tehnologic, aceste puncte necesită control specific de calitate în scopul asigurării unui produs calitativ și sigur.

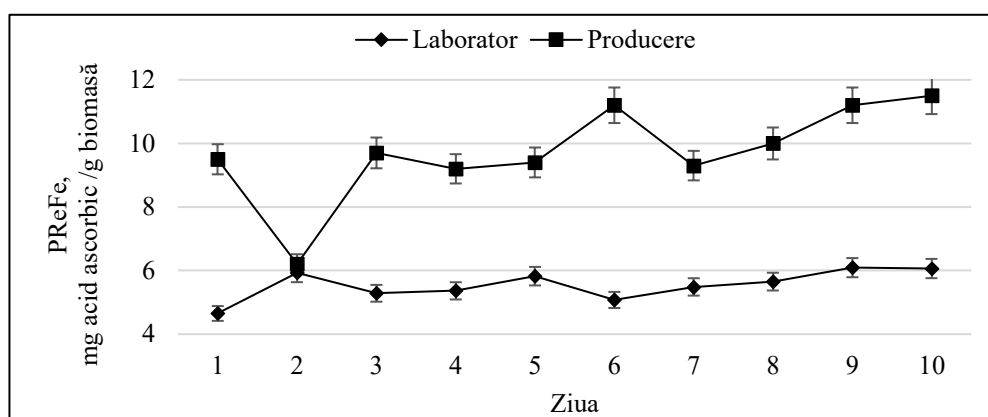
### **3.3. Modificarea activității antioxidante a biomasei de *Arthrospira platensis* pe durata unui ciclu de cultivare**

Tulpina *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 este o tulpină cu proprietăți biotehnologice valoroase și cu o calitate superioară a biomasei produse. Această tulpină este crescută cu succes în condiții industriale, de aceea experiențele au fost efectuate în condiții de laborator și în condiții de producere. Durata standard de cultivare a acestei culturi este de 10 zile, pe durata căroră a fost monitorizată capacitatea antioxidantă a biomasei. În aceste scopuri, de asemenea, ca și în cazul culturii de nostoc, au fost selectate mai multe metode, printre care metoda de determinare a puterii de reducere a ionilor de fier, metodele bazate pe determinarea capacității de inhibare a radicalilor ABTS<sup>+</sup> și DPPH<sup>•</sup>. De asemenea, pe durata ciclului vital a fost monitorizată cantitatea de dialdehidă malonică în calitate de marker al peroxidării lipidelor.

Figura 3.6 reflectă rezultatele obținute în cadrul testului de determinare a puterii de reducere a biomasei de spirulină pe durata ciclului vital în condiții de laborator și în condiții industriale. În condiții optimale de cultivare în laborator, puterea de reducere a biomasei oscilează nesemnificativ pe durata ciclului vital – între 4,50 și 6,06 mg echivalent acid ascorbic per gram biomasă. Unica diferență statistic semnificativă între două zile consecutive ale ciclului

de creștere se atestă în faza de latență, între cultura de 24 și 48 ore ( $p < 0.01$ ). Oscilațiile ulterioare ale puterii de reducere a fierului de către biomasa de spirulină sunt minore și ne semnificative statistic.

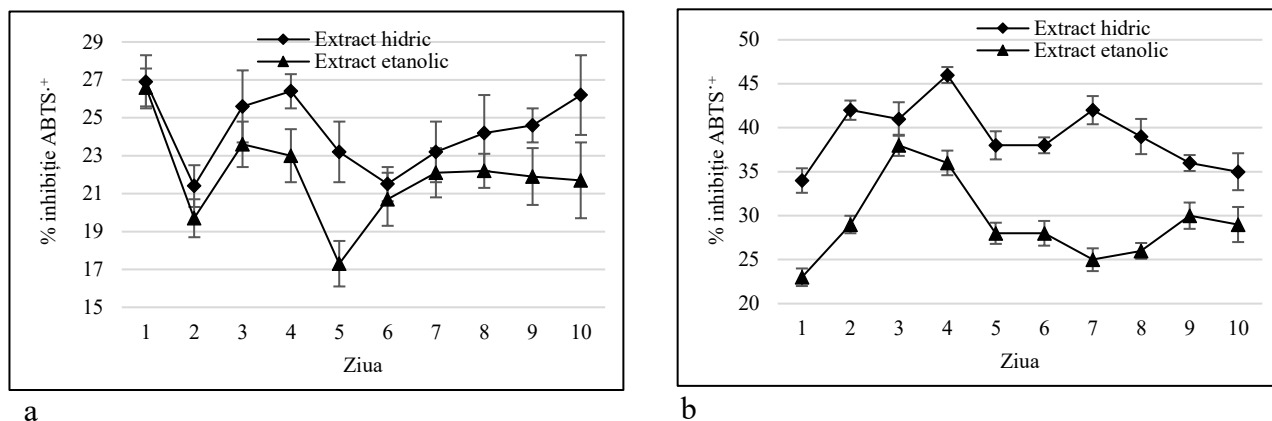
În condiții de producere, puterea de reducere a ionilor de fier a biomasei de spirulină este mai mare cu până la 80% comparativ cu spirulina crescută în condiții de laborator. De asemenea, oscilațiile acestui parametru pe durata ciclului de creștere a spirulinei sunt mai pronunțate și semnificative statistic. Cultura de 24 ore crescută în condiții industriale are o putere de reducere a fierului trivalent de 1,8 ori mai mare decât cultura echivalentă crescută în laborator, în timp ce culturile de 48 ore practic nu se deosebesc între ele. În condiții industriale de cultivare, în faza creșterii exponențiale, puterea de reducere a biomasei de spirulină oscilează cu un maxim pronunțat în ziua a 6-a (11,2 mg echivalent acid ascorbic/g biomasă). În faza staționară, puterea de reducere a spirulinei înregistrează o creștere lentă continuă de la valoarea de 9,3 mg/g acid ascorbic (ziua 7-a) până la valoarea de 11,5 mg/g acid ascorbic, determinată în ziua a 10-a, cu o deosebire statistic veridică între ziua a 7-a / a 9-a, și a 7-a / a 10-a ( $p < 0,01$  în ambele cazuri).



**Figura 3.6. Puterea de reducere a ionilor de fier (III) a biomasei de spirulină pe durata ciclului vital în condiții de laborator și în condiții de producere industrială**

Spirulina, ca și nostocul, manifestă comportament diferit în laborator și în condiții industriale. Nivelul de activitate în condiții de producere este mai înalt comparativ cu condițiile de laborator. A doua diferență se observă în cea de-a doua zi a ciclului vital, care corespunde fazei de accelerare a creșterii. În condiții de laborator are loc o creștere semnificativă a puterii de reducere a biomasei comparativ cu ziua anterioară, iar în condiții de producere se observă diminuarea cu aproximativ 30% a acestui parametru. Capacitatea antiradicalică a spirulinei a fost apreciată în baza testelor ABTS și DPPH, care au fost aplicate pentru două tipuri de extracte din

biomasă – hidrice și etanolice. Rezultatele testului ABTS pentru cultura de spirulină crescută în condiții de laborator și în condiții industriale sunt prezentate în figura 3.7.



**Fig.3.7. Activitatea antiradicalică (testul ABTS) a extractelor hidrice și etanolice din biomasa de spirulină pe durata ciclului vital în condiții de laborator (a) și de producere (b)**

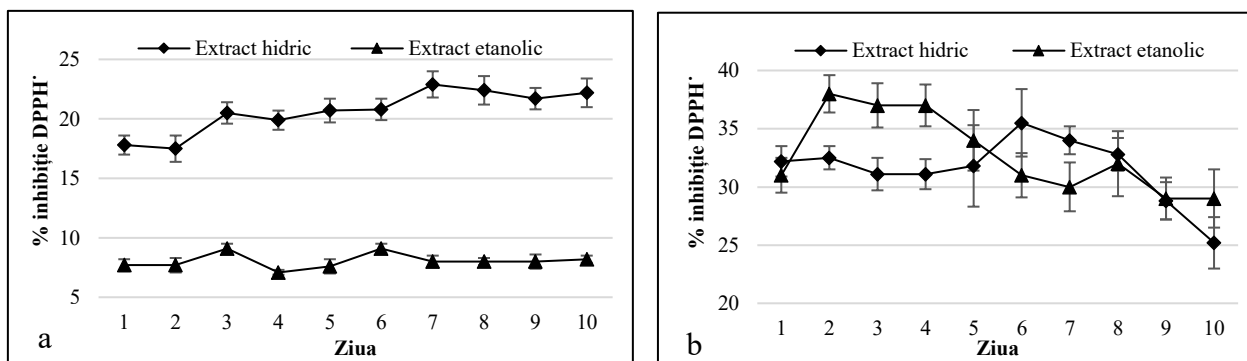
Activitatea antiradicalică a extractelor hidrice și etanolice față de radicalul cation  $ABTS^{+}$  este foarte asemănătoare între cele două tipuri de extracte în ambele condiții de cultivare. În condiții optimale de cultivare în laborator, extractele din cultura de 24 ore, aflată în faza de latență, se caracterizează prin activitate maximală, de aproximativ 27% inhibiție radical. În următoarele 24 ore are loc o scădere pronunțată (cu peste 20% față de ziua anterioară) a activității antiradicalice ale ambelor tipuri de extracte în raport cu radicalul  $ABTS^{+}$ . Activitatea extractelor din biomasa de spirulină din ziua a treia a ciclului vital din nou crește semnificativ comparativ cu ziua a doua, dar nu atinge valorile acesteia. Biomasa din ziua a patra se caracterizează prin activitatea componentelor hidrosolubile și etanol-solubile la nivelul zilei anterioare, după care urmează din nou o scădere a acestui parametru în ambele tipuri de extracte din biomasa de spirulină. Începând cu ziua a 6-a a ciclului vital, activitatea antiradicalică a extractului hidric din spirulină înregistrează o creștere lentă continuă cu valoarea maximă de 26,2 % inhibiție în ziua a 10-a, în timp ce activitatea extractului etanolic din biomasa de spirulină colectată la ziua a 6-a de creștere este semnificativ mai mare comparativ cu ziua anterioară și se menține la valori similare pe toată durata fazei staționare.

În condiții de producere, valorile testului ABTS pentru extractul etanolic sunt încadrate între 23 și 38% inhibiție radical, iar pentru extractul hidric – între 34 și 46% inhibiție. Spre deosebire de condițiile de laborator, în condiții de creștere industrială activitatea antiradicalică a spirulinei la cea de-a doua zi, în faza de latență și trecere la faza de accelerare a creșterii, se atestă o creștere semnificativă a activității antiradicalice în raport cu radicalul  $ABTS^{+}$  comparativ cu ziua anterioară. În schimb, cu referire la următoarele două zile ale ciclului vital



putem spune că în condiții de producere, ca și în cazul condițiilor de laborator, avem o activitate antiradicalică maximală a ambelor tipuri de extracte din biomasa de spirulină. Pe durata fazei de creștere exponențială, activitatea antioxidantă a extractului etanolic tinde spre micșorare, iar în faza staționară crește ușor. Totodată, activitatea extractului hidric din biomasa spirulinei colectată în aceste intervale se modifică în sens opus comparativ cu extractul etanolic. Cu toate aceste diferențe, valorile testului ABTS pentru extractul etanolic din biomasa de spirulină crescută în condiții de laborator și în condiții industriale la finalul fazei de creștere exponențială și în faza staționară sunt foarte apropiate și se încadrează în limitele de 22-30% inhibiție radical cation ABTS<sup>+</sup>. În schimb, activitatea antiradicalică a componentelor hidrosolubile din biomasa de spirulină crescută în condiții de producere, pe durata intervalului analizat mai sus, este mai mare comparativ cu cea a extractului hidric din biomasa crescută în laborator (35-42% inhibiție în producere față de 23-26% în laborator).

În scopul monitorizării modificării capacității antiradicalice a extractelor din biomasa de spirulină, realizată în baza mecanismului transferului de protoni, acestea au fost testate și cu aplicarea testului DPPH. Activitatea antiradicalică față de radicalul DPPH<sup>•</sup> a extractelor hidrice și etanolice din biomasa de spirulină în condiții de laborator și producere sunt prezentate în figura 3.8.



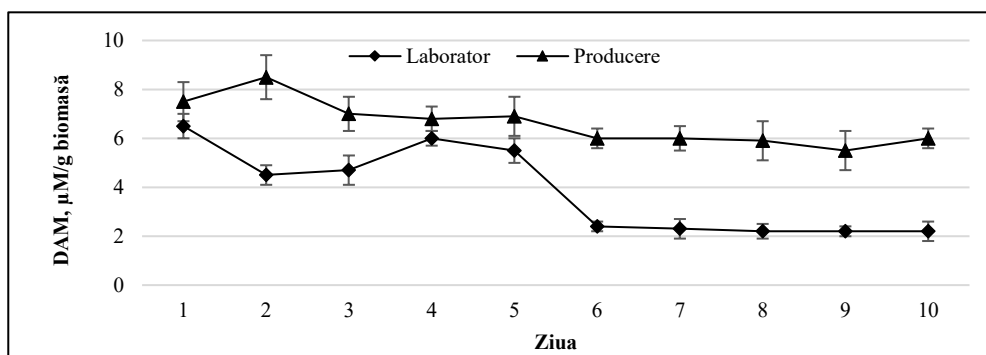
**Fig.3.8. Activitatea antiradicalică (testul DPPH) a extractelor hidrice și etanolice din biomasa de spirulină pe durata ciclului vital în condiții de laborator (a) și de producere (b)**

În condiții optimale de laborator, o activitate antiradicalică înaltă a extractelor etanolice din spirulină a fost observată la începutul și la sfârșitul fazei creșterii exponențiale. În faza creșterii exponențiale au fost înregistrate două maxime ale activității antioxidante a extractelor etanolice în ziua 3 de cultivare și ziua 6 de cultivare (9,1 % inhibiție DPPH<sup>•</sup>). În faza staționară, valorile activității antiradicalice a extractelor etanolice se mențin constante până la finalul cultivării. Activitatea extractelor hidrice din biomasa de spirulină crește lent, dar continuu pe

întreaga perioadă de cultivare. Valoarea maximală a fost atestată în ziua a 7-a (22,9% inhibiție DPPH'), în faza staționară, iar valorile minime – în primele 2 zile de cultivare (17,5 -17,8% inhibiție) (Figura 3.8.a.).

În condiții de producere, activitatea antiradicalică a extractelor etanolic și hidric din biomasa de spirulină este mult mai înaltă. Astfel, în dependență de vârsta culturii, activitatea extractului etanolic se încadrează în limitele de 29 și 38% inhibiție radical DPPH' (comparativ cu condițiile de laborator – 7,1 -9,1% inhibiție). La fel, valori mai mari ale testului DPPH au fost înregistrate și în cazul extractului hidric, care în condiții industriale au fost de 25,2 -35,5% inhibiție (față de 17,5 – 22,9% inhibiție). Activitatea antiradicalică a extractului hidric în condiții de producere a fost stabilă pe durata primelor 5 zile ale ciclului vital, după care în ziua a 6-a se înregistrează cea mai înaltă valoare a testului DPPH. În continuare, activitatea antiradicalică a extractului hidric descrește până în ziua a 10-a, când avem cea mai mică valoare din acest șir (Figura 3.8.b.).

Dialdehida malonică este un marker recunoscut pentru evaluarea stresului oxidativ, concentrația sa fiind un indicator al gradului de peroxidare a lipidelor, proces care depinde de nivelul radicalilor liberi. Nivelul de dialdehidă malonică în biomasa de spirulină se modifică pe durata ciclului vital și este diferit în condiții de laborator și în condiții de producere. Rezultatele obținute sunt prezentate în figura 3.9.



**Figura 3.9. Modificarea conținutului dialdehidei malonice în biomasa spirulinei pe durata ciclului vital**

Dacă pe durata primelor 24 ore din momentul inoculării nivelul DAM nu se deosebește semnificativ în condiții de laborator și în condiții de producere, atunci în zilele următoare situația se schimbă în mod diferit în cele două cazuri. Astfel, în laborator în ziua a doua și a treia nivelul DAM scade, iar în zilele următoare – a patra și a cincea din nou crește. Această creștere este asociată în timp cu prima parte a fazei de creștere exponențială. De la mijlocul fazei de creștere

exponențială și până la sfârșitul ciclului vital nivelul de dialdehidă malonică în biomasa de spirulină este minim și constant.

În condiții de producere, nivelul de peroxidare a lipidelor este mai înalt, comparativ cu condițiile de laborator. În ziua a doua și în zilele 6-10 ale ciclului vital această diferență este de peste două ori. Zilele 4 și 5 ale ciclului vital al spirulinei se caracterizează prin nivel foarte apropiat al DAM în biomasa obținută în laborator și în producere. Din ziua a șasea și până la finalul ciclului cantitatea DAM este puțin mai mică decât în ziua anterioară, dar nu semnificativ, și rămâne de peste 2 ori mai mare decât în biomasa crescută în laborator.

Astfel, pe durata unui ciclu de cultivare al spirulinei au loc multiple modificări ale statutului antioxidant al biomasei. Ca și în cazul nostocului, cele mai sensibile perioade sunt faza *lag*, faza de accelerare a creșterii și prima jumătate a fazei de creștere exponențială. Activitatea antioxidantă și intensitatea proceselor de oxidare în biomasă sunt diferite în dependență de condițiile în care are loc cultivarea spirulinei. În cazul speciei *Arthrospira platensis*, condițiile de producere sunt caracterizate prin procese de oxidare mai intense, comparativ cu cele de laborator.

#### **3.4. Capacitatea antioxidantă a biomasei de *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01 pe parcursul ciclului vital în sistem închis**

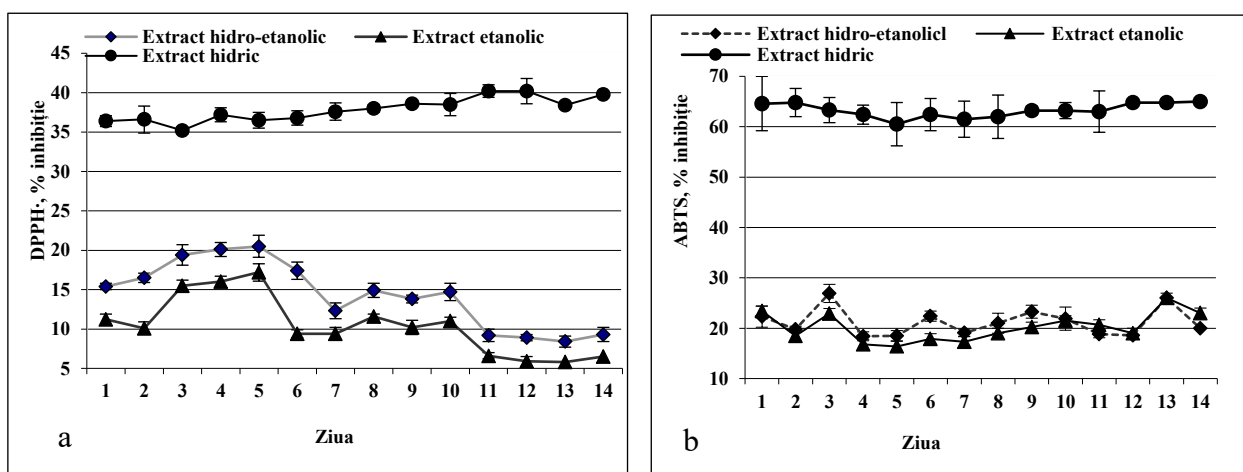
*Porphyridium cruentum* este o microalgă roșie cunoscută și un obiect biotehlogic de perspectivă pentru obținerea diferitor substanțe bioactive, cum ar fi polizaharidele sulfatate, acizii grași polinesaturați cu catenă lungă, în special acidul eicosapentaenoic și acidul arahidonic, ficobiliproteinele, dar și a preparatelor cu efect antioxidant și antiradicalic. Pe lângă cele menționate, biomasa de porfiridium conține cantități biotehnologic importante de carotenoizi, tocoferol, glutatation, agenți de chelare a metalelor și înregistrează o activitate semnificativă a enzimelor antioxidante primare și secundare.

Comparativ cu cianobacteriile, microalga porfiridium are un ciclu vital mai lung, dar procesele care au loc în fiecare dintre fazele ciclului vital se derulează în conformitate cu etapizarea ciclului vital al altor microorganisme. La porfiridium este foarte pronunțată faza de latență. Una dintre explicațiile acestui fenomen este faptul că celulele care constituie inoculul sunt înconjurate de o capsulă polizaharidică consistentă, care le asigură un înalt grad de stabilitate. Capsula este rezultatul acumulării polizaharidelor în cea de-a doua jumătate a fazei de creștere exponențială a culturii. Anume o astfel de cultură servește în calitate de inocul. Mediul nutritiv proaspăt se caracterizează prin viscozitate joasă, ceea ce duce la dizolvarea capsulei. În

acest fel, celulele rămân fără stratul protector și se adaptează mai dificil la noile condiții în care au fost transferate.

În dependență de faza ciclului vital, în celulele microalgelor și cianobacteriilor funcționează diferite mecanisme, care asigură supraviețuirea culturii, iar acest lucru se reflectă în modificarea activității biosintetice. Odată cu parcurgerea ciclului vital de către cultura de porfiridium, aflat într-un sistem închis, încep să acționeze factorii limitativi, unul dintre care este acumularea SRO, care se produce atât în rezultatul proceselor vitale normale, cât și în rezultatul epuizării resurselor nutritive, măririi densității celulelor și acumulării reziduurilor metabolice în mediu. Ca rezultat se modifică și necesitatea celulelor de a asigura protecția antioxidantă, care este asigurată de numeroase componente ale biomasei și acționează la diferite niveluri asupra diferitelor elemente metabolice și de mediu, ce cauzează stresul oxidativ al culturii.

Au fost supuse analizelor trei tipuri de extracte din biomasa de porfiridium: extractul hidric, extractul hidro-etanolic cu concentrația alcoolului de 45% și extractul etanolic. Modificarea în dinamică a capacității de inhibare a radicalilor DPPH<sup>•</sup> și ABTS<sup>•+</sup> pe durata ciclului vital al microalgei este prezentată în figura 3.10.



**Fig. 3.10. Activitatea antiradicalică față de radicalii DPPH<sup>•</sup> (a) și ABTS<sup>•+</sup> (b) a extractelor din biomasa de *Porphyridium cruentum* pe parcursul ciclului vital**

În figură pot fi observate fluctuații ale activității antioxidante în două tipuri de extracte – cel etanolic și cel hidro-etanolic. Valorile testului de inhibiție a radicalului DPPH<sup>•</sup> în aceste două extracte pe durata ciclului vital oscilează între 5 și 20% în laborator și între 16 și 27% în condiții de producere industrială. Fluctuațiile valorice în cazul testului DPPH<sup>•</sup> pentru extractul etanolic și cel hidro-etanolic urmează același pattern al modificărilor. Creșterea valorilor capacității de inhibiție a radicalului DPPH<sup>•</sup> în extractele etanolic și hidro-etanolic are loc până la a cincea zi de cultivare (care corespunde fazei creșterii exponențiale), după care urmează o scădere a activității

antiradicalice și menținerea acestor valori până la ziua a zecea de cultivare, care corespunde trecerii culturii în faza staționară. Faza staționară este caracterizată prin valori joase, dar stabile ale capacității antiradicalice a extractelor hidro-etanolic și etanolic din porfiridium. Capacitatea de reducere a radicalului DPPH' a extractelor din biomasa de porfiridium în faza staționară este mai joasă chiar și față de activitatea extractelor din biomasa aflată în fazele inițiale ale ciclului vital și este de cel mult 6,5% inhibiție în extractul etanolic, și 9,3% inhibiție în extractul hidro-etanolic (Figura 3.10.a.).

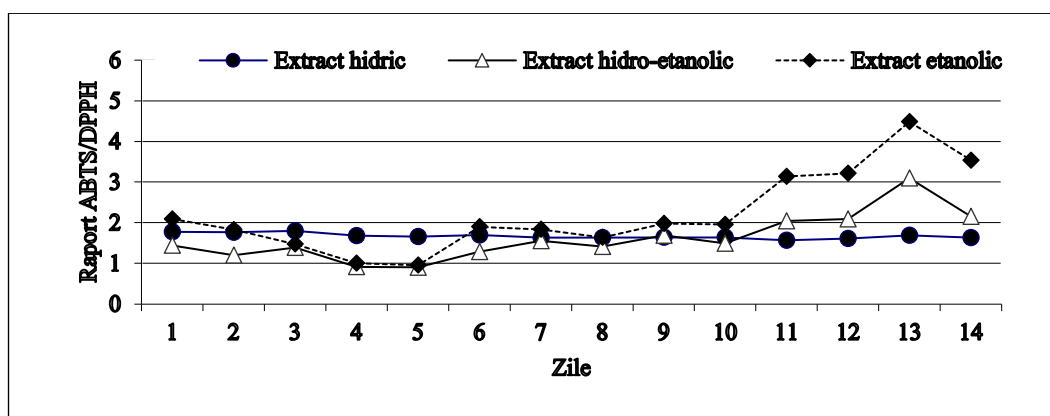
Activitatea antiradicalică în raport cu radicalul DPPH' a extractului hidric este net superioară comparativ cu activitatea celor două extracte analizate mai sus. Astfel, pe durata ciclului vital, valorile acestui test în extractul hidric oscilează în limite strânse – 35,1 – 40,2% inhibiție. Diferențele observate între valori nu sunt veridice din punct de vedere statistic, deci putem afirma că capacitatea de inhibiție a radicalului DPPH' rămâne constantă în extractul hidric din biomasă pe durata întregului ciclu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* (Figura 3.10.a).

În figura 3.10.b sunt prezentate rezultatele testului ABTS obținute pentru cele trei tipuri de extracte din biomasa de porfiridium pe durata ciclului vital. Se vede că activitatea extractelor etanolic și hidro-etanolic variază pe durata ciclului de creștere în limitele valorilor 16,4 și 26,9% inhibiție, diferențele dintre activitatea celor două extracte fiind semnificativă statistic pe durata fazei de creștere exponențială și în ultima zi de monitorizare a culturii – faza staționară ( $p < 0,05$  pentru toate valorile zilnice menționate). Valoarea maximală a testului ABTS în cazul extractului etanolic și celui hidro-etanolic a fost înregistrată la începutul fazei de creștere exponențială, fiind de 22,6% inhibiție în extractul etanolic și 26,9% inhibiție în extractul hidro-etanolic. Un alt maxim al valorilor testului ABTS pentru cele două tipuri de extracte a fost înregistrat în ziua a 13-a (faza staționară). Activitatea antiradicalică în raport cu radicalul ABTS<sup>•+</sup> a extractului hidric din biomasa de porfiridium este mult mai mare, atât comparativ cu alte tipuri de extracte, dar și față de activitatea extractului hidric față de radicalul DPPH', testul având valori de la 60,5 și 64,8% inhibiție, iar diferențele observate pe durata ciclului vital sunt nesemnificative din punct de vedere statistic (Figura 3.10. b).

Atât testul ABTS, cât și DPPH sunt teste considerate nespecifice, adică care pot fi aplicate atât în sisteme biologice, cât și în cele non-biologice, fiind realizate în baza unor radicali universali. În același timp, testele evidențiază compușii care își realizează activitatea în baza unor reacții diferite, fapt care explică diferențele valorice dintre aceste două teste.

În scopul aprecierii aportului diferitor componente în activitatea antiradicalică a biomasei este util de a analiza raportul dintre valorile testului ABTS și valorile testului DPPH. Rezultatele

pot fi urmărite în Figura 3.11. În cazul extractului hidric, avem o constanță a valorilor raportului respectiv pe durata întregului ciclu de creștere a culturii, ceea ce poate fi interpretat ca faptul, că pe durata ciclului vital componentele biomasei cu efect antiradicalic realizat în baza reacțiilor cu transfer de electroni și celor care acționează în baza transferului de protoni rămâne constant și echilibrat. Altfel stau lucrurile în cazul extractului etanolic și extractului hidro-etanolic. Raportul dintre valorile testului ABTS/DPPH se modifică în aceste două tipuri de extracte pe durata ciclului vital, dar respectă același model de variație. Pentru primele 10 zile valorile raportului variază între 0.9 și 2.0, prevalența fiind de partea activității manifestate în baza reacțiilor cu transfer de electroni. Doar în zilele 4 și 5 ale ciclului vital extractele din biomasa de porfiridium manifestă o activitate practic egală în raport cu radicalul DPPH' comparativ cu radicalul ABTS<sup>•+</sup>. În rest, până în ziua a 10-a inclusiv, activitatea extractelor hidro-etanolic și etanolic în raport cu radicalul ABTS<sup>•+</sup> este de 1,2-1,8 mai mare comparativ cu activitatea în raport cu radicalul DPPH'. Pe durata zilelor 11-14 se observă o creștere semnificativă a valorilor acestui raport cu o valoare maximă pentru ziua a 13-a a ciclului de cultivare. În baza acestor rezultate putem presupune o creștere semnificativă a ponderii componentelor extractile ale biomasei de porfiridium cu un mecanism antiradicalic bazat pe transfer de electroni, fenomen specific pentru procesele fiziologice normale în celulele vii.

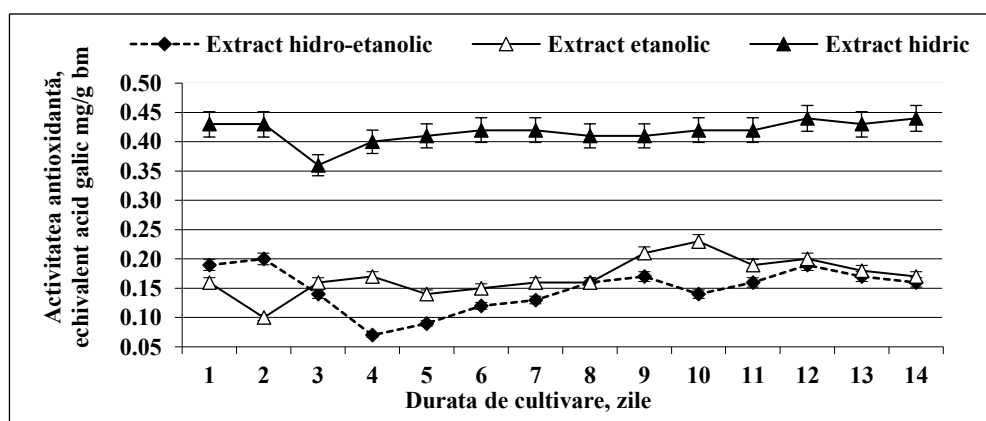


**Fig. 3.11. Raportul valorilor testelor ABTS/DPPH pentru extractele din biomasa de *Porphyridium cruentum* pe durata ciclului vital**

Un alt test de determinare a activității antioxidante a extractelor cu componență complexă este testul de reducere a reagentului Folin-Ciocalteu (FC). Acesta este aplicat atât pentru aprecierea activității antioxidante generale a extractelor policomponente, cât și pentru cuantificarea conținutului total de fenoli în aceste extracte. Rezultatele acestui test pentru cele trei tipuri de extracte din biomasa de porfiridium pe durata ciclului vital, exprimate în echivalent

de acid galic per gram de biomasă sunt prezentate în figura 3.12. Activitatea extractului hidric este semnificativ mai mare comparativ cu activitatea extractelor etanolic și hidro-etanolic. De asemenea, valorile testului în acest tip de extract sunt foarte apropiate unele de altele pe întreaga durată a ciclului și se înscriu între valorile de 0.40 – 0.45 mg acid galic per gram de biomasă uscată de porfiridium. Doar în cazul celei de-a 3-a zi de cultivare se atestă o valoare semnificativ mai joasă a activității antioxidante în baza testului Folin-Ciocalteu.

Extractele etanolic și hidro-etanolic au arătat valori mult mai joase ale testului FC, încadrându-se în limita de la 0,07 la 0,23 mg acid galic per g biomasă. Cea mai înaltă activitate a extractului hidro-etanolic este caracteristică extractelor obținute din biomasa aflată în faza de latență și în faza staționară de creștere. Mai mult, extractul are cea mai mare activitate în faza de latență a culturii. De asemenea, valori înalte ale testului FC au fost înregistrate la finalul fazei de creștere exponențială – începutul fazei staționare.



**Fig. 3.12. Activitatea antioxidantă stabilită în baza testului de reducere a reagentului Folin-Ciocalteu în extractele din biomasa de *Porphyridium cruentum***

Anterior a fost stabilit că în cazul culturii de porfiridium, testul de reducere a reagentului Folin-Ciocalteu exprimă mai degrabă cantitatea compușilor fenolici în extract, decât activitatea antioxidantă generală a extractului obținut (Sadovnic, 2014). În cazul prezentat în lucrare au fost analizate alte tipuri de extracte față de cele din lucrarea citată, de aceea am recurs la analiza corelațională a rezultatelor testului ABTS cu cele ale testului de reducere a reagentului FC. În cazul extractului hidric, coeficientul de corelație a fost  $r = -0,37$ , în cazul extractului hidro-etanolic –  $r = 0,51$ , iar în cazul extractului etanolic –  $r = 0,32$ . Rezultatele obținute confirmă lipsa unei corelări între valorile acestor două teste, ceea ce susține concluzia exprimată mai sus. Testul de reducere a reagentului Folin-Ciocalteu exprimă activitatea antioxidantă a componentelor de

natură fenolică din biomasa de porfiridium, în timp ce testul ABTS permite evidențierea activității unui spectru mai larg de compuși.

Astfel, a fost stabilit că pe durata ciclului vital al culturii de *Porphyridium cruentum* activitatea antioxidantă variază semnificativ, reflectând modificări atât ale activității vitale, cât și modificări ale componenței biochimice a biomasei. Aceste variații permit identificarea punctelor critice în care se produc modificări semnificative în cultură și care pot fi luate în considerare drept puncte importante pentru aplicarea procedurilor de stimulare a culturii în scopuri biotehnologice.

### **3.5. Dinamica parametrilor activității antioxidante a biomasei de *Haematococcus pluvialis* CNMN-AV-05 pe parcursul ciclului vital**

Cel mai semnificativ dintre studiile efectuate în laboratorul Ficobiotehnologie este exemplul culturii de *Haematococcus pluvialis*. În cazul acestei culturi, extractele etanolice din biomasă sunt practic monocomponente, deoarece în cazul fazei de celule verzi acestea sunt reprezentate prin  $\beta$ -caroten, iar în cazul aplanosporilor – prin astaxantină. În asemenea condiții între valorile testului ABTS și conținutul de carotenoizi în extracte este o corelație puternică, coeficientul de determinare fiind mai mare de 0,9. În acest caz este absolut suficientă determinarea acestor doi carotenoizi la etapele respective pentru a putea face o concluzie reală despre starea culturii, fie în condiții normale, fie în cele de stres oxidativ indus.

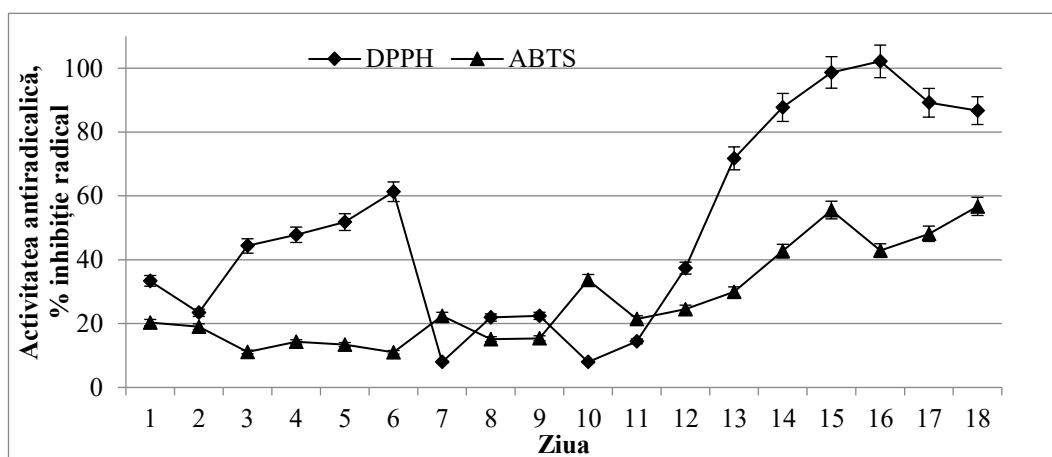
Ciclul vital al microalgei verzi *Haematococcus pluvialis* include două stări diferite: mobilă (celule verzi biflagelate) și staționară (ciști verzi, bruni și roșii). Etapa celulelor verzi mobile este etapa de multiplicare a celulelor și de sinteză a pigmentilor fotosintetici. În ciștii bruni începe transformarea carotenului în astaxantină, care finalizează în etapa de ciști roșii. La toate etapele de dezvoltare a hematococului celulele conțin componente antioxidante. În celulele verzi predomină clorofila, luteina,  $\beta$ -carotenul, violaxantina și neoxantina, se sintetizează lipidele, majoritatea având în componență acizi grași omega-3. Pentru ciștii bruni este caracteristic un complex de carotenoizi, raportul cărora este în permanentă fluctuație. Ciștii roșii conțin în calitate de carotenoid dominant astaxantina, care este un superantioxidant.

Din punct de vedere biotehnologic, este foarte important de a stabili în ce condiții și la ce etapă de dezvoltare putem obține o biomasă calitativă, din care putem extrage un complex antioxidant eficient. Determinarea punctelor critice pe durata ciclului vital oferă posibilități de a automatiza procesele biotehnologice și de a obține produsul dorit în condiții dirijate. Monitorizarea evoluției modificărilor în activitatea antioxidantă a biomasei algale pe durata ciclului vital este posibilă prin determinarea zilnică a capacității antioxidante a biomasei algale.



În cazul respectării condițiilor descrise mai sus, etapa celulelor verzi mobile este de 9 zile. Anume aceste 9 zile formează ciclul vital clasic, cunoscut pentru culturile de microorganisme în sisteme închise. Perioada primelor 48 ore prezintă faza *lag* în care are loc inițierea germinării ciștilor roșii și adaptarea celulelor verzi mobile. Următoarele 48 ore constituie faza de accelerare a germinației, după care urmează faza creșterii exponențiale (zilele 5-8). Ziua a 9-a constituie faza de încetinire a creșterii – anume acum se intervine cu aplicarea luminii de intensitate înaltă, pentru a induce formarea ciștilor. Zile 10-16 constituie faza staționară cu 2 etape diferite. În zilele 10-13 ale ciclului vital are loc procesul de transformare a carotenului în astaxantină și formarea ciștilor brunii. Perioada de formare a ciștilor roșii durează 3 zile (zilele 14-16 ale ciclului vital).

Activitatea antiradicalică a extractelor din biomasa de *Haematococcus pluvialis* pe durata ciclului vital a fost determinată prin aplicarea testelor de reducere a radicalului-cation ABTS și radicalului DPPH. Rezultatele testelor sunt prezentate în Figura 3.13.



**Fig. 3.13. Activitatea antioxidantă (teste DPPH, ABTS, % inhibiție) a extractului etanolic din biomasa de *H. pluvialis*, pe parcursul perioadei de cultivare**

Activitatea antiradicalică determinată în baza testului ABTS este la un nivel de aproximativ 20% inhibiție în primele 48 ore după inoculare. La această etapă cultura de haematococcus prezintă un mix care include un număr considerabil de ciști care mai conțin astaxantină și celule verzi mobile tinere care trec printr-o perioadă de adaptare la noile condiții. La ziua a patra, când are loc inițierea proceselor de diviziune celulară, practic este epuizată rezerva de astaxantină, celulele verzi devin mai vulnerabile, iar toate rezervele lor sunt orientate spre inițierea multiplicării celulare care urmează în etapa următoare. În etapa creșterii exponențiale avem o mărire lentă, dar stabilă a activității antioxidante a biomasei. În această

perioadă, procesele biosintetice sunt la cota maximă. Multe dintre produsele biosintezei posedă proprietăți antioxidante pronunțate.

Căderea bruscă care se înregistrează la ziua a 10 de cultivare este cauzată de stresul oxidativ indus. În următoarele zile (etapa ciștilor bruni) urmează o creștere pronunțată a activității antiradicalice a extractelor din *H. pluvialis*, determinată de transformarea treptată a carotenului în astaxantină. Etapa ciștilor roșii este caracterizată prin procese specifice de formare a învelișurilor celulare, ceea ce contribuie la micșorarea activității antiradicalice a extractelor, dar care revine la valori înalte la ziua a 18-a a ciclului.

Între conținutul total de carotenoizi și activitatea reducătoare a extractului etanolic în raport cu radicalul cation  $ABTS^{\cdot+}$ , obținut din biomasa de hematococ la etapa celulelor mobile verzi, în perioada de germinare a ciștilor roșii, utilizați în calitate de inocul (primele 4 zile) se observă o dependență corelațională puternică. La această etapă se modifică peretele celular, are loc activarea proceselor biosintetice datorită mediului de cultivare bogat în nutrienți, celulele conțin un raport variabil de carotenoizi, caracterizat prin scăderea treptată a cantității de astaxantină și creșterea cantității de  $\beta$ -caroten, și a sumei carotenoizilor. Aceeași tendință se păstrează și în următoarele 5 zile. În etapa de ciști bruni este destul de dificil de a stabili legăturile între activitatea antioxidantă prin reducerea radicalului  $ABTS^{\cdot+}$  a extractelor etanolice și conținutul carotenoizilor în ele din cauza labilității și reversibilității proceselor de transformare, care se înregistrează pentru componentele din această clasă.

Activitatea de inhibiție a radicalului  $DPPH^{\cdot}$ , de asemenea, se modifică în limite largi pe durata ciclului vital al culturii de haematococcus. Valori de peste 40% inhibiție radical în cazul acestui test au fost înregistrate pentru extractele din biomasa microalgă aflată la zilele 3-6 și 13-18 ale ciclului vital. Comparativ cu momentul inoculării, peste 24 ore are loc o scădere de la 33,3% inhibiție la 23,4% a capacității de inhibare a extractului etanolic din biomasă. Următoarele 24 ore se remarcă printr-o creștere a activității antiradicalice în raport cu radicalul  $DPPH^{\cdot}$ , până la 44,4% inhibiție. Activitatea înaltă a extractelor este specifică și pentru extractele din biomasa colectată în următoarele 4 zile, după care aceasta scade brusc până la aproximativ 8% inhibiție radical. Revenirea la valori înalte ale activității antiradicalice are loc abia la ziua a 13-a ciclului vital, atingând cotele maxime în ziua 15 și 16 ale ciclului. Rezultatele acestui test nu corelează cu conținutul pigmentilor carotenoizi, care prezintă principalul interes din punct de vedere biotehnologic, fiind mai puțin informativ în contextul dat.

Astfel, ca și în cazul celorlalte culturi ficologice studiate, aplicarea testelor adecvate de evidențiere a modificărilor în statutul antioxidant al *Haematococcus pluvialis* permite evidențierea fazelor specifice caracterizate prin vulnerabilitate maximă, dar și prin

susceptibilitate maximă în raport cu diferite intervenții externe, inclusiv cele tehnologice aplicate în scopuri de stimulare. Rezultatele obținute ne permit să afirmăm că etapa de celule mobile verzi din cadrul ciclului de cultivare al algei verzi *Haematococcus pluvialis* este potrivită pentru studiul variațiilor statutului antioxidant al culturii. Aplicând doi parametri, care prezintă dependență corelațională puternică (activitatea antiradicalică în raport cu radicalul cation ABTS<sup>•+</sup> și conținutul de carotenoizi) reducem posibilitatea erorilor în interpretarea rezultatelor obținute, mai ales atunci, când studiem influența diferitor factori externi, inclusiv cei care țin de condițiile tehnologice industriale.

### **3.6. Concluzii la capitolul 3.**

Delimitarea fazelor ciclului vital al cianobacteriilor și microalgelor se face în conformitate cu metodologia clasică în baza ratei de creștere și a timpului de generație, care în cazul culturilor ficologice diferă mult în comparație cu culturile bacteriene tipice. La modul practic, curba de creștere a culturilor microbiene în ciclu închis exprimă dependența numărului de celule/biomasa de timp. Din punct de vedere biotehnologic, este important ca în cadrul tehnologiilor de creștere a microalgelor și cianobacteriilor, de rând cu cantitatea de biomasă, să fie urmărită dinamica parametrilor productivi și de siguranță. Aplicarea unei game de metode de stabilire a activității antioxidante, realizate în baza diferitor mecanisme și în baza diferitor compuși cu activitate biologică pronunțată ne-a permis să obținem un tablou amplu, care descrie modificările ce au loc la nivel de asigurare a unui statut antioxidant stabil la microalgele și cianobacteriile de interes biotehnologic. Curbele de modificare a activității antioxidante obținute prin aplicarea a mai multor teste standard, ca aspect nu repetă curbele de creștere a masei celulare, dar prezintă zone specifice, în care parametrii monitorizați diferă semnificativ de restul datelor din cadrul seriilor respective.

În acest capitol au fost analizate detaliat curbele de modificare a activității antioxidante a patru obiecte ficologice, ce reprezintă două domenii și trei filumuri diferite ale lumii vii. În pofida distanței evolutive enorme dintre aceste organisme, modul de manifestare a variațiilor statutului antioxidant pe durata unui ciclu de creștere la tulpinile analizate are multe elemente comune. Faza de latență la toate speciile studiate se evidențiază prin particularități specifice, care fiind diferite la fiecare obiect evidențiază într-un mod sau altul această etapă a ciclului vital. O altă particularitate care se evidențiază din datele analizate constă în aceea că la trecerea culturii de la o fază de creștere la alta se produc anumite salturi ale valorilor parametrilor monitorizați, care în opinia noastră reflectă restructurări funcționale ale celulelor microalgelor și cianobacteriilor. Din punct de vedere tehnologic, aceste puncte pot fi potrivite pentru aplicarea

manipulărilor în scop de dirijare a proceselor biosintetice în culturile ficologice. Cele expuse mai sus pot fi generalizate în următoarele concluzii:

1. Activitatea antioxidantă a culturilor de microalge și cianobacterii studiate se modifică pe durata unui ciclu de cultivare în sistem închis în mod diferit în dependență de cultură, amplitudinea modificărilor fiind mai mică la cianobacterii.
2. Oscilațiile activității antioxidante pe durata ciclului vital al microalgelor și cianobacteriilor sunt determinate de procesele fiziologice, inclusiv de cele biosintetice, în celule la fiecare etapă a ciclului celular. Creșterea activității antioxidante odată cu avansarea în timp a culturii este asociată cu acumularea componentelor funcționale ale celulelor, iar scăderea activității antioxidante – cu acumularea produselor de rezervă. Modificarea bruscă a capacității antioxidante a culturilor este asociată cu trecerea acestora de la o stare funcțională la alta și corespunde, în special, cu trecerea de la o fază a ciclului vital la alta.
3. Cunoașterea particularităților de modificare a proprietăților antioxidante a biomasei microalgale și cianobacteriene pe durata ciclului vital este crucială pentru implementarea diferitor procedee biotehnologice de stimulare a culturilor ficologice și pentru obținerea unei biomase valoroase, sigure pentru consum.

Rezultatele și concluziile expuse în acest capitol au fost publicate în mai multe lucrări științifice, prezentate și discutate cu comunitatea academică la manifestări științifice internaționale [3, 4, 14, 15, 20, 29, 95, 110, 111].

#### 4. STRESUL TEHNOLOGIC LA CIANOBACTERIILE ȘI MICROALGELE DE INTERES INDUSTRIAL

Condițiile de stres de orice natură impun modificări semnificative în activitatea vitală a microalgelor și cianobacteriilor, procesele fiziologice fiind orientate spre adaptarea culturilor la condițiile specifice. Ca rezultat, atât componența biochimică, cât și activitatea antioxidantă a biomasei obținute se modifică comparativ cu condițiile considerate drept optimale pentru fiecare cultură. Variațiile de temperatură, intensitate și durată a perioadei de lumină, nivelul de salinitate a mediului nutritiv și aplicarea stimulatoarelor – acestea sunt principalele provocări la care trebuie să răspundă culturile de cianobacterii și microalge crescute în condiții industriale. În acest capitol sunt analizate reacțiile de răspuns ale culturilor de *Arthrospira platensis*, *Nostoc linckia* și *Porphyridium cruentum* la diferite tipuri de stres asociat procesului tehnologic.

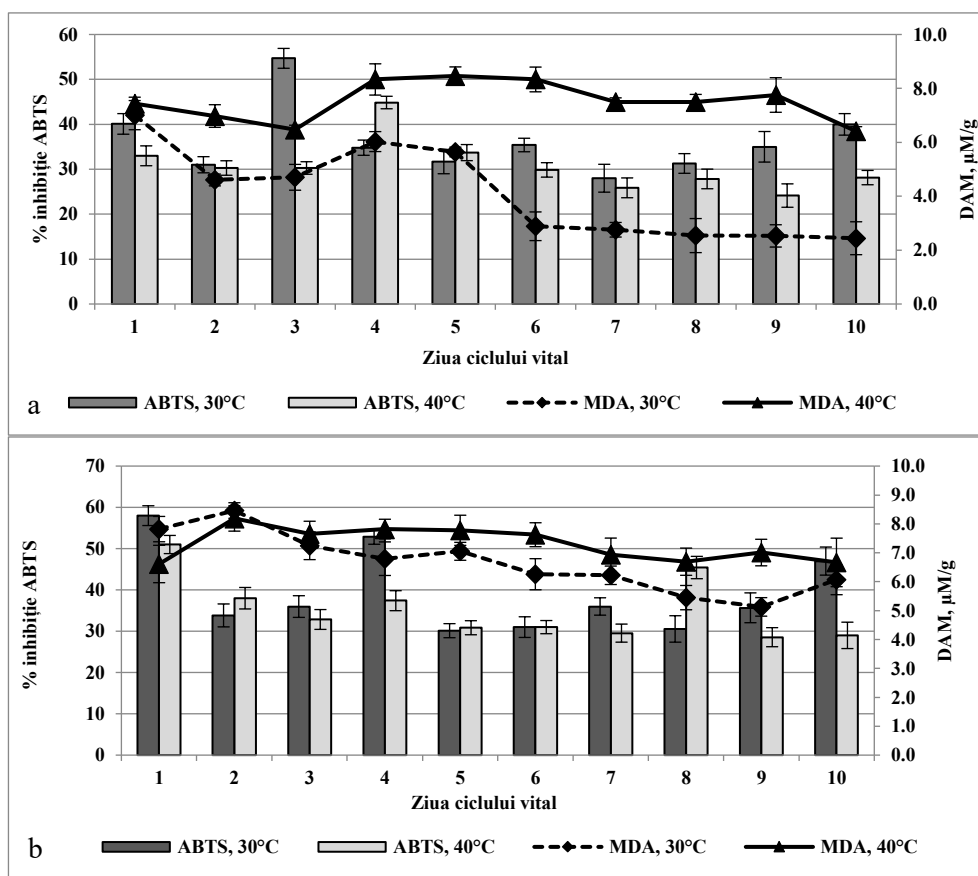
##### 4.1. Influența stresului termic asupra tulpinii tehnologice *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11

*Arthrospira platensis* este o specie activ crescută în diferite tipuri de bioreactoare, inclusiv în cele de tip deschis, în multe țări ale lumii. Optimul de creștere pentru majoritatea tulpinilor este de aproximativ 30°C. În această lucrare, ne-am propus să observăm modificarea componenței biomasei de spirulină în cazul creșterii ei în condiții de stres termic (creștere la o temperatură de 40°C) în condiții de laborator și în condiții industriale, în bioreactoare deschise.

În condiții de laborator, *A. platensis* a fost crescută în baloane conice din sticlă cu volumul de 250 ml, pe agitator rotativ setat la 130 rotații per minut, pe mediul nutritiv SP-1. În cazul stresului termic, spirulina a fost menținută la temperatura de 40°C. Iluminarea culturii a fost continuă cu intensitatea de 50  $\mu\text{M}$  fotoni·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, pH-ul de 9-11. În condiții de producere, cianobacteria a fost crescută la aceeași temperatură, iluminare și pH, pe același mediu nutritiv, la amestecare continuă în tancuri deschise cu capacitatea de 60 l. Durata cultivării a fost de 10 zile, ceea ce constituie un ciclu vital. La intervale de 24 ore au fost preluate probe pentru efectuarea testelor biochimice. În calitate de control a servit cultura de spirulină crescută în condiții termice optime. Pe durata ciclului au fost monitorizați parametrii cheie ai calității biomasei și ai activității antioxidante a acesteia.

În figura 4.1 sunt prezentate rezultatele cu referire la conținutul de dialdehidă malonică în biomasa de spirulina și activitatea antioxidantă a extractelor pe durata ciclului vital în condiții de

laborator (Figura 4.1 A) și în condiții de producere industrială (Figura 4.1 B), în condiții optime și la temperatură ridicată.



**Fig. 4.1 Activitatea antioxidantă și cantitatea de dialdehidă malonică în biomasa de *Arthrospira platensis* în condiții de stres termic pe durata ciclului vital: (a)- condiții de laborator; (b) – condiții industriale**

Compararea rezultatelor obținute sugerează concluzia că condițiile industriale de producere sunt din start condiții de stres, comparativ cu condițiile de laborator. După primele 24 ore după inoculare (în faza *lag*) valorile DAM în condiții de temperatură optimă sunt aproximativ aceleași în laborator și la producere (7.01 μM/g în laborator și 7.82 μM/g în producere). În continuare, însă, tabloul se schimbă: în condiții de laborator, la trecerea culturii în faza de accelerare a creșterii, nivelul de DAM scade semnificativ, până la 4,6 μM/g, iar în condiții de producere acest parametru este în creștere – la ziua a doua de cultivare nivelul DAM este de 8.46 μM/g. În condiții de laborator, la trecerea culturii în faza de creștere exponențială (ziua a 4-a și a 5-a de creștere), se observă un nou salt al conținutului de DAM, pe când în condiții de producere acest parametru este în scădere continuă. Cu toate acestea, în condiții de producere în zilele 4 și 5 cantitatea DAM este veridic mai înaltă decât în condiții de laborator

( $p < 0.001$ ). La cea de-a 10-a zi de cultivare, când se face colectarea finală a biomasei, conținutul DAM în biomasa obținută în condiții de producere este de 3 ori mai înalt comparativ cu biomasa crescută în laborator.

Temperatura de 40°C duce la intensificarea procesului de peroxidare a lipidelor și la acumularea produsului final – DAM. Fluctuațiile valorilor acestui parametru pe durata ciclului vital în condiții de laborator și de producere repetă fluctuațiile respective, observate la temperatura optimă. Trebuie să menționăm că cultura de *A. platensis* crescută în laborator este mai sensibilă la temperatura înaltă comparativ cu cea crescută în condiții industriale. Cu toate că în ambele cazuri la temperatura de 40°C nivelul DAM este veridic mai mare decât la temperatura de 30°C ( $p < 0.001$ ), discrepanța este mai pronunțată în condiții de laborator. Astfel, în faza staționară (ziua 7-10), în condiții de laborator, la temperatura de 40°C, DAM este de 2.63-3.07 ori mai mare decât la temperatura de 30°C, iar în condiții de producere creșterea DAM este de 1.1-1.37 ori ( $p < 0.05$ ).

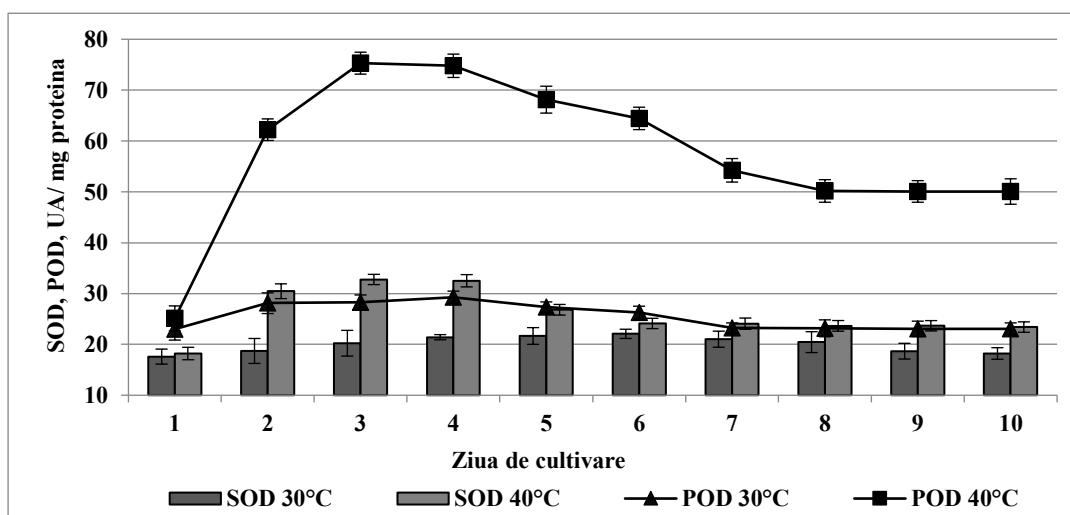
Activitatea antioxidantă a extractelor hidrice din biomasa de spirulină a fost determinată utilizând testul ABTS. Valorile testului în extractele din biomasa crescută la temperatură optimă de 30°C în condiții de laborator variază pe durata ciclului vital în limitele de 28.0 și 54.7% inhibiție radical cation ABTS<sup>+</sup>, iar în condiții de producere – între 31.0 și 58.0% (Figura 4.1). Putem evidenția începutul fazei de creștere exponențială, care în condiții de laborator este la ziua a treia, iar în condiții de producere – cu întârziere, la ziua a 4-a a ciclului vital. În acest moment de timp se înregistrează o scădere pronunțată a activității antioxidante a extractelor hidrice din biomasa crescută la temperatură de 40°C comparativ cu cea crescută la temperatură optimă. În condiții de laborator, activitatea extractului hidric din biomasa crescută la 30°C este de 1.8 ori mai mare comparativ cu cea a extractului din biomasa crescută la 40°C.

În condiții optime, perioada ciclului vital, când cultura trece la faza creșterii exponențiale, este caracterizată prin rezistență sporită a celulelor față de acțiunea diferitor factori chimici. Anume din aceste considerente se recomandă ca, în caz de necesitate, diferiți stimulatori să fie adăugați la mediul nutritiv în care crește spirulina nu la începutul ciclului, ci anume în faza creșterii exponențiale. Rezultatele prezentate aici sugerează faptul că, în condiții de stres termic, rezistența culturii la acțiunea radicalilor liberi la începutul fazei de creștere exponențială este practic la același nivel cu perioadele învecinate, iar perioada respectivă posibil să nu mai ofere siguranța observată în cazul temperaturii normale.

La finele ciclului vital, atât în condiții de laborator, cât și în condiții de producere (ziua 9-10) se observă o scădere veridică a activității antioxidante a extractelor hidrice din biomasa de spirulină crescută în condiții de temperatură înaltă. Astfel, în baza rezultatelor prezentate, putem

afirma că temperatura înaltă – de 40°C prezintă un factor de stres pentru tulpina tehnologică de *Arthrospira platensis*. Aceasta se confirmă prin creșterea cantității de DAM în biomasă pe durata întregului ciclu vital și prin scăderea activității antioxidante, realizate în baza schimbului de electroni, care se observă în special la începutul fazei de creștere exponențială și la finele fazei staționare.

Enzimele antioxidante sunt cunoscute ca enzime de prima linie de apărare a celulelor vii de acțiunea nocivă a radicalilor liberi. Este demonstrat că acțiunea diferitor factori de mediu duce la modificarea activității acestor enzime în celulele de spirulină. Astfel, iradierea cu raze gama a celulelor de spirulină în doza de până la 2 kGy intensifică activitatea SOD de peste 2 ori și a POD – de 3 ori [390]. Diferite valori ale pH-ului în intervalul 8-10 nu provoacă modificări ale activității SOD, în schimb duce la scăderea de peste 1,5 ori a activității POD. La creșterea ulterioară a pH-ului mai sus de 10 are loc mărirea activității SOD și scăderea activității enzimice în raport cu peroxidul de hidrogen a enzimei POD [214]. O creștere a activității SOD de peste 6 ori și a activității POD de peste 10 ori se atestă în biomasa de spirulina crescută în prezența unei cantități de până la 8mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [32]. Exemplele aduse demonstrează că în cazul spirulinei, ca și la alte organisme vii în condiții de stres oxidativ, are loc modificarea activității enzimelor antioxidante. Pornind de la aceasta, ne-am pus drept scop să urmărim modificările activității SOD și POD la spirulină pe durata ciclului vital în condiții optime și la temperatură ridicată. Rezultatele sunt prezentate în Figura 4.2.



**Fig. 4.2. Activitatea enzimelor antioxidante în biomasa de *Arthrospira platensis* în condiții de stres termic/laborator pe durata ciclului vital**

În condiții optime la inoculare, activitatea SOD în biomasa de spirulină constituie 17,6 UA/mg proteină și activitatea POD – 23,0 UA/mg proteină. Perioada *lag* este caracterizată printr-o creștere ușoară a activității acestor enzime. Nivelul dat de activitate se menține și pe



durata fazei de creștere exponențială. În faza staționară, activitatea enzimelor antioxidante primare scade până la nivelul înregistrat pentru inocul. În condiții de temperatură ridicată, în primele 3 zile de cultivare, se observă creșterea activității enzimelor antioxidante față de nivelul înregistrat în inocul. Comparativ cu condițiile optime, valorile obținute sunt de 1,8-3,0 ori mai mari. În continuare, ca și în condiții optime, are loc scăderea activității SOD și POD. Trebuie să menționăm că în condiții de temperatură înaltă scăderea activității enzimelor antioxidante se produce mult mai devreme, încă în timpul fazei de creștere exponențială a culturii de spirulină. Nivelul de activitate a SOD și POD în condiții de temperatură ridicată rămâne mai înalt comparativ cu condițiile optime până la sfârșitul ciclului vital.

Astfel, în condiții optime cel mai înalt nivel de activitate al enzimelor antioxidante primare se înregistrează pe durata fazei *lag* și a celei de creștere exponențială. La temperatura de 40°C cea mai înaltă activitate a SOD și POD sunt în faza *lag* și la începutul fazei de creștere exponențială. Activitatea celor două enzime în biomasa de spirulină pe durata ciclului vital la temperatura de 40°C este mai înaltă decât la 30°C. Rezultatele prezentate mai sus denotă starea de stres în biomasa de spirulină la temperatură ridicată – 40°C, dar și a condițiilor de producere industrială comparativ cu cele de laborator

În continuare, am avut drept scop să stabilim dacă starea de stres este asociată cu cantitatea de biomasă produsă și cu conținutul principalelor componente, pentru care se obține această biomasă. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul A4.1. În condiții de laborator la temperatură optimă, adaptarea culturii la noile condiții după inoculare decurge mai ușor decât în condiții de temperatură de 40°C. Aceasta determină o cantitate de biomasă mai mare cu 13,7% după 24 ore de la inoculare în condiții optime. Faza de creștere exponențială se caracterizează prin valori apropiate ale cantității de biomasă în ambele experiențe. Diferențele se observă doar la sfârșitul acestei faze și pe durata fazei staționare. În acest interval de timp, în condiții de temperatură ridicată, cantitatea de biomasă este mai mare cu 15.0-18.6% comparativ cu condițiile optime ( $p < 0.01$ ). Spre finele ciclului vital are loc practic o egalare a cantității de biomasă în ambele cazuri.

În condiții de producere, cantitatea de biomasă obținută este mai mare comparativ cu experiențele de laborator (cu 17.8% în condiții optime și cu 30.3% în condiții de temperatură ridicată,  $p < 0.005$ ). În același timp, nu există o diferență statistic veridică pe durata ciclului vital între variantele experimentale cu diferit nivel termic.

Spirulina este în primul rând un superproducător de proteină, ficobiliproteine și polizaharide sulfatate. Proteina din componența biomasei de spirulină se caracterizează printr-o componență aminoacidică echilibrată, de aceea conținutul de proteină este unul din parametrii de

calitate a biomasei de spirulină produsă în condiții industriale. În experiențele efectuate în laborator, conținutul de proteine în biomasa spirulinei pe durata ciclului vital a fost destul de constant. Excepție prezintă doar începutul fazei staționare (ziua a 7-a) în condiții de temperatură înaltă, când se observă o ușoară scădere (cu 12%) a cantității de proteine în biomasa de spirulină obținută la 40°C comparativ cu cea crescută în condiții optime. În condiții de producere industrială mici deosebiri în cantitatea de proteine se înregistrează doar în prima jumătate a fazei de creștere exponențială a culturii. Deosebire veridică din punct de vedere statistic se înregistrează doar în cea de-a treia zi a ciclului vital, când în condiții de temperatură înaltă cantitatea de proteine în biomasă este cu 10,1% mai mare comparativ cu biomasa crescută în condiții optime. În faza staționară când are loc colectarea de biomasă, conținutul de proteine atât în condiții de laborator, cât și de producere, la ambele nivele termice aplicate este aproximativ același, fără diferențe veridice din punct de vedere statistic.

Pigmenții ficobiliproteici sunt un grup de substanțe macromoleculare, care reacționează prompt la modificarea condițiilor de mediu ori la cele asociate cu stresul oxidativ. Pe lângă funcția de captare a luminii (în domeniul lungimilor de undă de 495-650 nm) și transferul ei spre clorofilă, aceste substanțe posedă și proprietăți antioxidante. Ficobiliproteinele, pigmenți tetrapirolici hidrosolubili cu un potențial cuantic înalt al fluorescenței, sunt formate prin asocierea apoproteinelor cu ficobilinele, care acționează ca cromofori. Ficobiliproteinele devin atractive pentru utilizare comercială datorită numărului mare de cromofori, gradului de fluorescență înalt, capacității de a forma conjugate stabile cu diferite substanțe, solubilitatea în apă. Ele sunt deja utilizate în calitate de coloranți naturali în industria alimentară (C-ficocianina) și în industria cosmetică (C-ficocianina și R-ficoeretrina). Datorită proprietăților lor spectrale se mai utilizează în calitate de trasori în imunodiagnostică, microscopie diagnostică și în cercetările biomedicale.

Ca antioxidanți eficienți, ficobiliproteinele se manifestă în procesul de neutralizare a radicalilor liberi. Astfel, a fost stabilit că acești compuși elimină radicalii aloxil, hidroxil și peroxil. Efectul lor protector este exprimat prin protecția membranelor fiziologic active de procesul de peroxidare [387]. Modificarea conținutului de ficobiliproteine în componența celulelor microalgelor și cianobacteriilor este unul din mecanismele de rezistență a acestor organisme la acțiunea diferitor factori. Astfel, o modificare esențială a conținutului de ficocianină și aloficocianină la *Arthrospira platensis* este înregistrată atât la acțiunea diferitor factor chimici, cum ar fi compușii coordinativi ai metalelor de tranziție, cât și la acțiunea factorilor fizici de mediu, cum sunt temperatura și intensitatea luminii.

Cantitatea de ficobiliproteine în biomasa de spirulină pe durata ciclului vital în laborator în condiții de temperatură optimă variază în limitele de 12.04-18.38% BAU, iar în condiții de temperatură ridicată – 10.22-15.65%. Cele mai semnificative diferențe se observă la începutul fazei de creștere exponențială și în faza staționară, când în condiții de temperatură înaltă are loc o scădere a conținutului de ficobiliproteine cu până la 30% față de condițiile de temperatură optimă.

În condiții de producere industrială în faza staționară de asemenea se observă o scădere a cantității de ficobiliproteine în biomasa de spirulină crescută în condiții de temperatură înaltă cu până la 33,4% în ziua a opta a ciclului vital, dar spre sfârșitul ciclului tehnologic, la colectarea biomasei, are loc o egalare a acestui parametru în biomasa obținută în condiții optime și în condiții de temperatură de 40°C.

Lipidele, de asemenea, sunt o componentă celulară, care se modifică în dependență de condițiile de mediu și de vârsta fiziologică a culturii. Temperatura este unul dintre factorii fizici care influențează cantitatea și calitatea lipidelor în celulele vii. Ca parte componentă a membranelor biologice, lipidele determină gradul de fluiditate a acestor structuri, intensitatea schimbului de substanțe cu mediul extracelular și capacitatea de supraviețuire a organismelor.

La spirulină în condiții de laborator la temperatura de 30°C cantitatea de lipide scade la începutul fazei de creștere exponențială, după care urmează creșterea lor cantitativă. La finele ciclului vital, cantitatea de lipide este maximală – 5.69% BAU. La creșterea spirulinei la temperatura de 40°C cantitatea de lipide este stabilă pe parcursul ciclului vital, dar scade semnificativ (practic de 2 ori) în faza staționară. În condiții de producere industrială între variantele de temperatură nu se atestă diferențe semnificative între cantitățile de lipide în biomasa de spirulină pe durata ciclului vital.

Glucidele constituie o componentă importantă a biomasei de spirulină. În special polizaharidele se caracterizează prin activitate biologică înaltă – antiinflamatoare, antioxidantă și anticancer [31, 117, 251]. În condiții optime de laborator cantitatea de glucide atinge 10-15%, în dependență de vârsta culturii. În experiențele efectuate la creșterea spirulinei la temperatura de 30°C cantitatea glucidelor se menține în aceste limite, cu mici variații pe durata ciclului vital. În condiții de temperatură înaltă, în prima jumătate a fazei creșterii exponențiale are loc acumularea accelerată a glucidelor, cantitatea lor fiind cu 35% mai mare comparativ cu condițiile optime. Începând cu ziua a 5-a de cultivare, cantitatea de glucide în biomasa de spirulină crescută în condiții de temperatură ridicată revine la valorile caracteristice pentru condițiile de temperatură optimă.

În condiții de producere industrială, temperatura înaltă provoacă o scădere a cantității de glucide în biomasa de spirulină, care în dependență de faza ciclului vital constituie 9.3-32.1%. Cel mai înalt conținut de glucide în biomasă se înregistrează la începutul fazei de creștere exponențială și în faza staționară, atât la temperatura de 30°C, cât și la cea de 40°C.

În concluzie la acest compartiment putem afirma că temperatura înaltă (40°C) este un factor de stres pentru cultura de *Arthrospira platensis* atât în condiții de laborator, cât și în condiții de producere. În condiții de laborator cantitatea de dialdehidă malonică în biomasa crescută la temperatură înaltă este de 3 ori mai mare ca în biomasa crescută la temperatură optimă, iar în condiții de producere industrială creșterea cantității DAM este de 37%.

Creșterea spirulinei în condiții de temperatură înaltă este, de asemenea, asociată cu mărirea activității enzimelor antioxidante primare atât în condiții de laborator, cât și în condiții de producere industrială. Conținutul de proteine nu se modifică semnificativ ca rezultat al acțiunii temperaturii înalte, în schimb se înregistrează o scădere importantă a cantității de ficobiliproteine în prima jumătate a fazei de creștere exponențială cu 30-33% comparativ cu condițiile optime, atât în laborator, cât și la producere. La sfârșitul ciclului vital, cantitatea de ficobiliproteine în biomasa crescută la diferite temperaturi devine aproximativ egală.

La temperatură înaltă în condiții de laborator cantitatea de lipide în biomasa de spirulină scade practic de 2 ori comparativ cu condițiile de temperatură optimă, în timp ce în condiții de producere industrială diferența aceasta este minimală.

În condiții de laborator, temperatura înaltă provoacă o creștere a cantității de glucide cu până la 35% în prima jumătate a fazei de creștere exponențială, pe când în condiții de producere industrială cantitatea de glucide în biomasa crescută la temperatura de 40°C este stabil mai joasă comparativ cu biomasa crescută în condiții optime, pe tot parcursul ciclului vital.

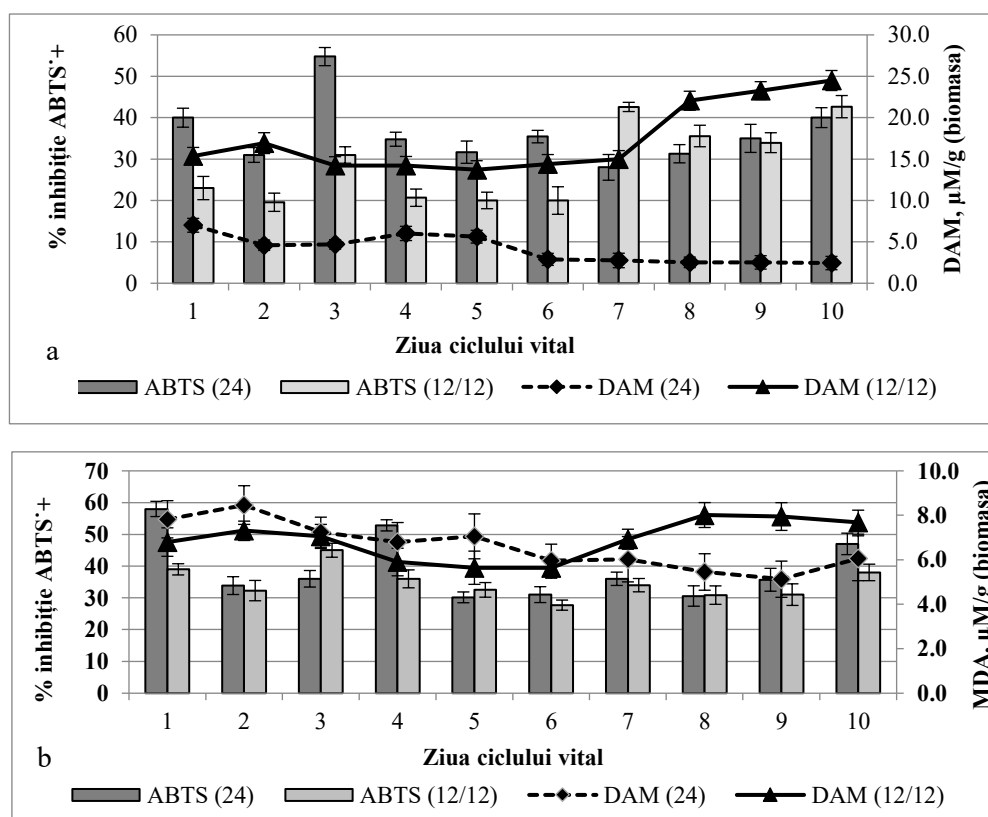
#### **4.2. Influența stresului de lumină asupra spirulinei în condiții de laborator și de producere**

În natură cianobacteriile sunt adaptate la condiții de fotoperiodism, iar situația în care perioadele de lumină și cele de întuneric alternează este normală pentru spirulina care populează habitatele naturale. În experiențele noastre a fost utilizată o tulpină adaptată la condiții industriale, creată pentru producere de biomasă și alte produse valoroase. În condiții industriale pentru această tulpină se aplică regimul de iluminare continuă cu densitatea fluxului fonic de 50  $\mu\text{M}$  fotoni / $\text{m}^2$  /s. În aceste condiții, durata unui ciclu închis deplin este de 10 zile, ceea ce este convenabil din punct de vedere economic. În același timp, ne-am pus drept scop să urmărim,

dacă iluminarea continuă este mai potrivită față de iluminarea periodică din punct de vedere al siguranței biomasei de spirulină obținută.

Pentru aceasta au fost comparați parametrii de calitate și siguranță ai biomasei de spirulină crescută în condiții de laborator și în condiții industriale cu aplicarea a două regimuri de iluminare – continuă și periodică (12 ore întuneric: 12 ore lumină). Mediul nutritiv utilizat este descris în compartimentul precedent. Temperatura a fost de 30°C.

Pentru a aprecia nivelul de stres în cultura de spirulină a fost determinată cantitatea de dialdehidă malonică. Rezultatele sunt prezentate în figura 4.3.



**Fig. 4.3. Activitatea antioxidantă și cantitatea de dialdehidă malonică în biomasa de *Arthrospira platensis* în condiții de stres de iluminare pe durata ciclului vital: (a)- condiții de laborator; (b) – condiții de producere. ((24)—iluminare continuă; (12/12)—iluminare periodică (12 ore lumină:12 ore întuneric))**

În condiții de laborator, cantitatea DAM în biomasa de spirulină la iluminare continuă a variat între 2.44 și 7.01 mmol/g (Figura 4.3. A). Cel mai înalt nivel al DAM este caracteristic fazei lag. Trecerea culturii în faza de creștere exponențială este asociată cu scăderea nivelului DAM în biomasă cu 14-34% comparativ cu faza precedentă. Astfel, pe durata zilelor 2-5 cantitatea DAM este în limitele de 4.60-6.03 mmol/g. Începând cu ziua a 6-a, DAM scade și mai

mult – practic în jumătate față de ziua precedentă. Nivelul DAM rămâne constant jos până la finele ciclului de creștere (în limita valorilor de 2.44-2.88 mmol/g). Aplicarea regimului de iluminare periodică a spirulinei în condiții de laborator s-a asociat cu o creștere foarte pronunțată a DAM. Astfel, pe durata fazei *lag* și celei de creștere exponențială, în condiții de iluminare periodică, nivelul DAM în spirulină a fost de 2.2-3.7 ori mai mare comparativ cu valorile respective obținute pentru cultura iluminată continuu. Începând cu cea de-a 6-a zi de cultivare diferența aceasta a fost și mai mare. La finele ciclului vital, biomasa de spirulină crescută în condiții de iluminare periodică conținea de 10 ori mai multă DAM față de biomasa obținută la iluminare continuă.

Am menționat anterior că tulpina *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 este o tulpină tehnologică selectată pentru creștere industrială în condiții de iluminare continuă și care se caracterizează printr-un ciclu vital scurt. Acest lucru explică rezultatele descrise mai sus, care denotă o stare de stres pronunțat în celulele spirulinei, atunci când sunt supuse reducerii perioadei luminoase la 12 ore.

În condiții industriale situația este diferită de cea din laborator (Figura 4.3. B). După cum am mai menționat, condițiile industriale în sine prezintă o situație de stres comparativ cu cele de laborator. Cantitatea DAM la cultivare industrială în condiții de iluminare continuă variază în limitele valorilor de 5.13-8.46 mmol/g. Cele mai joase valori ale DAM, ca și în condiții de laborator, sunt în faza staționară. Reducerea perioadei luminoase la 12 ore produce anumite modificări în cantitatea DAM, dar nu atât de dramatice ca în cazul condițiilor de laborator. Cele mai semnificative diferențe se observă în perioada staționară, când la iluminarea periodică are loc creșterea DAM în biomasa de spirulină cu 26.7-55.0% față de valorile respective obținute pentru condițiile de iluminare continuă ( $p < 0.001$ ).

Activitatea antioxidantă a extractelor hidrice din biomasa de spirulină obținută în laborator în condiții de iluminare continuă și periodică, de asemenea, a fost diferită. În condiții de laborator, la iluminare continuă, în dependență de faza ciclului vital valorile testului ABTS au fost în limitele de 28.0-54.8% inhibiție (Figura 4.3. A). Se evidențiază începutul fazei de creștere exponențială, când activitatea antioxidantă a extractului din biomasă este veridic mai mare comparativ cu celelalte valori înregistrate pe durata ciclului vital ( $p < 0.001$ ). Iluminarea periodică provoacă modificări importante în nivelul activității antioxidante a extractelor de spirulină, care diferă în dependență de etapa ciclului vital. Astfel, pe durata primelor 6 zile de cultivare a spirulinei, în condiții de iluminare periodică activitatea antioxidantă este mai joasă cu 36.8-55.5% față de valorile pentru zilele respective înregistrate în extractele obținute din biomasa crescută în condiții de iluminare continuă. Ziua a 7-a – etapa de încetinire a creșterii se

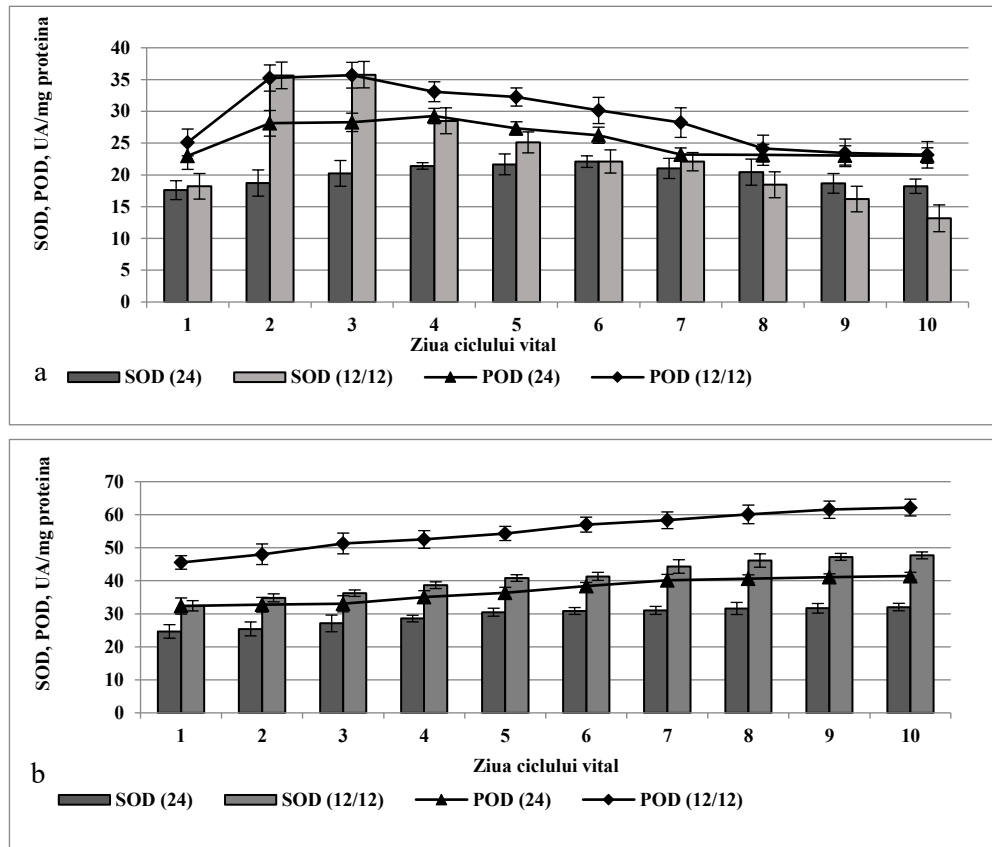
deosebește, deoarece activitatea antioxidantă a extractului din biomasa de spirulină iluminată periodic a fost semnificativ mai mare comparativ cu biomasa iluminată continuu. Faza staționară este caracterizată prin valori asemănătoare (fără deosebiri veridice din punct de vedere statistic) ale activității antioxidante în ambele variante de iluminare.

În condiții de producere, deosebirea dintre nivelul de activitate antioxidantă a extractelor hidrice din biomasa de spirulină crescută în condiții de iluminare continuă și în condiții de fotoperiodism nu este atât de clară ca în laborator (Figura 4.3. B). O scădere a activității antioxidante în condiții de fotoperiodism se atestă în faza *lag*, la ziua a 4-a și la ziua a 10-a a ciclului vital. Și în cea de-a treia zi a ciclului (faza de accelerare a creșterii) se observă diferență în activitatea antioxidantă a spirulinei obținută în 2 regimuri diferite de iluminare, numai că situația este inversă. În această etapă are loc o creștere a activității antioxidante a extractului hidric din biomasa de spirulină crescută în condiții de fotoperiodism.

Astfel, rezultatele descrise ne permit să concluzionăm că pentru tulpina industrială *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 fotoperiodismul (12:12) prezintă o stare de stres, care este foarte pronunțat în condiții de laborator pe toată durata ciclului vital. În condiții industriale, de asemenea, fotoperiodismul poate fi apreciat ca o situație de stres, dar un stres de o intensitate mult mai joasă, comparativ cu situația în laborator. În condiții industriale și în cele de laborator, cel mai intens stres cauzat de reducerea timpului luminos este caracteristic pentru faza staționară a ciclului vital.

Calitatea și intensitatea luminii, dar și fotoperiodismul au o influență marcantă asupra activității enzimelor antioxidante, în special asupra superoxid-dismutazei la organismele fotosintetizatoare. De exemplu, la alga *Gracilariaopsis tenuifrons* crescută în condiții de fotoperiodism activitatea SOD în perioada de lumină este de 2 ori mai înaltă decât în perioada de întuneric. Variațiile circadiene în activitatea SOD dispar la cultivare în condiții de lumină constantă. Aceasta demonstrează implicarea luminii în reglarea activității SOD. Intensitatea și lungimea de undă luminoasă aplicată, de asemenea, influențează activitatea SOD. Lumina albastră s-a dovedit a fi cel mai bun inductor al activității SOD la această algă [364]. Același efect al luminii albastre – creșterea activității enzimelor antioxidante, a fost observat și în cazul plantelor superioare [203]. Intensitatea scăzută a luminii pe o durată de câteva cicluri circadiene de asemenea este asociată cu creșterea activității enzimelor antioxidante [481].

Deoarece anterior am demonstrat că pentru tulpina industrială *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 fotoperiodismul a prezentat o condiție de stres, am presupus că activitatea enzimelor antioxidante primare va fi, de asemenea, afectată. Rezultatele sunt prezentate în figura 4.4.



**Fig. 4.4. Activitatea enzimelor antioxidante în biomasa de *Arthrospira platensis* în condiții de stres de iluminare pe durata ciclului vital: (a) - condiții de laborator; (b) – condiții de producere. ((24) - iluminare continuă; (12/12) - iluminare periodică (12 ore lumină:12 ore întuneric))**

În condiții de iluminare continuă, în laborator cea mai înaltă activitate SOD și POD a fost caracteristică pentru perioada *lag* și cea de creștere exponențială. În acest interval de timp activitatea SOD la spirulină variază în limita de 17.6-22.1 U/mg proteină, iar activitatea POD – între 26.2-29.3 U/mg proteină. În faza staționară activitatea enzimelor antioxidante primare scade până la nivelul înregistrat pentru inocul. În condiții de fotoperiodism, modificarea activității enzimelor antioxidante comparativ cu iluminarea continuă se observă începând cu faza creșterii exponențiale a culturii. În perioada zilelor 3-6 de cultivare se observă o creștere a activității tuturor enzimelor studiate. Cea mai pronunțată creștere este în cazul SOD - activitatea înregistrată este de peste 2 ori mai mare comparativ cu condițiile de iluminare continuă. În continuare activitatea enzimelor antioxidante scade. În faza staționară, activitatea SOD scade sub nivelul caracteristic culturii de spirulină crescută în condiții de iluminare continuă, iar activitatea POD practic se egalează cu cea a matorului.

Astfel, în condiții de laborator, atât la iluminare continuă, cât și în condiții de fotoperiodism, cea mai înaltă activitate a enzimelor antioxidante primare SOD și POD este



caracteristică fazei *lag* și fazei exponențiale de creștere. În condiții de fotoperiodism, în timpul etapelor menționate ale ciclului vital, activitatea enzimelor studiate este mai mare (de peste 1.4 ori în cazul POD și de peste 2 ori în cazul SOD). Scăderea activității SOD sub nivelul martorului în condiții de fotoperiodism pe durata fazei staționare în condiții de laborator este un semn că intensitatea stresului creat este foarte înalt, iar enzimele de prima linie de apărare cedează și urmează a se include alte componente nonenzimatice pentru a efectua protecția antioxidantă.

În condiții industriale, la iluminare continuă activitatea SOD și POD este mai mare de 1.4-1.8 ori comparativ cu condițiile de laborator. De rând cu alte date prezentate mai sus, aceasta confirmă faptul că condițiile industriale în sine constituie un factor de stres. Fotoperiodismul intervine și el ca un alt factor de stres, care duce la o mărire de până la 1,5 ori a activității enzimelor antioxidante. Spre deosebire de experiențele de laborator, aici nu se atestă scăderea activității SOD și POD în faza staționară. Astfel, în condiții industriale activitatea enzimelor rămâne înaltă pe durata întregului ciclu vital.

În tabelul A 4.2. sunt prezentate rezultatele cu referire la cantitatea de biomasă acumulată și conținutul de proteine, glucide, lipide, ficobiliproteine în biomasa de spirulină pe durata ciclului vital în condiții de iluminare continuă și în condiții de fotoperiodism. În condiții de laborator, la iluminare cantitatea de biomasă în faza *lag* este cu 12 % mai mare decât în condițiile de iluminare periodică. Deoarece această diferență nu este semnificativă statistic, vorbim doar despre o tendință de mărire, ceea ce nu poate indica asupra unei adaptări mai bune a culturii la noile condiții după inoculare. Faza de creștere exponențială se caracterizează prin valori apropiate ale cantității de biomasă în ambele experiențe. Diferențele se observă doar la sfârșitul acestei faze și pe durata fazei staționare. În acest interval de timp, în condiții de fotoperiodism cantitatea de biomasă este mai mare cu 23.3-39.3% comparativ cu condițiile de iluminare continuă ( $p < 0.005$ ). Diferența aceasta se păstrează până la finele ciclului vital.

În condiții de producere, cantitatea de biomasă obținută la finele ciclului vital atât la iluminare continuă, cât și în condiții de fotoperiodism, este mai mare cu peste 16% ( $p < 0.01$ ) comparativ cu experiențele de laborator. Spre deosebire de condițiile de laborator, diferența dintre cantitatea de biomasă acumulată este semnificativă deja în perioada de creștere exponențială. Astfel, la ziua a 5 a ciclului vital se înregistrează cea mai mare diferență între biomasa acumulată în cele două experiențe – de peste 60%. Cantitatea de biomasă de spirulină în condiții industriale la iluminare periodică se menține mai înaltă cu 29.6-62.5% până la sfârșitul ciclului vital.

Observăm că regimul fotoperiodic pare a fi mai convenabil din punct de vedere tehnologic, deoarece permite acumularea unei cantități mai mari de biomasă de spirulină. Cu

toate acestea, cantitatea de DAM, activitatea antioxidantă a extractelor hidrice și activitatea enzimelor antioxidante primare denotă o stare de stres, care ar putea fi asociată cu scăderea calității și siguranței biomasei obținute în condiții de laborator: conținutul de proteine în biomasa spirulinei pe durata ciclului vital a fost practic constant atât la iluminare constantă, cât și la fotoperiodism. Diferența constă în aceea că la iluminare periodică cantitatea de proteine în biomasa de spirulină este semnificativ mai mică, comparativ cu condițiile optime pentru tulpină. În dependență de etapa ciclului vital scăderea cantității de proteine în biomasă a constituit 12.1-25.8%.

În condiții industriale avem același tablou – un nivel practic uniform al cantității de proteine în biomasă atât la iluminare continuă, cât și în condiții de fotoperiodism. Și în acest caz avem o scădere a cantității de proteine în biomasa de spirulină crescută în condiții de fotoperiodism comparativ cu cea crescută la iluminare continuă. În prima jumătate a fazei de creștere exponențială diferența dintre variantele experimentale este statistic nesemnificativă (zilele 3-5 ale ciclului vital). În celelalte perioade diferențele sunt veridice și constituie 13-15%.

Funcția de bază a ficobiliproteinelor constă în colectarea energiei luminii și transmiterea ei spre sistemul fotosintetic. Din acest punct de vedere, orice variație în regimul de iluminare ar trebui să producă modificări cantitative ale acestor compuși valoroși. Cantitatea de ficobiliproteine în biomasa de spirulină pe durata ciclului vital în laborator în condiții de iluminare continuă variază în limitele de 12.04-18.38% BAU, iar în condiții de fotoperiodism – 14.1-18.3%. Cu toate că intervalele de variație sunt foarte apropiate, diferențele între conținutul de ficobiliproteine în biomasa de spirulină sunt bine conturate pe durata ciclului vital. Astfel, în faza *lag* și la începutul fazei de creștere exponențială, în condiții de fotoperiodism cantitatea de ficobiliproteine în biomasa de spirulină este cu până la 40% ( $p < 0.001$ ) mai mare decât în perioadele respective în condiții de iluminare continuă. În perioada ce urmează conținutul de ficobiliproteine în spirulină nu diferă semnificativ în dependență de regimul de iluminare.

În condiții de producere industrială, la iluminare continuă, în perioadele critice ale ciclului vital (faza *lag* - prima zi, prima zi a fazei de creștere exponențială – a 3-a zi, faza de încetinire a creșterii – a 7-a zi) avem un nivel mai înalt al ficobiliproteinelor în biomasă comparativ cu condițiile de laborator și iluminare continuă. În celelalte zile cantitatea de ficobiliproteine în biomasa crescută în laborator și cea crescută în condiții industriale nu diferă semnificativ. În cazul iluminării periodice, creșterea cantității de ficobiliproteine în biomasa de spirulină în condiții industriale comparativ cu cele de laborator se înregistrează în faza de accelerare a creșterii (a 2-a zi) și în faza staționară. În aceste perioade cantitatea de

ficobiliproteine în condiții de creștere industrială este cu 31-45% mai mare decât în condiții de laborator.

Astfel, fotoperiodismul provoacă modificări în conținutul de ficobiliproteine în biomasă într-o manieră diferită în condiții de laborator și cele industriale. În condiții industriale, la finele ciclului vital se observă cea mai mare creștere a cantității de ficobiliproteine – cu 32% comparativ cu iluminarea continuă în condiții de producere și cu 45% comparativ cu condițiile de fotoperiodism în laborator.

Cantitatea de lipide în biomasa cianobacteriilor, de asemenea, este influențată de intensitatea luminii. Astfel, a fost demonstrat că lumina de culoare roșie favorizează acumularea de lipide în biomasa microalgelor. În condiții de imitare a ritmului circadian de iluminare (de la 0 la 1920 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ), cantitatea maximală de lipide la cianobacteria *Synechocystis sp.* PCC6803 (14% din biomasa uscată) se obține la intensitatea maximală a luminii [138].

La spirulină în condiții de laborator, la iluminare continuă cantitatea de lipide scade la începutul fazei de creștere exponențială după care urmează creșterea lor cantitativă. La finele ciclului vital cantitatea de lipide este maximală – 5.69% BAU. La creșterea spirulinei în condiții de fotoperiodism cantitatea de lipide este stabilă pe parcursul ciclului vital. O diferență semnificativă statistic se observă doar la finalul ciclului vital, când cantitatea de lipide în biomasă este cu 25% mai mică comparativ cu biomasa crescută la iluminare continuă.

În condiții industriale, la cultivare în regim de iluminare periodică cantitatea de lipide în biomasa de spirulină este mai joasă ori foarte apropiată cu nivelul caracteristic pentru biomasa crescută la iluminare continuă. Excepție prezintă zilele 7-8, când are loc încetinirea creșterii și trecerea culturii în faza staționară, când ca urmare a regimului fotoperiodic, se produce o creștere a cantității de lipide cu 21-29%. Pe durata fazei staționare însă acest decalaj este eliminat, cantitățile de lipide devenind echivalente în ambele experiențe.

Glucidele constituie o componentă importantă a biomasei de spirulină. Cantitatea lor poate fi influențată esențial de intensitatea luminii. De exemplu, producerea de glucide la 6 tulpini de nostoc a fost mărită esențial prin aplicarea iluminării cu intensitate înaltă [324]. În experiențele noastre, de asemenea, am observat că condițiile de iluminare influențează cantitatea de glucide acumulate în celulele de spirulină. În condiții de iluminare continuă, în laborator cantitatea de glucide atinge 10-15%, în dependență de vârsta culturii. În experiențele efectuate la creșterea spirulinei în condiții de fotoperiodism în laborator s-a observat o creștere de peste 2 ori a cantității de glucide. Excepție a fost faza *lag*, dar și în această fază cantitatea glucidelor în biomasa de spirulină crescută în condiții de fotoperiodism a fost mai mare decât în cazul spirulinei crescute în condiții de iluminare continuă (cu 31%).

În condiții de producere industrială, iluminarea periodică provoacă o creștere a cantității de glucide în biomasa de spirulină, care în dependență de faza ciclului vital constituie 48-79%. Cel mai înalt conținut de glucide în biomasă se înregistrează în faza *lag* și în faza de încetinire a creșterii. Faza staționară se caracterizează prin scăderea cantității de glucide în biomasa crescută în condiții de fotoperiodism la nivelul înregistrat în spirulina crescută la iluminare continuă.

În concluzie la acest compartiment, putem afirma că pentru tulpina industrială *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 fotoperiodismul prezintă o stare de stres, care este mai pronunțat în condiții de laborator. În condiții industriale și în cele de laborator, cel mai intens stres cauzat de reducerea timpului luminos este caracteristic pentru faza staționară a ciclului vital.

Creșterea tulpinii *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 în laborator în condiții de fotoperiodism este asociată cu scăderea activității enzimelor antioxidante (comparativ cu situația de iluminare continuă) de la începutul ciclului vital și până la sfârșitul fazei de creștere exponențială, iar în condiții industriale o scădere veridică se vede, în special, la finalul ciclului vital.

Fotoperiodismul este asociat în experiențele noastre cu o creștere semnificativă a cantității de biomasă obținută pe durata unui ciclu vital. Astfel, în condiții industriale se obține de peste 1,6 ori mai multă biomasă decât la iluminarea continuă a culturii. Cu toate acestea, situația dată trebuie tratată cu atenție maximă, deoarece este asociată cu un risc major de acumulare a radicalilor liberi ca rezultat al situației de stres indus.

Prezența stresului indus de fotoperiodism este confirmată și prin reducerea cantității de proteine (cu până la 25%) în biomasa de *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 obținută în condiții de iluminare periodică atât în laborator, cât și în condiții industriale, comparativ cu condițiile de iluminare continuă.

Fotoperiodismul provoacă modificări în conținutul de ficobiliproteine în biomasă într-o manieră diferită în condiții de laborator și cele industriale. În condiții industriale, la finele ciclului vital se observă cea mai mare creștere a cantității de ficobiliproteine – cu 32 % comparativ cu iluminarea continuă în condiții de producere și cu 45% comparativ cu condițiile de fotoperiodism în laborator. Creșterea cantității de ficobiliproteine, asociată cu creșterea cantității de biomasă în condiții de fotoperiodism, poate fi o soluție simplă și eficientă atunci când scopul producerii spirulinei este obținerea pigmentilor ficobilinici.

În condiții de laborator fotoperiodismul provoacă o scădere a cantității de lipide la sfârșitul ciclului vital, iar în condiții industriale aceste valori sunt foarte asemănătoare. În schimb, în condiții industriale avem o scurtă perioadă (zilele 7-8) când biomasa de *Arthrospira*

*platensis* CNMN-CB-11 conține o cantitate de lipide cu o pătrime mai mare comparativ cu condițiile de iluminare constantă. Fotoperiodismul la această tulpină este asociat și cu o creștere a cantității de glucide în biomasă – de până la două ori în condiții de laborator și de până la 1,8 ori în condiții industriale.

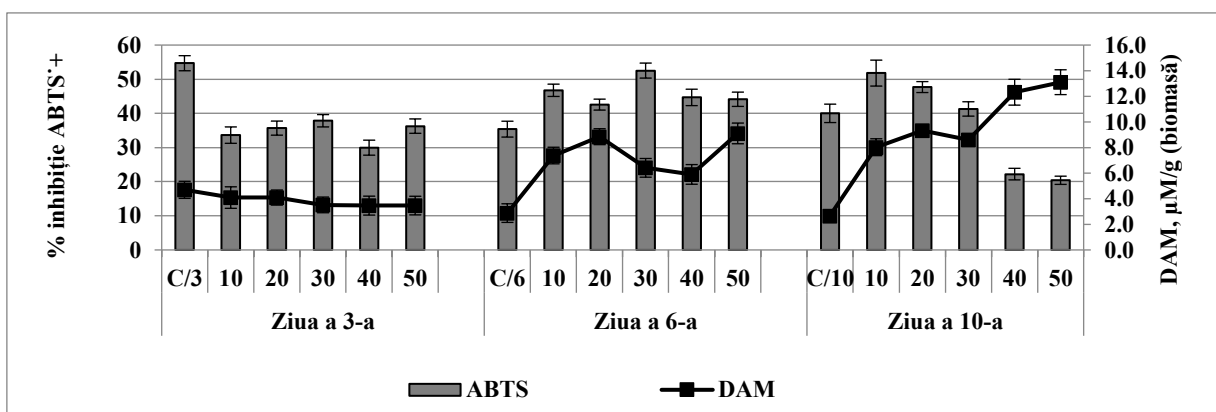
Cu toate că în condiții de fotoperiodism unii parametri tehnologici se caracterizează prin valori atractive (crește cantitatea de biomasă acumulată, precum și cantitatea de ficobiliproteine și glucide în biomasă), această situație urmează a fi tratată cu mare atenție, pentru a nu permite compromiterea siguranței produselor obținute din cauza acumulării de radicali liberi.

### **4.3. Influența stresului salin asupra *Arthrospira platensis* și *Nostoc linckia* în condiții de laborator**

Cantitatea de clorură de sodiu în mediile pentru creșterea tulpinilor *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 și *Nostoc linckia* CNMN-CB-03 este < 1 g/l. Stresul provocat de acest compus la ambele tulpini este asociat cu reducerea cantității de biomasă obținută, de aceea în condiții industriale controlate asemenea situații sunt evitate. Studiul toleranței la clorura de sodiu are mai mult valoare fundamentală, decât pur tehnologică (cu scop de producere a biomasei), din care cauză experiențele au fost realizate doar în condiții de laborator.

Pentru a evalua răspunsul culturii de *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 la stresul salin au fost testate 5 concentrații de NaCl (10, 20, 30, 40 și 50 g/l). În calitate de control a fost utilizată spirulina crescută pe mediul SP-1, descris anterior. În acest mediu cantitatea de NaCl este de 1 g/l. În calitate de marker al stresului oxidativ a fost utilizat ca și în exemplele precedente cantitatea de dialdehidă malonică în biomasă. Măsurările au fost efectuate de 3 ori pe durata ciclului vital – la zilele 3, 6 și 10. Rezultatele obținute sunt prezentate în figura 4.5. La cea de-a 3-a zi a ciclului vital nu se observă diferențe statistic veridice între variantele experimentale, nivelul DAM fiind cuprins între 3.46 și 4.70 mmol/g. În schimb, activitatea antioxidantă a extractului hidric din biomasa de spirulină crescută pe medii cu salinitatea înaltă este cu 33.7-45.3% mai joasă ( $p < 0.001$ ) comparativ cu biomasa crescută în condiții de salinitate normală. La cea de-a 6 zi de cultivare cantitatea DAM în biomasa de spirulină în condiții de stres salin în dependență de concentrația de NaCl este de 2.0-3.2 ori mai mare comparativ cu martorul. Activitatea antioxidantă (testul ABTS), de asemenea, crește în condiții de stres salin cu 20-48% comparativ cu martorul. Ca și la cea de-a 3 zi, nu s-au înregistrat deosebiri veridice statistic între variantele de stres salin. Aceste diferențe devin vizibile abia la sfârșitul ciclului vital. Testele efectuate la cea de-a 10 zi arată că la concentrațiile de 10 și 20 g/l NaCl atât cantitatea DAM, cât și activitatea de inhibare a radicalului cation ABTS<sup>•+</sup> rămâne la același nivel ca și la ziua a 6-a.

În cazul concentrației de 30 g/l cantitatea DAM crește și devine de 3,2 ori mai mare ca în martor, iar activitatea antioxidantă scade până la nivelul martorului. Concentrațiile mari de NaCl (40 și 50 g/l) la finele ciclului vital au dus la creșterea și mai pronunțată a DAM (de 4.6 și 4.9 ori mai mare ca în control), dar și la o scădere esențială a activității antioxidante (cu până la 50%). Astfel, rezultatele descrise mai sus denotă că salinitatea înaltă prezintă un factor de stres pentru cultura de spirulină. Stresul oxidativ se instalează lent, astfel la cea de-a 3-a zi a ciclului vital nivelul markerului de stres oxidativ în biomasă este la nivelul controlului, iar la celelalte două monitorizări – crește semnificativ. În același timp, la a doua monitorizare și parțial la cea de-a treia, se atestă creșterea activității antioxidante a biomasei, care este o dovadă a mobilizării capacităților antioxidante ale celulei pentru a stinge radicalii formați.

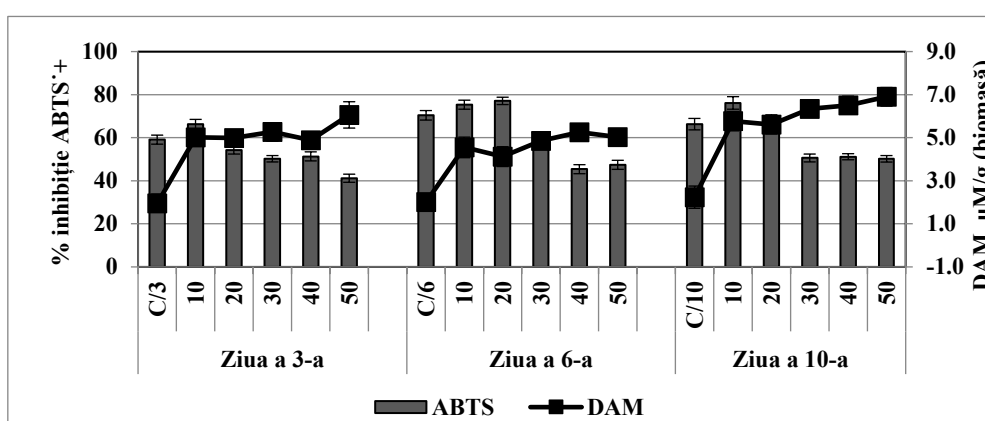


#### 4.5. Activitatea antioxidantă și cantitatea de dialdehidă malonică în biomasă de *Arthrospira platensis* la diferite concentrații de NaCl în mediu. (C/3, C/6, și C/10—controlul la ziua 3, 6 și 10); 10, 20, 30, 40, 50— concentrația de NaCl, g/l)

Cu înaintarea în ciclul vital, la cea de-a 6-a zi putem vorbi despre o stare de stres oxidativ pronunțat, confirmat prin nivelurile ridicate ale DAM. Activitatea antioxidantă a biomasei continuă să rămână veridic mai mare comparativ cu martorul. Sfârșitul ciclului vital denotă că concentrațiile de 40 și 50 g/l NaCl provoacă un stres pronunțat, fiind asociate cu o creștere de până la 5 ori a cantității DAM și scăderea cu până la 50% a activității antioxidante a extractelor hidrice din biomasă.

Același tip de experiențe a fost realizat și cu tulpina *Nostoc linckia* CNM-CB-03. În calitate de mediu nutritiv standard a fost utilizat mediul Gromov 6 optimizat. Cultivarea a fost efectuată în baloane Erlenmeyer cu menținerea următorilor parametri: pH-ul 6,8-7,2, temperatura 25-27 °C, densitatea fluxului de fotoni de 50 µM/m<sup>2</sup>/s, agitare periodică lentă. Durata cultivării – 10 zile. Au fost aplicate aceleași concentrații de clorură de sodiu ca și în cazul spirulinei.

Cantitatea DAM și activitatea antioxidantă a extractelor hidrice din biomasa de nostoc pe mediu standard și în condiții de stres salin sunt prezentate în figura 4.6. Spre deosebire de spirulină, în condiții de stres salin nostocul la cea de-a 3 zi a ciclului vital conține de 2.5-3.1 ori mai multă DAM comparativ cu controlul. În cazul acestei tulpini nivelul de peroxidare a lipidelor se intensifică semnificativ în condiții de stres salin. Activitatea antioxidantă a extractului hidric din biomasa de nostoc crescut pe mediu cu 10 g/l NaCl este mai mare comparativ cu martorul ( $p < 0.01$ ). Concentrațiile mai mari de NaCl provoacă scăderea acestui parametru. Cea mai joasă activitate de inhibiție a radicalului ABTS o are extractul din biomasa de nostoc crescut pe mediu cu 50 g/l sare (cu 31% mai mic ca martorul,  $p < 0.001$ ).



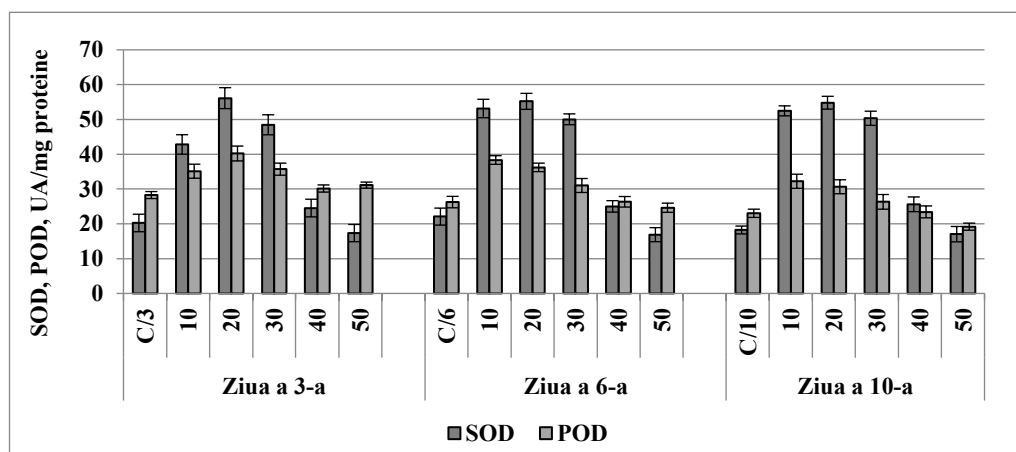
**Fig. 4.6. Activitatea antioxidantă și cantitatea de dialdehidă malonică în biomasa de *Nostoc linckia* la diferite concentrații de NaCl în mediu. (C/3, C/6, și C/10—controlul la ziua 3, 6 și 10); 10, 20, 30, 40, 50— concentrația de NaCl, g/l)**

La cea de-a 6 zi a ciclului vital, cantitatea DAM în biomasa de nostoc crescută pe medii cu diferite concentrații de NaCl rămâne cu mult mai mare față de martor (de 2.0-2.6 ori). Activitatea antioxidantă a extractelor hidrice în cazul concentrațiilor de NaCl de 10 și 20 g/l este la nivelul martorului, iar în cazul concentrațiilor de 30, 40 și 50 g/l este veridic mai joasă (cu 17-36%).

La cea de-a 10 zi a ciclului vital, în condiții de stres salin cantitatea DAM în biomasa de nostoc continuă să rămână înaltă, iar activitatea antioxidantă la concentrațiile de 30, 40 și 50 g/l – joasă comparativ cu martorul. Există și o deosebire față de rezultatele obținute pentru perioadele anterioare. În cazul concentrației de 10 g/l activitatea antioxidantă a extractului hidric din nostoc este veridic mai mare comparativ cu martorul. Activitatea enzimelor antioxidante primare în celulele ambelor tulpini studiate a fost modificată semnificativ în condiții de stres salin. La spirulina crescută în condiții de stres salin la concentrația de 10 g/l NaCl are loc

creșterea activității celor 3 enzime (Figura 4.7). Valorile crescute ale activității SOD în condiții de stres indus prin aplicarea concentrației de 10 g/l NaCl se mențin la toate etapele de monitorizare, inclusiv la cea de-a treia zi a ciclului vital. La a 6-a zi a ciclului vital activitatea SOD în variantele experimentale se păstrează la nivelul zilei a 3-a, iar activitatea POD scade comparativ cu valorile înregistrate anterior.

Tendința dată se păstrează și la cea de-a 10-a zi de cultivare, activitatea POD fiind și mai mică comparativ cu ziua a 6-a.



**Fig. 4.7. Activitatea enzimelor antioxidante la *Arthrospira platensis* în condiții de nivel diferit de salinitate. (C/3, C/6, și C/10—controlul la ziua 3, 6 și 10); 10, 20, 30, 40, 50—concentrația de NaCl, g/l)**

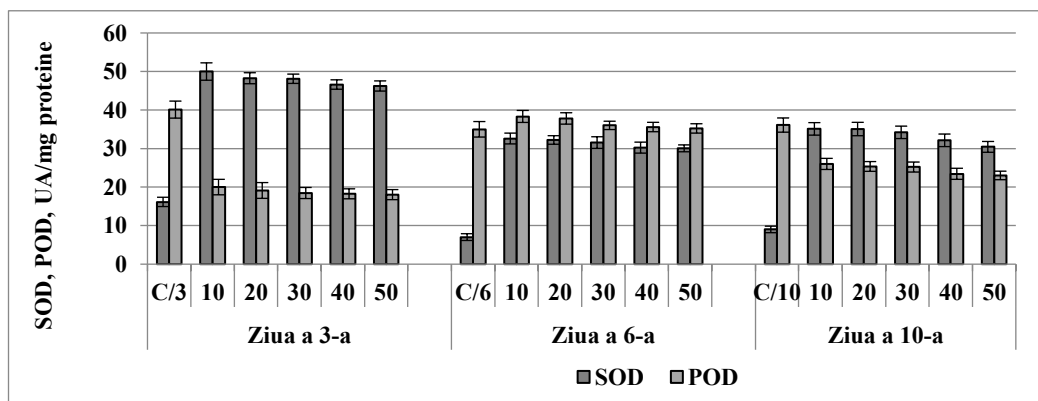
Conform rezultatelor prezentate anterior, la ziua a treia nu se observă o creștere a cantității de dialdehidă malonică în biomasa de spirulină crescută în condiții de stres salin. Într-o anumită măsură, aceasta poate fi explicat prin activitatea înaltă a enzimelor antioxidante primare, care asigură eliminarea eficientă a superoxid - radicalului (SOD), iar apoi a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> format ca rezultat al reacției de dismutație (POD). La concentrațiile înalte de NaCl funcția de eliminare a peroxidului de hidrogen este realizată de peroxidaze, activitatea cărora se menține la un nivel destul de înalt.

Ziua a 6-a de cultivare a spirulinei, în condiții de stres salin, se deosebește printr-un nivel foarte înalt al DAM în biomasă. Deosebirea de ziua a 3-a a ciclului vital constă în scăderea activității POD. Astfel, chiar dacă activitatea SOD este înaltă, scăderea activității enzimelor implicate în eliminarea H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> duce la acumularea acestei molecule reactive și la formarea celui mai periculos radical - radicalul hidroxil ( $\cdot$ OH). Deoarece radicalul hidroxil atacă activ toate macromoleculele învecinate site-ului de formare, inclusiv lipidele, procesul de peroxidare este foarte activ. Această situație este reflectată în mărirea nivelului de DAM, care la spirulină, în



condiții de stres salin, este pronunțată la sfârșitul fazei de creștere exponențială a culturii și în faza staționară.

Activitatea enzimelor antioxidante primare la tulpina *Nostoc linckia* CNM-CB-03, de asemenea, se modifică în condiții de stres salin (Figura 4.8).



**Fig. 4.8. Activitatea enzimelor antioxidante la *Nostoc linckia* în condiții de nivel diferit de salinitate. (C/3, C/6, și C/10—controlul la ziua 3, 6 și 10); 10, 20, 30, 40, 50— concentrația de NaCl, g/l)**

În linii generale, tendințele se păstrează ca și în cazul spirulinei. La nostoc, de asemenea, crește activitatea SOD și scade activitatea POD. La cea de a 3-a zi a ciclului vital, în condiții de stres salin, începând cu cea mai joasă concentrație de NaCl aplicată (10 g/l), activitatea SOD crește de peste 3 ori, iar activitatea POD scade aproximativ de 2 ori. Această situație se păstrează pe întreaga durată a ciclului vital cu anumite fluctuații valorice. În aceste condiții, ținând cont de explicațiile aduse mai sus, putem argumenta creșterea semnificativă a nivelului DAM în biomasa de nostoc în condiții de stres salin prin dezechilibrul în activitatea enzimelor antioxidante primare – creșterea activității SOD și scăderea activității POD.

Cantitatea de biomasă de spirulină produsă în condiții de stres salin la ziua a 3-a și a 6-a este practic la nivelul controlului (Tabelul A.4.3.). La sfârșitul ciclului vital însă (ziua a 10-a), în dependență de concentrația de NaCl, cantitatea de biomasă de spirulină acumulată este cu 16,8-35,6% mai joasă comparativ cu condițiile standard. Calitatea biomasei obținute, de asemenea, este diferită în condiții de stres salin. La ziua a 3 și a 6-a cantitatea de proteine în biomasa de spirulină crescută în condiții de stres salin scade ușor (în unele variante experimentale, statistic nesemnificativ) comparativ cu controlul.

Ca și în cazul biomasei, diferențele sunt evidente la sfârșitul ciclului vital. Biomasa de spirulină crescută în condiții de stres salin conține cu până la 29% mai puține proteine decât controlul. Scade și cantitatea de ficobiliproteine în biomasă.

La ziua a 6-a a ciclului vital, la concentrațiile de 30, 40 și 50 g/l NaCl cantitatea de ficobiliproteine scade cu 38-45% comparativ cu controlul. La sfârșitul ciclului vital și în cazul concentrațiilor mici (10 și 20 g/l) de NaCl cantitatea de ficobiliproteine în biomasă este semnificativ redusă – cu 27-34%.

Cantitatea de lipide în biomasa de spirulină crește în condiții de stres salin. Diferența este vizibilă deja la ziua a 3-a a ciclului vital, când în dependență de concentrația de sare utilizată s-a obținut o creștere de 12,6-20,4%. Odată cu vârsta culturii crește și diferența dintre cantitatea de lipide în biomasa de spirulină crescută în condiții de stres salin și control. La ziua a 10-a, în toate variantele cu stres salin cantitatea de lipide în spirulină este mai mare ca în control cu 35-63%. Cantitatea de glucide în spirulină în condiții de stres salin, de asemenea, crește. La cea de a treia zi a ciclului vital o creștere a conținutului de glucide se observă la concentrațiile de 30, 40 și 50 g/l NaCl (cu până la 33%). La sfârșitul fazei de creștere exponențială cantitatea de glucide în toate variantele cu stres salin este mai mare ca în control cu până la 46%. La ziua a 10-a creșterea conținutului de glucide este și mai pronunțată – cu 45-81% comparativ cu controlul.

Creșterea cantității de glucide și lipide în condiții de stres salin este orientată spre minimalizarea pierderii de apă de către celule în condiții hiperosmotice și prezintă un mecanism universal de protecție a organismelor în condiții extreme.

Și în cazul nostocului cantitatea de biomasă obținută în condiții de stres salin este mult mai joasă comparativ cu controlul. La concentrația de 10 g/l NaCl scăderea devine semnificativă doar la sfârșitul ciclului vital, când cantitatea de biomasă acumulată în condiții de stres este cu aproximativ 19% mai mică comparativ cu martorul. Celelalte concentrații provoacă o diminuare a cantității de biomasă începând cu cea de-a 6 zi a ciclului vital – cu până la 26%, iar la sfârșitul ciclului diferența constituie deja până la 39%.

Spre deosebire de spirulină, la nostoc cantitatea de proteine în biomasă variază ne semnificativ în condiții de stres salin. Doar concentrația de 50 g/l NaCl provoacă o scădere a conținutului de proteină cu până la 21% comparativ cu controlul. Cantitatea de ficobiliproteine rămâne la nivelul martorului pe durata fazei exponențiale în biomasa de nostoc crescută pe mediu cu 10 g/l NaCl. La sfârșitul ciclului vital chiar și la această concentrație se observă o scădere ușoară a cantității de ficobiliproteine. La concentrațiile mai mari de NaCl cantitatea de ficobiliproteine în nostoc scade cu 38-59% față de control. Conținutul de lipide în toate variantele cu stres salin la cea de-a 3-a zi a ciclului vital este la nivelul martorului, iar la ziua a 6-a și a 10-a crește semnificativ - cu 20-58% față de control. Și conținutul de glucide are un trend pozitiv în variantele cu stres salin, iar la sfârșitul ciclului se observă o creștere semnificativă cu până la 33% față de martor în toate variantele experimentale.

Concentrațiile înalte de sare în mediile de cultivare a tulpinilor studiate de spirulină și nostoc sunt asociate cu stresul oxidativ în celulele cianobacteriilor, fapt care este confirmat prin creșterea cantității de DAM, care este un produs final al peroxidării lipidelor. La concentrația de 10 g/l de NaCl sistemul enzimatic de protecție antioxidantă la spirulină funcționează echilibrat și asigură protecția eficientă a celulelor datorită activității mărite a SOD și POD. La concentrațiile înalte de NaCl apare o discrepanță în funcționarea acestui sistem, exprimată prin activitatea sporită a SOD și scăderea activității peroxidazei. La nostoc, același fenomen se observă la prima monitorizare (a treia zi) și este caracteristic pentru toate concentrațiile, inclusiv pentru cea de 10 g/l NaCl.

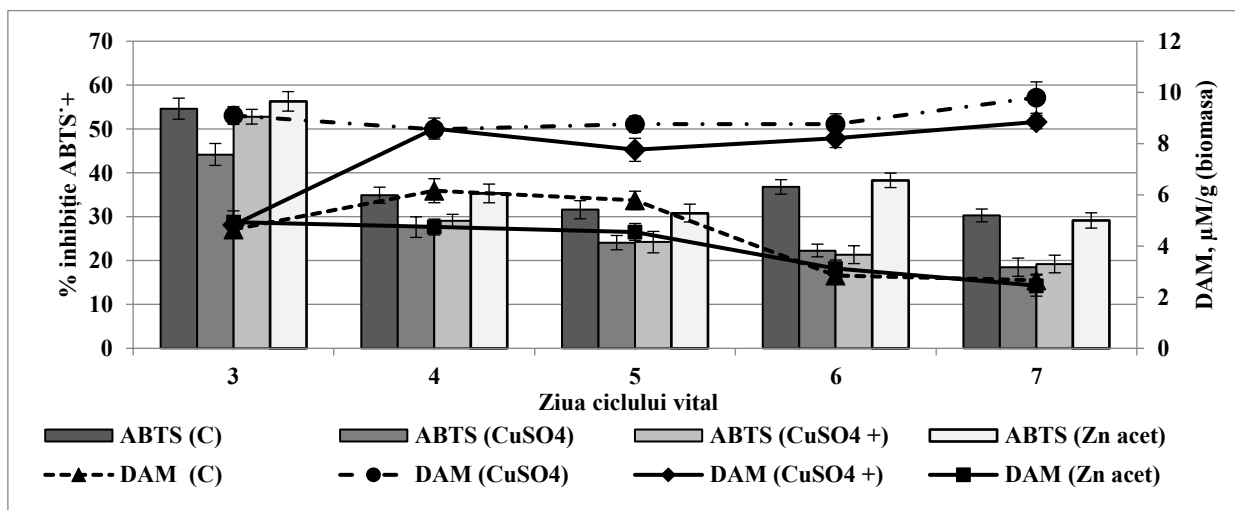
Ca rezultat al stresului instalat, cantitatea de biomasă obținută într-un ciclu de creștere scade esențial atât la spirulină, cât și la nostoc. Starea de stres afectează, de asemenea, și calitatea biomasei. Stresul salin duce la scăderea cantității de proteine și ficobiliproteine la ambele culturi și la creșterea conținutului de lipide și polizaharide.

#### **4.4. Influența ionilor metalici asupra *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11, *Nostoc linckia* CNM-CB-03 și *Porphyridium cruentum* CNM-AR-01**

În acest capitol este expusă analiza reacțiilor de răspuns ale culturilor de spirulină, nostoc și porfiridium la acțiunea  $Zn^{2+}$  (recunoscut ca stimulator de creștere în anumite limite de concentrații) și  $Cu^{2+}$  (cu potențial toxic pronunțat chiar la concentrații joase). Cuprul a fost introdus în formă de sare – sulfat de cupru, în cantitate de 5 mg/l, iar zincul – în formă de acetat de zinc de aceeași concentrație. Adăugarea sulfatului de cupru s-a efectuat la momentul pregătirii mediului nutritiv (varianta I) și la începutul fazei creșterii exponențiale (varianta II). Varianta a doua a fost aplicată pentru a verifica, dacă vârsta culturii are influență asupra nivelului de toxicitate provocat și dacă este posibil de a minimaliza efectele nocive asupra culturii. Monitorizarea parametrilor biochimici s-a efectuat pe durata fazei de creștere exponențială (ziua a 3-a – a 7-a). Mediul nutritiv utilizat în varianta control conținea  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  în cantitate de 0.08 mg/l și nu conținea zinc.

Cantitatea de dialdehidă malonică în biomasa de spirulină crescută în mediu cu cupru și zinc și activitatea antiradicalică a extractului hidric sunt prezentate în Figura 4.9. Conform rezultatelor, cantitatea de dialdehidă malonică în biomasa control și în cea crescută pe mediu cu acetat de zinc este la același nivel, iar în ziua a 4-a și a 5-a – cantitatea DAM este chiar mai mare în cazul martorului. Astfel, acetatul de zinc nu a fost un factor de stres, care să inducă oxidarea accelerată a lipidelor din componența celulelor de spirulină.

Complet altfel a fost situația la adăugarea sulfatului de cupru. Prezența metalului în mediul nutritiv, care este adăugat la inocularea culturii se asociază cu mărirea cantității de DAM în biomasa de spirulină pe durata fazei de creștere exponențială de 1,3-3,7 ori comparativ cu controlul și de 1,8-4,0 ori comparativ cu valorile respective obținute la adăugarea acetatului de zinc în mediu nutritiv. Și cea de-a doua variantă experimentală, când sulfatul de cupru a fost adăugat la cea de-a treia zi de cultivare, de asemenea, se deosebește prin valori foarte înalte ale DAM. Diferența este vizibilă începând cu cea de-a 4 zi a ciclului vital. Pe durata perioadei între zilele a 4-a și a 7-a în această experiență, cantitatea DAM este de 1,3 – 3,3 ori mai mare comparativ cu controlul și de 1,7-3,6 ori mai mare față de nivelul DAM în spirulina crescută în prezența acetatului de zinc



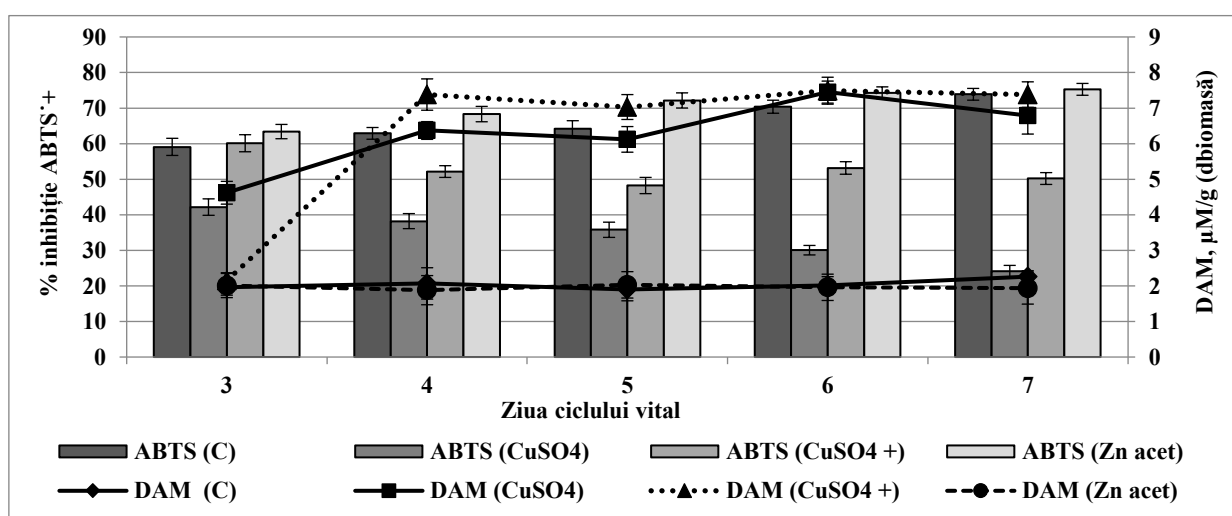
**Fig.4.9. Activitatea antioxidantă și conținutul de dialdehidă malonică în biomasa de *Arthrospira platensis* în prezența cuprului și zincului. ((C) - control; (CuSO<sub>4</sub>) - 5 mg/l CuSO<sub>4</sub> adăugat la prima zi; (CuSO<sub>4</sub>+) - 5 mg/l CuSO<sub>4</sub> adăugat la ziua a 3-a; (Zn acet) - 5 mg/l ZnC<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub> adăugat la prima zi)**

Activitatea antioxidantă a extractelor hidrice din biomasa de spirulină de asemenea este modificată în cazul utilizării sulfatului de cupru. În ambele variante experimentale se observă o scădere semnificativă ( $p < 0,001$ ) a valorilor testului ABTS. În cazul aplicării acetatului de zinc nu are loc o modificare semnificativă a activității antioxidante.

Datele prezentate mai sus demonstrează că cuprul induce o stare de stres pronunțat la spirulină, care este confirmat prin creșterea cantității DAM și scăderea activității antioxidante a extractelor hidrice din biomasă. Adăugarea întârziată a sulfatului de cupru nu ameliorează situația dată. La 24 ore după adăugarea ionilor de metal, cantitatea DAM o depășește pe cea din

biomasa probei control de 1,7 ori, iar la sfârșitul fazei de creștere exponențială, cantitatea de produse finale ale degradării oxidative ale lipidelor este de 3,6 ori mai mare ca în control. Zincul nu produce accelerarea procesului de peroxidare al lipidelor, cantitatea DAM fiind la nivelul controlului. De asemenea, nici activitatea antioxidantă nu este modificată la spirulina sub influența zincului.

Mediul nutritiv pentru creșterea tulpinii *Nostoc linckia* CNMN-CB-03 conține zinc în formă de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  în cantitate de 0.05 mg și nu conține cupru. Cantitatea de dialdehidă malonică în biomasă de nostoc obținută pe mediu la care a fost adăugat sulfatul de cupru ori acetatul de zinc în cantitate de 5 mg/l și activitatea antiradicalică a extractului hidric sunt prezentate în Figura 4.10.

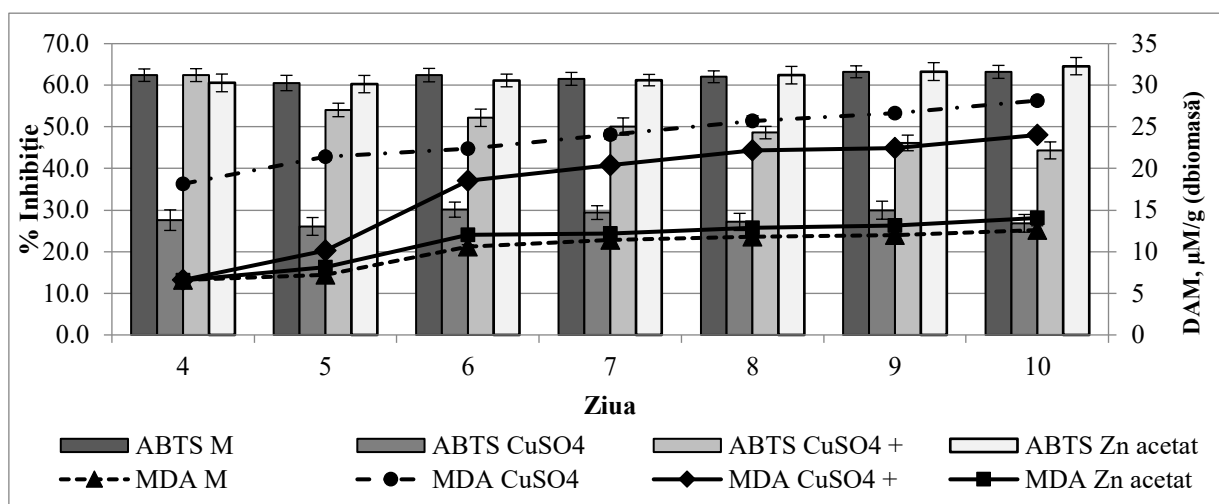


**Fig.4.10. Activitatea antioxidantă și conținutul de dialdehidă malonică în biomasa de *Nostoc linckia* în prezența cuprului și zincului. ((C) - control; (CuSO<sub>4</sub>) - 5 mg/l CuSO<sub>4</sub> adăugat la prima zi; (CuSO<sub>4</sub>+) - 5 mg/l CuSO<sub>4</sub> adăugat la ziua a 3-a; (Zn acet) - 5 mg/l ZnC<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub> adăugat la prima zi)**

Ca și în cazul spirulinei, adăugarea la mediul nutritiv a unei cantități de 5 mg/l de acetat de zinc nu a provocat modificarea nivelului DAM în biomasă și nici a activității antioxidante a extractului hidric. Sulfatul de cupru însă, a provocat o creștere semnificativă a dialdehidei malonice și o scădere a activității antioxidante a extractelor hidrice. În cazul DAM, termenul de introducere a sării de cupru nu a avut un impact vădit. Atât în cazul introducerii CuSO<sub>4</sub> în mediu nutritiv la inoculare, cât și în cazul adăugării lui la ziua a 3-a a ciclului vital, cantitatea DAM în biomasa de nostoc crește de 3,0-3,7 ori. În schimb, la adăugarea cuprului la începutul fazei de creștere exponențială activitatea antioxidantă a extractelor hidrice din biomasă scade mai puțin (cu 20-47%) comparativ cu experiența unde cuprul a fost adăugat la începutul ciclului vital (scăderea cu 40-206%). Rezultatele demonstrează că sulfatul de cupru în cantitate de 5 mg/l, în

special la adăugarea lui la începutul ciclului vital, generează o stare de stres oxidativ pronunțat. Cantitatea markerului stresului – DAM - crește de peste 3 ori, iar activitatea antioxidantă scade spre sfârșitul fazei creșterii exponențiale, de asemenea, de 3 ori. Adăugarea mai târzie a sulfatului de cupru este asociată totuși cu starea de stres oxidativ pronunțat, dar scăderea activității antioxidante a extractelor hidrice în acest caz este de cel mult 1,5 ori față de proba martor.

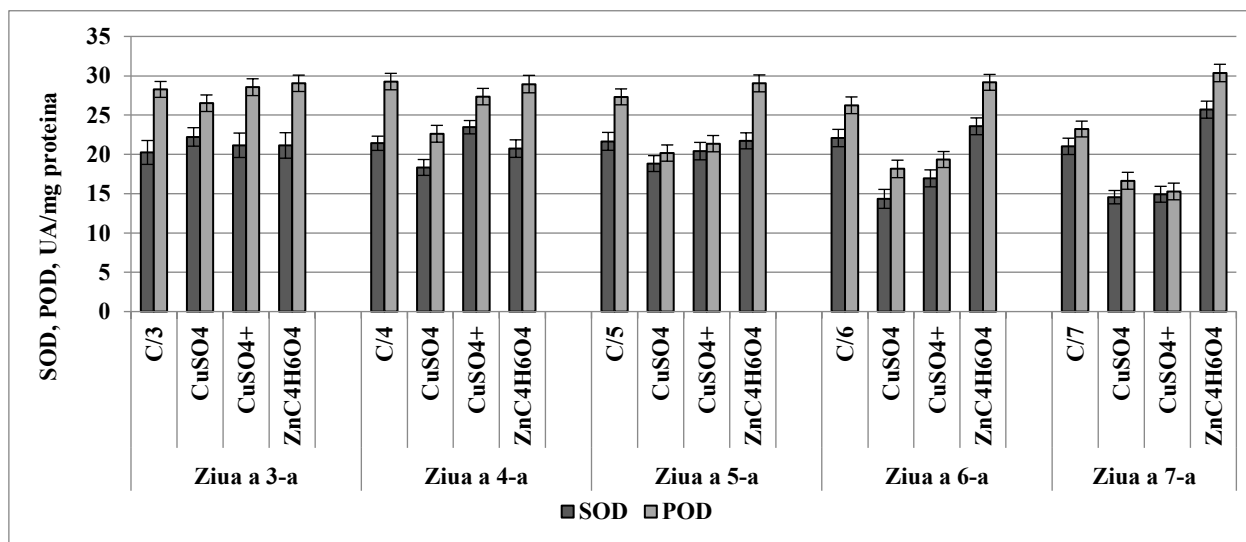
Același tip de test a fost realizat și pentru cultura de porfiridium. Rezultatele sunt prezentate în figura 4.11. Activitatea antioxidantă a extractului hidric din biomasa de porfiridium în raport cu radicalul ABTS<sup>•+</sup>, în varianta cu adăugarea sulfatului de cupru la prima zi scade de 2.1-2.4 ori comparativ cu martorul. La adăugarea cuprului în cea de-a treia zi de cultivare de asemenea, se observă o scădere a acestui parametru, dar mult mai puțin pronunțată – de maximum 1.4 ori față de martor, efectul negativ fiind în creștere pe durata ciclului de cultivare a microalgei. Prezența acetatului de zinc nu produce modificări ale valorilor testului ABTS pe durata cultivării.



**Fig.4.11. Activitatea antioxidantă și conținutul de dialdehidă malonică în biomasa de *Porphyridium cruentum* în prezența cuprului și zincului. ((C) - control; (CuSO<sub>4</sub>) - 5 mg/l CuSO<sub>4</sub> adăugat la prima zi; (CuSO<sub>4</sub>+) - 5 mg/l CuSO<sub>4</sub> adăugat la ziua a 3-a; (Zn acetat) - 5 mg/l ZnC<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub> adăugat la prima zi)**

Cantitatea de dialdehidă malonică în biomasa de porfiridium în cazul prezenței acetatului de zinc în mediu este similară cu cea caracteristică martorului. Prezența ionilor de cupru produce o creștere semnificativă a cantității DAM, în ambele variante de administrare a compusului. Atunci când sulfatul de cupru este adăugat la ziua a 3-a de cultivare cantitatea DAM crește de 1.4 – 1.9 ori comparativ cu martorul, iar în cazul adăugării compusului la începutul ciclului de creștere – de 2.1 -3 ori.

Activitatea enzimelor antioxidante se modifică puternic sub acțiunea cuprului, atât la spirulină, cât și la nostoc. La adăugarea cuprului la inoculare, începând cu cea de-a 4 zi a ciclului vital se observă o scădere semnificativă a activității superoxid-dismutazei la spirulină. Când sulfatul de cupru a fost adăugat la cea de-a treia zi de cultivare, scăderea semnificativă a activității SOD se observă la cea de-a 6-a zi. Observăm că în ambele variante, la sfârșitul fazei de creștere exponențială avem o scădere cu 41-44 % a activității SOD în experiențele cu cupru comparativ cu controlul (Figura 4.12).

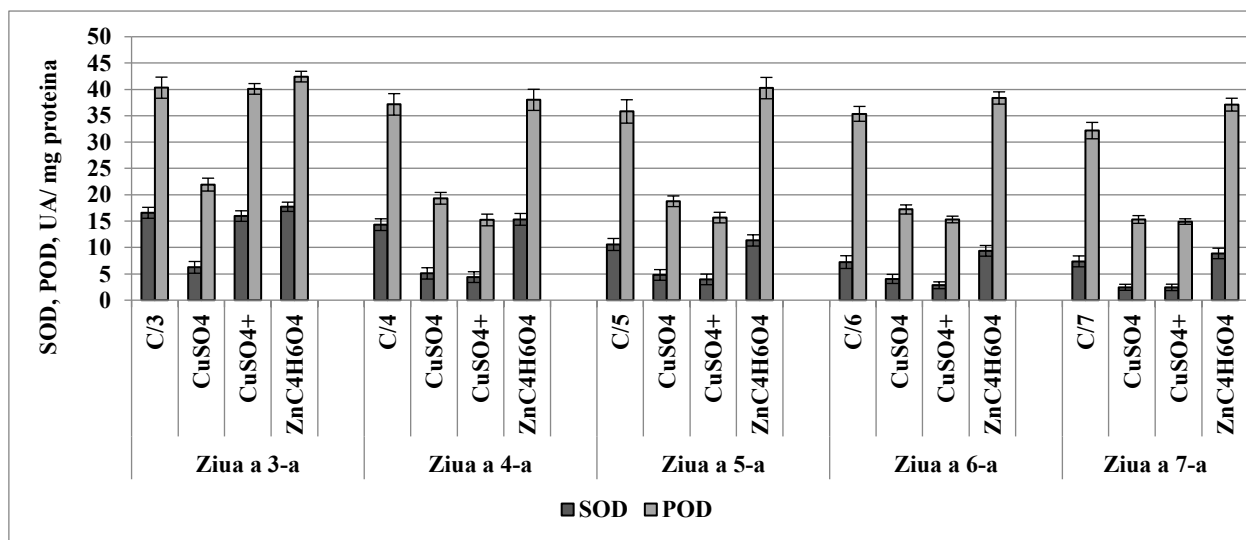


**Fig.4.12. Activitatea enzimelor antioxidante în biomasa de *Arthrospira platensis* în prezența cuprului și zincului. ((C/3, C/4, C/5, C/6, C/7) - controlul pentru ziua respectivă; (CuSO<sub>4</sub>) - 5 mg/l CuSO<sub>4</sub> adăugat la prima zi; (CuSO<sub>4</sub>+) - 5 mg/l CuSO<sub>4</sub> adăugat la ziua a 3-a; (Zn acet) - 5 mg/l ZnC<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub> adăugat la prima zi)**

Activitatea peroxidazei, de asemenea, scade sub influența cuprului. La cea de-a 7-a zi această scădere constituie 39-52%. Astfel, acțiunea inhibitoare a cuprului asupra enzimelor antioxidante primare nu se vede imediat, ci se manifestă în timp. Acetatul de zinc nu are efect inhibitor asupra SOD și POD la spirulină. Activitatea enzimelor pe durata fazei de creștere exponențială este la nivelul controlului, iar la cea de-a 7 zi de cultivare se observă o creștere semnificativă a activității SOD și POD sub acțiunea zincului (cu 22,2 și 30,7%, respectiv).

La nostoc, cuprul provoacă inhibarea activității enzimelor antioxidante primare pe toată durata fazei de creștere exponențială (figura 4.13). Atunci când sulfatul de cupru a fost adăugat la inoculare, la începutul fazei creșterii exponențiale activitatea SOD scade de 2,7 ori, iar POD – de 1,8 ori comparativ cu controlul. Pe durata acestei faze, în biomasa de nostoc crescut pe mediu cu sulfat de cupru se menține un nivel jos al activității enzimelor antioxidante. La sfârșitul fazei, nivelul de inhibiție al enzimelor este foarte pronunțat.

Atunci când sulfatul de cupru este introdus la ziua a 3-a de cultivare, deja peste 24 ore activitatea SOD și POD scade semnificativ (de 3,3 și 2,4 ori, respectiv). Și în această variantă activitatea enzimelor antioxidante primare rămâne mult mai joasă comparativ cu controlul pe durata fazei exponențiale.



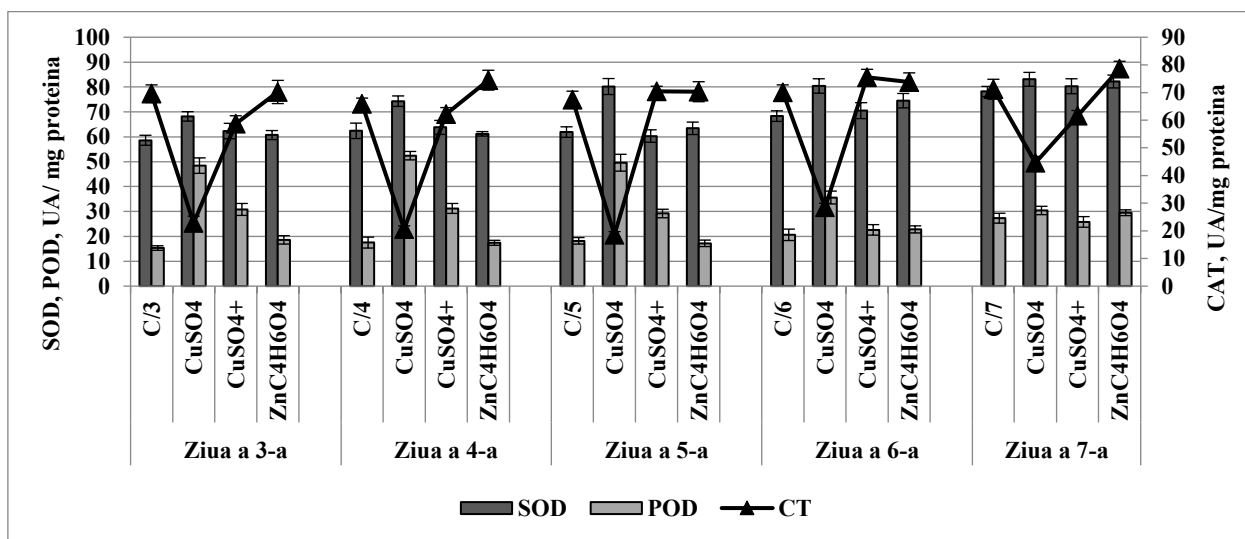
**Fig.4.13. Activitatea enzimelor antioxidante în biomasa de *Nostoc linckia* în prezența cuprului și zincului. ((C/3, C/4, C/5, C/6, C/7) - control pentru ziua respectivă; (CuSO<sub>4</sub>) - 5 mg/l CuSO<sub>4</sub> adăugat la prima zi; (CuSO<sub>4</sub>+) - 5 mg/l CuSO<sub>4</sub> adăugat la ziua a 3-a; (Zn acet) - 5 mg/l ZnC<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub> adăugat la prima zi)**

Acetatul de zinc nu modifică esențial activitatea enzimelor antioxidante la nostoc. Atât la începutul, cât și la sfârșitul fazei exponențiale activitatea SOD și POD se menține la nivelul controlului.

La cultura *Porphyridium cruentum*, de asemenea, putem urmări modificări serioase ale activității enzimelor antioxidante de primă linie de protecție, în special în condiții de interacțiune cu ionii de cupru (figura 4.14). Cele mai mici fluctuații au fost observate pentru enzima superoxidismutaza, activitatea căreia crește semnificativ doar în cazul adăugării sulfatului de cupru la începutul ciclului de cultivare, dar aceste deosebiri se atenuează spre finalul fazei de creștere exponențială. Activitatea enzimelor implicate în înlăturarea peroxidului de hidrogen – catalaza și peroxidaza, însă, se modifică într-o manieră mult mai accentuată. La adăugarea sulfatului de cupru la începutul perioadei de cultivare se produce o creștere a activității POD și o diminuare a activității catalazei (CAT). În zilele 3-5, activitatea POD crește de 2.5 -3.0 ori comparativ cu martorul, iar activitatea CAT scade de peste trei ori. În următoarea zi diferențele se atenuează, dar totuși rămân semnificative. În ziua a șaptea, activitatea POD revine la nivelul martorului, iar activitatea CAT rămâne semnificativ mai joasă. La adăugarea sulfatului de cupru



în sistem la începutul fazei creșterii accelerate a culturii, variațiile activității enzimice repetă același model ca și în cazul descris mai sus, dar amplitudinea oscilațiilor este mult mai redusă.



**Fig.4.14. Activitatea enzimelor antioxidante în biomasa de *Porphyridium cruentum* în prezența cuprului și zincului. ((C/3, C/4, C/5, C/6, C/7) - control pentru ziua respectivă; (CuSO<sub>4</sub>) - 5 mg/l CuSO<sub>4</sub> adăugat la prima zi; (CuSO<sub>4</sub>+) - 5 mg/l CuSO<sub>4</sub> adăugat la ziua a 3-a; (Zn acet) - 5 mg/l ZnC<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub> adăugat la prima zi)**

Activitatea enzimelor antioxidante în biomasa spirulinei și a nostocului sub acțiunea cuprului și a zincului denotă două stări diferite ale culturilor de cianobacterii. În cazul cuprului este vorba de un stres oxidativ profund. Căderea activității SOD și POD duce la acumularea radicalilor și moleculelor reactive, care atacă lipidele din componența membranelor. Ca rezultat al procesului de peroxidare a acestora se formează o cantitate sporită de DAM, care servește drept marker al stresului.

În cazul acetatului de zinc este o situație diferită. Activitatea enzimelor antioxidante primare nu este afectată și ca rezultat, acestea realizează protecția eficientă a celulelor. Lipsa stresului este confirmată și prin nivelul normal al DAM.

Cantitatea de biomasă de spirulină este influențată esențial de cupru. La adăugarea sulfatului de cupru la începutul ciclului de viață, cantitatea de biomasă de spirulină scade cu până la 40 % spre mijlocul fazei de creștere exponențială, iar la ziua a 6-a cultura este deja în faza de declin (Tabelul A. 4.4). Situația este mai bună în cazul adăugării sulfatului de cupru la cea de a treia zi de cultivare. În acest caz, cantitatea de biomasă obținută la sfârșitul fazei de creștere exponențială este cu până la 24% mai joasă comparativ cu cultura netratată.

Ținând cont de faptul că în producerea industrială de cele mai multe ori parametrul principal este cantitatea de biomasă obținută, situația descrisă mai sus ar părea o soluție în cazul

când este necesar de a introduce anumite substanțe chimice la mediul nutritiv. Aparent, adăugarea acestora la începutul fazei de creștere exponențială ar soluționa problema pierderilor masive de biomasă. În același timp, în aceste condiții cantitatea de dialdehidă malonică este foarte înaltă în biomasă și practic nu se deosebește de varianta, când sulfatul de cupru este adăugat la începutul cultivării (Figura 4.12). Astfel, cu toate că avem un nivel acceptabil de biomasă, calitatea ei poate prezenta un pericol real pentru consumatori din cauza produselor degradării oxidative a acesteia. Situația dată denotă că cantitatea de biomasă nu poate fi un indicator al siguranței produselor ficologice și este necesar de a introduce parametri de control, care să permită de a evita utilizarea biomasei care prezintă potențial prooxidant înalt. Acetatul de zinc din contra, la începutul fazei de creștere exponențială, provoacă o creștere a biomasei de spirulină cu până la 21%, iar spre sfârșitul fazei, avem o egalare cu controlul (Tabelul A. 4.4). Conținutul de proteine și ficobiliproteine în biomasa de spirulină scade atunci când cuprul este adăugat la începutul ciclului de viață. Astfel, cantitatea de proteine sub influența cuprului este cu 38% mai joasă la sfârșitul fazei de creștere exponențială, iar cantitatea ficobiliproteinelor scade de peste 10 ori. La adăugarea cuprului la ziua a treia conținutul de proteine în spirulină nu se modifică semnificativ, în schimb cantitatea de ficobiliproteine scade de 2.3 ori. Cantitatea de lipide este mărită sub acțiunea cuprului cu peste 40% în ambele variante. Și cantitatea hidraților de carbon crește sub influența cuprului de 2.0-2.3 ori.

În cazul nostocului, sulfatul de cupru are efect de diminuare a biomasei obținute doar în varianta în care a fost adăugat la începutul cultivării. Comparativ cu spirulina, la nostoc nu se observă clar un declin al culturii, dar are loc o oprire a acumulării de biomasă. Aceasta poate fi explicat prin capacitatea nostocului de a intra în perioade de latență în caz de condiții nefavorabile ale mediului ambiant. Atunci când sulfatul de cupru este adăugat la cea de-a treia zi de cultivare, practic nu avem o scădere semnificativă statistic a cantității de biomasă, doar că și această tulpină acumulează o cantitate foarte înaltă de DAM.

Calitatea biomasei de nostoc, de asemenea, este modificată sub influența cuprului. Ca și la spirulină, la nostoc cantitatea de proteine scade de peste 2 ori atunci când sulfatul de cupru este adăugat la începutul ciclului de viață și de peste 3 ori, când cuprul este adăugat la cea de a treia zi. Cantitatea de ficobiliproteine, indiferent de timpul adăugării cuprului scade de peste 3 ori comparativ cu martorul. În ambele variante cu cupru, în biomasa de nostoc crește conținutul de carbohidrați de aproximativ 1.3 ori și de lipide – de până la 1.6 ori. Acetatul de zinc nu produce modificări majore în cantitatea proteinelor totale, lipidelor și hidraților de carbon la spirulină și nostoc. Doar cantitatea de ficobiliproteine la spirulină scade cu 29%, iar la nostoc – crește cu 45% (datele analizate pot fi urmărite în Tabelul A4.4).

Microalga *Porphyridium cruentum* prezintă reacții foarte asemănătoare cu cele ale nostocului. Cantitatea de biomasă obținută la finalul ciclului de cultivare în prezența cuprului este mai joasă, cu 12 % comparativ cu martorul în cazul adăugării compusului în cea de-a treia zi de cultivare și cu 25% la adăugarea acestuia în prima zi. Chiar dacă parametrii biochimici ai biomasei se modifică în limite moderate (datele pot fi urmărite în tabelul A4.5), cantitatea DAM și abaterea de la valorile normale a activității enzimelor antioxidante de prima linie indică clar că prezența ionilor de cupru sunt un factor de stres eminent pentru această microalgă.

Astfel, aici am analizat două situații diferite: acțiunea unui metal cu potențial toxic înalt – cuprul, și a unuia mai puțin toxic – zincul asupra a trei tulpini de importanță industrială – *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11, *Nostoc linckia* CNMN-CB-03 și *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01. Am constatat că cuprul induce stresul oxidativ la toate tulpinile, fiind adăugat la inoculare, ori la cea de-a treia zi de creștere. În aceste condiții, în biomasa ficologică crește semnificativ cantitatea DAM, scade activitatea antioxidantă a extractelor hidrice, se modifică semnificativ activitatea enzimelor antioxidante primare.

Cantitatea de biomasă în cazul celor trei tulpini scade semnificativ atunci când cuprul este adăugat la inoculare. În cazul când cuprul este adăugat la cea de a treia zi de cultivare, pierderile de biomasă sunt mai puțin pronunțate, la fel ca și cele de proteină sau alți compuși valoroși.

Ambele tulpini cianobacteriene au răspuns prin mărirea cantității de carbohidrați și de lipide la prezența cuprului, indiferent de timpul de adăugare a lui, iar în cazul porfiridiumului crește doar cantitatea de carbohidrați, în timp ce cantitatea de lipide scade. De asemenea, în biomasa de spirulină și nostoc scade semnificativ cantitatea pigmentilor ficobilinici sub influența cuprului. În cazul porfiridiumului, reducerea cantității de pigmenti ficobilinici persistă, dar este mai puțin pronunțată.

Acetatul de zinc în concentrația de 5mg/l nu s-a manifestat ca inductor de stres la tulpinile studiate. Astfel, cantitatea de DAM, activitatea antioxidantă a extractelor hidrice și activitatea enzimelor antioxidante primare nu se modifică sub influența zincului, ori se modifică în limite foarte înguste. În același timp, în cazul nostocului zincul sporește cantitatea de biomasă cu peste 20%. În mod diferit se modifică și cantitatea de ficobiliproteine – scade la spirulină și crește la nostoc. Astfel, zincul poate fi un inductor ori inhibitor specific pentru anumite procese metabolice la cianobacterii, iar pentru descifrarea mecanismelor acestei acțiuni este necesar de a acumula date cu referire la diferite tulpini.

#### 4.5. Concluzii la capitolul 4.

În acest capitol este prezentat efectul stresului termic și al iluminării asupra spirulinei (tulpina *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11) în condiții de laborator și de producere industrială. De asemenea, sunt descrise efectele stresului salin și stresului provocat de ionii metalici asupra spirulinei și nostocului (tulpina *Nostoc linckia* CNMN-CB-03) și efectele stresului provocat de cupru asupra porfiridiumului (tulpina *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01) în condiții de laborator.

Rezultatele obținute sugerează că condițiile de producție, cu menținerea nivelului optim al factorilor fizici, pentru spirulină sunt condiții de stres în comparație cu cele de laborator, fapt confirmat prin cantități mai mari ale markerului de stres în biomasă, în special în punctele vulnerabile ale ciclului vital. Temperatura mai înaltă decât optimul pentru cultură și iluminarea periodică sunt factori de stres pentru spirulină atât în condiții de laborator, cât și de producere. Cantitatea de dialdehidă malonică din biomasa crescută în condiții de laborator la temperatură supraoptimală a fost de 3 ori mai mare față de temperatura optimă, iar în condiții de producere industrială - cu 37% mai mare. Activitatea enzimelor antioxidante primare, de asemenea, este mai înaltă atunci când spirulina crește în regim termic supraoptimal, în special discrepanța fiind caracteristică pentru faza de latență și faza de creștere exponențială timpurie. Astfel, sensibilitatea spirulinei la stres hipertermic este mai pronunțată în condiții de laborator comparativ cu condițiile industriale.

*Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 este o tulpină tehnologică selectată pentru cultivarea industrială în condiții de iluminare continuă și ciclu tehnologic comparativ scurt. Condițiile fotoperiodismului cu 12 ore de lumină și 12 ore de întuneric induc o stare de stres, care este foarte pronunțată în condiții de laborator pe tot parcursul ciclului vital al cianobacteriei, cu accent deosebit la trecerea culturii în faza staționară. În condiții industriale, fotoperiodismul poate fi privit, de asemenea, ca un stres, dar de o intensitate mult mai mică față de situația din laborator. Condițiile fotoperiodismului cauzează o creștere a activității enzimelor antioxidante, în special pe durata fazelor de latență și creștere exponențială. Pe durata fazei staționare în condiții de laborator are loc o reducere semnificativă a activității SOD, fenomen care lipsește în condiții de producere industrială.

Rezultatele obținute în cadrul cercetărilor descrise în acest capitol sugerează necesitatea aplicării în condiții de producere a mai multor parametri de control a calității decât cei care au la bază productivitatea. Astfel, cu toate că s-a demonstrat că iluminarea periodică este o stare de stres pentru tulpina *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 la diferite etape ale ciclului, cantitatea de biomasă obținută atât în condiții de laborator, cât și în condiții industriale este cu aproximativ

40-60% mai mare decât în condiții de iluminare continuă. În același timp, avem o scădere pronunțată a unuia dintre principalii parametri de calitate a biomasei de spirulină – cantitatea de proteine în biomasă, care în condițiile menționate este cu până la 26% mai joasă decât în condiții de iluminare continuă. În schimb, în aceste condiții putem asigura o producere mai mare de ficobiliproteine (cu 32%) și carbohidrați (până la 1,8 ori) în comparație cu iluminarea continuă. Astfel, în dependență de scopul în care va fi utilizată biomasa obținută, putem aplica diverse strategii de gestionare eficientă a stărilor de stres în culturile cianobacteriene.

Salinitatea ridicată este un factor de stres pentru culturile de spirulină și nostoc, care este confirmată printr-un nivel înalt al markerului de stres și printr-o discrepanță în funcționarea sistemului antioxidant enzimatic, exprimată prin activitatea sporită a SOD și scăderea activității peroxidazice. Ca urmare a acestor fenomene, în condiții de stres salin, biomasa cianobacteriană produsă într-un ciclu de creștere scade substanțial, iar componența acesteia este deplasată de la optimul caracteristic - cantitatea de proteine și ficobiliproteine scade, iar conținutul de lipide și polizaharide crește comparativ cu martorul.

În dependență de potențialul toxic pe care îl au, metalele, de asemenea, pot induce starea de stres oxidativ la culturile de cianobacterii și microalge. Cuprul induce stresul oxidativ la toate cele trei tulpini implicate în studiu, fapt confirmat prin creșterea nivelului DAM, modificarea activității antioxidante a biomasei și a activității enzimelor antioxidante primare în limite foarte largi, scăderea semnificativă a cantității de biomasă ficologică obținută în cadrul unui ciclu tehnologic și conținutul de ficobiliproteine în aceasta. Ambele tulpini cianobacteriene au răspuns la prezența cuprului prin reducerea semnificativă a conținutului de ficobiliproteine, creșterea cantității de carbohidrați și lipide, iar tulpina microalgă – prin creșterea cantității de carbohidrați.

Astfel, patru tipuri diferite de stres au generat modificări generalizate în toți parametrii productivi și de siguranță ai biomasei de spirulină, nostoc și porfiridium, fiind afectată productivitatea, componența biochimică, activitatea antioxidantă și cantitatea markerului stresului oxidativ.

Cele menționate mai sus pot fi expuse în următoarele concluzii:

1. Procesul tehnologic de creștere industrială, în care se mențin condițiile optime, este o stare de stres pentru cianobacteria *Arthrospira platensis* CNMN-11 față de condițiile de laborator. Răspunsul spirulinei la stres în condiții de laborator poate fi diferit de cel care apare în condiții industriale. Transferul tehnologic din laborator poate fi efectuat numai după verificarea rezultatelor în condiții industriale.

2. Toate tipurile de stres sunt asociate cu creșterea cantității de DAM din biomasa ficologică, cu modificarea activității antioxidante a extractelor hidrice și a activității enzimelor antioxidante de primă linie de protecție. În funcție de tulpină, tipul de stres și de intensitatea lui, valorile parametrilor care reflectă statutul antioxidant al biomasei pot crește sau scădea.
3. În condiții de stres moderat (de exemplu, în cazul iluminării periodice) se pot obține anumite avantaje tehnologice, cum ar fi creșterea producției de biomasă și niveluri ridicate de ficobiliproteine și carbohidrați din biomasă. Cu toate acestea, situația dată trebuie tratată cu precauție maximă, deoarece este asociată cu un risc ridicat de acumulare de radicali liberi, care rezultă din stresul indus. Atunci când scopul producerii nu este utilizarea biomasei integrale, ci extracția anumitor componente bioactive (ex. ficobiliproteine, polizaharide), avantajele stresului moderat pot fi aplicate cu succes ca soluții tehnologice simple, ieftine și eficiente.

Ideile și concluziile enunțate mai sus au fost expuse în multiple publicații (monografii, capitole în monografii, articole în reviste științifice, articole și teze la conferințe) [1-4, 6-8, 15, 21, 23, 29, 59, 83, 89, 91, 98, 112, 113, 370, 373-375].

## 5. STRESUL OXIDATIV ÎN NANOBIOTEHNOLOGIA CIANOBACTERIILOR ȘI MICROALGELOR

Nanomaterialele de diferite tipuri devin practic omniprezente în ultimul deceniu datorită utilizării intense într-o gamă largă de industrii [179, 346]. Ca rezultat se conturează mai multe elemente de interacțiune între obiectele ficologice și nanomaterialele, în special cu nanoparticulele [275, 276, 315]. Printre acestea, unul dintre primele aspecte este cel al nanobiosintezei realizate cu ajutorul microalgelor și cianobacteriilor. Nanobiosinteza este activ explorată de cercetători în ultimul timp, accentul fiind pus pe utilizarea diferitor tipuri de extracte caracterizate prin capacitate de reducere mare. Mai puțin este studiat aspectul sintezei nanoparticulelor în celulele vii ale microalgelor și cianobacteriilor, care are loc datorită activării mecanismului de protecție care transformă ionii agresivi în forme mai puțin toxice (de exemplu de nanoparticule).

Cel de-al doilea aspect al interacțiunii nanomaterialelor cu cianobacteriile și microalgele este cel al efectelor biologice generate de nanoparticule produse industrial și deversate în mediul ambiant ori aplicate în mod intenționat în calitate de factori biotehnologici. Din acest punct de vedere, nanoparticulele pot fi tratate ca stimulatori ai diferitor procese sau ca inhibitori, aspectele de toxicitate și siguranță fiind de bază atunci când vorbim despre aplicare în biotehnologie [198]. În multe cazuri, contactul dintre nanomateriale și celulele microalgelor și cianobacteriilor declanșează mecanisme de biotransformare, prin care nanomaterialele cu potențial toxic sunt modificate prin atribuirea de straturi de înveliș suplimentare formate din componentele celulare proprii. Acest proces, numit biofuncționalizare a nanomaterialelor, prezintă un alt aspect al interacțiunii nanomaterialelor cu obiectele ficologice. În acest capitol este analizat rolul stresului oxidativ în procesele asociate cu cele trei aspecte descrise mai sus: bionanosinteza, bionanofuncționalizarea și bionanotoxicitatea.

### 5.1. Stresul oxidativ la cianobacterii și microalge în procesul de bionanosintează

Metoda biologică de sinteză a nanoparticulelor are multiple priorități, cea mai importantă fiind caracterul prietenos mediului. În scopuri de bionanosintează sunt utilizate diverse organisme vii, celule și derivate celulare, printre care și microorganismele fotosintetizatoare [187, 261, 262, 336, 389]. Cianobacteriile și microalgele reprezintă obiecte de studiu interesante în ceea ce privește biosinteza nanoparticulelor, deoarece sunt o sursă de metaboliți cu proprietăți reducătoare care pot asigura eficiența procesului. În scopul nanobiosintezei au fost utilizați cu succes numeroși reprezentanți ai cianofitelor, ca de exemplu *Plectonema boryanum*, *Anabaena* sp., *Calothrix* sp., *Oscillatoria willei*, *Lyngbya majuscula*, *Spirulina subsalsa* ș.a. [30, 69, 261, 437]. În cazul

cianobacteriilor biosinteza nanoparticulelor se realizează extracelular sau în baza derivatelor celulare, cum ar fi extractele proteice, extractelor glucidice, fracția de C-ficoeretrină ș.a. [69, 161, 187, 262, 277, 463, 300, 301]. În acest subcapitol, însă, vom pune accent pe biosinteza nanoparticulelor cu utilizarea culturilor vii de microalge și cianobacterii.

### **5.1.1. Biosinteza nanoparticulelor de argint în culturile vii de cianobacterii și microalge și efectele asociate procesului**

Nanoparticulele de argint (AgNP) prezintă unele dintre cele mai solicitate nanomateriale. Datorită proprietăților lor optice, electrice și termice, conductivității electrice ridicate și activității biologice, AgNP pot avea diferite aplicații în medicină, industria farmaceutică, cosmetică, alimentară și textilă, optoelectronică etc. Printre proprietățile biologice ale AgNP menționăm, în special, cele antibiotice, fiind active contra culturilor bacteriene [57, 75, 155, 195, 478], fungice [41, 57, 282, 321, 462, 478] și contra virusurilor [124, 166, 323, 393]. De asemenea, AgNP posedă acțiuni antiinflamatoare și anti-angiogenică [296]. Astfel, datorită proprietăților menționate mai sus, nanoparticulele de argint pot fi utilizate eficient pentru tratamentul următoarelor boli: cancer, ateroscleroză, artrită reumatoidă, retinopatie diabetică, psoriazis, endometrioză și adipozitate.

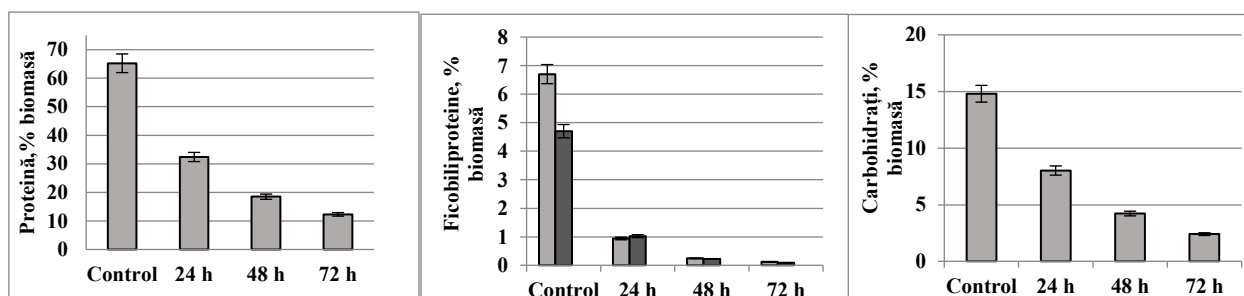
Sinteza mediată biologic de nanoparticule metalice folosind diferite sisteme biologice, inclusiv bacterii, cianobacterii, ciuperci, alge, diferite extracte de plante și biomolecule, este simplă, rentabilă și ecologică [119, 213, 475, 478]. Procesul se bazează pe mecanismele protectoare ale organismelor vii care se exprimă în capacitatea acestora de a realiza bioacumularea diferitelor metale într-o formă mai puțin toxică. Cele mai perfecte mecanisme de protecție sunt caracteristice bacteriilor și microalgelor extremofile, care pot fi privite ca microfabrici capabile să furnizeze produse specifice și controlate, inclusiv nanoparticule [49, 168, 287, 294].

*Arthrospira platensis* este un organism poliextremofil și deci obiect ideal pentru cercetări fundamentale în domeniul bionanosintezei. În cadrul cercetărilor efectuate, pentru realizarea biosintezei nanoparticulelor de argint biomasa standardizată a cianobacteriei a fost transferată în soluție nutritivă din care se înlătură compușii cu clor, ce conține 100 mg/l nitrat de argint. Monitorizarea procesului s-a efectuat pe durata a 72 ore, iar probele s-au prelevat la intervalele stabilite de 24 ore. Dovezile procesului de bionanosinteză au fost obținute prin mai multe metode dintre care primară a fost spectroscopia UV-Vis, după care prezența nanoparticulelor în biomasă a fost demonstrată prin spectroscopie cu raze X cu dispersie de energie, difracție și microscopie electronică. Rezultatele obținute pot fi văzute în figura A 5.1 din compartimentul Anexe.

Biosinteza nanoparticulelor de argint de către spirulină are la bază mecanisme de protecție a culturii de acțiunea nocivă a ionilor de argint, care provoacă o stare pronunțată de stres oxidativ. Pe durata nanobiosintezei putem urmări atât modificări ale componenței biochimice a biomasei,



cât și variații ale activității antioxidante. Rezultatele referitor la modificările biochimice din biomasa de *Arthrospira platensis* după procesul de formare a nanoparticulelor de argint, după parametrii esențiali, sunt prezentate în Figura 5.1.

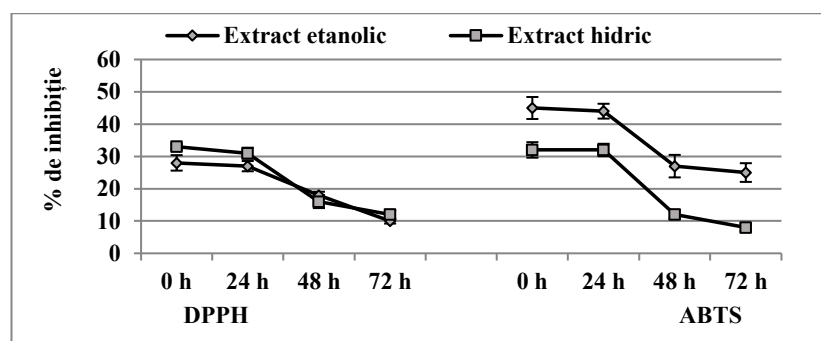


**Fig. 5.1. Modificarea conținutului unor componente în biomasa de *Arthrospira platensis* pe durata nanobiosintezei**

Ca rezultat al expunerii la azotatul de argint a biomasei de spirulină toți parametrii monitorizați au scăzut semnificativ. La 24 ore de la declanșarea procesului, cantitatea de proteine scade cu 22,7%, cantitatea de ficocianină se reduce de la 6,7% la 0,94%, cea de aloficocianină – de la 4,7% la 1,02%, iar cantitatea de carbohidrați scade de 2 ori. După 72 ore de la începutul biosintezei, cantitatea de proteine în biomasă este de 11,2%, cantitatea totală de ficobiliproteine – de 0,2%, iar cantitatea totală de carbohidrați – de 2,4% din biomasa uscată. Așa dar, testele biochimice în biomasa cianobacteriană demonstrează prezența unui efect toxic asupra tulpinii de spirulină studiată și incapacitatea culturii de a contracara efectele survenite, cu toate că reducerea ionilor de argint la forma zero-valentă a nanoparticulelor este o cale de a diminua efectele negative. Descreșterea drastică a conținutului de proteine, ficobiliproteine, polizaharide și lipide indică asupra degradării biomasei de spirulină. Acest lucru este confirmat și prin scăderea semnificativă a activității antioxidante a biomasei de spirulină în procesul de biosinteză a nanoparticulelor de argint (Figura 5.2).

Activitatea antiradicalică a extractelor hidric și etanolic practic nu se modifică în primele 24 ore ale procesului. După 48 ore însă activitatea antioxidantă a extractelor scade substanțial. Testul ABTS indică reducerea activității extractului hidric cu 62,5% și a celui etanolic cu 84,4% față de începutul experienței. În cazul testului DPPH, activitatea extractului hidric scade cu 52,2%, iar a celui etanolic cu 35,8%.

Analizate la general, rezultatele indică asupra posibilității utilizării cianobacteriei *Arthrospira platensis* în calitate de matrice pentru sinteza nanoparticulelor la timpii de contact cu sursa de argint de până la 24 ore, pentru a evita destrucțiunile majore ale biomasei. Este evident că stresul provocat de ionii de argint este sever, iar cultura de spirulină reușește să facă față situației o perioadă scurtă de timp.



**Fig. 5.2. Activitatea antiradicalică a extractelor din biomasa de *Arthrospira platensis* în procesul de nanobiosinteză a AgNP**

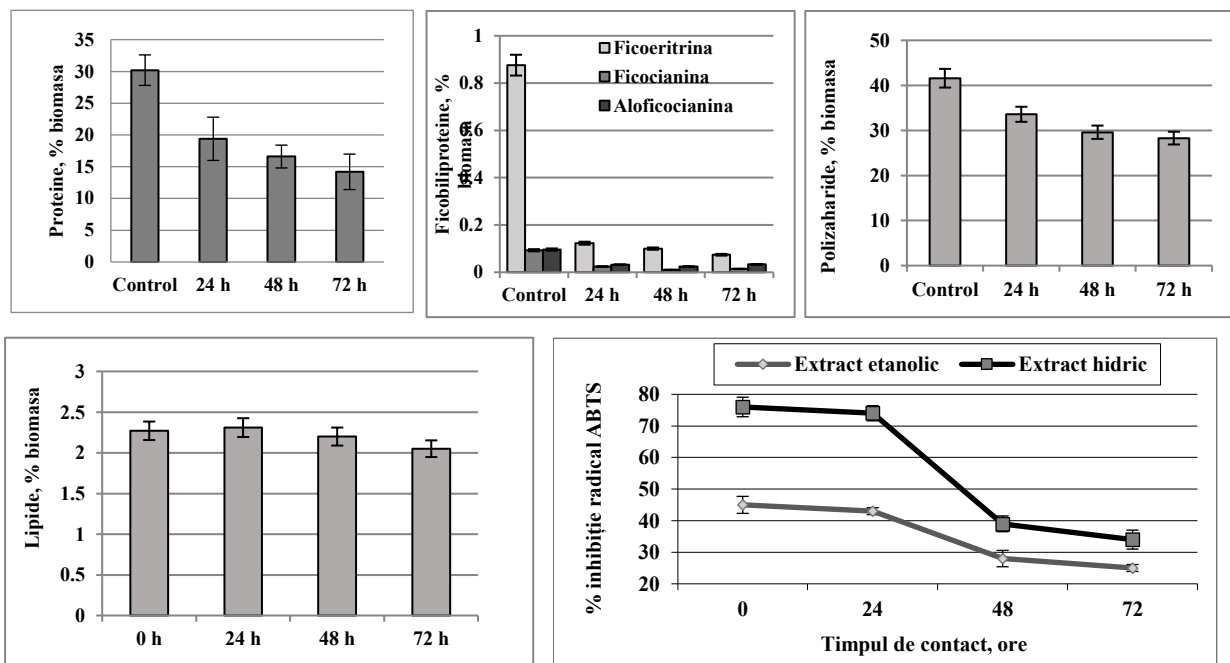
Același tip de experiențe a fost realizat pe cultura de *Nostoc linckia*, care se caracterizează printr-o toleranță mai mare la xenobiotice. Schema experimentală a fost aceeași, iar dovezile biosintezei nanoparticulelor de argint de către cultura vie de nostoc pot fi urmărite în figura A5.2.

Rezultatele prezentate demonstrează că celulele de *Nostoc linckia* sunt o matrice potrivită pentru producerea nanoparticulelor de argint. Nanoparticule obținute prin procedura de biosinteză cu utilizarea biomasei de nostoc pot fi folosite atât în stare pură, cât și în componența biomasei. Utilizarea nanoparticulelor în stare pură presupune extragerea și purificarea lor, ceea ce implică cheltuieli suplimentare. Din punct de vedere biotehnologic este convenabil de a utiliza biomasa integrală de nostoc, care conține nanoparticulele incorporate. Din aceste considerente este important de a monitoriza calitatea biomasei, astfel, încât să fie sigură pentru procesarea sau consumul ulterior. În scopul stabilirii și evaluării modificărilor biochimice din biomasa de *Nostoc linckia* pe parcursul procesului de nanobiosinteză au fost determinați parametrii biochimici esențiali ai biomasei de nostoc (proteinele, lipidele, glucidele și ficobiliproteinele) și activitatea antioxidantă a acesteia. Rezultatele sunt prezentate în figura 5.3.

Modificările conținutului de proteine în biomasa de nostoc ca rezultat al procesului de biosinteză a nanoparticulelor de argint sunt semnificative. Biomasa martorului în experiența descrisă a conținut 30% de proteine. Pe durata contactului biomasei cu soluția care conține ioni de argint a avut loc o diminuare importantă a acestui nivel, care la 72 ore de contact a atins cifra de 14% la biomasă. În primele 24 ore de contact, reducerea de proteine a constituit 45% față de nivelul inițial, iar la finele experienței – 51%. La contactul culturii de nostoc cu soluția de azotat de argint, după 24 de ore conținutul de ficobiliproteinele totale în biomasă a scăzut cu 83%, din contul componentei majore – ficoeritrina, dar și a celor minore – ficocianina și aloficocianina.

În biomasa de *Nostoc linckia* sunt prezente endopolizaharidele cu funcție structurală și exopolizaharidele, în special cu funcție de protecție. Rezultatele obținute demonstrează că acești compuși degradează rapid pe durata experienței. În primele 24 ore de contact, cantitatea de

polizaharide scade de la 41,6% BAU la 38,6%, iar la finele experienței cantitatea lor în cultura de nostoc constituie 32%. Reieșind din funcția de protecție pe care o au polizaharidele, putem afirma că nivelul mai mic de degradare a acestor molecule comparativ cu cea a proteinelor este o modalitate de a asigura rezistența culturii la condițiile nocive de mediu.



**Fig. 5.3. Modificarea conținutului unor componente în biomasa de *Nostoc linckia* și a activității antioxidante pe durata nanobiosintezei**

Lipidele din biomasa de nostoc exercită funcția structurală în componența membranelor celulare, iar menținerea unei cantități stabile a lor este o condiție a integrității celulare. Modificarea neesențială a cantității de lipide în biomasa de nostoc confirmă acest fapt. Rezultatele prezentate în figura 5.3. arată că în primele 48 ore de contact a biomasei de nostoc cu soluția de azotat de argint cantitatea de lipide în biomasa nu se modifică, iar după 72 ore de contact aceasta scade nesemnificativ – doar cu 9,7% față de nivelul inițial.

Pentru a aprecia activitatea antioxidantă a biomasei de nostoc și modificarea acesteia pe parcursul procesului de sinteză a nanoparticulelor au fost obținute două tipuri de extracte – extract hidric și extract etanolic. Rezultatele testului ABTS arată o scădere mai importantă a activității antiradicalice a extractului hidric comparativ cu a celui etanolic. În primele 24 ore de contact are loc o modificare neesențială a activității antioxidante a extractelor de nostoc, în schimb după 48 ore de contact a biomasei cu azotatul de argint activitatea extractelor scade simțitor – cu 12,5% în cazul extractului etanolic și cu 65% în cazul celui hidric.

Așadar, modificarea principalilor parametri ai biomasei de nostoc demonstrează prezența unui efect toxic, amplificat în timp, care este determinat de prezența ionilor toxici în mediu. Descreșterea drastică a conținutului de proteine, ficobiliproteine, polizaharide indică asupra degradării biomasei de nostoc. Păstrarea nivelului cantitativ al lipidelor denotă faptul că nostocul conține în mare parte lipide cu funcție structurală, integritatea cărora este vitală pentru supraviețuirea celulelor. Efectul toxic este confirmat și de diminuarea capacității antiradicalice a biomasei de nostoc care, de asemenea, se dezvoltă în timp.

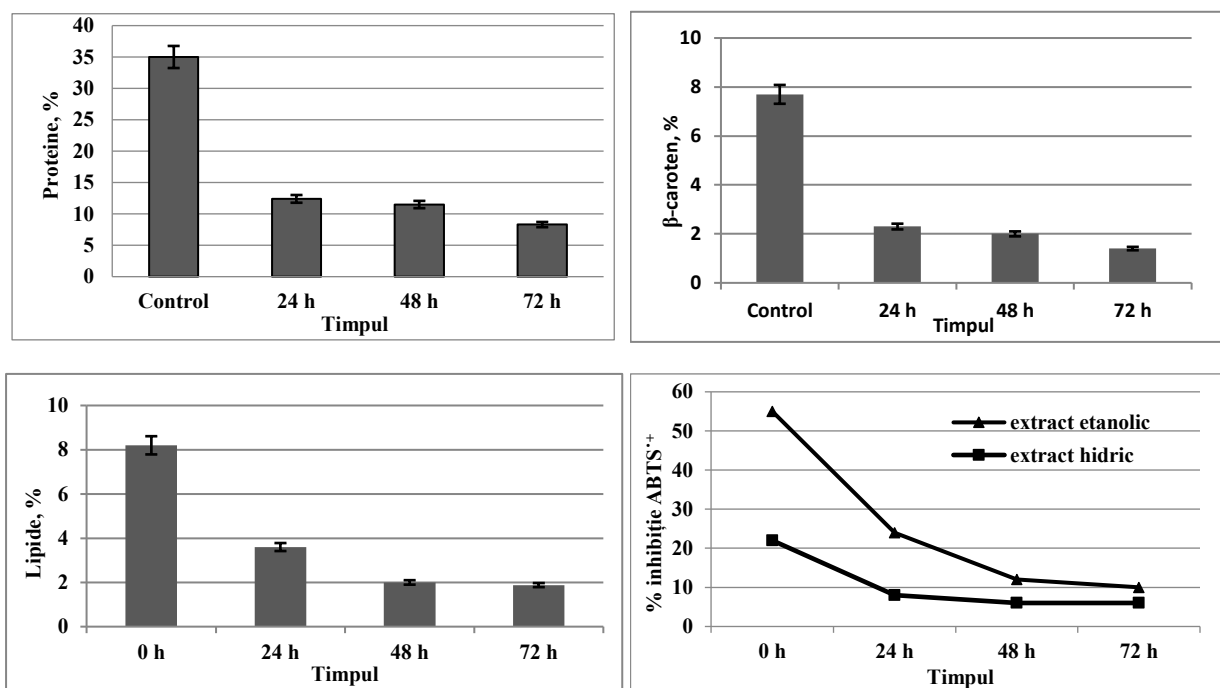
Rezultatele obținute indică asupra posibilității utilizării cianobacteriei *Nostoc linckia* în calitate de matrice pentru sinteza nanoparticulelor de argint. Timpul optimal de contact al culturii cu soluția ce conține ionii de argint este de 24 ore, deoarece oferă posibilitatea de a evita degradarea biomasei și de utilizare a biomasei integrale.

Procesul de biosinteză a nanoparticulelor de argint a fost, de asemenea, realizat și pe culturi de microalge. Una dintre aceste culturi a fost tulpina *Dunaliella salina* CNMN-AV-02, care este o sursă naturală de  $\beta$ -caroten și un extremofil halofil. Speciile de *Dunaliella* pot crește în bazine cu salinitate ridicată, cu concentrații de NaCl care depășesc 3 M, fiind și o cultură crescută la nivel industrial.

*Dunaliella* este foarte sensibilă la acțiunea nanoparticulelor de argint. De exemplu, AgNP de 50 nm au un efect negativ asupra *Dunaliella tertiolecta*, care se manifestă prin scăderea conținutului de clorofilă în celule, micșorarea numărului de celule viabile, intensificarea formării SRO și peroxidării lipidelor. Concentrațiile toxice pentru speciile de *Dunaliella* încep de la 0,01 mg/l [325]. Efectele negative ale AgNP asupra *Dunaliella* sp. ar putea fi explicate prin interferența lor cu disponibilitatea luminii și, prin urmare, cu reducerea creșterii microalgelor [353]. Pe baza sensibilității culturii microalgei *Dunaliella salina* a fost dezvoltat un sistem de determinare a toxicității nanomaterialelor prin evaluarea morții celulare și a modificării ratei de creștere a culturii la diferite concentrații toxice. Performanța metodei a fost exemplificată cu diferite preparate care conțin Ag, inclusiv AgNP de 20 nm. Deși nanoparticulele au fost mai puțin toxice în comparație cu alte forme de argint, efectul lor negativ asupra dunaliei este evident [180].

Încercările anterioare de a obține nanoparticule de argint folosind culturi de *Dunaliella* nu au fost reușite [295]. În schimb, nanoparticulele de argint au fost obținute în extracte din celulele de *Dunaliella*, care au fost folosite ca agenți reducători și stabilizatori. Aceste nanoparticule au demonstrat potențial anticancer comparabil cu cunoscutul preparat Cisplatin [408]. Astfel, este o sarcină inovativă de a obține preparate care conțin AgNP pe baza biomasei de *Dunaliella*. În continuare, prezentăm rezultatele încercărilor noastre de a obține AgNP cu ajutorul culturii vii de *Dunaliella salina* și de a evalua efectul procesului de nanobiosinteză asupra compoziției biochimice a biomasei.

Condițiile experimentale au fost similare cu cele care au fost aplicate pentru cianobacterii. Dovezile biosintezei nanoparticulelor de argint utilizând cultura de *Dunaliella salina* sunt prezentate în figura A.5.3., iar în continuare vom expune rezultatele cu referire la modificările componenței biochimice și a activității antioxidante ale biomasei de dunalielă. Sub acțiunea ionilor de argint s-au observat modificări calitative și cantitative ale compoziției biomasei de *D. salina*. Rezultatele obținute pentru parametrii biochimici esențiali (proteine, lipide și carotenoizi) sunt prezentate în figura 5.4.



**Fig. 5.4. Modificarea conținutului unor componente în biomasa de *Dunaliella salina* și a activității antioxidante pe durata nanobiosintezei**

În primele 24 ore de interacțiune a biomasei cu soluția de azotat de argint, conținutul de proteine din biomasă a scăzut cu 65%, iar după 78 ore acestea au constituit 8% din conținutul lor inițial. Scăderea conținutului de proteine la *D. salina* a fost mai pronunțată decât la cianobacteriile *Arthrospira platensis* și *Nostoc linckia*, la care acest parametru a fost redus cu 45 %, 51%, respectiv. S-a observat, de asemenea, o scădere drastică a conținutului de  $\beta$ -caroten în biomasa de *D. salina*. După 24 de ore, cantitatea pigmentului a scăzut de la 7,7% la 2,3%, iar după 72 ore conținutul de  $\beta$ -caroten din biomasă a constituit 1,4%.

*Dunaliella salina* este o sursă bogată de o varietate de lipide, care sunt componente structurale importante ale membranelor și joacă un rol în rezervarea carbonului și a energiei [122, 152]. S-a demonstrat că conținutul de lipide la speciile din genul *Dunaliella* se modifică ca răspuns la variabilele de mediu, cum ar fi condițiile de creștere, factorii nutriționali și stresul abiotic (pH,

lumină, salinitate etc.) [122, 445]. Modificarea conținutului de lipide s-a observat și pe durata nanobiosintezei. După 24 de ore de interacțiune a biomasei cu sarea de argint, conținutul de lipide din biomasă a scăzut cu 56% în comparație cu conținutul lor inițial, după care a scăzut la nivelul de aproximativ 2% din biomasă. Activitatea antioxidantă a extractelor etanolice și hidrice din biomasa de *D. salina* a fost semnificativ redusă: cu 56% pentru extractul etanolic și cu 63% pentru extractul hidric în primele 24 de ore de interacțiune cu soluția de azotat de argint. După 72 de ore de interacțiune, activitatea antioxidantă a extractului etanolic a fost redusă cu 82% și a celui hidric - cu 73%. Astfel, în acest studiu au fost obținute nanoparticule de argint în biomasa vie de dunalielă, dar parametrii biochimici au fost afectați semnificativ în primele 24 de ore de interacțiune a biomasei cu nitratul de argint, rezultând scăderea conținutului de proteine cu 65% și a  $\beta$ -carotenului și lipidelor cu 70%, și respectiv cu 56%.

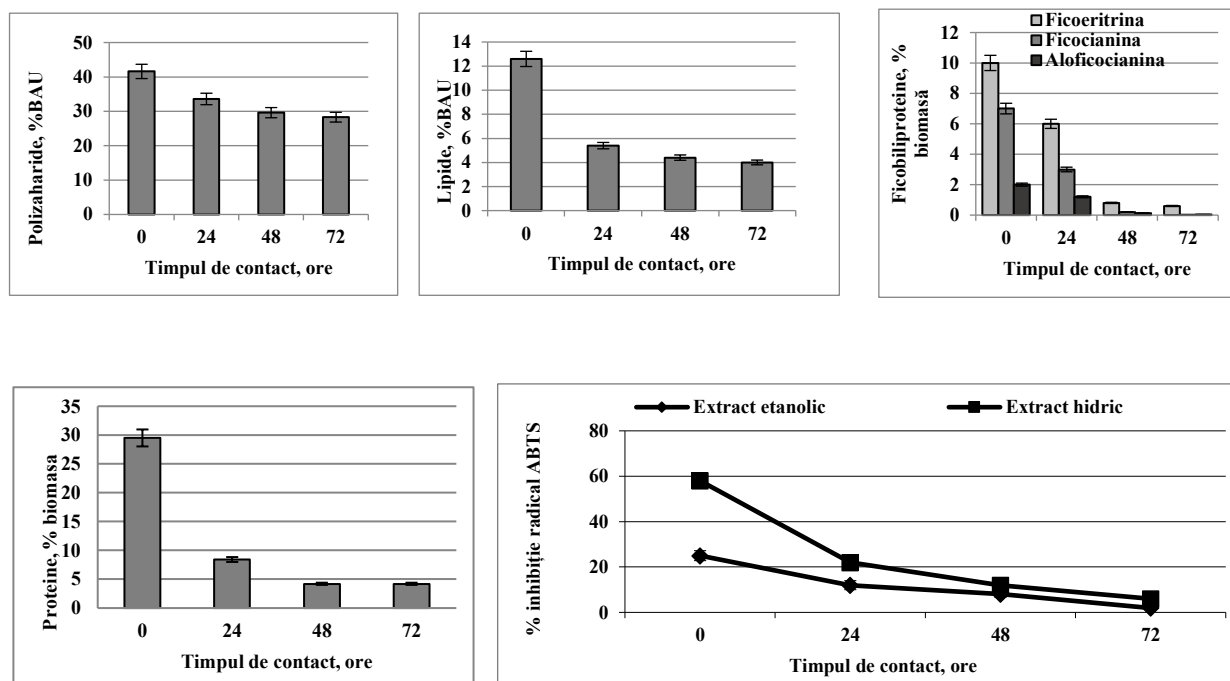
Cultura de *Porphyridium cruentum*, de asemenea, este o matrice potrivită pentru biosinteza nanoparticulelor de argint. Experiențele au fost realizate în aceleași condiții ca și în cazul celor trei obiecte ficologice descrise mai sus. Dovezile prezenței nanoparticulelor de argint pot fi urmărite în figura A 5.4. În continuare sunt prezentate rezultatele cu referire la modificările biochimice și activitatea antioxidantă a biomasei de porfiridium pe durata procesului de biosinteză a nanoparticulelor de argint, care pot fi urmărite în figura 5.5.

Biomasa probei control, în experiența descrisă, a conținut 29% de proteină. Pe durata contactului biomasei cu soluția ce conține ioni de argint a avut loc o scădere semnificativă a acestui nivel care la 24 ore de contact a atins cifra de 8% la biomasă. În următoarele 24 ore, reducerea de proteine a constituit 86% față de nivelul inițial, care s-a menținut și la finele experienței. A scăzut și cantitatea ficobiliproteinelor: după 24 de ore conținutul lor a scăzut cu 46%, cantitatea celor trei pigmenți ficobilinici modificându-se după cum urmează. După 48 ore de contact cantitatea de ficoeritrină în biomasa de porfiridium s-a redus cu 92%, cea de ficocianină – cu 97%, iar cea de aloficocianină – cu 94% față de martor.

Pentru biomasa de *Porphyridium cruentum* este caracteristic conținutul sporit de carbohidrați, care au funcții diverse, de la cele structurale (componente ale capsulei celulare) la cele de rezerve energetice. În primele 24 ore de contact, cantitatea de carbohidrați scade de la 41,6% BAU la 33,6%, iar la finele experienței cantitatea lor în cultura de porfiridium constituie 28,3%. În primele 24 ore de contact a biomasei de *Porphyridium cruentum* cu soluția de azotat de argint cantitatea de lipide în biomasă se modifică semnificativ – scade cu 57% față de nivelul inițial. În condițiile de contact îndelungat al biomasei algale cu nitratul de argint, conținutul lipidelor scade cu până la 65% comparativ cu proba control.

Datele testului ABTS arată o scădere mai importantă a activității antiradicalice a extractului hidric obținut din biomasa de porfiridium comparativ cu a celui etanolic. Astfel, după 24 ore de

contact cu azotatul de argint, activitatea antioxidantă a extractului hidric s-a redus cu 66%, iar a celui etanolic – cu 52%. După 48 ore de contact a biomasei cu azotatul de argint activitatea extractelor scade neesențial comparativ cu primele 24 ore.



**Fig. 5.5. Modificarea conținutului unor componente în biomasa de *Porphyridium cruentum* și a activității antioxidante pe durata nanobiosintezei**

Așadar, testele biochimice efectuate pentru principalii parametri ai biomasei de *Porphyridium cruentum* demonstrează prezența unui efect toxic, care se manifestă în primele ore ale expunerii biomasei algale contactului cu nitratul de argint. Descreșterea semnificativă a conținutului de proteină, ficobiliproteine, lipide indică asupra degradării biomasei de porfiridium. Efectul toxic este confirmat și de diminuarea capacității antiradicalice a biomasei. Menționăm că în cazul porfiridiumului efectul toxic se manifestă imediat comparativ cu cianobacteriile, la care acest efect este progresiv în timp. În același timp, microalga *Porphyridium cruentum* poate fi o matrice importantă pentru realizarea biosintezei nanoparticulelor de argint, proces ce are la bază activarea mecanismelor de protecție contra stresului provocat de prezența ionilor de argint.

### **5.1.2. Modificarea parametrilor biochimici și capacității antioxidante la cianobacterii în procesul de biosinteză a nanoparticulelor de seleniu**

Seleniul este un element indispensabil pentru viață, fiind parte componentă a enzimelor antioxidante. Carența de seleniu poate duce la dezvoltarea cancerului sau la maladii cardio-

vasculare. În același timp, excesul de seleniu este extrem de toxic pentru celulele vii. Astfel, utilizarea seleniului în diferite tratamente cere o abordare foarte atentă, din cauza diapazonului îngust între doza terapeutică și cea toxică [237]. Nanoparticulele de seleniu sunt foarte atractive datorită toxicității lor atenuate comparativ cu alte forme și sunt intens studiate ca alternativă pentru antibiotice ori pentru preparatele destinate tratamentului cancerului [159, 172, 397, 449]. Afară de aceasta SeNP au proprietăți antioxidante, anti-inflamatoare și antidiabetice [237]. În ultimii ani se atrage atenția și asupra potențialului teranostic al nanoparticulelor de seleniu [311].

Ca și în cazul altor tipuri de nanomateriale, biosinteza nanoparticulelor de Se de către microorganismele vii sau în baza diferitor extracte este foarte atractivă [247]. În cazul organismelor vii, puterea de reducere a celulelor este aplicată în calitate de strategie de diminuare a toxicității seleniului anorganic din componența ionilor selenit și selenat prin transformarea lui în nanoparticule de seleniu (SeNP).

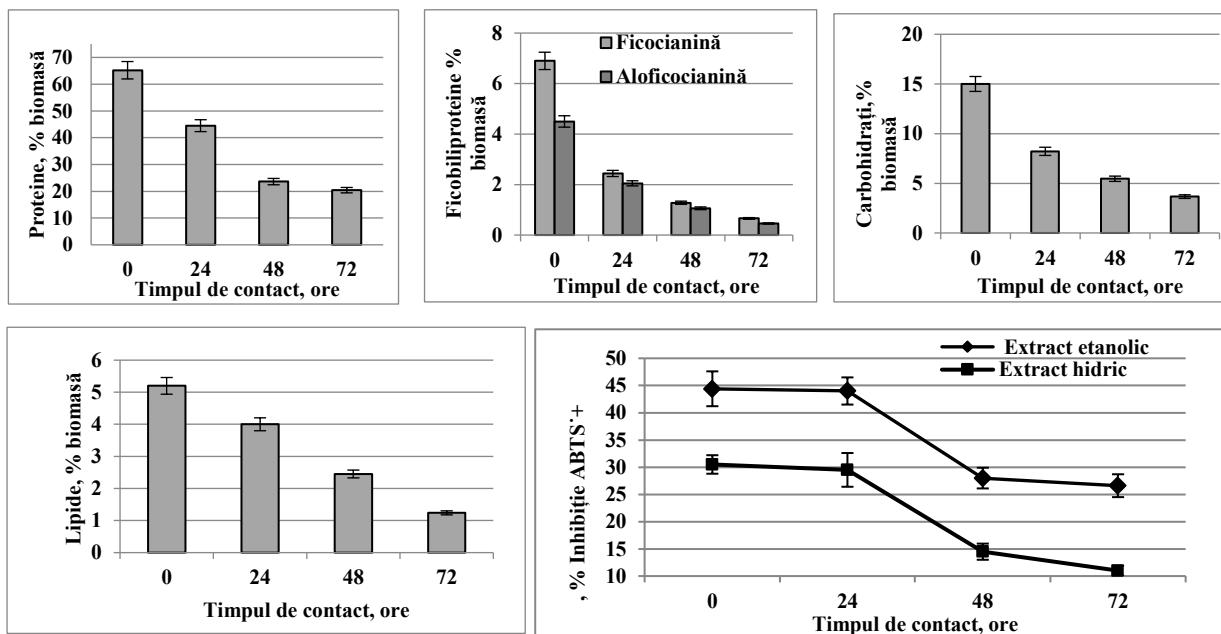
De cele mai multe ori, în calitate de matrice vie pentru biosinteza de nanoparticule de seleniu sunt folosite culturile de funghi [55, 150, 421, 475] și bacterii [343, 347, 391, 441]. Unele cianobacterii, de asemenea, au fost testate în acest scop, de exemplu *Hapalosiphon* sp. [121], *Synechocystis* sp. [186], *Microcystis aeruginosa* [480], *Anabaena* sp. [58], *Anabaena variabilis*, *Arthrospira indica*, *Gloeocapsa gelatinosa*, *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp. [35, 36]. În același timp, au fost menționate diferite modificări care intervin în celulele cianobacteriilor, care contactează cu seleniul în diferite forme. Acestea se referă la inhibarea sau reducerea ratei de creștere a culturilor la anumite concentrații, specifice pentru fiecare specie de cianobacterie, modificarea parametrilor biochimici, proprietăților antioxidante, nivelului de specii reactive ale oxigenului în celule, modificările structurale ale celulelor și modificarea expresiei unor gene asociate cu procesul de fotosinteză [58, 121, 186, 480].

În cazul spirulinei se consideră că condițiile de biosinteză a SeNP sunt incompatibile cu viața culturii. Cu toate acestea, există câteva exemple de reușită, în care se produce reducerea semnificativă a pH-ul mediului de la 11 la 7 [38]. Sinteza intracelulară a nanoparticulelor de seleniu ar putea avea loc datorită activității a două enzime principale – selenat reductaza și selenit reductaza, iar sinteza extracelulară se produce sub acțiunea diferitor substanțe cu potențial reducător din diferite clase de compuși organici [36].

Obținerea biomasei de spirulină (*Arthrospira platensis*), cunoscută pentru multiplele beneficii terapeutice, care conține nanoparticule biogene de seleniu pare a fi o direcție foarte interesantă atât din punct de vedere al științei fundamentale, cât și din punct de vedere aplicativ. În această ordine de idei, ne-am propus să studiem posibilitatea de a obține nanoparticule de seleniu în condițiile păstrării unei calități înalte a biomasei de *Arthrospira platensis*. În scopul obținerii nanoparticulelor de seleniu în cultura vie de spirulină au fost realizate cercetări similare



celor expuse în subcapitolul 5.1.1. În calitate de precursor de nanobiosinteză a fost utilizat selenitul de cobalt. Dovezile biosintezei nanoparticulelor de seleniu în biomasa de spirulină pot fi examinate în figura A.5.5, iar rezultatele testelor biochimice sunt prezentate în figura 5.6.



**Fig. 5.6. Modificarea conținutului unor componente în biomasa de *Arthrospira platensis* și a activității antioxidante pe durata biosintezei nanoparticulelor de seleniu**

Ca rezultat al contactului biomasei de spirulină cu soluția selenitului de cobalt conținutul proteinelor a scăzut cu 32% în primele 24 ore de reacție, iar după 72 ore de contact acestea au constituit 20,4% din biomasă. Astfel, reducerea totală a cantității de proteine în biomasa de spirulină a constituit 69%. Conținutul de ficocianină în biomasa de spirulină, după 24 ore, a scăzut de la 6,9% la 2,44%, iar conținutul de aloficocianină - de la 4,5% la 2,05% din biomasa uscată. După 72 ore, ficocianina a fost la nivel de 0,66% din biomasă, iar aloficocianina - de 0,46%. După 72 de ore de expunere acțiunii precursorului de sinteză, conținutul de carbohidrați în biomasa de spirulină a scăzut cu 75,6%, constituind 3,66% în biomasă comparativ cu conținutul inițial de 15% biomasă. Pe durata primelor 24 de ore ale procesului de nanobiosinteză, conținutul de lipide în biomasa de spirulină a scăzut cu 23%, urmat de o reducere de 2 ori la 48 ore. Spre finele experienței, cantitatea de lipide în biomasa de spirulină a fost de aproximativ 1%.

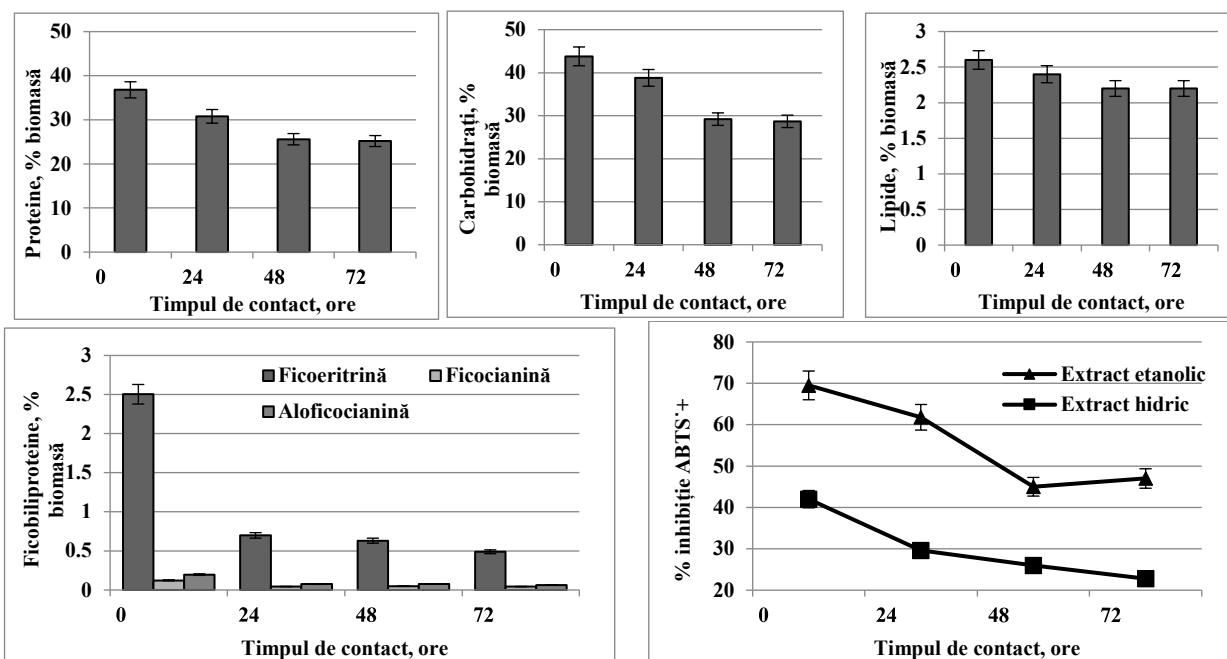
Prezintă interes rezultatele testului antioxidant obținut pentru biomasa de spirulină după primele 24 ore de sinteză și acumulare a nanoparticulelor de Se. Cu toate că a fost determinată o diminuare esențială a componentelor biomasei de spirulină, testul ABTS a arătat valori înalte ale activității antioxidante pentru ambele tipuri de extracte. Prin urmare, după primele 24 ore biomasa de spirulină păstrează capacitatea de a participa în reacțiile de reducere. Următoarele 24 ore se

caracterizează prin reducerea activității antioxidante a extractului etanolic cu 37% și a celui hidric - cu 52% față de valoarea inițială. Activitatea extractului hidric scade în continuare cu încă 12% până la finalul experienței. Astfel, în cazul aplicării cianobacteriei *Arthrospira platensis* în calitate de matrice pentru sinteza nanoparticulelor de Se, ca rezultat al contactului biomasei mature de spirulină cu soluția selenitului de cobalt, procesele degenerative nu poartă un caracter agresiv, dacă durata contactului este de până la 24 ore.

Nanoparticulele de seleniu au fost sintetizate în aceleași condiții cu utilizarea culturii de *Nostoc linckia*. Dovezile biosintezei nanoparticulelor de seleniu în biomasa de nostoc pot fi examinate în figura A.5.6, iar rezultatele testelor biochimice sunt prezentate în figura 5.7.

Sinteza nanoparticulelor de Se în biomasa de *Nostoc linckia* duce la modificarea componenței biochimice a ei. După primele 24 ore, conținutul de ficoeritrină se reduce semnificativ, cu 72%, iar după 72 ore de contact al biomasei cu selenitul de cobalt, reducerea conținutului de ficoeritrină este de 80%. Conținutul de ficocianină se reduce cu 75% după primele 24 ore de nanosinteză, cu menținerea la un nivel stabil pe următoarea perioadă experimentală. În mod similar se modifică și cantitatea de aloficocianină, reducerea majoră fiind produsă după primele 24 ore de contact. Primele 24 ore de contact cu selenitul de sodiu au finalizat cu o reducere de 16% a conținutului proteinelor în biomasa. În următoarele 24 ore conținutul proteinelor a scăzut încă cu 30% față de ziua anterioară. După 72 ore de contact cu selenitul de cobalt, biomasa de nostoc conține 25% proteină. Reducerea semnificativă a conținutului de carbohidrați are loc după 48 ore de contact a biomasei de nostoc cu ionii de selenit și constituie 33%. De asemenea, în primele 48 ore de contact a biomasei de nostoc cu selenitul de cobalt, cantitatea de lipide se modifică neesențial cu 15%, iar după 72 ore de contact o scădere ulterioară nu a fost înregistrată.

Rezultatele testului ABTS sunt prezentate în figura 5.7. Este evidentă reducerea puternică a activității antioxidante a extractului hidric, cu aproape 50% spre sfârșitul experimentului. Pentru extractul hidric este caracteristică scăderea continuă a activității antioxidante, pornind de la 29% după primele 24 ore de contact a biomasei cu ionii de selenit. După 48 ore testul ABTS a arătat o reducere cu 38% a activității antioxidante, iar după 72 ore – cu 46%. Pentru extractele etanolice, tabloul modificării activității antioxidante este diferit. În primele 24 ore, reducerea activității antioxidante este una neesențială - cu 11%. În următoarele 48 ore, testul antioxidant indică o scădere cu 35% a capacității extractului etanolic de a reduce radicalul ABTS. Astfel, componentele hidrosolubile sunt cele mai vulnerabile, activitatea lor scăzând progresiv, în timp ce activitatea extractului etanolic prezintă scădere imediată și nu are tendință de a evolua în timp. În acest compartiment am demonstrat posibilitatea de utilizare a culturilor vii ale cianobacteriilor și microalgelor în scopul realizării procesului de biosinteză a nanoparticulelor.



**Fig. 5.7. Modificarea conținutului unor componente în biomasa de *Nostoc linckia* și a activității antioxidante pe durata biosintezei nanoparticulelor de seleniu**

Acest fenomen se bazează pe răspunsul celulelor la stresul oxidativ generat de prezența precursorilor de sinteză, în cazul acestui studiu, a azotatului de argint și a selenitului de cobalt. În formă de săruri minerală care disociază în mediul nutritiv, precursorii de sinteză prezintă o toxicitate pronunțată pentru microorganismele studiate. În scopul protejării de efectele nocive ale xenobioticelor în celulele microalgelor și cianobacteriilor se includ mecanismele de protecție antioxidantă, care reduc efectele degradării oxidative, dar și mecanismele care asigură biotransformarea elementelor nocive. Așa cum în toate cazurile studiate a fost demonstrat procesul de biosinteză a nanoparticulelor, acestea fiind în formă de element zerovalent, avem de-a face cu procese clare de oxidoreducere, care interferează cu protecția antioxidantă sau sunt parte componentă a acestora.

## 5.2. Stresul oxidativ provocat de diferite nanoparticule la microalge și cianobacterii

Creșterea impresionantă a nivelului de aplicare a nanoparticulelor este determinată de proprietățile lor unice; scăderea prețului nanomaterialelor ca rezultat al perfecționării tehnologiilor de producere care generează o creștere a disponibilității nanomaterialelor pe piață; interesul fundamental și practic față de nanoparticule care generează un interes științific accentuat și duce, într-un final, la mai multe cunoștințe în acest domeniu [438]. Inevitabil, acestea pătrund în mediul ambiant și, în primul rând, în mediul acvatic, unele pot veni în contact cu diferite

organisme, produce diferite efecte asupra acestora, intra în lanțurile trofice ș.a. Concentrația diferitor nanoparticule în apele de suprafață este de ordinul nanogramelor sau cel mult al microgramelor pe litru. Conform estimărilor, calculelor, modelelor teoretice și măsurătorilor nemijlocite, nanoparticulele de TiO<sub>2</sub>, de exemplu, sunt considerate a fi cele mai numeroase în mediul acvatic, concentrația lor fiind de peste 2 μg/l, iar nanoparticulele de argint care sunt cel mai activ utilizate, se găsesc în mediul acvatic în concentrație de 1,5 ng/l [72, 126, 428].

Nanoparticulele nimeresc în mediul acvatic atât pe cale naturală (praful cosmic, activitatea vulcanică, incendiile vegetale, eroziunea solului), cât și pe cale antropică. Prin activitate antropică, nanoparticulele pot fi introduse în mediul acvatic în mod intenționat, de exemplu utilizarea nanoparticulelor pentru bioremedierea apelor subterane sau deversările ce provin din producerea de nanomateriale, utilizarea lor în medicină și alte domenii. Eliberarea neintenționată a nanoparticulelor în mediul acvatic este legată de activități precum arderea combustibililor fosili, minerit și demolare de imobile [438].

Nanoparticulele naturale au fost prezente în mediu de milioane de ani și au fost în contact cu diferite organisme vii, iar încărcătura lor practic nu se modifică prea tare în timp. Pe de altă parte, nanoparticulele ingineresti cresc continuu ca volum de producere și aplicare, și deci, și ca poluanți ai mediului acvatic. Proprietățile speciale ale suprafeței nanomaterialelor produse artificial le conferă proprietăți toxicologice și fizico-chimice noi în comparație cu cele naturale. Acest fapt cere o atenție deosebită din partea societății față de nanomateriale, de aceea, una dintre direcțiile noastre de cercetare se referă la relația dintre nanoparticule și cianobacterii și microalge. În continuare, vor fi expuse rezultatele cercetărilor, care reflectă efectele diferitor tipuri de nanoparticule asupra obiectelor ficologice din punct de vedere al stresului oxidativ pe care acestea îl provoacă.

### ***5.2.1. Stresul provocat de prezența punctelor cuantice CdSe, ZnSe, ZnS în cultura de spirulină și porfiridium***

Nanoparticulele luminescente (puncte cuantice) CdSe, ZnSe, ZnS cu proprietăți optice unice sunt produse pe cale industrială și pe larg utilizate în optoelectronică, în crearea noii generații de baterii solare și, mai nou, în medicină și în special în oncologie. În aceste condiții este necesar un studiu al toxicității acestor nanoparticule care ar delimita, pe viitor, domeniile de utilizare a lor. Sistemele hibride nanomateriale – microorganisme fotosintetizante oferă posibilitatea de a efectua un studiu calitativ al toxicității nanoparticulelor asupra organismului în condițiile mediului acvatic. Microalgele și cianobacteriile prezintă obiecte foarte comode și reprezentative, care oferă facilități enorme în modelarea diferitor efecte și stabilirea mecanismelor de acțiune a diferitor compuși asupra proceselor vitale în celulă. Reacția standard a culturilor ficologice la acțiunile extrinseci de

diferită natură poate fi urmărită după procesul de diviziune celulară, monitorizând în mod indirect cantitatea de biomasă acumulată într-un ciclu de cultivare. Astfel, pentru toate tipurile de nanoparticule studiate, de rând cu activitatea antioxidantă, a fost monitorizată și cantitatea și calitatea biomasei obținute.

În acest studiu, au fost utilizate nanoparticule de CdSe cu dimensiunea de 3-5 nm, obținute prin metoda sintezei în solvent cu punct de fierbere ridicat, particule de ZnSe cu dimensiunea de 40 nm și ZnS cu dimensiunea de 30-35 nm obținute prin metoda hidrotermală de cercetătorii din cadrul Institutului de Inginerie și Nanotehnologii Ghițu. Nanoparticulele au fost suplimentate la mediile de cultură ale spirulinei și porfiridiumului în trei serii de experiențe cu modificarea concentrației de la sutimi de mg la zeci de mg într-un litru.

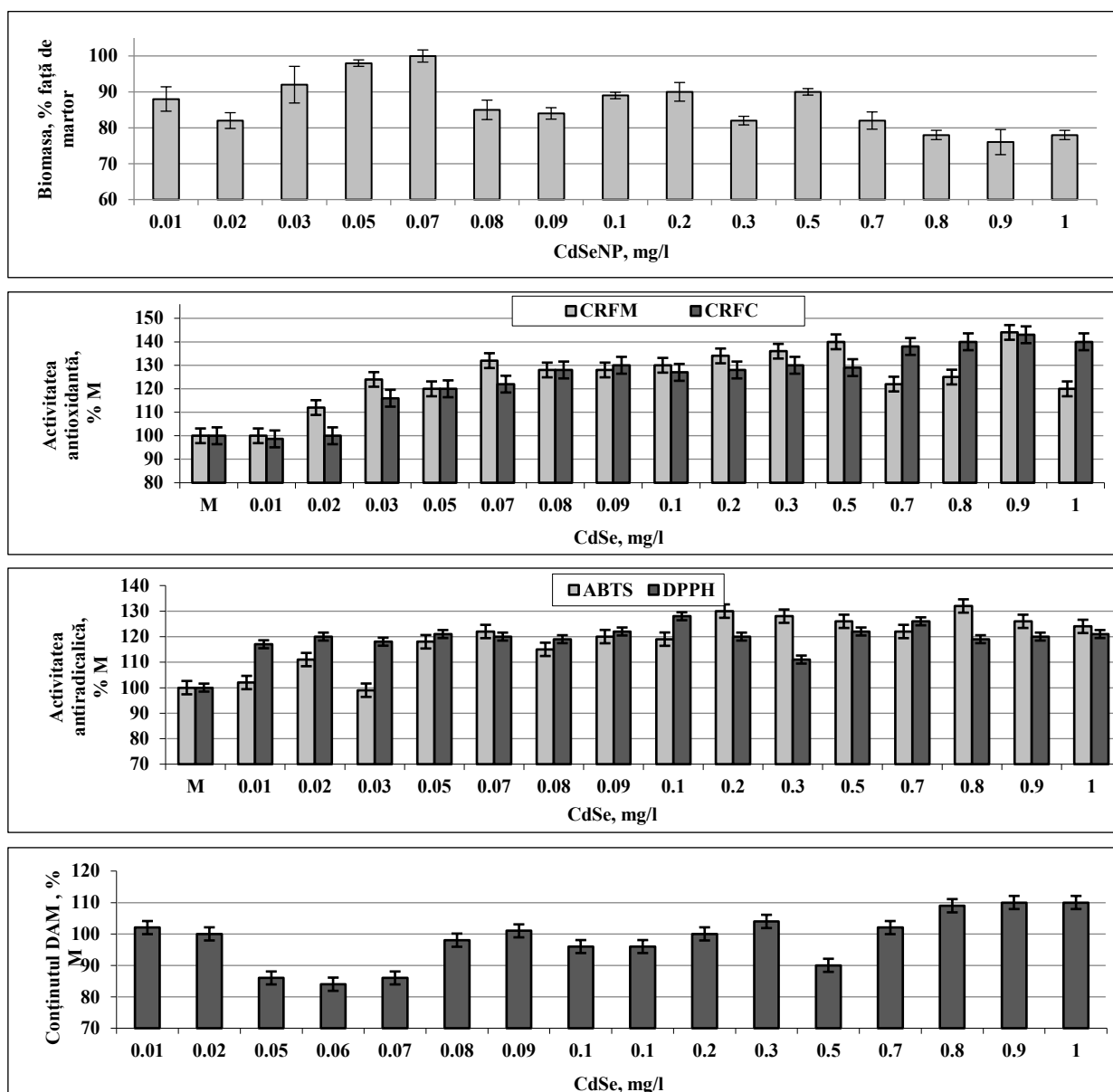
Rezultatele obținute în cazul testării culturii de *Arthrospira platensis* la sensibilitate în raport cu punctele cuantice CdSe, cu referire la cantitatea de biomasă, activitatea antioxidantă și cantitatea de dialdehidă malonică sunt prezentate în figura 5.8.

La concentrațiile de 0,05 și 0,07 mg/l, cantitatea de biomasă a fost la nivelul martorului, în timp ce celelalte concentrații au avut efect de reducere a productivității (cu până la 24%). Un alt indice al adaptării culturii la acțiunea xenobioticelor este activitatea antioxidantă în biomasă. În dependență de factorii care induc stresul oxidativ cu acumularea radicalilor, are loc sinteza unor sau altor componente antioxidante în biomasă în scopul diminuării efectelor adverse. Activitatea antioxidantă a biomasei de spirulină a fost determinată prin utilizarea metodelor de reducere a reagenților fosfomolibdenic (CRFM) și Folin-Ciocalteu (CRFC) și a radicalilor ABTS<sup>•+</sup> și DPPH<sup>•</sup>.

Rezultatele testelor de reducere a reagenților fosfomolibdenic și Folin Ciocalteu au arătat creșterea activității componentelor antioxidante reducătoare în biomasă cu până la 45% față de martor. Aceste două teste identifică prioritar capacitatea de prevenire a formării radicalilor liberi sub influența particulelor introduse. Testele antiradicalice nespecifice (cu reducerea radicalilor ABTS<sup>•+</sup> și DPPH<sup>•</sup>) determină capacitatea componentelor antioxidante de a reduce radicalii formați deja în baza mecanismului transferului de electroni sau hidrogen. Pentru ambele teste a fost înregistrată o creștere de 17-32% față de martor a activității antiradicalice a biomasei de spirulină în prezența nanoparticulelor.

Unul din cele mai semnificative teste care caracterizează evoluția stresului oxidativ în celulă este testul specific de determinare a peroxidării lipidelor prin cuantificarea produsului final – dialdehida malonică. Rezultatele obținute arată că creșterea acestui indicator cu 10-19% se atestă doar la concentrațiile de 0,8-1,0 mg/l.

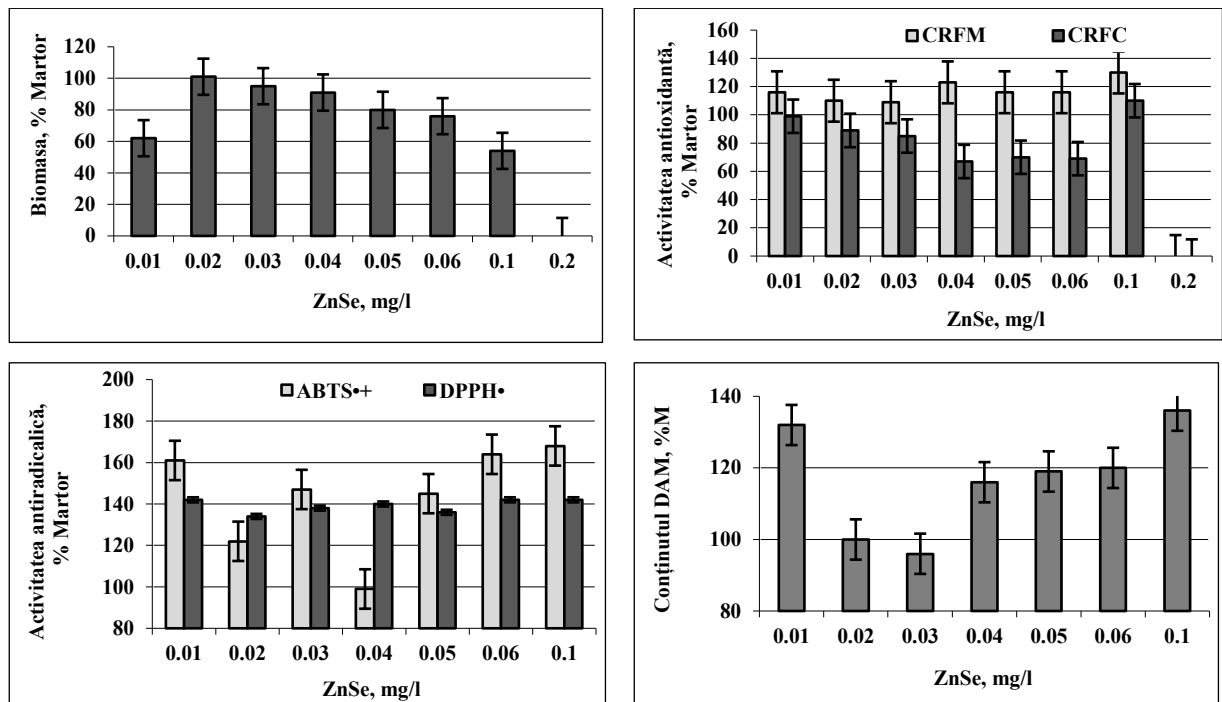
În cazul nanoparticulelor ZnSe, testele prelabile au demonstrat moartea celulară care survine la concentrații mai mari de 0,2 mg/l, de aceea în experiențe au fost aplicate concentrațiile de la 0,01 mg/l la 0,2 mg/l. Rezultatele experiențelor sunt prezentate în Figura 5.9.



**Figura 5.8. Efectul nanoparticulelor CdSe asupra cantității de biomasă, activității antioxidante și conținutului de dialdehidă malonică la *Arthrospira platensis***

Concentrațiile de 0,02 - 0,04 mg/l nu au modificat productivitatea culturii de spirulină, în timp ce toate celelalte concentrații au provocat scăderea cantității de biomasă cu până la 46% față de martor, iar la concentrația de 0,2 mg/l cultura a fost compromisă.

Pentru concentrațiile particulelor de ZnSe de la 0,01 până la 0,06 mg/l, s-a înregistrat o creștere a activității antioxidante prin testul de reducere a reactivului fosfomolibdenic cu 16-23% față de martor, în timp ce testul Folin-Ciocalteu, din contra, indică o scădere a acestei activități. Pentru concentrația particulelor de ZnSe de 0,1mg/l, a fost înregistrată creșterea activității antioxidante prin ambele teste. Capacitatea de reducere a radicalului ABTS<sup>•+</sup> este cu 22-68% mai mare ca la martor, iar a radicalului DPPH<sup>•</sup> - cu 34-42%, la acțiunea nanoparticulelor ZnSe. Valorile testului DAM indică o creștere cu 16-32% comparativ cu martorul.

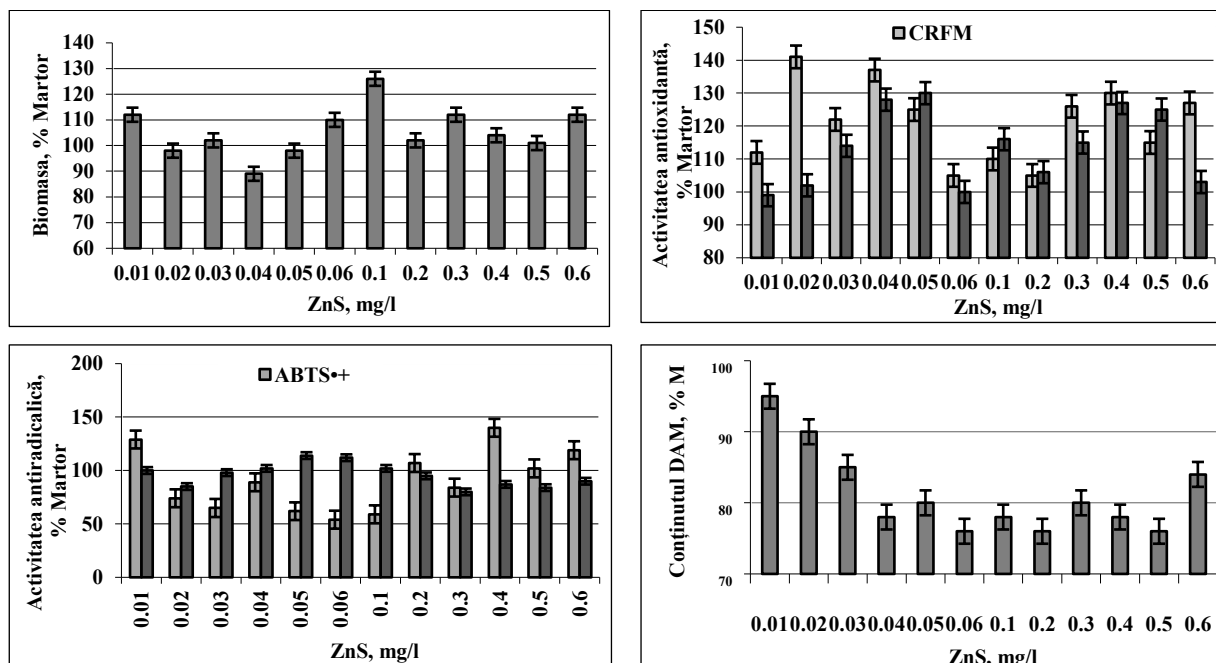


**Figura 5.9. Efectul nanoparticulelor ZnSe asupra cantității de biomasă, activității antioxidante și conținutului de dialdehidă malonică la *Arthrospira platensis***

Experiențele cu aplicarea nanoparticulelor de ZnS la mediul de cultivare a cianobacteriei *Arthrospira platensis* au pornit de la determinarea concentrațiilor maxime toxice pentru microalge. În limitele de concentrații de la 1 la 6 mg/l s-a înregistrat reducerea productivității cu 10-22%, iar concentrația de 8 mg/l este fatală pentru spirulină. Concentrațiile mai mici au permis de a înregistra fluctuații ale nivelului de acumulare a biomasei în jurul nivelului probei martor și chiar creșteri ale productivității de până la 26% (Figura 5.10)

Testele de determinare a activității antioxidante a biomasei de *Arthrospira platensis* au elucidat o capacitate de reducere a reagentului fosfomolibdenic cu valori de până la 62% mai mari față de martor, iar cazuri de diminuare a capacității de reducere a reactivului fosfomolibdenic nu s-au înregistrat. Testul reducerii reagentului Folin-Ciocalteu arată că concentrațiile mici ale particulelor de ZnS au produs sporirea valorilor antioxidante cu până la 41%. La concentrațiile de 1 și 2 mg/l a nanoparticulelor ZnS capacitatea sistemelor antioxidante de a inhiba radicalii ABTS<sup>•+</sup> și DPPH<sup>•</sup> este foarte înaltă (152-186% testul ABTS și 120-132% testul DPPH). În condițiile unei productivități reduse, activitatea antiradicalică înaltă demonstrează activarea proceselor biosintetice, orientate spre menținerea viabilității culturii cianobacteriene. Pentru concentrațiile mici ale nanoparticulelor, probele experimentale au înregistrat o reducere a activității antiradicalice stabilită prin testul ABTS cu 20-30% față de probele martor. Capacitatea de reducere a radicalului DPPH<sup>•</sup> este mult mai uniformă în seria experimentală studiată și oscilează în limitele

variantei martor, fără a înregistra creșteri ori diminuări esențiale. Rezultatele testului DAM denotă o diminuare a conținutului dialdehidei malonice formate pentru majoritatea variantelor experimentale, și doar în cazul concentrației de 6 mg/l, unde se înregistrează scăderea productivității cianobacteriei, crește și cantitatea de dialdehidă malonică.



**Figura 5.10. Efectul nanoparticulelor ZnS asupra cantității de biomasă, activității antioxidante și conținutului de dialdehidă malonică la *Arthrospira platensis***

Prin urmare, ca și în cazurile precedente, mecanismul acțiunii toxice a particulelor de ZnS este identic cu cel al altor tipuri de particule luate în studiu. În scopul aprecierii impactului nanoparticulelor asupra culturii de spirulină au fost calculați coeficienții de corelație între productivitate și cantitatea de dialdehidă malonică în biomasă. Rezultate semnificative cu  $p < 0.05 - 0.001$  au fost obținute în cazul nanoparticulelor de CdSe pe intervalele de concentrații 0,01 - 0,10 mg/l și 0,10 - 4,00 mg/l și în cazul nanoparticulelor de ZnSe în intervalul de concentrații 0,01 - 0,10 mg/l (tabelul 5.1).

**Tabelul 5.1. Coeficienții de corelație semnificativi între cantitatea de biomasă de spirulină și conținutul dialdehidei malonice în biomasă la acțiunea nanoparticulelor de CdSe și ZnSe**

	Tipul de NP/Domeniul de concentrații		
	CdSe 0,1-4,0 mg/l	CdSe 0,01-0,1 mg/l	ZnSe 0,01-0,1 mg/l
Valoarea coeficientului de corelație	-0,9054	-0,8211	-0,8980



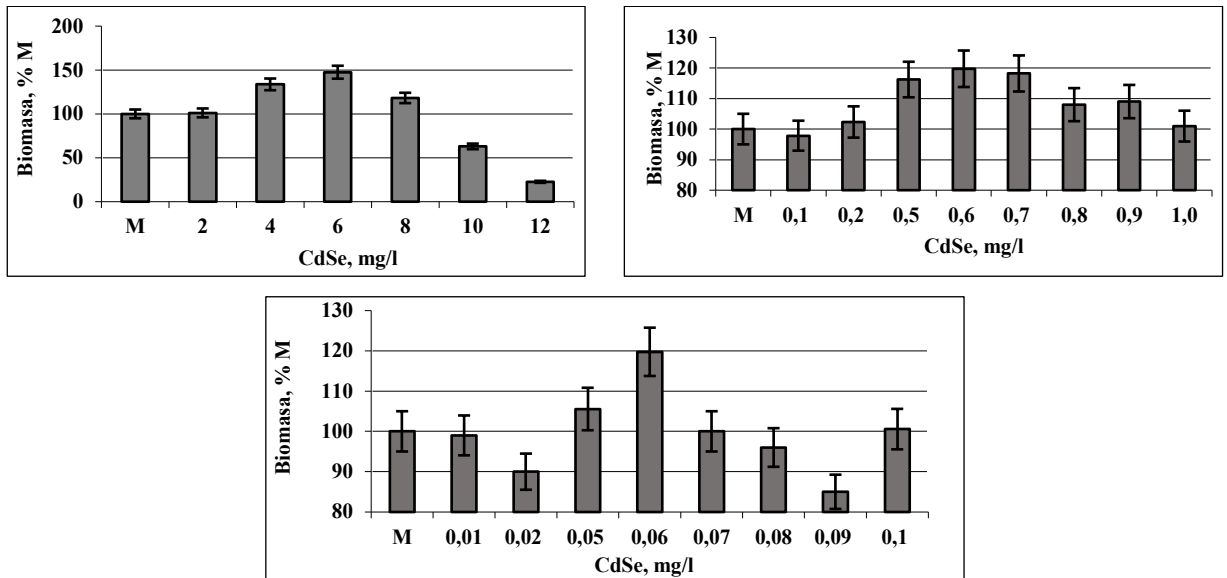
Rezultatele prezentate mai sus arată, că în cazul manifestării reacțiilor toxice de către *Arthrospira platensis* se înregistrează o corelație pozitivă puternică între productivitate și cantitatea de dialdehidă malonică produsă în rezultatul peroxidării lipidelor.

În cadrul cercetărilor efectuate a fost stabilit că toxicitatea celor 3 tipuri de particule pentru cultura de spirulină descrește în șirul ZnSe>CdSe>ZnS. Activitatea antioxidantă a componentelor hidrosolubile ale biomasei de spirulină se modifică în dependență de tipul de particule și concentrația lor. Metoda specifică de determinare a procesului de peroxidare a lipidelor cu densitatea joasă permite de a stabili o corelație puternică negativă ( $r = -0,82 \dots -0,90$ ) între cantitatea de biomasă acumulată de cultură și produsele peroxidării (dialdehida malonică) anume în diapazonul de concentrații, în care nanoparticulele manifestă un efect toxic. Nivelul înalt de corelație între cantitatea de biomasă și produsele degradării oxidative a lipidelor evidențiază unul dintre mecanismele acestei influențe, care constă în degradarea membranelor biologice, modificarea permeabilității și dereglarea proceselor vitale. Cultura de spirulină este mai sensibilă, comparativ cu alte obiecte ficologice, față de prezența nanoparticulelor cu potențial toxic în mediul de cultivare și urmează a fi un obiect preferabil pentru cercetări de acest gen. Rezultatele obținute evidențiază sensibilitatea culturii de *Arthrospira platensis* în raport cu nanomaterialele și posibilitatea utilizării ei pentru teste de stabilire a toxicității xenobioticelor.

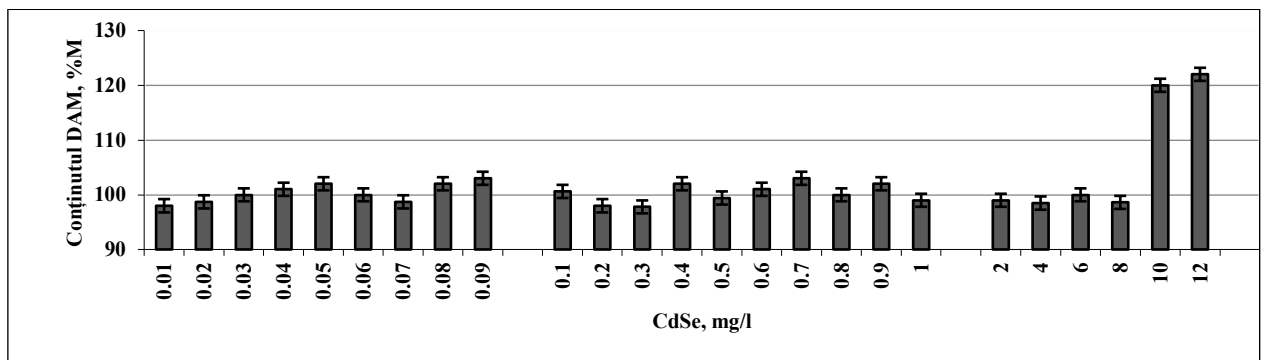
Același set de nanoparticule luminescente a fost testat și pe cultura microalgei roșii *Porphyridium cruentum*. Nanoparticulele CdSe au fost testate în 3 serii de experiențe cu modificarea concentrației CdSe de la sutimi de mg la zeci de mg per litru. În figura 5.11 sunt prezentate rezultatele cu referire la cantitatea de biomasă exprimată în % față de martor.

Analizând caracterul influenței nanoparticulelor de CdSe pe eșantionul total de concentrații asupra productivității culturii de *Porphyridium cruentum* putem afirma că avem un efect al dependenței doză-efect definit ca efect de undă, generat de fenomenele fizico-coloidale în mediul lichid determinate de concentrațiile de nanoparticule. Rezultatele testului acumulării produselor finale ale degradării oxidative a acizilor grași sunt prezentate în Figura 5.12.

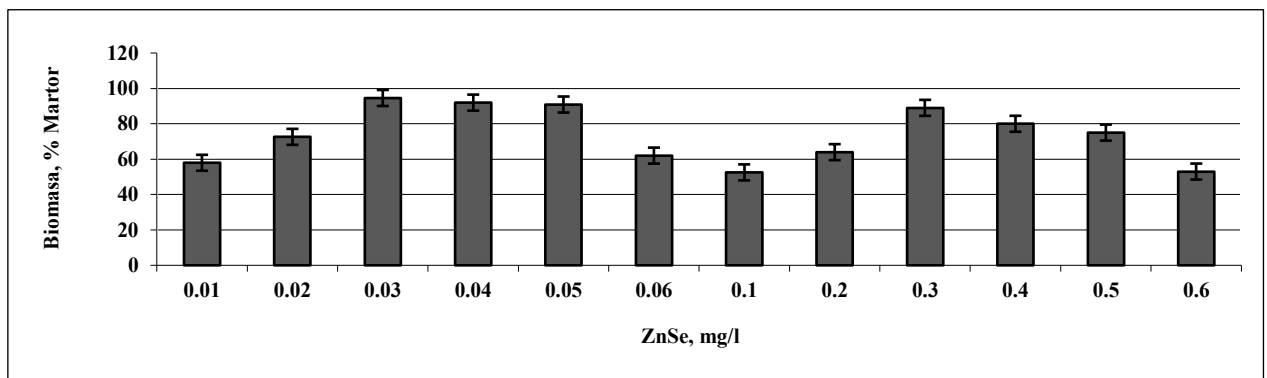
Rezultatele obținute arată că doar concentrațiile toxice ale nanoparticulelor de CdSe de 10-12 mg/l au indus oxidarea lipidelor în proporții ce depășesc semnificativ martorul. La etapa de pretestare a fost stabilit că concentrațiile de ZnSe începând cu 0,8 mg/l au provocat moartea culturii. De aceea, cercetările ulterioare au fost realizate pe domeniul de concentrații de la 0,01 mg/l până la 0,6 mg/l a nanoparticulelor de ZnSe. Rezultatele experiențelor sunt prezentate în Figura 5.13. În cazul acestor nanoparticule de asemenea, avem efectul de undă, care caracterizează relația doză - efect.



**Fig.5.11. Biomasa de *Porphyridium cruentum* (% față de proba martor) crescută în prezența nanoparticulelor de CdSe**



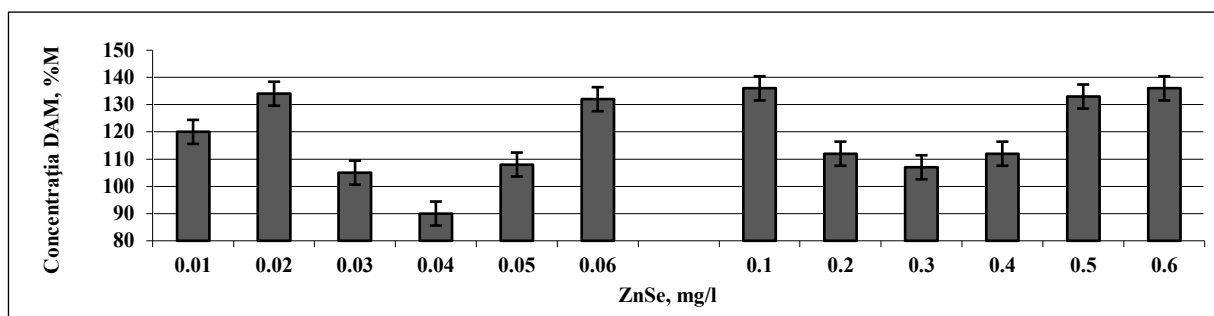
**Fig. 5.12. Dialdehida malonică, %M în biomasa de porfiridium la cultivare în prezența nanoparticulelor de CdSe**



**Fig.5.13. Biomasa de *Porphyridium cruentum* (% față de martor) obținută la creștere în prezența nanoparticulelor de ZnSe**

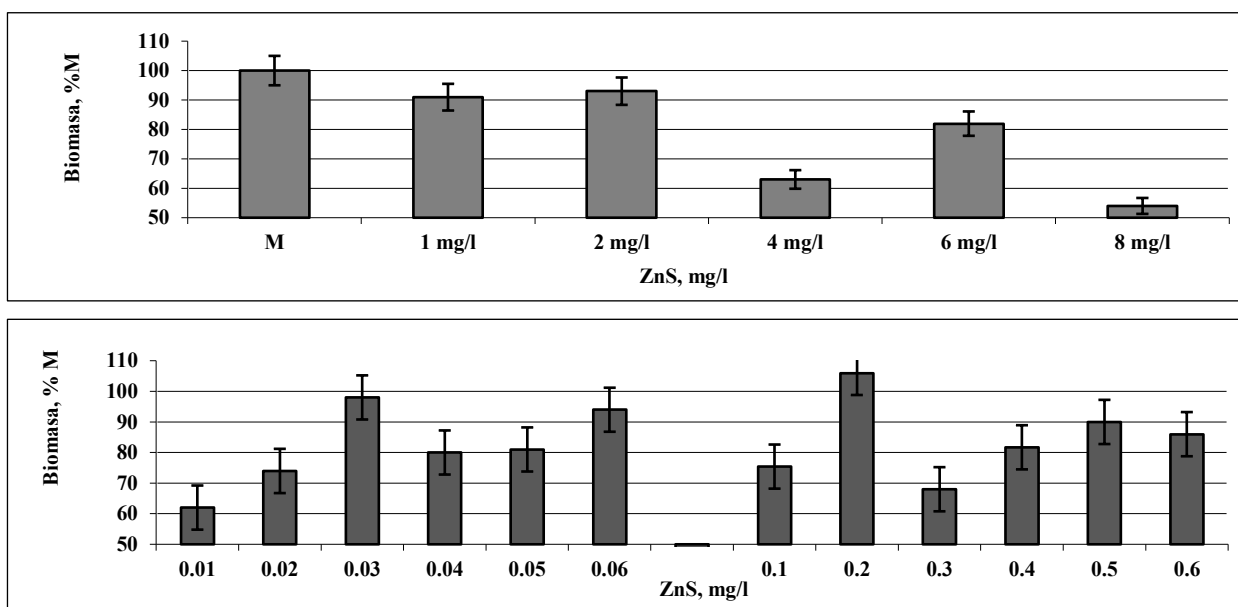
Se observă o reducere cu 42-28% a productivității, în comparație cu probele martor, în cazul concentrațiilor de 0,01-0,02 mg/l și cu 47-36% în cazul concentrațiilor de 0,06 - 0,2 mg/l. Pentru concentrațiile de 0,03-0,05mg/l productivitatea este la nivelul probelor martor (90-95%).

Determinarea produselor finale de oxidare a lipidelor prin testul acumulării dialdehidei malonice a pus în evidență impactul toxic al nanoparticulelor de ZnSe asupra celulelor de porfiridium. Rezultatele obținute (Figura 5.14) indică o acumulare a produselor degradării oxidative a lipidelor. Cantitatea DAM crește cu 20-30% comparativ cu martorul.



**Fig. 5.14. Dialdehida malonică, %M în biomasa de *Porphyridium cruentum* la cultivare în prezența nanoparticulelor de ZnSe**

Experiențele cu aplicarea nanoparticulelor de ZnS la mediul de cultivare a *Porphyridium cruentum* au pornit de la determinarea concentrațiilor maxime toxice pentru această microalgă. A fost stabilit că nanoparticulele de ZnS reduc productivitatea practic în toate variantele de concentrații utilizate, concentrația de 8 mg/l generând o scădere de două ori a productivității față de probele martor (Figura 5.15).

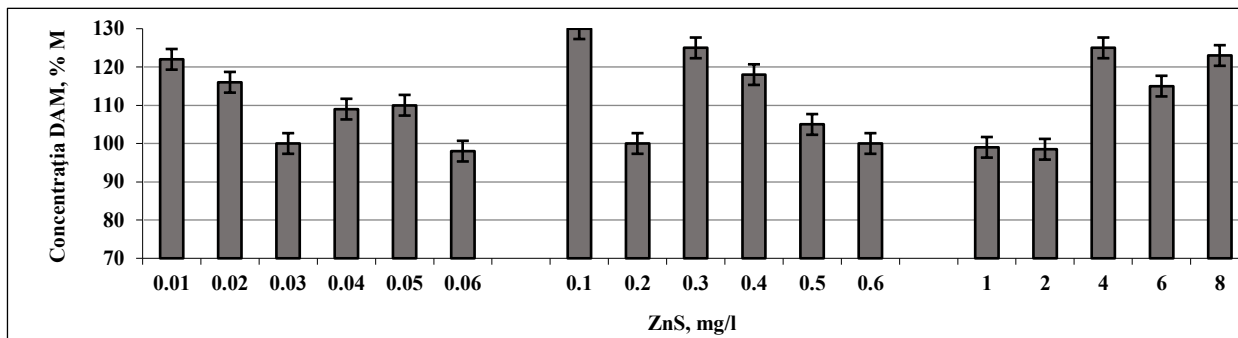


**Fig. 5.15. Biomasa de *Porphyridium cruentum* (% față martor) obținută în prezența nanoparticulelor de ZnS (0,01-0,6 mg/l)**

Concentrațiile mai mici au manifestat, de asemenea, un grad pronunțat de toxicitate, excepție prezentând concentrațiile de 0,03 și 0,2 mg/l unde productivitatea a fost la nivelul martorului. Un efect de reducere asupra nivelului de acumulare a biomasei s-a manifestat în

probele cu concentrația nanoparticulelor de 0,01 (cu 35%), 0,02 (cu 25%), 0,1 (cu 25%) și 0,3 (cu 32%).

Rezultatele testului dialdehidei malonice (Figura 5.16) denotă o creștere semnificativă a acestui marker de stres în prezența concentrațiilor 0,01-0,02 mg/l; 0,1 și 0,3 mg/l și 4-8 mg/l nanoparticule de ZnS.



**Fig. 5.16. Dialdehida malonică (%față de martor) în biomasa de *Porphyridium cruentum* la creștere în prezența nanoparticulelor de ZnS**

Productivitatea microalgei obținute prin aplicarea acestor concentrații este redusă, prin urmare mecanismul acțiunii toxice a particulelor de ZnS este identic cu cel al nanoparticulelor examinate anterior. În scopul aprecierii impactului nanoparticulelor asupra culturii de porfiridium au fost calculați coeficienții de corelație între cantitatea de biomasă obținută și conținutul dialdehidei malonice în această biomasă. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 5.2. În tabel sunt trecute doar rezultate semnificative cu  $p < 0.05 - 0.001$ .

**Tabelul 5.2. Coeficienții de corelație semnificativi între cantitatea de biomasă de porfiridium și conținutul dialdehidei malonice în biomasă la acțiunea nanoparticulelor de CdSe, ZnSe și ZnS**

	Cantitatea de biomasă		
	CdSe 1-12 mg/l	ZnS 1-8 mg/l	ZnSe 0,01-0,06 mg/l
DAM	-0,7837	-0,8563	-0,6087

Nivelul înalt de corelație între cantitatea de biomasă și produsele degradării oxidative a lipidelor evidențiază mecanismul acestei influențe, care constă în degradarea lipidelor din componența membranelor biologice și ca rezultat modificarea permeabilității și dereglarea proceselor vitale la porfiridium. Rezultatele obținute arată, că în cazul manifestării reacțiilor toxice la *Porphyridium cruentum* se înregistrează o corelație puternică negativă între productivitate și cantitatea de aldehydă malonică produsă în rezultatul peroxidării lipidelor. În acest studiu, a fost stabilit că toxicitatea celor trei tipuri de nanoparticule pentru cultura microalgei roșii *Porphyridium cruentum* descrește în șirul ZnSe>CdSe>ZnS. Dependența efectului nanoparticulelor de

concentrația lor asupra cantității de biomasă acumulată are un caracter de undă, iar mecanismul acestei influențe urmează a fi stabilit.

### **5.2.2. Stresul provocat de prezența nanoparticulelor de aur și argint în cultura de spirulină și porfiridium**

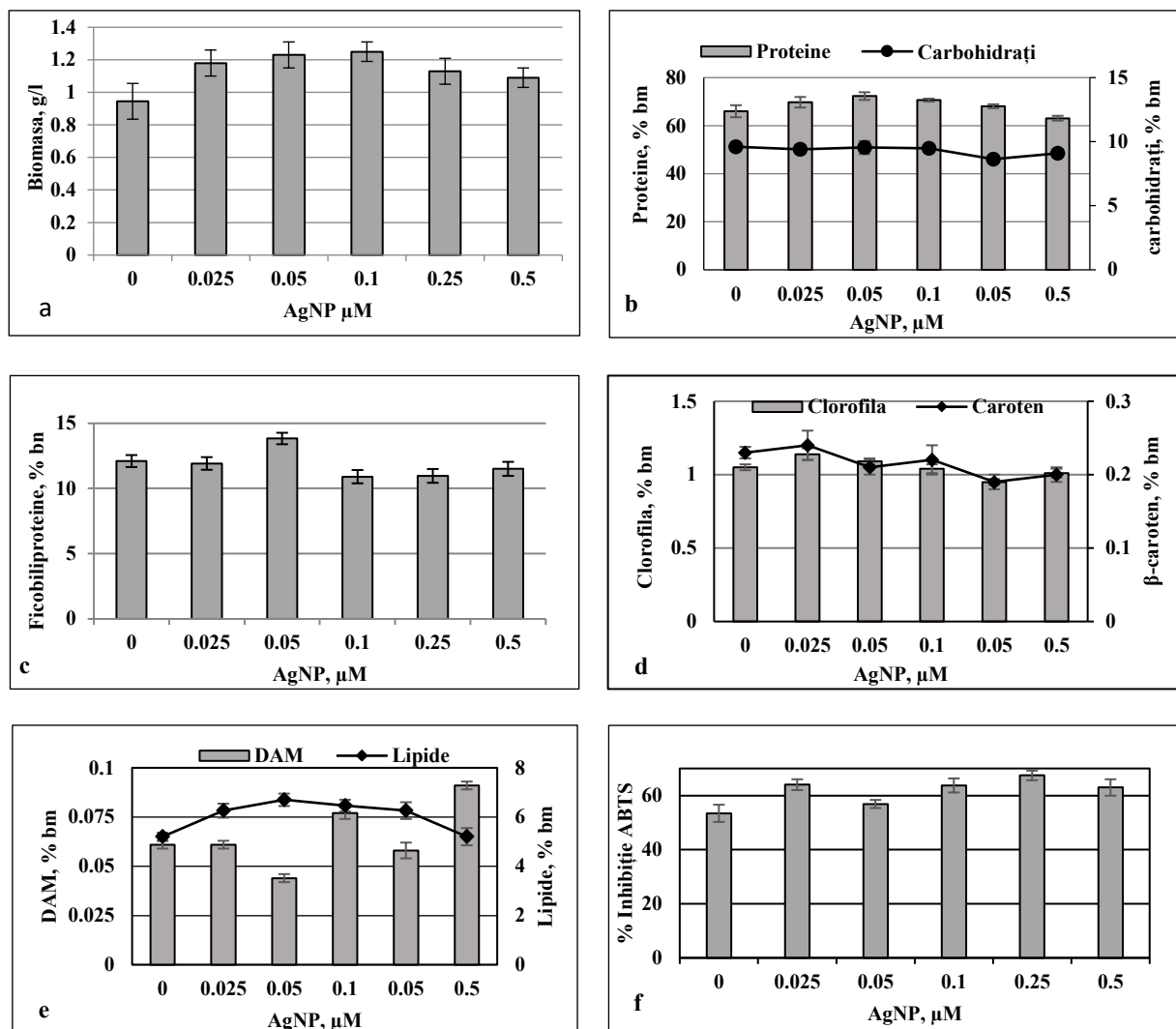
Nanoparticulele metalice, inclusiv cele de aur și argint, pot prezenta toxicitate pentru organismele vii, în principal datorită dimensiunii lor mici (>100 nm), raportului mare suprafață-volum și fațetelor foarte reactive [339]. Deoarece nanoparticulele au aceleași dimensiuni ca moleculele biologice, ele pot deteriora ADN-ul, denatura proteinele și pot produce radicali liberi [119]. Nanoparticulele pătrund ușor în sistemul circulator, se acumulează în diferite organe și chiar translocă bariera hematoencefalică [341, 482].

Efectul nanoparticulelor de metale asupra cianobacteriilor a fost descris în mai multe lucrări [74, 288,397]. Cu toate acestea, în marea parte a cercetărilor de acest tip sunt aplicate concentrații foarte mari de nanoparticule – de sute de mg/l. De asemenea, au fost studiate unele aspecte ale interacțiunii culturii de *P. cruentum* cu diferite nanoparticule. Din publicațiile existente reiese, că mecanismul prin care nanoparticulele afectează procesele metabolice în microalge este stresul oxidativ, care poate modifica nivelul de sinteză și acumulare a anumitor componente de interes în biomasa ficologică. Gradul de stres oxidativ cauzat de nanoparticule depinde de caracteristicile specifice ale nanoparticulelor de aur și argint, în special de compoziții utilizați pentru stabilizarea acestora cu polimeri organici [229]. Astfel, în funcție de proprietățile nanoparticulelor și de tipul de celule care interacționează cu acestea, pot fi observate numeroase efecte benefice și negative ale nanoparticulelor asupra spirulinei și porfiridiumului - două obiecte ficologice prețioase [79, 358, 362].

Obiectivul prezentului studiu a fost de a studia capacitatea nanoparticulelor de AgNP și AuNP stabilizate cu polimeri organici de a induce starea de stres la cianobacteria *Arthrospira platensis* și microalga *Porphyridium cruentum* în timpul cultivării acesteia în sistem închis. Introducerea AgNP în mediul de cultură al spirulinei în intervalul de concentrație 0,025 -0,1  $\mu\text{M}$  a produs efecte favorabile asupra biomasei spirulinei, rezultând o creștere a acesteia cu 24,2 – 31,6 % în comparație cu martorul (Figura 5.17, a).

La concentrații de AgNP de 0,25 și 0,5  $\mu\text{M}$ , biomasa a crescut cu 18,9 și, respectiv, 14,7%. La concentrații de AgNP de 0,05 și 0,1  $\mu\text{M}$  în mediu, a avut loc o ușoară creștere a conținutului de proteine. Conținutul de carbohidrați și cantitatea de pigmenți fotosintetici primari și secundari (clorofila  $\alpha$ ,  $\beta$ -carotenul și ficobiliproteinele) nu s-a modificat semnificativ sub acțiunea AgNP. Conținutul celor doi pigmenți fotosintetici principali ( $\beta$ -caroten și clorofilă  $\alpha$ ) a fost foarte asemănător. Conținutul de clorofilă  $\alpha$  din biomasa suplimentată cu AgNP a variat de la 0,95% la

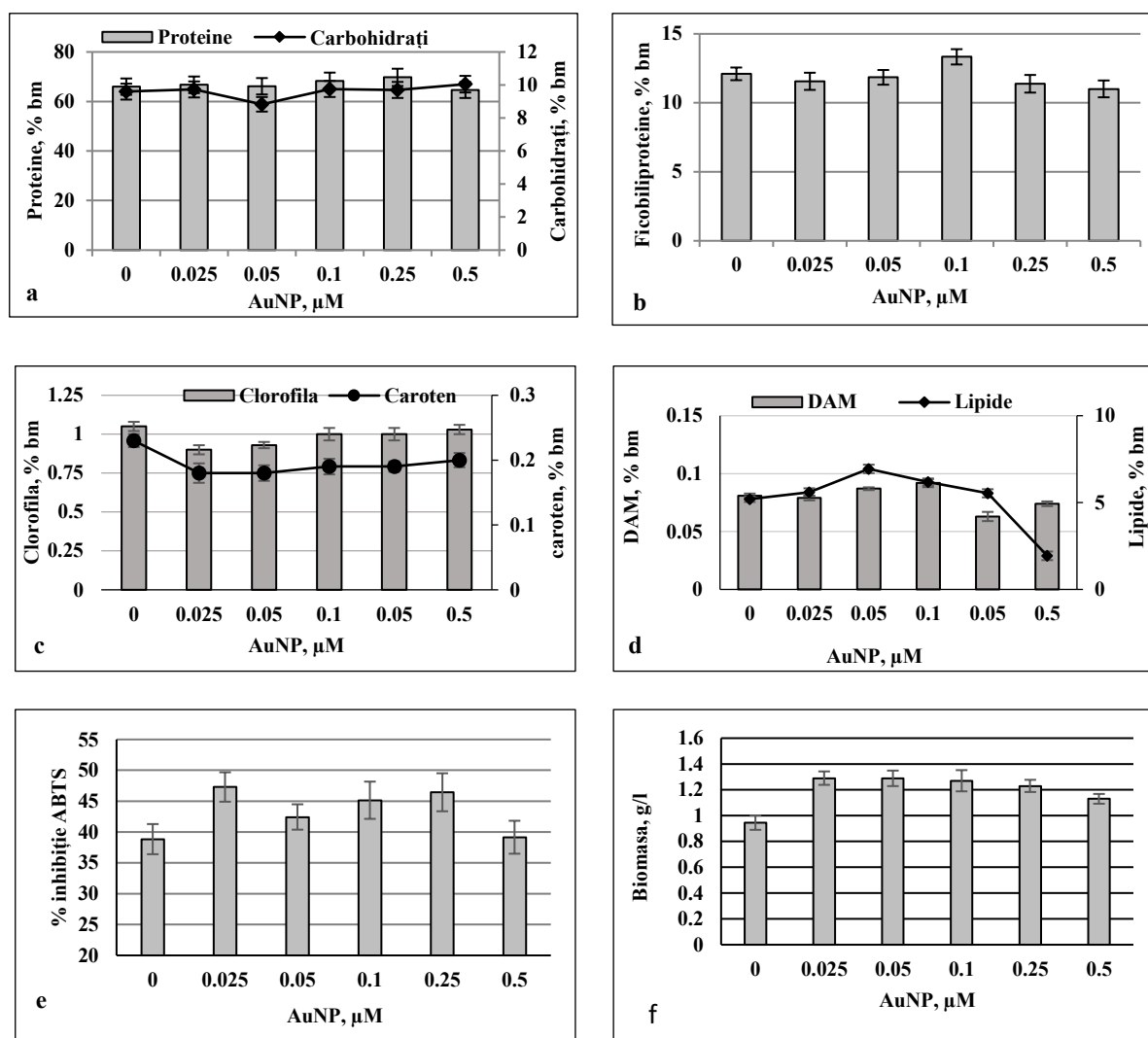
1,14% din biomasa, variație nesemnificativă statistic. În cazul  $\beta$ -carotenului, variațiile au fost, de asemenea, minore, de la 0,19% la 0,24% (Figura 5.17, d).



**Fig.5.17. Modificarea parametrilor biomasei de spirulină la introducerea AgNP în mediu de cultură: (a) biomasa, (b) proteine și carbohidrați, (c) ficobiliproteine, (d)  $\beta$ -caroten și clorofilă  $\alpha$ , (e) lipide și DAM și (f) activitatea antioxidantă a extractului hidric**

Componentele al căror conținut s-a schimbat semnificativ sub acțiunea AgNP au fost lipidele. La concentrația AgNP în soluție de 0,025–0,1 μM, creșterea conținutului de lipide a fost de 20,3%–28,6% în comparație cu biomasa martor (Figura 5.17, e). Conținutul de dialdehidă malonică (DAM) a arătat o tendință de creștere la concentrații de AgNP de 0,1 și 0,5 μM cu 26,2% și 49,2%, respectiv, în comparație cu biomasa martor. Activitatea antioxidantă a extractului hidric din biomasa spirulinei a fost, de asemenea, afectată de prezența nanoparticulelor de argint în mediul de cultură. Astfel, la toate concentrațiile studiate s-a observat o creștere semnificativă statistic a activității antioxidante cu 18,6%–26,7% față de biomasa martor ( $p < 0,01$  pentru concentrațiile de 0,25 și 0,5 μM și  $p < 0,05$  pentru celelalte concentrații).

Introducerea AuNP în mediul de cultură în intervalul de concentrație 0,025–0,5  $\mu\text{M}$  a avut un efect pozitiv asupra creșterii biomasei spirulinei (Figura 5.18, f). Astfel, producerea de biomasă la finalul ciclului vital a crescut cu 29,4%–35,8% în comparație cu martorul. Conținutul de proteine din biomasă nu a fost influențat de prezența AuNP în mediul de cultură și a variat între 64,6% și 69,7% din biomasă (Figura 5.18, a). Același lucru este valabil și pentru carbohidrați, al căror conținut în biomasă a fost între 8,8%–9,8% din biomasa uscată de spirulină. Conținutul de carbohidrați din biomasă a fost de 9,6%.



**Fig.5.18. Modificarea parametrilor biomasei de spirulină la introducerea AuNP în mediu de cultură: (a) proteine și carbohidrați, (b) ficobiliproteine, (c)  $\beta$ -caroten și clorofilă  $\alpha$ , (d) lipide și DAM, (e) activitatea antioxidantă a extractului hidric, (f) biomasă**

La o concentrație de AuNP de 0,025  $\mu\text{M}$  în soluție, conținutul de ficobiliproteine din biomasă a scăzut cu 21%, în timp ce la o concentrație de 0,1  $\mu\text{M}$  - a crescut cu 10% față de martor. Alte concentrații de AuNP nu au afectat conținutul de ficobiliproteine, care au rămas la nivelul biomasei de martor (12,1% din biomasa uscată). Conținutul de  $\beta$ -caroten și clorofilă  $\alpha$  s-a modificat în același mod. Cele mai mici concentrații de AuNP de 0,025–0,05  $\mu\text{M}$  au indus o

scădere a conținutului de  $\beta$ -caroten cu 19,8%–22,5% și de clorofilă  $\alpha$  cu 11,3%–14,7% în comparație cu biomasa nativă (Figura 5.18, c). La un interval de concentrație de 0,1–0,5  $\mu\text{M}$ , conținutul de  $\beta$ -caroten a scăzut cu 8,4%–16,3%. Concentrațiile AuNP de 0,1–0,5  $\mu\text{M}$  nu au influențat semnificativ conținutul de clorofilă  $\alpha$ .

Au fost observate creșteri ale conținutului de lipide cu 33,5% și, respectiv, 18,7% la concentrațiile AuNP de 0,05 și 0,10  $\mu\text{M}$ . Cu toate acestea, la o concentrație AuNP de 0,5  $\mu\text{M}$  a avut loc o scădere pronunțată a conținutului de lipide cu 63,1% în comparație cu biomasa nativă (Figura 5.18, d). S-a observat creșterea conținutului de DAM într-un interval de concentrație AuNP de 0,025–0,1  $\mu\text{M}$  cu 29,5%–50,8% în comparație cu biomasa martor. Un conținut crescut de DAM a fost observat și la o concentrație AuNP de 0,5  $\mu\text{M}$  cu 21,3% în comparație cu biomasa martor, ceea ce este relevant, mai ales ținând cont de conținutul redus de lipide din biomasă. Activitatea antioxidantă s-a schimbat numai la cea mai mică concentrație de AuNP din mediu, și anume 0,025  $\mu\text{M}$  (Figura 5.26, e). La această concentrație, activitatea antioxidantă a extractului de apă a crescut cu 15,8% ( $p = 0,014$ ), în timp ce la celelalte concentrații a fost la nivelul biomasei martor.

Nanoparticulele de argint și aur în intervalul de concentrație de 0,025–0,5  $\mu\text{M}$  stimulează creșterea biomasei spirulinei cu 31,6% și, respectiv, 35,8%. Ambele tipuri de NP nu au modificat semnificativ conținutul de proteine, carbohidrați și pigmenți. Conținutul de lipide a crescut la concentrații de NP de până la 0,1  $\mu\text{M}$ , iar la concentrație de 0,5  $\mu\text{M}$  a fost înregistrată o diminuare a acestui parametru. Au fost observate unele modificări legate de mecanismul fotosintetic. Unul dintre indicatorii activității fotosintetice este raportul clorofilă/caroten. Valoarea acestui raport diferă de la o specie la alta și depinde de starea fiziologică a celulelor. Un raport scăzut clorofilă/caroten este considerat un indicator al stresului. Valorile obținute în această cercetare pentru raportul clorofilă/caroten sunt date în Tabelul 5.3.

**Tabelul 5.3. Efectul nanoparticulelor asupra ratei clorofilă  $\alpha$ / $\beta$ -caroten la spirulină**

Tipul de nanoparticule	Rata Clorofilă $\alpha$ / $\beta$ -caroten					
	Concentrația nanoparticulelor, $\mu\text{M}$					
	0 (M)	0.025	0.05	0.10	0.25	0.50
AgNP	4.57	4.86	5.21	5.07	5.04	4.17
AuNP	4.57	5.03	5.05	5.13	5.18	5.05

Pentru AgNP la concentrații de 0,025–0,25  $\mu\text{M}$  a fost observată o creștere a acestui raport în comparație cu martorul, ceea ce indică o activitate de fotosinteză ridicată. Aceste date corelează cu creșterea biomasei. La o concentrație de AgNP de 0,50  $\mu\text{M}$  s-a observat o scădere a raportului față de martor, ceea ce ar putea fi un indicator al unei stări de stres pentru cultura de spirulină.

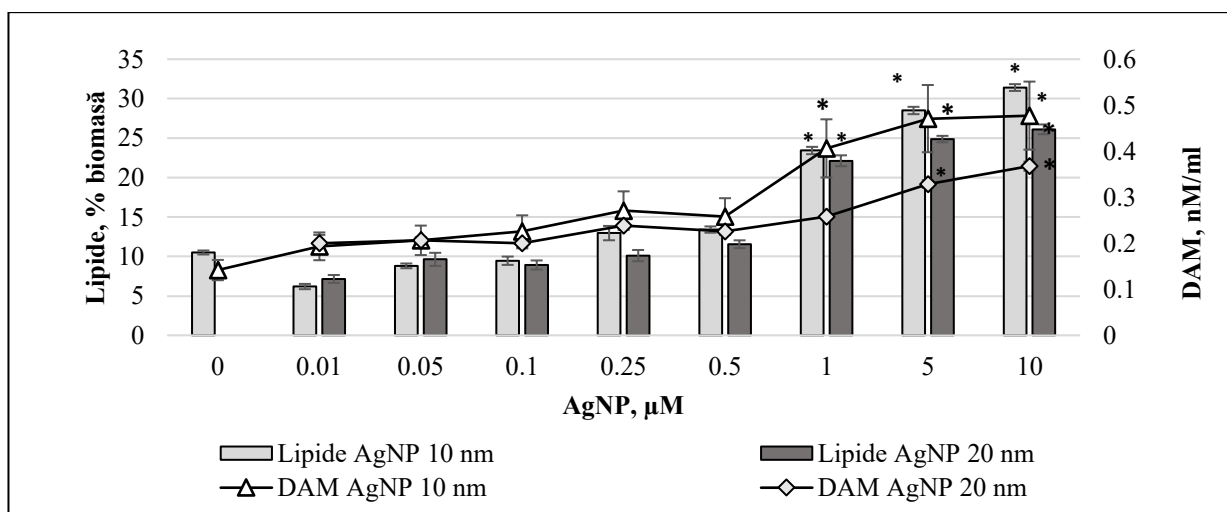
Concentrația AgNP și AuNP de 0,5  $\mu\text{M}$  implică mai multe elemente de toxicitate în cultura spirulinei. Printre acestea pot fi menționate scăderea conținutului de lipide, creșterea nivelului de



DAM și scăderea raportului clorofilă/caroten. Menținerea nivelului ridicat de productivitate la această concentrație a fost asigurată de un nivel adecvat al activității antioxidante a biomasei.

Efectul nanoparticulelor de aur și argint a fost studiat utilizând în calitate de obiect model cultura de *Porphyridium cruentum*. Datele care vor fi expuse în continuare se referă la efectele nanoparticulelor de Au și Ag cu dimensiunea de 10 și 20 nm, stabilizate în citrat asupra creșterii culturii de *Porphyridium cruentum* pe durata unui ciclu tehnologic în regim de sistem închis și asupra unor parametri de siguranță ai calității biomasei obținute.

Cultura microalgei roșii *Porphyridium cruentum*, a fost expusă, pe durata unui ciclu de cultivare de 14 zile, acțiunii diferitor concentrații de nanoparticulele de Ag și Au cu dimensiunile de 10 și 20 nm și stabilizate în citrat. În biomasa microalgală, colectată la sfârșitul ciclului de cultivare, a fost determinat conținutul lipidelor totale și a produselor degradării oxidative a acestor compuși (conținutul DAM). Expunerea culturii microalgale concentrațiilor mici (0,01 - 0,1  $\mu\text{M}$ ) de nanoparticule de Ag pe durata cultivării s-a soldat cu o diminuare a conținutului de lipide în biomasă (Figura 5.19). Pentru concentrația de 0,01  $\mu\text{M}$  a AgNP cu dimensiunea de 10 nm s-a constatat o scădere cu 41% a conținutului de lipide, iar pentru AgNP de 20 nm - o scădere cu 32% a cantității lipidelor. Concentrațiile mai mari de AgNP (0,05 și 0,1  $\mu\text{M}$ ) de ambele dimensiuni au avut un efect inhibitor mai puțin pronunțat asupra acumulării de lipide, conținutul lor în biomasă fiind cu 8 - 16% mai mic comparativ cu controlul.



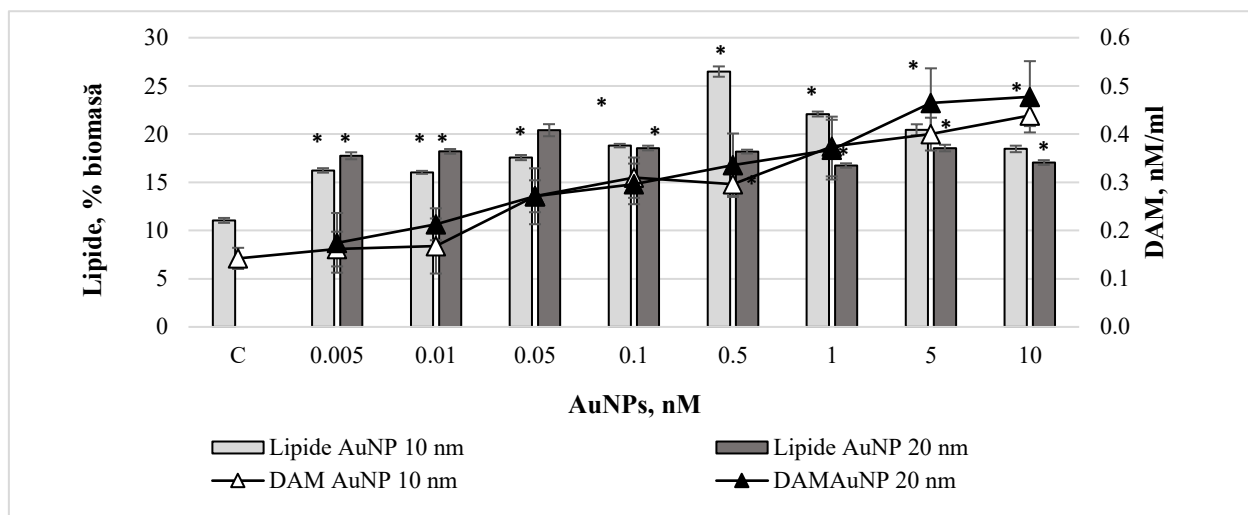
**Figura 5.19. Efectul diferitor concentrații ale nanoparticulelor de argint cu dimensiunea de 10 și 20 nm asupra conținutului de lipide și DAM în biomasa de *Porphyridium cruentum* (\* $p < 0,001$  pentru diferența față de martor)**

Majorarea concentrației nanoparticulelor în diapazonul luat în studiu, adăugate în mediul de cultivare a *P. Cruentum*, a corelat cu creșterea conținutului de lipide în biomasă. Nanoparticulele de Ag cu dimensiunea de 10 nm, în concentrațiile de 0,25 și 0,5  $\mu\text{M}$ , au stimulat acumularea lipidelor, creșterea constituind 23 - 27%. Concentrațiile de 1 - 10  $\mu\text{M}$  au indus un spor

de 2,2-3,0 ori a conținutului de lipide în biomasa microalgală. În cazul nanoparticulelor de 20 nm, suplimentate în concentrațiile de 0,25 și 0,5  $\mu\text{M}$ , s-a observat o creștere nesemnificativă, de 10%, a conținutului de lipide în biomasa de porfiridium. În limita concentrațiilor aplicate de AgNP, dependența dintre concentrația AgNP în mediul de cultivare a microalgei și conținutul lipidelor în biomasa colectată în ziua a 14 - a a ciclului de cultivare este una puternică, coeficientul de corelație Pearson calculat pentru AgNP de 10 nm este de  $r=0,856$  și pentru AgNP de 20 nm este de  $r=0,819$ .

Astfel, nanoparticulele de Ag cu dimensiunile de 10 și 20 nm stabilizate în citrat manifestă două tipuri de efecte asupra culturii microalgale de *P. cruentum*: efectul inhibitor, caracteristic pentru concentrațiile mici și efectul stimulator, caracteristic pentru concentrațiile mari. Acesta nu este un fenomen unic, reacții de răspuns similare fiind întâlnite și în cazul altor tipuri de nanoparticule și altor microalge [454].

În cazul aplicării nanoparticulelor de aur s-a constatat o creștere semnificativă a conținutului de lipide în biomasă la toate concentrațiile testate, cea mai mare creștere fiind cu 45 - 60%, în cazul concentrației de 0,005 nM a AuNP (Figura 5.20). Pentru nanoparticulele de aur de 10 nm, creșterea maximală, de 2,4 ori, a conținutului de lipide în biomasă a fost înregistrată la concentrația de 0,5 nM a nanoparticulelor. Concentrațiile de 1 - 10 nM ale nanoparticulelor de aur cu dimensiunea de 10 nm au menținut efectul stimulator asupra lipidogenezei, iar conținutul de lipide a fost cu 67% - de două ori mai mare comparativ cu valorile controlului.



**Figura 5.20. Efectul diferitelor concentrații ale nanoparticulelor de aur cu dimensiunea de 10 și 20 nm asupra conținutului de lipide și DAM în biomasa de *Porphyridium cruentum* (\* $p < 0,001$  pentru diferența față de martor)**

Nanoparticulele de aur de 20 nm au avut un efect stimulator moderat asupra producției de lipide în cultura algală, fără a se observa fluctuații semnificative în funcție de concentrația acestora în mediul de cultivare. Cu toate acestea, s-a identificat o concentrație optimală, de 0,05 nM, a nanoparticulelor, care a dus la o creștere cu 86% a conținutului de lipide comparativ cu valorile

controlului. În intervalul de concentrații cuprins între 0,1 și 10 nM, creșterea conținutului de lipide în biomasă a fost de peste 50%.

Așadar, nanoparticulele de aur cu dimensiunile de 10 și 20 nm, stabilizate în citrat și adăugate în mediul de cultivare de la începutul ciclului de cultivare, stimulează producția de lipide și acumularea lor în biomasa algală, fără a se observa o dependență clară directă doză-efect între concentrația nanoparticulelor și conținutul de lipide.

Creșterea conținutului de lipide în biomasă în cazul contactului microalgelor cu diferite tipuri de nanoparticule este considerată o reacție de răspuns la condițiile de stres oxidativ [229, 328]. Pentru a clarifica dacă inducerea procesului de sinteză a lipidelor în biomasa de *P. cruentum* este rezultatul efectului direct de stimulare al nanoparticulelor sau un răspuns la stresul indus de prezența acestora în mediul de cultivare, în biomasa colectată au fost determinate cantitățile dialdehidei malonice (DAM) (Figurile 5.27 și 5.28).

Analiza rezultatelor testului DAM demonstrează că ambele tipuri de nanoparticule induc formarea unor cantități mari ale dialdehidei malonice în biomasa microalgală. Se observă că efectul AgNP asupra conținutului de DAM în biomasa de *P. cruentum* este dependent de concentrație, cu o tendință de creștere a valorilor odată cu creșterea concentrației de AgNP (Figura 5.27). În cazul AgNP de 10 nm, concentrațiile cuprinse între 0,01 - 0,5  $\mu\text{M}$  au dus la o creștere cu 36 - 90% a conținutului de DAM în biomasă, în timp ce concentrațiile cuprinse între 1 - 10  $\mu\text{M}$  au provocat o creștere a conținutului dialdehidei malonice de 2,8-3,4 ori. Aceasta sugerează că conținutul înalt de lipide corelează cu valorile mai mari ale DAM.

În cazul AgNP de 20 nm, creșterea conținutului de DAM este mai moderată, cu cele mai mari valori obținute pentru concentrațiile de 5 și 10  $\mu\text{M}$  ale nanoparticulelor. În comparație cu martorul, conținutul de DAM în aceste variante a fost de 2,0 - 2,5 ori mai mare. În variantele cu suplimentarea AgNP de 20 nm în concentrațiile de la 0,01  $\mu\text{M}$  la 1  $\mu\text{M}$ , conținutul de DAM în biomasă a crescut cu 40-80%. Este important de menționat că există o corelație puternică pozitivă între valorile dialdehidei malonice determinate în biomasa de *P. cruentum* și concentrațiile de nanoparticule aplicate la mediul de cultivare. Această dependență este evidențiată de coeficienții de corelație  $r=0,823$  pentru AgNP de 10 nm și  $r=0,899$  pentru AgNP de 20 nm.

O creștere a valorilor dialdehidei malonice în biomasa de porfiridium a fost determinată și în cazul aplicării nanoparticulelor de aur cu dimensiunea de 10 și 20 nm, stabilizate în citrat (Figura 5.28). În cazul ambelor dimensiuni de nanoparticule de aur aplicate, s-a constatat că valorile dialdehidei malonice cresc odată cu majorarea concentrației de nanoparticule în mediul de cultivare. Pentru AuNP de 10 nm, o mărire de 10 ori a concentrației de nanoparticule, de la 0,005 nM la 0,05 nM, a dus la o creștere cu 13% - 90% a valorilor DAM față de martor. Concentrațiile nanoparticulelor cuprinse între 0,1 nM și 10 nM au determinat o creștere de 2 - 3 ori a conținutului

de dialdehidă malonică, pe fonul unei creșteri cu 60 - 80% a conținutului de lipide în biomasă, în variantele menționate.

Pentru AuNP de 20 nm, s-a observat o creștere cu 22 - 90% a conținutului de dialdehidă malonică în cazul concentrațiilor cuprinse între 0,005 - 0,05 nM și de peste 2 - 3 ori în cazul concentrațiilor de 5 nM și 10 nM a nanoparticulelor. În variantele analizate, creșterea conținutului de lipide a constituit 50 - 70%. Este important de remarcat faptul că procesul de oxidare a lipidelor este mult mai pronunțat decât sinteza acestora, ceea ce demonstrează existența unui proces oxidativ puternic, dependent de concentrațiile nanoparticulelor de aur din mediul de cultivare a *P. cruentum*. Coeficienții de corelație dintre valorile dialdehidei malonice determinate în biomasa microalgă și concentrațiile nanoparticulelor de aur de 10 și 20 nm din mediul de cultivare a confirmat existența unei dependențe puternice pozitive între aceste variabile ( $r = 0,744$  și  $r = 0,817$ ).

### **5.3. Stresul oxidativ pe durata biofuncționalizării nanoparticulelor de aur și argint de către microalge și cianobacterii**

Procesul de biofuncționalizare conferă nanoparticulelor metalice proprietatea de a declanșa fenomene fotofizice neconvenționale, datorită semnalelor optice puternice și stabile, ceea ce oferă posibilitatea aplicării lor în diferite tehnici de diagnostic. Strategia de biofuncționalizare aplicată poate afecta eficiența și biodisponibilitatea nanoparticulelor în raport cu celulele țintă. O prioritate foarte importantă a nanoparticulelor biofuncționalizate constă în nivelul scăzut al toxicității acestora pentru organismele vii comparativ cu nanoparticulele nefuncționalizate. Prin biofuncționalizare poate fi înlăturată instabilitatea nanoparticulelor. Biomoleculele conectate la suprafața diferitor tipuri de nanoparticule modifică proprietățile lor și pot asigura un nivel foarte înalt de stabilitate și deci, ușurează esențial manipularea acestora.

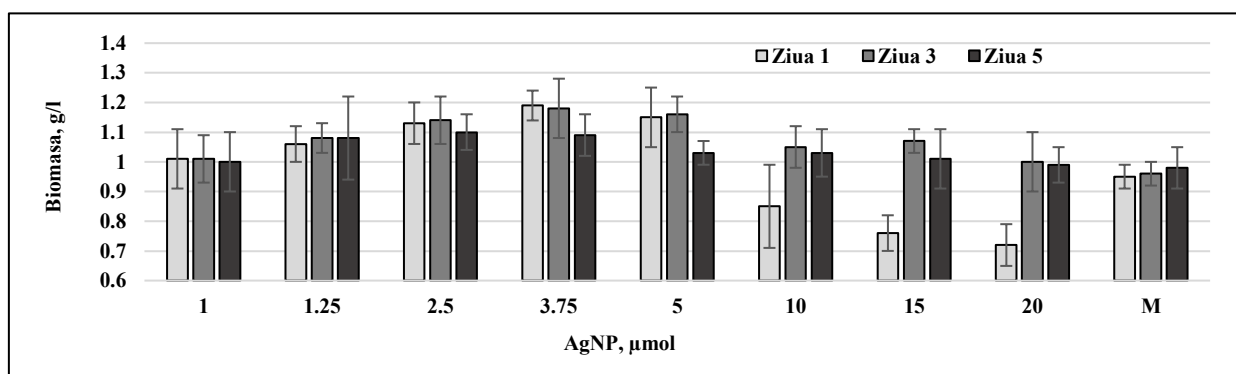
Procesul de biofuncționalizare poate fi realizat atât de culturile vii de cianobacterii și microalge, cât și de diferite extracte și componente ale biomasei. În cazul utilizării culturilor vii în scopul biofuncționalizării nanoparticulelor metalice, procesele pot decurge spontan ori pot fi dirijate prin diverse procedee biotehnologice. Microalga *Porphyridium cruentum* și cianobacteria *Arthrospira platensis* sunt obiecte biotehnologice valoroase, crescute la nivel industrial în întreaga lume pentru calitatea biomasei lor, care conține pigmenți ficobilinici și carotenoizi, proteine de calitate superioară, acizi grași polinesaturați, o gamă vastă de vitamine și minerale. Păstrarea calității biomasei acestor două obiecte biotehnologice pe durata procesului de biofuncționalizare deschide perspectiva utilizării complexului biomasă-nanoparticule funcționalizate, ceea ce poate oferi beneficii suplimentare.

În acest subcapitol este abordată anume această direcție – biofuncționalizarea nanoparticulelor de aur și argint stabilizate în polietilenglicol, produse industrial, cu utilizarea culturilor de porfiridium și de spirulină.

### 5.3.1. Biofuncționalizarea spontană a nanoparticulelor de argint și aur în biomasa de *Arthrospira platensis* în baza mecanismelor de protecție antioxidantă

În studiul dat au fost utilizate nanoparticule de argint și de aur de dimensiuni mici de 5 nm, stabilizate în polietilenglicol. Spirulina a fost cultivată în prezența nanoparticulelor, care au fost introduse în mediul de cultivare în perioade diferite ale ciclului vital în scopul evidențierii a unor posibilități de dirijare a proceselor naturale de biofuncționalizare a nanoparticulelor metalice în cultura vie și de păstrare a calității biomasei implicate în aceste procese. Adăugarea nanoparticulelor s-a realizat în 3 serii experimentale care se deosebesc după vârsta culturii: 1) faza lag – prima zi; 2) începutul fazei de creștere exponențială - a 3-a zi de cultivare și 3) sfârșitul fazei de creștere exponențială - a 5-a zi de cultivare. Durata experiențelor a fost de 6 zile. În biomasa colectată au fost efectuate testele biochimice de determinare a componenței biomasei și de monitorizare a stresului oxidativ. Concentrațiile testate au fost de la 1,0 la 20,0  $\mu\text{M}$  (după metal).

Dovezile biofuncționalizării nanoparticulelor de argint în biomasa de spirulină sunt prezentate în figura A5.7 din compartimentul Anexe. Cantitatea de biomasă la finalul experienței este prezentată în figura 5.21.



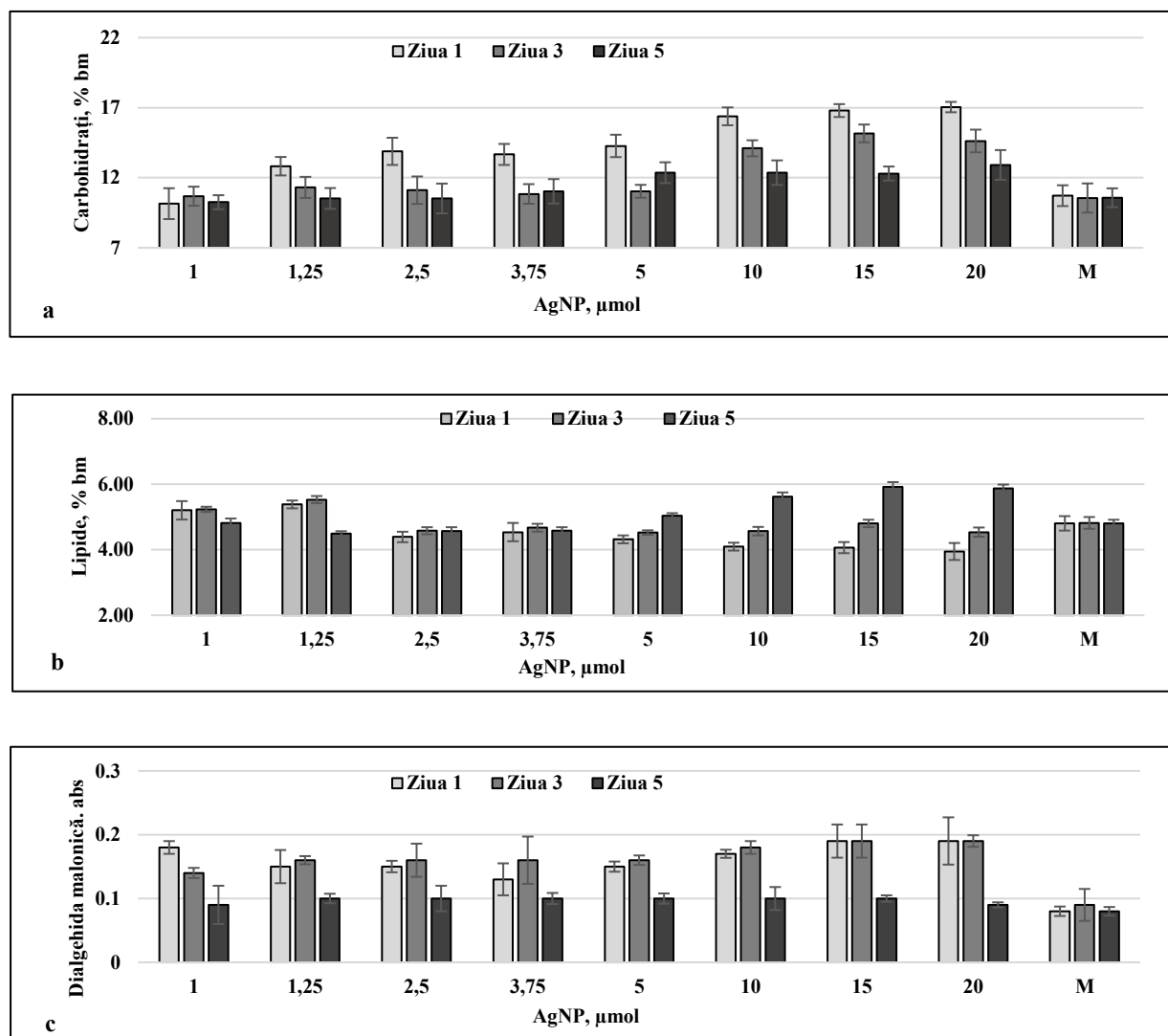
**Fig. 5.21. Biomasă de spirulină pe durata procesului de biofuncționalizare a AgNP în dependență de vârsta culturii**

Pentru concentrațiile în intervalul de la 2,5 la 5,0  $\mu\text{M}$ , aplicate în prima zi de cultivare a fost înregistrată o tendință de creștere a producerii de biomasă ( $p < 0,05$ ). În cazul concentrațiilor de 15-20  $\mu\text{M}$ , s-a observat o scădere veridică cu 20-24% a cantității de biomasă de spirulină ( $p < 0,01$ ), ceea ce demonstrează efectul inhibitor sau toxic al concentrațiilor respective de AgNP.

În cazul concentrațiilor de la 2,5 la 5,0  $\mu\text{M}$  AgNP, aplicate în a 3-a zi de cultivare s-a observat o tendință de creștere a biomasei. În cazul concentrațiilor de 15-20  $\mu\text{M}$  AgNP, conținutul

de biomasă de spirulină nu a scăzut în comparație cu varianta de adăugare a nanoparticulelor la prima zi de cultivare, ceea ce arată că vârsta culturii este un factor determinant al răspunsului spirulinei la prezența în mediul de cultivare a AgNP. O dovadă în plus sunt rezultatele obținute pentru experiența suplimentării mediului de cultivare cu nanoparticule de Ag în ziua a 5-a de cultivare, când activitatea biosintetică pierde din intensitate, iar cantitatea de biomasă de spirulină nu se modifică semnificativ sub acțiunea AgNP.

Modificarea componenței biomasei de spirulină la adăugarea nanoparticulelor de argint la diferite etape ale ciclului vital poate fi urmărită pe figura 5.22.



**Fig. 5.22. Efectul diferitor concentrații ale nanoparticule de argint asupra componenței biomasei de spirulină în dependență de perioada de aplicare: a – carbohidrați, b – lipide, c - DAM**

Pentru concentrația de 1,25  $\mu\text{M}$  AgNP, aplicată în prima zi de cultivare, a fost înregistrată o creștere cu 20% a conținutului de carbohidrați în biomasa spirulinei. În cazul concentrațiilor de la 2,5 la 20  $\mu\text{M}$ , conținutul de carbohidrați în biomasa spirulinei crește cu 29-59% peste valoarea

probelor control. În cazul dat, a fost stabilită o corelație puternică pozitivă dintre concentrația nanoparticulelor din mediul de cultivare și conținutul de carbohidrați în biomasa spirulinei, coeficientul de corelație Pearson fiind de 0,865. La adăugarea nanoparticulelor în a 3-a zi de cultivare, în concentrațiile de la 1,0 la 5,0  $\mu\text{M}$ , nu a fost determinată modificarea conținutului de carbohidrați, iar la concentrațiile de AgNP de la 10 la 20  $\mu\text{M}$ , conținutul de glucide crește cu 34-44%, comparativ cu valorile martorului. Și în cazul adăugării nanoparticulelor la ziua a 3-a a ciclului vital există o corelație puternică pozitivă între concentrația nanoparticulelor și cantitatea carbohidraților în biomasă ( $r=0,919$ ).

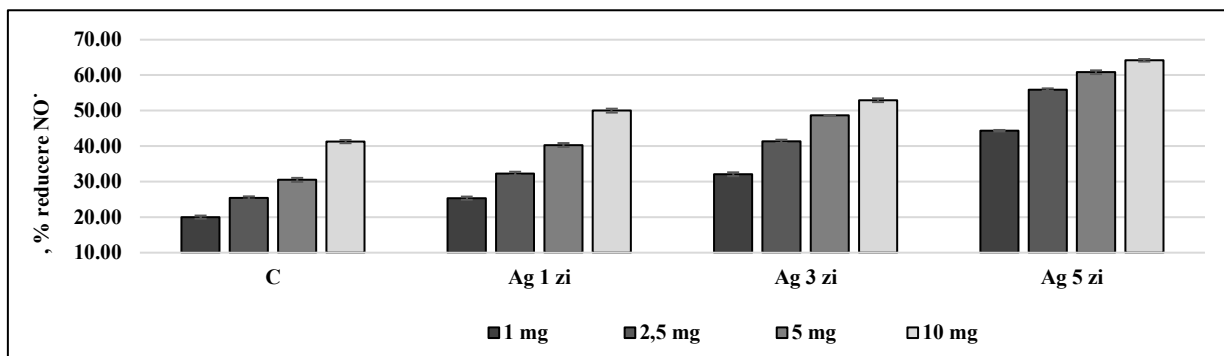
La adăugarea nanoparticulelor de argint în ziua a 5-a zi a ciclului de cultivare la mediul nutritiv al spirulinei, la concentrațiile de 10-20  $\mu\text{M}$  s-a observat o creștere cu 16-22% față de martor a conținutului de carbohidrați. Coeficientul de corelație Pearson (0,959) determinat pentru relația dintre concentrația AgNP și conținutul de carbohidrați în această variantă de suplimentare a AgNP indică o corelație puternică pozitivă între acești doi parametri. Creșterea semnificativă a conținutului de carbohidrați în biomasa spirulinei indică asupra modificării direcției proceselor biosintetice spre formarea de rezerve de carbon în scopul stabilizării componentelor structurale membranare pe durata unui posibil proces de biofuncționalizare a nanoparticulelor de către cultura de spirulină.

Conținutul lipidelor nu s-a modificat semnificativ sub acțiunea AgNP la adăugarea lor în prima zi a ciclului în concentrații de 1,0-10,0  $\mu\text{M}$ , iar la concentrațiile de 15-20  $\mu\text{M}$  AgNP, valoarea parametrului scade cu 16-18% față de martor. Coeficientul de corelație de -0,782 indică o dependență invers proporțională puternică dintre concentrația AgNP și conținutul de lipide la spirulină. Un spor cu 15% a cantității lipidelor a fost identificat în biomasa obținută la concentrația de 1,25  $\mu\text{M}$  AgNP aplicată în a 3-a zi de cultivare. În experiența cu suplimentarea nanoparticulelor de Ag la mediul de cultivare a spirulinei în ziua a 5-a zi a ciclului de cultivare, a fost stabilită o creștere cu 17-23% a conținutului de lipide în varianta concentrațiilor de 10, 15 și 20  $\mu\text{M}$ . Coeficientul Pearson, determinat pentru relația dintre concentrația AgNP și conținutul de lipide indică o corelația puternică pozitivă,  $r=0,932$ .

Implicarea nanoparticulelor de argint în activitatea biosintetică a spirulinei este însoțită de instalarea unei stări de stres, prezența căruia poate fi demonstrată în baza testului de cuantificare a produselor degradării oxidative a lipidelor (figura 5.22,c). În varianta experimentală cu introducerea nanoparticulelor în prima zi, modificarea conținutului DAM este lineară, corelația cu concentrațiile AgNP fiind puternică,  $r=0,868$ . Conținutul DAM este cu 70-97% mai mare pentru concentrațiile de 1,0 - 1,25  $\mu\text{M}$  AgNP și de peste 2 ori pentru concentrațiile de 10 - 20  $\mu\text{M}$  AgNP în comparație cu valorile martorului. La concentrațiile de 2,5 - 5,0  $\mu\text{M}$  AgNP a fost stabilită o creștere cu 44-70% a conținutului de DAM, în timp ce lipidele constituie mai puțin de 4,5% din

biomasă, ceea ce indică clar o stare de stres oxidativ. În varianta experimentală cu introducerea nanoparticulelor în a 3-a zi de cultivare, conținutul produselor degradării oxidative a lipidelor a fost dublu sau peste comparativ cu martorul, iar la adăugarea AgNP în a 5-a zi de cultivare, modificarea conținutului DAM este mai puțin semnificativă.

În extractele hidro-etanolice de 50% din biomasa de spirulină crescută cu adăugarea a 10  $\mu\text{M}$  AgNP, cu 1,0 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5,0 mg/ml și 10 mg/ml substanță activă uscată a fost determinată capacitatea de reducere a radicalului oxidului nitric. Rezultatele sunt prezentate în figura 5.23.



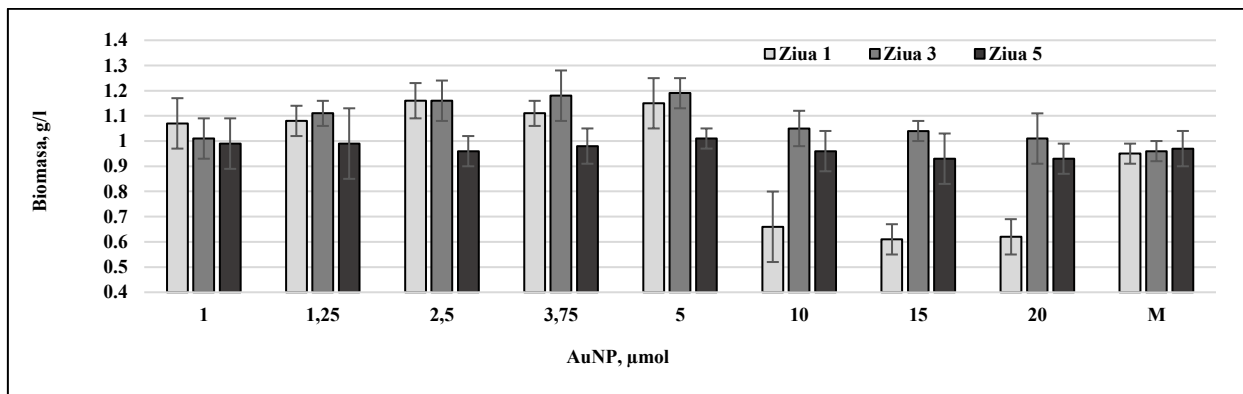
**Fig. 5.23. Capacitatea de reducere a radicalului oxidului nitric a extractelor din biomasa spirulinei, obținută în prezența a 10 $\mu\text{M}$  AgNP în dependență de vârsta culturii la momentul adăugării nanoparticulelor și conținutul de substanță uscată în extract**

Capacitatea de reducere a oxidului nitric a extractului cu 1,0 mg/ml substanță uscată (adăugare NP la prima zi) este cu 27% peste valorile martor. Același tip de extract obținut din biomasa, la care nanoparticulele au fost suplimentate în a 3-a zi de cultivare, a arătat o creștere cu 60% a capacității de reducere a radicalului oxidului nitric, iar în cazul variantei de adăugare a AgNP la ziua a cincea creșterea a fost de peste 2 ori. Pentru extractele hidro-etanolice de 2,5 mg/ml, cu un presupus conținut de nanoparticule de Ag funcționalizate, de asemenea, a fost stabilită o creștere a capacității de reducere a oxidului nitric cu 60-80% față de martor, în dependență de durata contactului culturii cu AgNP. Pentru extractele etanolice de 5,0 mg/ml și 10 mg/ml, cu conținut de nanoparticule de Ag funcționalizate, a fost stabilită o creștere de 2-3 ori a capacității de reducere a radicalului oxidului nitric comparativ cu martorul. Rezultatele obținute arată că modificarea proprietății de reducere a oxidului nitric a extractelor din biomasa de spirulină este un indice al prezenței nanoparticulelor funcționalizate.

Același tip de cercetare a fost realizat cu utilizarea nanoparticulelor de aur, care au fost adăugate la mediul de cultivare al spirulinei în concentrațiile de la 1,0 la 20,0 nM la trei etape diferite ale ciclului vital (prima, a 3-a și a 5-a zi). Cantitatea de biomasă acumulată în fiecare dintre variantele experimentale este prezentată în figura 5.24. Pentru concentrațiile în intervalul de la 2,5 la 5,0 nM, aplicate în prima zi de cultivare s-a observat o creștere a producerii de biomasă cu până



la 20% față de martor, iar la concentrațiile de 10-20 nM cantitatea de biomasă se reduce cu 30-35%. Efectul inhibitor în cazul AuNP este mai pronunțat față de cel produs de AgNP. Pentru concentrațiile nanoparticulelor în intervalul de la 1,25 la 5,0  $\mu\text{M}$ , aplicate în a 3-a zi de cultivare a spirulinei a fost stabilită o creștere a producerii de biomasă cu 16-23%. În cazul concentrațiilor de 10-20  $\mu\text{M}$ , efectul inhibitor nu a fost observat, spre deosebire de varianta precedentă, ceea ce demonstrează că vârsta culturii la care are loc contactul cu nanomaterialele este un factor determinant al răspunsului spirulinei la situația de stres.



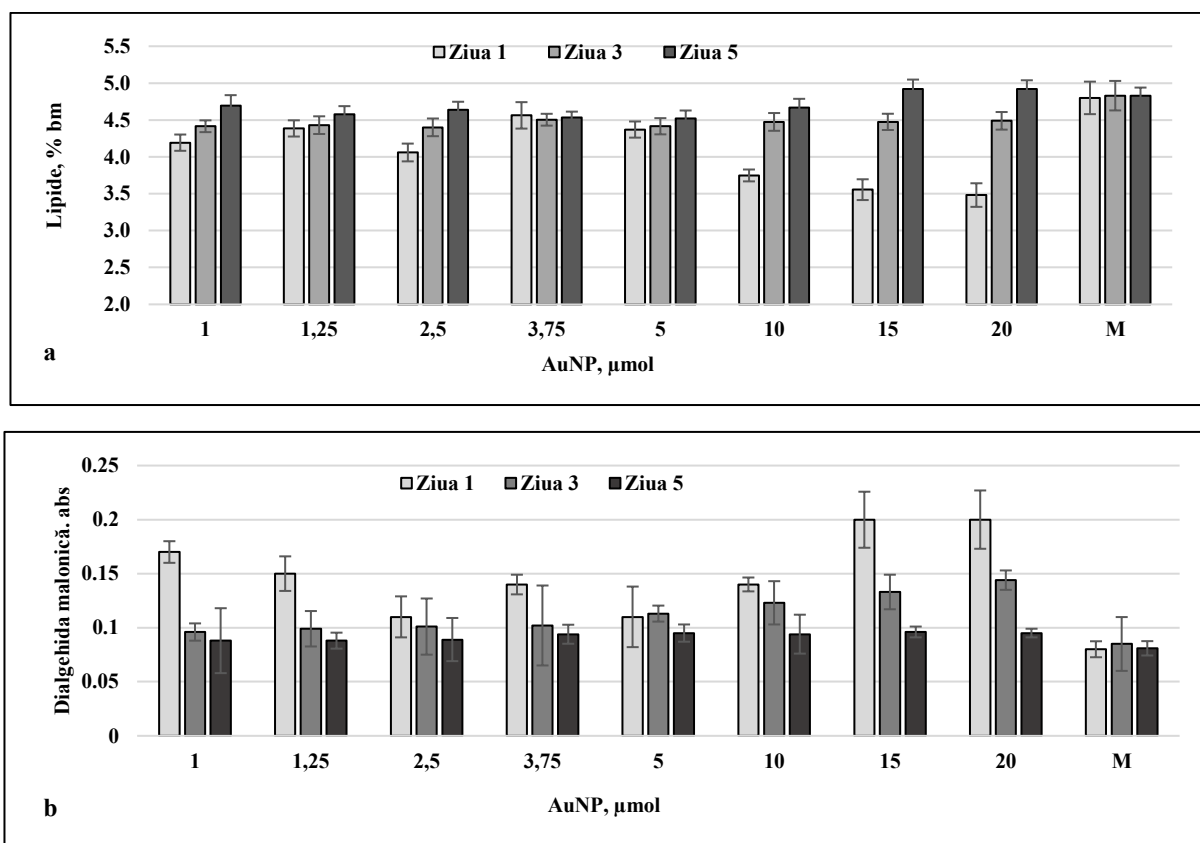
**Fig. 5.24. Biomasă de spirulină pe durata procesului de biofuncționalizare a AuNP în dependență de vârsta culturii la momentul contactului cu nanoparticulele**

Odată cu creșterea concentrației de nanoparticule cantitatea de biomasă se reduce, iar coeficientul de corelație între concentrația NP și cantitatea de biomasă pe tot diapazonul de concentrații este de -0,553. Introducerea AuNP în mediul în ziua a 5-a de cultivare nu a produs modificări ale cantității de biomasă în raport cu martorul.

Cantitatea de lipide și dialdehidă malonică în biomasă obținută poate fi urmărită în figura 5.25. Conținutul lipidelor nu s-a modificat semnificativ sub acțiunea nanoparticulelor de aur adăugate din prima zi a ciclului de cultivare a spirulinei (figura 5.25, a). Doar în cazul aplicării concentrațiilor de 10-20  $\mu\text{M}$  AuNP, cantitatea lor a fost cu 16-18% mai mică față de martor. Pentru varianta de adăugare a nanoparticulelor în cea de a treia zi se observă o tendință stabilă de creștere a conținutului de lipide odată cu creșterea concentrației NP ( $r = 0,676$ ). Aceeași tendință se observă și în cazul adăugării nanoparticulelor de aur la cea de-a cincea zi a ciclului vital, coeficientul de corelare fiind de 0,834. Menținerea conținutului de lipide la valorile normale, poate fi asociată cu un nivel relativ scăzut de radicali. Pentru a verifica aceasta a fost realizat testul TBARS. Rezultatele obținute sunt prezentate în figura 5.25, b.

În varianta experimentală cu introducerea nanoparticulelor în prima zi de cultivare, conținutul de dialdehidă malonică este semnificativ mai mare comparativ cu martorul și corelează cu concentrația NP ( $r = 0,731$ ). Degradarea oxidativă a lipidelor indică asupra acumulării în exces a speciilor reactive de oxigen ca rezultat al unui efect toxic al nanoparticulelor de Au. Odată cu

Înaintarea în vârstă a culturii de spirulină efectele toxice ale nanoparticulelor de aur devin mai atenuate. Astfel, per ansamblu, răspunsul culturii la prezența nanoparticulelor denotă un efect toxic moderat, ce se exprimă prin valori crescute ale carbohidraților și menținerea conținutului lipidelor la nivelul fiziologic. Este evidentă sensibilitatea sporită a culturii de spirulină aflată în faza de latență și o rezistență înaltă a culturii la finele etapei de creștere exponențială la prezența nanoparticulelor de aur de dimensiuni mici stabilizate în polietilenglicol.

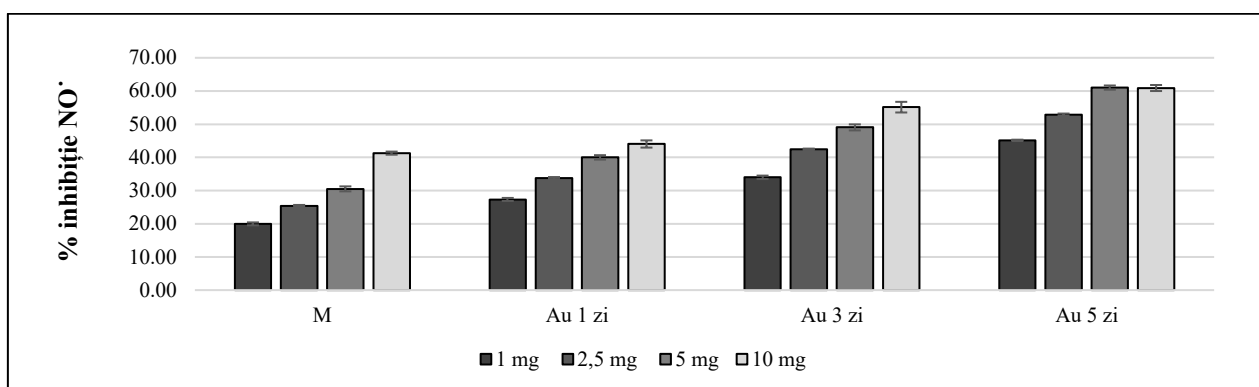


**Fig. 5.25. Conținutul (a) lipidelor și (b) dialdehidei malonice în biomasa spirulinei pe durata procesului de biofuncționalizare a AuNP în dependență de vârsta culturii la momentul contactului cu nanoparticulele**

Extractele obținute din biomasa de spirulină crescută în condiții standard și în condiții de adăugare a nanoparticulelor de aur în concentrație de 10  $\mu\text{M}$  la prima, a treia și a cincea zi de cultivare au fost testate în vederea estimării capacității de reducere a oxidului nitric (fig.5.26). Acest parametru a fost în creștere constantă atât odată cu creșterea concentrației de masă uscată în extractele standardizate, cât și cu faza ciclului de cultivare. În variantele cu adăugarea nanoparticulelor la ziua a cincea capacitatea de reducere a oxidului nitric a fost dublă comparativ cu martorul (figura 5.26).

În rezultatul experiențelor a fost demonstrată dependența dintre vârstă culturii de spirulină și răspunsul ei la prezența nanoparticulelor în mediul de cultivare în ceea ce ține de eficiența procesului de biofuncționalizare a NP. Cultura aflată la faza de latență este mai sensibilă la

acțiunea nanoparticulelor de aur și argint, iar modificările în componența biomasei sunt cele mai vizibile.



**Fig. 5.26. Capacitatea de reducere a oxidului nitric a extractelor din biomasa spirulinei, obținută în prezența AuNP în dependență de vârsta culturii la momentul contactului cu nanoparticulele și conținutului de substanță uscată în extract**

Degradarea oxidativă a lipidelor indică asupra acumulării în exces a speciilor reactive de oxigen ca rezultat al unei influențe a nanoparticulelor de Au și Ag, suplimentate la mediul de cultivare la începutul ciclului de cultivare și la începutul fazei exponențiale în scop de biofuncționalizare. Conținutul DAM, determinate în probele de spirulină, la adăugarea de nanoparticule la sfârșitul perioadei exponențiale este cu mult mai mic. În aceste circumstanțe, activarea lipidogenezei ca rezultat al degradării oxidative imediate a lipidelor este o reacție rapidă și eficientă la stresul oxidativ. Situația, când cantitatea de DAM este în continuă creștere în condițiile unei lipidogeneze normale este un indicator al stării de stres de intensitate înaltă.

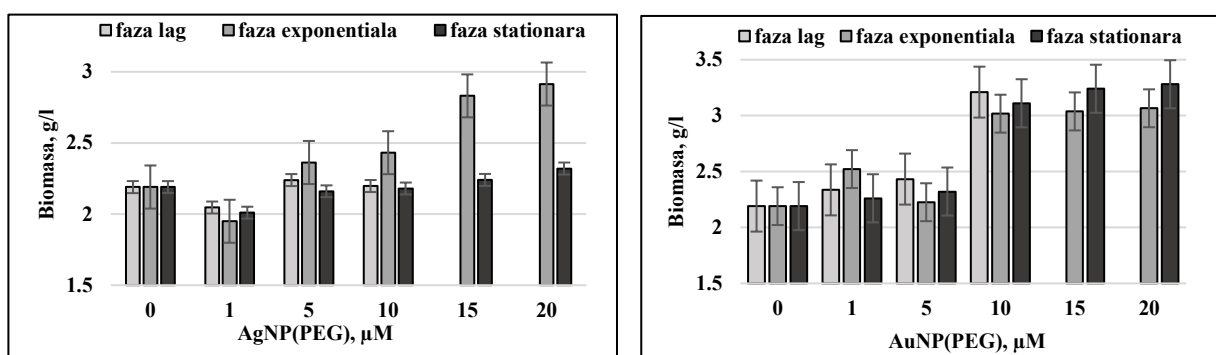
Cercetările realizate demonstrează, că în scopul obținerii biomasei calitative de spirulină cu conținut de nanoparticule biofuncționalizate este optimal de a utiliza biomasă aflată la finele fazei de creștere exponențială, când efectele stresului oxidativ sunt minimale.

### **5.3.2. Biofuncționalizarea nanoparticulelor de argint și aur în biomasa de *Porphyridium cruentum* în baza mecanismelor de protecție antioxidantă**

Cercetări similare celor descrise în subcapitolul 5.3.1. au fost realizate având în calitate de obiect de studiu microalga roșie *Porphyridium cruentum*. Concentrațiile aplicate au fost de la 0,05 până la 10  $\mu\text{M}$  după metal, în trei serii experimentale care se deosebesc după vârsta culturii la care au fost suplimentate nanoparticulele: faza *lag* (prima zi); începutul fazei exponențiale (a 5-a zi de cultivare); sfârșitul fazei exponențiale (a 9-a zi de cultivare). Concentrațiile de 15 și 20  $\mu\text{M}$  au fost adăugate la ziua a cincea și a noua din cauza efectului toxic la adăugarea precoce a NP.

Influența nanoparticulelor de Au și Ag în concentrațiile de la 0,01  $\mu\text{M}$  la 0,5  $\mu\text{M}$  adăugate la începutul fazei de latență nu au provocat modificări ale productivității microalgei, iar efectele

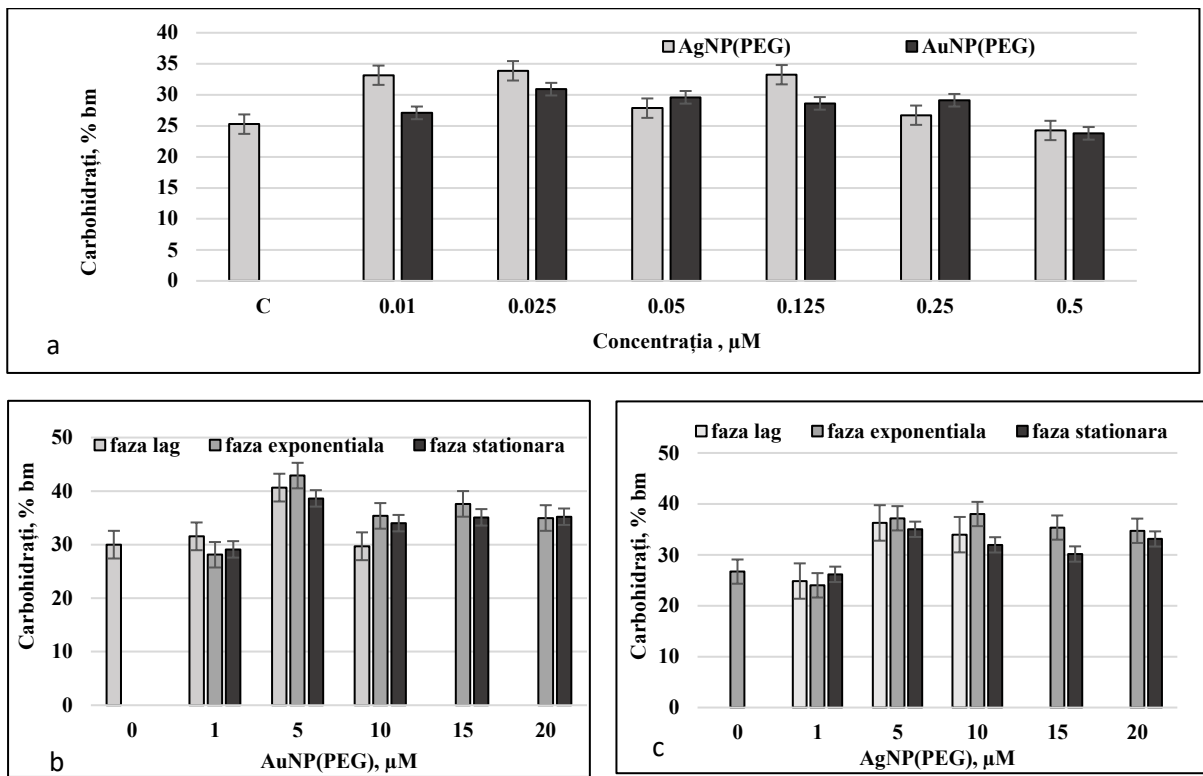
observate la concentrații mai mari ale NP pot fi urmărite în figura 5.27. Pentru concentrațiile de AgNP, aplicate în intervalul de la 1,0 la 10,0  $\mu\text{M}$ , adăugate în prima zi și la începutul fazei exponențiale cantitatea de biomasă de porfiridium a fost la nivelul matorului. Pentru varianta aplicării nanoparticulelor la începutul fazei exponențiale în concentrațiile de 15,0 și 20,0  $\mu\text{M}$ , a fost observat un efect de stimulare a producerii de biomasă cu 29-22%. Concentrația de 10,0  $\mu\text{M}$  AuNP(PEG) a sporit producerea de biomasă algală cu 38-46% față de proba martor, valorile obținute pentru diferite termene de administrare fiind statistic omogene. Pentru varianta aplicării AuNP la începutul fazei exponențiale în concentrațiile de 15,0 și 20,0  $\mu\text{M}$ , cantitatea de biomasă a crescut cu 38-40%, iar în ultima variantă biomasă algală a crescut cu 48-50%.



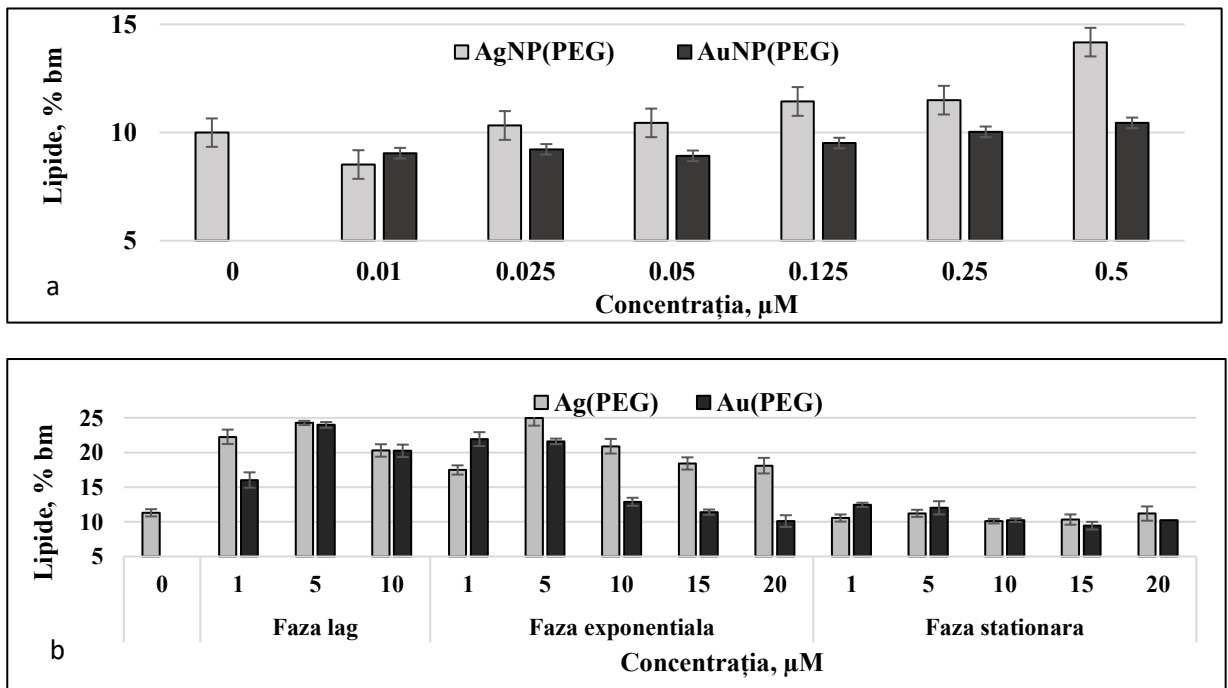
**Fig. 5.27. Biomasa de *P. cruentum* la introducerea AgNP(PEG) și AuNP(PEG) în mediul de cultivare în intervalul concentrațiilor 1,0 – 20,0  $\mu\text{M}$  pe durata ciclului de cultivare**

În cazul concentrațiilor cuprinse între 0,01-0,025  $\mu\text{M}$  AgNP, aplicate în prima zi de cultivare, a fost observată o creștere cu până la 30% a conținutului de carbohidrați în biomasă de *P. cruentum* (figura 5.28). În cazul nanoparticulelor de aur în concentrație de 0,01-0,25  $\mu\text{M}$ , adăugate în trei variante creșterea cantității carbohidraților în biomasă algală a fost cu până la 42%. Pentru concentrațiile cuprinse între 0,01-0,5  $\mu\text{M}$  AgNP, aplicate în prima zi de cultivare, a fost stabilită o tendință de creștere a conținutului de lipide în biomasă de *P. cruentum*. La concentrațiile de 0,125-0,25  $\mu\text{M}$  AgNP conținutul lipidelor în biomasă este cu până la 14% peste valoarea matorului (figura 5.29), iar la 0,5  $\mu\text{M}$  nanoparticule - cu 40%. Coeficientul de corelație între concentrația nanoparticulelor de argint și conținutul de lipide în biomasă a fost de 0,809. Nanoparticulele de aur nu au modificat conținutul lipidelor la porfiridium.

Cantitatea de lipide determinată în biomasă obținută la creștere în prezența nanoparticulelor de aur și argint poate fi văzută în figura 5.29. La aplicarea nanoparticulelor de argint în concentrații mari la începutul fazei de latență a fost identificată o creștere cu 41-100% a conținutului de lipide. Aplicarea AgNP în faza exponențială a dus la o creștere a lipidelor în biomasă cu 55-112%. Atunci când nanoparticulele sunt introduse pentru biofuncționalizare în faza staționară, modificarea conținutului de lipide nu are loc.



**Fig. 5.28. Conținutul de carbohidrați în biomasa de *P. cruentum* la introducerea nanoparticulelor de aur și argint în mediul de cultivare la începutul fazei de latență (a) și la trei etape diferite ale ciclului vital (b,c)**

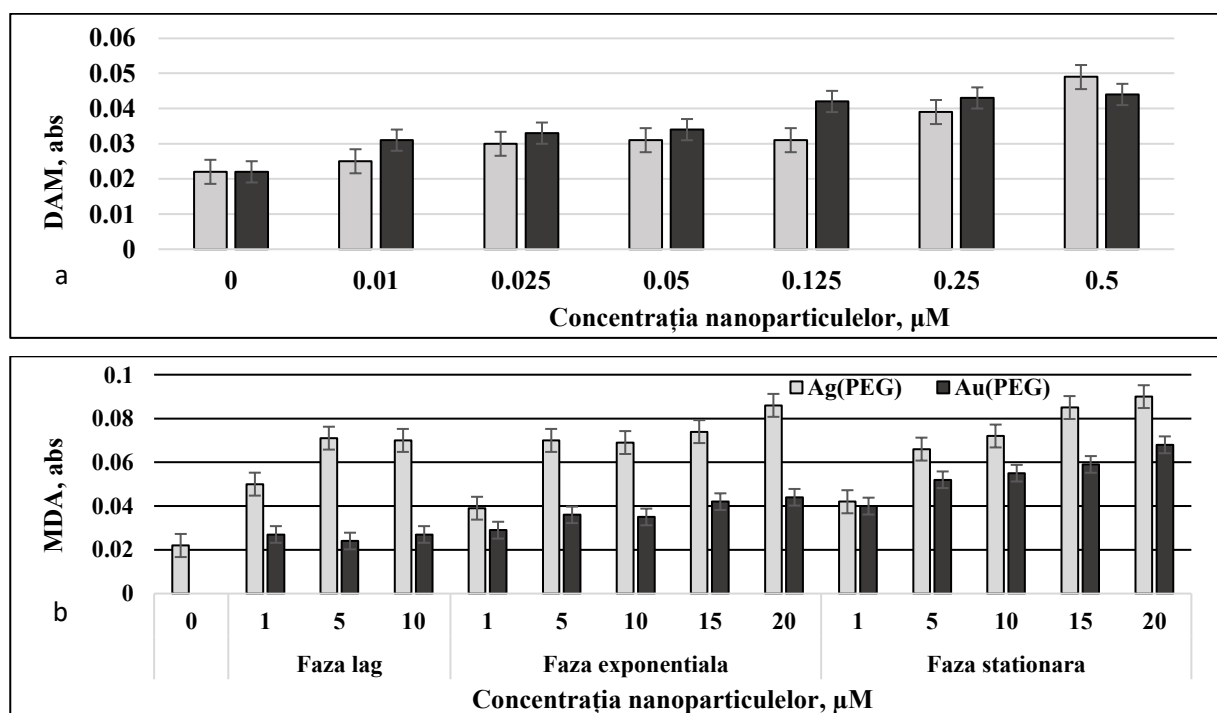


**Fig. 5.29. Conținutul de lipide în biomasa de *P. cruentum* la introducerea nanoparticulelor de aur și argint în mediul de cultivare la începutul fazei de latență (a) și la trei etape diferite ale ciclului vital (b)**

În cazul nanoparticulelor de aur adăugate pentru biofuncționalizare în faza *lag* se produce o creștere a conținutului de lipide în biomasa de porfiridium cu 42-107% comparativ cu martorul. Atunci când nanoparticulele se adaugă în faza exponențială, concentrațiile 1,5 – 10,0  $\mu\text{M}$  asigură acumularea unei cantități importante de lipide, care este cu 40-209% mai mare decât la martor. La adăugarea celor două tipuri de nanoparticule în faza staționară, indiferent de concentrațiile aplicate, conținutul de lipide în biomasă a rămas la nivelul martorului.

Vârsta culturii s-a poziționat în calitate de factor determinant în modificarea sintezei lipidelor. Cele mai active s-au dovedit a fi nanoparticulele de argint care s-au implicat activ în remodelarea conținutului lipidelor. Coeficientul Pearson determinat pentru relația dintre concentrația AgNP aplicate în faza de latență și conținutul de lipide în biomasa de porfiridium este de -0,902. Corelația invers proporțională dintre concentrația nanoparticulelor de argint și conținutul lipidelor în biomasa algală poate fi dovada deteriorărilor oxidative în membranele celulare ca urmare a impactului nanoparticulelor și a reorientării activității biosintetice spre menținerea integrității funcționale a membranelor.

Produsul degradării oxidative a lipidelor – dialdehida malonică, a fost monitorizat în această experiență, iar rezultatele pot fi urmărite în figura 5.30.



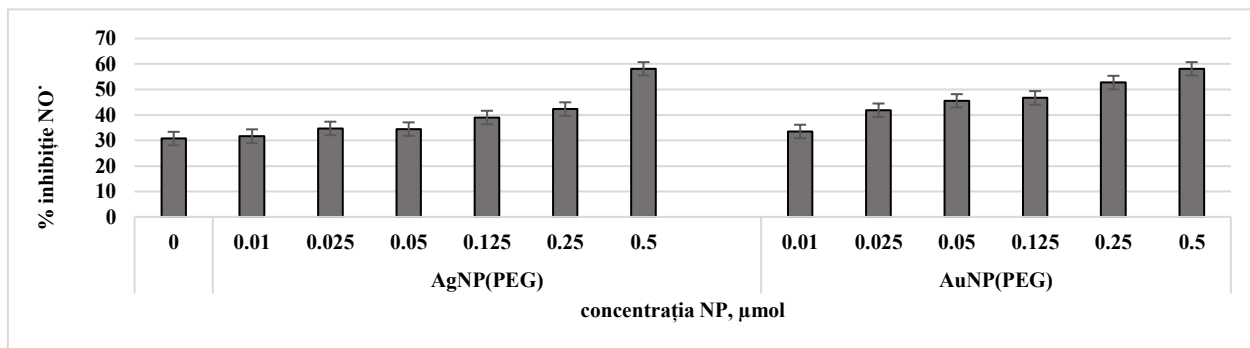
**Fig. 5.30. Conținutul de dialdehidă malonică în biomasa de *P. cruentum* la introducerea nanoparticulelor de aur și argint în mediul de cultivare la începutul fazei de latență (a) și la trei etape diferite ale ciclului vital (b)**

În varianta experimentală cu introducerea nanoparticulelor AgPEG în faza de latență, modificarea conținutului DAM este una lineară, corelarea cu concentrațiile AgNP fiind puternică,

$r=0,978$ . Conținutul produselor degradării oxidative a lipidelor în biomasa de *P. cruentum* este cu 36-77% mai mare pentru concentrațiile de 0,01-0,25  $\mu\text{M}$  AgNP și de peste 2 ori pentru concentrația de 0,5  $\mu\text{M}$  AgNP în comparație cu valorile martorului. AuNP adăugate în aceleași condiții produc modificarea conținutului DAM, corelația între valorile DAM și concentrațiile AgNP fiind puternică ( $r=0,803$ ).

În varianta experimentală cu introducerea nanoparticulelor de argint, în concentrații mai mari (1-10  $\mu\text{M}$ ), la începutul fazei de latență, modificarea conținutului dialdehidei malonice este de asemenea, una lineară, corelația cu concentrațiile AgNP fiind puternică,  $r=0,782$ . Conținutul produselor degradării oxidative a lipidelor a fost de 2-3 ori mai mare față de martor. Adăugarea nanoparticulelor de argint la începutul fazelor de creștere exponențială și staționară de asemenea duce la mărirea nivelului DAM în biomasa de porfiridium, iar valorile obținute sunt de mai mult de 4 ori mai mari comparativ cu martorul în cazul concentrațiilor de 20  $\mu\text{M}$ .

Idea implicării mecanismelor de răspuns la starea de stres oxidativ în procesul de biofuncționalizare este susținută și de datele cu referire la capacitatea de reducere a biomasei de porfiridium. Astfel, a fost demonstrat că capacitatea de reducere a radicalului oxidului nitric, determinată pentru extractele obținute din biomasa de *P. cruentum*, cultivată în prezența nanoparticulelor stabilizate în polietilenglicol, suplimentate la mediul de cultivare în faza de latență, a crescut semnificativ (figura 5.31).



**Fig. 5.31. Capacitatea de reducere a radicalului oxidul nitric de către extractele etanolice din biomasa de *P. cruentum* crescută în prezența nanoparticulelor de aur și argint**

Nanoparticulele de aur și argint au indus creșterea capacității de reducere a oxidului nitric în extractele din biomasa de *P. cruentum*, cu 36-89%. Există o corelație puternică pozitivă dintre concentrațiile nanoparticulelor și valorile capacității de reducere a oxidului nitric. Astfel, coeficientul Pearson pentru varianta AgNP este 0,989, iar pentru AuNP 0,893.

Vârsta culturii de *P. cruentum* este un factor important în formarea reacției de răspuns a culturii la stresul oxidativ generat de prezența nanoparticulelor de aur și argint stabilizate în polietilenglicol, dar și de modelare a procesului de biofuncționalizare a nanoparticulelor. Faza creșterii exponențiale, fiind cea mai importantă fază a ciclului de cultivare a porfiridiumului, se

evidențiază ca termen potrivit în scopul obținerii de nanoparticule biofuncționalizate în celulele microalgale, dar poate fi asociată cu o acumulare în exces a produselor degradării oxidative a lipidelor.

#### **5.4. Concluzii la capitolul 5**

Rezultatele cercetărilor expuse în acest capitol sunt de un interes și actualitate majoră, domeniul nanotehnologiilor fiind tot mai prezent în viața societății, afectând în diferite moduri diverse domenii, inclusiv sănătatea și protecția mediului. Tendința de a aplica nanomateriale în diferite arii de activitate umană – de la industria frumuseții la cea de bioremediere a mediului acvatic și edafic, ridică multiple întrebări de etică și siguranță. În același timp, domeniul nanotehnologiilor este cel mai activ dezvoltat, iar rezultatele obținute sunt implementate în viața cotidiană cu o viteză uluitoare și pune omnia în fața necesității de a confrunța provocările asociate cu acest domeniu.

În această ordine de idei, este necesar să fim pregătiți pentru a da răspunsuri cu referire la efectele imediate și cele întârziate ale nanomaterialelor asupra organismelor vii, dar și la posibilitatea de valorificare a acestui domeniu fascinat – interacțiunea celulelor vii cu nanoparticule de diferit gen. Capitolul dat acoperă trei arii de interes, și anume: efectele produse de diferite tipuri de nanomateriale asupra organismelor acvatice; posibilitatea utilizării obiectelor ficologice în calitate de „fabrici verzi” pentru producerea de nanoparticule de interes tehnologic și medical în condiții prietenoase mediului; și posibilitatea biofuncționalizării nanomaterialelor de producere inginerescă în scopul atribuirii de noi proprietăți și de modificare a nivelului de toxicitate, biodisponibilitate și eficiență în raport cu celule, țesuturi și organisme vii.

În cadrul primei direcții, nanomaterialele au fost tratate la fel ca și alți factori de stres pentru culturile ficologice, fiind monitorizați parametrii productivi și de siguranță ai biomasei obținute în condiții de contact cu aceste materiale specifice. Concluzia despre nivelul de stres s-a făcut în baza unei analize ample a modificărilor produse în nivelul de producere a biomasei, în componența biomasei produse și în activitatea antioxidantă a acesteia. În studiu au fost luate nanoparticule cu o utilizare practică extinsă – nanoparticulele luminescente utilizate în multiple arii ingineresti și nanoparticulele metalelor nobile, utilizate tot mai mult în diferite industrii și medicină. A fost demonstrată instalarea stării de stres oxidativ în condițiile contactului culturilor de cianobacterii și microalge cu nanoparticulele, evidențiat parametrii care atestă incontestabil efectele negative ale acestui contact, dar și posibilitățile de minimalizare a efectelor negative provocate de nanomateriale în raport cu microorganismele testate. În cadrul cercetărilor realizate s-a evidențiat un efect paradoxal de stimulare a culturii de porfiridium prin contact cu nanoparticulele de CdSe cu potențial toxic major. Mecanismul presupus al acestui fenomen a fost expus în unul dintre



articolele la tema tezei [372] și constă în formarea unui sistem hibrid ficoeritrină-nanoparticule, care mărește eficiența procesului de captare a energiei luminoase de către microalgă.

În cadrul celei de-a doua direcții am avut drept scop de a acoperi un domeniu în care există lipsă sau insuficiență de date cu referire la utilizarea culturilor vii de cianobacterii și microalge în calitate de matrice pentru nanosinteză. În linii generale, marea majoritate a cercetărilor de biosinteză a nanoparticulelor sunt bazate pe aplicarea diferitor tipuri de extracte și derivate celulare cu un potențial reducător pronunțat, care asigură derularea reacțiilor de oxidoreducere cu trecerea ionilor metalici în stare redusă și cu formare de nanoparticule. În capitolul dat, ne-am propus să evidențiem posibilitatea de a obține nanoparticule în celulele de microalge și cianobacterii în condițiile păstrării calității și valorii biologice a acestor culturi. O asemenea abordare este prețioasă atunci când avem drept scop de a aplica o viziune integrată de utilizare a nanomaterialelor. Aceasta se referă în special la domeniul de teranostică, când proprietățile nanoparticulelor de biosinteză și a matricei biologice în care acestea sunt incluse să fie valorificate pentru diagnosticare și tratament într-o singură procedură. În acest capitol a fost demonstrată posibilitatea de obținere a nanoparticulelor pornind de la forme chimice diferite ale elementelor de interes. În același timp se urmărește păstrarea unui echilibru între nanobiosinteză și calitatea biomasei la finalul acestui proces.

Cea de-a treia direcție a reieșit din limitările celei de-a doua direcții, și anume de faptul, că în cele mai multe cazuri studiate, concentrațiile de ioni ale elementelor de interes, necesare pentru a declanșa procesele spontane de nanobiosinteză în celulele de microalge și cianobacterii au efecte toxice nefaste asupra culturilor, provoacă degradarea pronunțată a calității biomase și limitează serios posibilitatea de a valorifica integrat nanoparticulele incorporate în biomasă. Ideea pusă în practică a constat în utilizarea mecanismelor de protecție antioxidantă a microalgelor și cianobacteriilor, care se declanșează la contactul culturilor cu nanoparticulele, în scopul modificării proprietăților acestora prin atribuire de învelișuri funcționale suplimentare. În acest capitol sunt prezentate rezultatele care demonstrează posibilitatea realizării procedurii de biofuncționalizare a nanoparticulelor ingineresti în condiții prietenoase mediului.

Cele expuse mai sus pot fi generalizate în următoarele concluzii:

1. Nanoparticulele de diferită natură prezintă factori de stres pentru culturile de microalge și cianobacterii.
2. Efectele nanoparticulelor sunt determinate de proprietățile fizico-chimice ale acestora, durata contactului celulelor cianobacteriene și microalgale cu ele, concentrațiile lor în mediu și starea fiziologică a culturilor în timpul contactului cu nanomaterialele.

3. Inducerea stării de stres ca rezultat al contactului dintre nanoparticule și celulele microalgelor și cianobacteriilor declanșează mecanismele de protecție celulară, care stau la baza procesului de biofuncționalizare a nanoparticulelor.
4. Atât culturile vii de cianobacterii și microalge, cât și diferite tipuri de fracții de biomasă posedă capacitatea de a realiza biosinteza de nanoparticule pornind de la ioni, procesul având la bază puterea de reducere a matricei de sinteză folosită.

Rezultatele, ideile și concluziile expuse în acest capitol au fost publicate în monografii [4, 15, 491], articole în reviste Wos/Scopus [97, 99, 100, 105, 108, 371, 372, 488, 489], articole în reviste naționale [11,12], culegeri de lucrări ale manifestărilor științifice [86,90, 93, 94, 109, 128, 292, 369].

## 6. STRESUL OXIDATIV ÎN PROCESELE DE BIOREMEDIERE A APELOR CONTAMINATE CU METALE

Poluarea mediului ambiant este o problemă majoră a actualității. Urbanizarea și industrializarea globală, extinderea terenurilor arabile, defrișarea activă și abuzivă, activitățile tehnologice ale omenirii duc la deversarea și acumularea masivă a substanțelor toxice în aer, apă și sol. Apa fiind una dintre cele mai mari bogății ale planetei, este supusă zilnic unei presiuni antropice enorme. Apa potabilă, care constituie mai puțin de 3 % din rezervele acvatice ale pământului, este prima afectată de procesul de poluare. Potrivit datelor Programului Organizației Națiunilor Unite pentru Evaluarea Apelor Mondiale [461], care monitorizează resursele de apă potabilă din lume, 2 milioane de tone de deșeuri umane sunt deversate zilnic în diferite corpuri acvatice. Doar metalele grele și nămolurile toxice constituie 300-400 de tone pe an [461]. Dacă în trecut deșeurile managerie și agricole erau în centrul atenției cercetătorilor, acum accentele se schimbă considerabil. Apar alte tipuri de contaminanți, printre care microcontaminanți, materiale plastice, poluanți organici persistenti, gaze cu efecte de seră, care nu numai că contaminează anumite site-uri naturale, ci pun în pericol echilibrul natural al planetei la nivel global [142]. Astfel, aspectele legate de remedierea apelor sunt tot mai importante și se află în centrul atenției atât a oamenilor de știință, cât și a politicianilor.

În prezent, managementul proceselor de monitorizare și purificare a apei sunt dominate de strategiile de remediere fizico-chimică și de infrastructura tradițională, prezentată prin stații de control și epurare clasice. Aceste tehnologii de remediere sunt asociate cu un consum mare de energie și sunt destul de scumpe [210, 379, 442, 474]. În același timp, posibilitățile biotehnologiilor sunt nejustificat ignorate. Biotehnologiile de bioremediere numite și "tehnologii verzi", care presupun implicarea organismelor vii, pot completa și spori eficiența tehnologiilor tradiționale.

Printre principalele priorități ale bioremedierii comparativ cu remedierea tradițională putem menționa: prețul redus, care este determinat inclusiv de aplicarea utilajului simplu și necostisitor; posibilitatea biotransformării complete a contaminanților organici în compuși chimici nontoxici; perceperea pozitivă de către societatea civilă, deoarece are loc în baza proceselor naturale. Anume aceste priorități determină interesul sporit al cercetătorilor pentru acest domeniu.

Tehnologiile de bioremediere implică utilizarea microorganismelor în scopul reducerii, eliminării complete ori transformării contaminanților în mediile poluate. Bioremedierea *in situ* este dependentă de prezența microorganismelor specifice în cantități și proporții bine stabilite și de condițiile de mediu adecvate. De cele mai multe ori, bioremedierea *in situ* este realizată de

către microorganismele indigene, adaptate deja la condițiile mediului poluat. Aceste microorganisme sunt capabile să utilizeze contaminanții în calitate de substrat acceptor de electroni, ori ca sursă de elemente biogene, în special de carbon. Ca rezultat al reacțiilor chimice realizate, compușii organici sunt supuși biodegradării complete cu formarea de dioxid de carbon, apă, metan și cu acumularea de biomasă. Compușii anorganici sunt acumulați în biomasa microbială – proces numit bioacumulare – sau supuși biotransformării în produse nontoxice ori cu potențial toxic redus [164, 221].

Una dintre cele mai contemporane direcții ale bioremedierii este aplicarea principiilor ingineriei metabolice și biologiei sistemice care permit nu doar utilizarea potențialului organismelor vii în înlăturarea eficientă a contaminanților din mediul poluat, ci și de a îmbunătăți performanțele organismelor în parte, cât și a comunităților de organisme, caracteristice unui anumit ecosistem. În același timp, succesul unei asemenea abordări constă în acumularea informațiilor valoroase despre procesele biologice implicate în bioremediere la nivel de molecule, celule, organisme și comunități. Aceste informații apoi servesc drept bază pentru manipulări moleculare, menite să sporească eficiența proceselor de bioremediere [140].

Printre microorganismele cu potențial bioremediator un loc aparte revine organismelor fototrofe, în primul rând datorită cerințelor minimale ale acestora față de mediu, acestea necesitând doar aportul de CO<sub>2</sub> și prezența luminii [76, 366, 376]. Această prioritate enormă mai este completată și de posibilitatea utilizării biomasei în calitate de fertilizator, sau în calitate de sursă de substanțe cu activitate biologică înaltă.

Astfel, utilizarea microorganismelor fotosintetizante în procesele de bioremediere, pe lângă posibilitatea îndepărtării eficiente a poluanților, oferă plusvaloare prin posibilitatea utilizării controlate a biomasei în diferite domenii.

### **6.1. Particularitățile răspunsului culturii de spirulină la stresul oxidativ în condiții de tratare a efluenților contaminați cu metale grele și cicluri repetate de cultivare**

*Arthrospira platensis* este un obiect model convenabil pentru studii de bioremediere, fiind un extremofil, care face față mai multor provocări: alcalinitate ridicată, temperatură ridicată și concentrație mare de sare în mediul de cultură. Mai mult, spirulina poate supraviețui nu numai în medii cu un conținut ridicat de metale grele și poluanți organici persistenti, dar și să acumuleze o cantitate mare de biomasă în aceste condiții [250].

Practic, sunt cunoscute mecanisme care asigură toleranța la diferite condiții extreme la organismele vii în general și în special la spirulină. Astfel, metalele grele provoacă o stare de stres în celulele vii prin generarea unei cantități exorbitante de specii reactive de oxigen, care

acționează ca molecule de semnalizare. La rândul lor, SRO induc producerea unei game de compuși cu proprietăți antioxidante (enzime antioxidante, în special superoxiddismutază, catalază și peroxidază, fitochelatine și metalotioneine, precum și antioxidanți cu greutate moleculară mică). Carotenoizii, compușii fenolici, derivații de clorofilă și ficobiliproteinele sunt printre antioxidanții spirulinei cu cea mai mare activitate [218].

Celulele spirulinei au un conținut bogat de proteine și peptide (în medie 65-75% din biomasa absolut uscată). Cercetătorii atribuie acestei particularități remarcabile nu numai acumularea de metale grele, ci și formarea de conjugați cu metaboliții poluanților organici [250]. Toleranța ridicată la pH este asociată cu capacitatea organismelor de a menține o homeostazie relativă a citoplasmei. În acest context, un rol de bază revine procesului de acumulare activă de  $H^+$  prin antiportori electrogeni secundari de cationi/protoni, care în organismele extremofile alcalifile utilizează  $Na^+$  ca substrat de eflux cuplat cu absorbția de  $H^+$  [244].

Astfel, spirulina posedă mecanisme care asigură supraviețuirea acestei cianobacterii în condiții care diferă esențial de cele optime. Mediile poluate, inclusiv cel acvatic, pot fi asociate cu condiții extreme. Prin urmare, organismele extremofile, în special cele care posedă mecanisme de îndepărtare a metalelor grele și a poluanților organici persistenti, sunt obiecte de perspectivă în bioremediere. Având în vedere cele de mai sus, *Arthrospira platensis* este un obiect model pentru cercetări care vizează depistarea mecanismelor implicate în procesul de bioremediere și elaborarea unor proceduri eficiente de îndepărtare a poluanților din diverse medii acvatice. De asemenea, spirulina este și un obiect convenabil din punct de vedere tehnologic, fiind ușor de manipulat atât în condiții de laborator, cât și în condiții industriale. Ciclul vital al cianobacteriei, în funcție de compoziția mediului nutritiv și de condițiile de creștere, poate varia în limite foarte largi - de la 6 la 21 de zile. Mai mult, acest parametru poate fi setat prin aplicarea procedurilor specifice de cultivare astfel încât durata și compoziția biochimică a biomasei obținute să corespundă unor cerințe prestabilite. Celulele spirulinei aflate în faza de creștere exponențială și în faza de început de declin se caracterizează prin prezența unui număr mare de bule de gaz, ceea ce asigură flocularea biomasei microalgale și, prin urmare, o putem colecta cu ușurință și fără cheltuieli mari. Structura specifică a celulelor spirulinei cu perete celular de tip gram-negativ facilitează extragerea componentelor celulare atât pentru analize riguroase, cât și pentru utilizarea lor în diverse domenii.

Biomasa spirulinei, obținută în condiții controlate în bioreactoare închise, este foarte valoroasă pentru industria farmaceutică, dar destul de costisitoare. Utilizarea unei astfel de biomase ca sorbent simplu pentru metale grele nu este rentabilă. Cu totul diferită este situația când biomasa este cultivată în bioreactoare în aer liber în condiții semicontrolate. Această biomasă este mult mai puțin valoroasă pentru producția de medicamente, dar – destul de ieftină

pentru a fi utilizată în procesele de bioremediere. Astfel, utilizarea spirulinei în cercetări de bioremediere este argumentată atât din punct de vedere fundamental, cât și aplicativ.

În continuare, sunt expuse rezultatele obținute în studiul îndepărtării metalelor grele din sisteme polimetalice cu conținut de cupru și crom în cicluri repetate de cultivare cu utilizarea cianobacteriei *Arthrospira platensis*.

Primul sistem polimetalic testat a fost constituit în baza prezenței cuprului. Afară de cupru, sistemele au inclus: I – fier; II – fier și nichel; III – fier și zinc; IV – fier, zinc și nichel. Componența chimică a sistemelor studiate este prezentată în tabelul 6.1.

**Tabelul.6.1. Componența chimică a sistemelor polimetalice cu conținut de cupru**

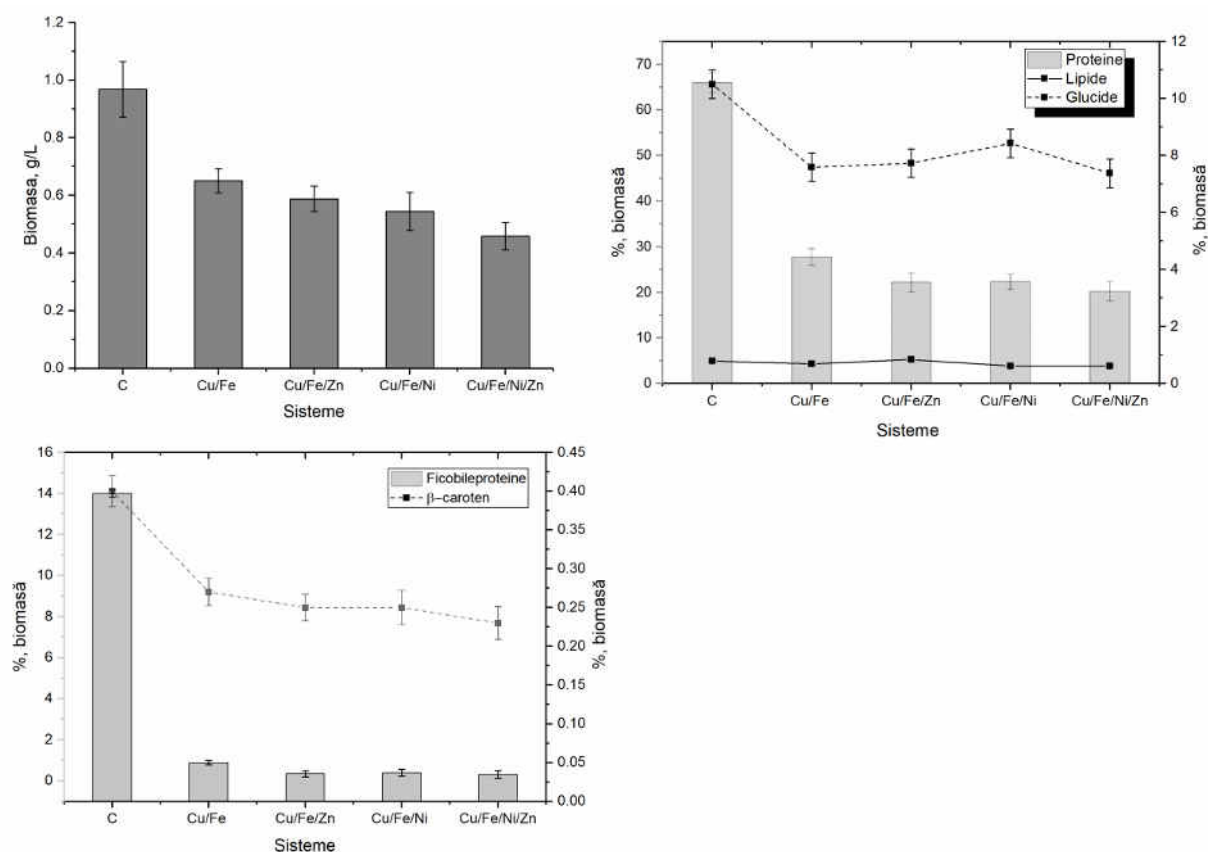
Sistemul	Concentrația metalului, mg/l			
	Cu	Fe	Ni	Zn
Cu/Fe	10±0.1	5±0.05	-	-
Cu/Fe/Ni	10±0.2	5±0.07	2±0.02	-
Cu/Fe/Zn	10±0.1	5±0.06	-	2±0.03
Cu/Fe/Ni/Zn	10±0.1	5±0.05	2±0.01	2±0.04

Rezultatele cu referire la acumularea metalelor în biomasă sunt prezentate în anexe (figura A6.1.). Conform datelor analizei de activare cu neutroni, în sistemul Cu/Fe, biomasa spirulinei a acumulat 6,0±0,3 mg/g de cupru, care este de 200 de ori mai mare decât în biomasa martor și 7,2±0,3 mg/g de fier – de 1,6 ori mai mult în comparație cu martorul. La adăugarea ionilor de zinc în sistem, capacitatea de acumulare a biomasei pentru cupru rămâne la nivelul sistemului Cu/Fe (6,0±0,3 mg/g), în timp ce cantitatea de fier acumulată de biomasă a constituit 6,75±0,33 mg/g (de 1,5 ori mai mult decât la martor), iar cantitatea de zinc a fost de 1,60±0,05 mg/g (de 26 de ori mai mare decât la martor). În sistemul Cu/Fe/Ni, cantitatea de cupru acumulată a crescut în comparație cu cele două sisteme anterioare cu aproximativ 1,0 mg/g, în timp ce absorbția de fier a fost redusă semnificativ. În cazul sistemului Cu/Fe/Ni, cantitatea de fier din biomasa suplimentată cu metal a fost aproximativ de două ori mai mică decât în biomasa martor (2,5±0,01 mg/g). Cantitatea de ioni de nichel acumulați a constituit 0,16±0,08 mg/g. În sistemul cuaternar Cu/Fe/Ni/Zn s-a observat cea mai mare acumulare pentru toate elementele: 9,7±0,5 mg/g pentru cupru, 7,8±0,4 mg/g pentru fier, 1,5±0,06 mg/g pentru zinc și 0,6±0,03 mg/g pentru nichel.

Fierul, cuprul și zincul sunt elemente importante necesare organismelor vii, fiind implicate în multe procese celulare, însă, în cazul în care concentrațiile lor în mediu depășesc norma fiziologică stabilită, pot deveni toxice pentru celule. Deși metalul prezent în sistemele analizate joacă un rol important în fiziologia cianobacteriilor, la concentrații date: 10 mg/l pentru cupru, 5 mg/l pentru fier, 2 mg/l pentru zinc și nichel, biomasa spirulinei a putut supraviețui doar

pe durata unui ciclu, ceea ce indică efectul toxic al ionilor metalici prezenți în mediu. Toxicitatea cuprului pentru cianobacterii poate fi explicată prin producerea de specii reactive de oxigen prin reacțiile Fenton și Haber-Weiss, care duc la deteriorarea severă a lipidelor, proteinelor, ADN-ului și altor molecule citoplasmice și înlocuirea Mg în clorofilă [211, 348]. Alături de cupru, fierul catalizează formarea speciilor reactive de oxigen prin reacțiile Fenton, ducând la stres oxidativ [183]. Comparând sistemele Cu/Fe/Zn și Cu/Fe/Ni, s-a observat că spirulina a acumulat aproximativ de 7 ori mai mult zinc decât nichel, în pofida faptului că au fost adăugate în mediul nutritiv în aceeași concentrație. Acumularea de zinc în biomasa de spirulină în cantități care depășesc cantitatea optimă determinată pentru creșterea și dezvoltarea sa este o particularitate specifică culturii date [313].

Rezultatele cu referire la nivelul de productivitate și componența biochimică a biomasei de spirulină obținută în cele 4 sisteme polimetalice sunt prezentate în figura 6.1.



**Fig. 6.1. Cantitatea de biomasă de spirulină și compoziția ei biochimică la creștere pe medii ce conțin sisteme polimetalice cu conținut de Cu, Fe, Zn, Ni.**

La adăugarea ionilor de cupru și fier în mediul de cultivare, biomasa spirulinei a fost de  $0,65 \pm 0,04$  g/l, adică cu 32,8% mai mică decât biomasa din control. În sistemul care conține ioni de cupru, fier și zinc s-a acumulat  $0,59 \pm 0,04$  g/l de biomasă absolut uscată (cu 39,2% mai puțin decât la martor). În sistemul Cu/Fe/Ni, cantitatea de biomasă a constituit  $0,55 \pm 0,07$  g/l. Cea mai

pronunțată scădere a biomasei a avut loc în sistemul care conține toți cei 4 ioni metalici – cu 52,6% mai puțin în comparație cu cantitatea de biomasă de control.

În timpul experimentului a fost monitorizată compoziția biochimică a biomasei (conținut de proteine, carbohidrați, lipide și pigmenți) la sfârșitul ciclului de cultivare. În sistemul care conține cupru și fier, cantitatea proteinelor a constituit 27,75% din biomasa absolut uscată, ceea ce este cu 50% mai mică decât conținutul acestora în biomasa martor (Fig.6.1). În două sisteme care conțin trei ioni metalici și un sistem care conține patru metale, conținutul de proteine în biomasă a constituit 22,2; 22,3 % și, respectiv, 20,25 % din biomasă. Aceste valori sunt cu 66-69% mai mici în comparație cu biomasa martor. Conținutul de carbohidrați din biomasa spirulinei obținută în sistemele cu metale a fost cu 19,7 - 29,2% mai mic în comparație cu biomasa martor. Lipidele sunt singurele macromolecule, care și-au menținut conținutul în biomasă, crescută în prezența sistemelor polimetalice.

La concentrațiile analizate ale ionilor metalici în toate sistemele studiate, conținutul de  $\beta$ -caroten și ficobiliproteine a fost redus (Fig. 6.1). Conținutul de ficobiliproteine în biomasa martor a fost de 14%, în timp ce biomasa obținută în sisteme polimetalice este practic lipsită de acești pigmenți. Conținutul lor în biomasa de spirulină în variantele experimentale a variat între 0,32 și 0,88% din biomasă. Conținutul de  $\beta$ -caroten a fost, de asemenea, redus semnificativ, dar într-o măsură mai mică în comparație cu conținutul de ficobiliproteine. Astfel, biomasa martor conține 0,4%  $\beta$ -caroten, în timp ce biomasa obținută în sisteme cu metale – 0,23-0,27%.

Rezultatele prezentate denotă o toxicitate extremă a sistemelor polimetalice cu cupru în concentrațiile indicate în tabelul 6.1. Din acest motiv am repetat această cercetare în sisteme polimetalice diluate de 2 și 4 ori comparativ cu cele descrise anterior. În continuare, sunt prezentate rezultatele pentru sistemele polimetalice cu compoziția chimică descrisă în tabelul 6.2.

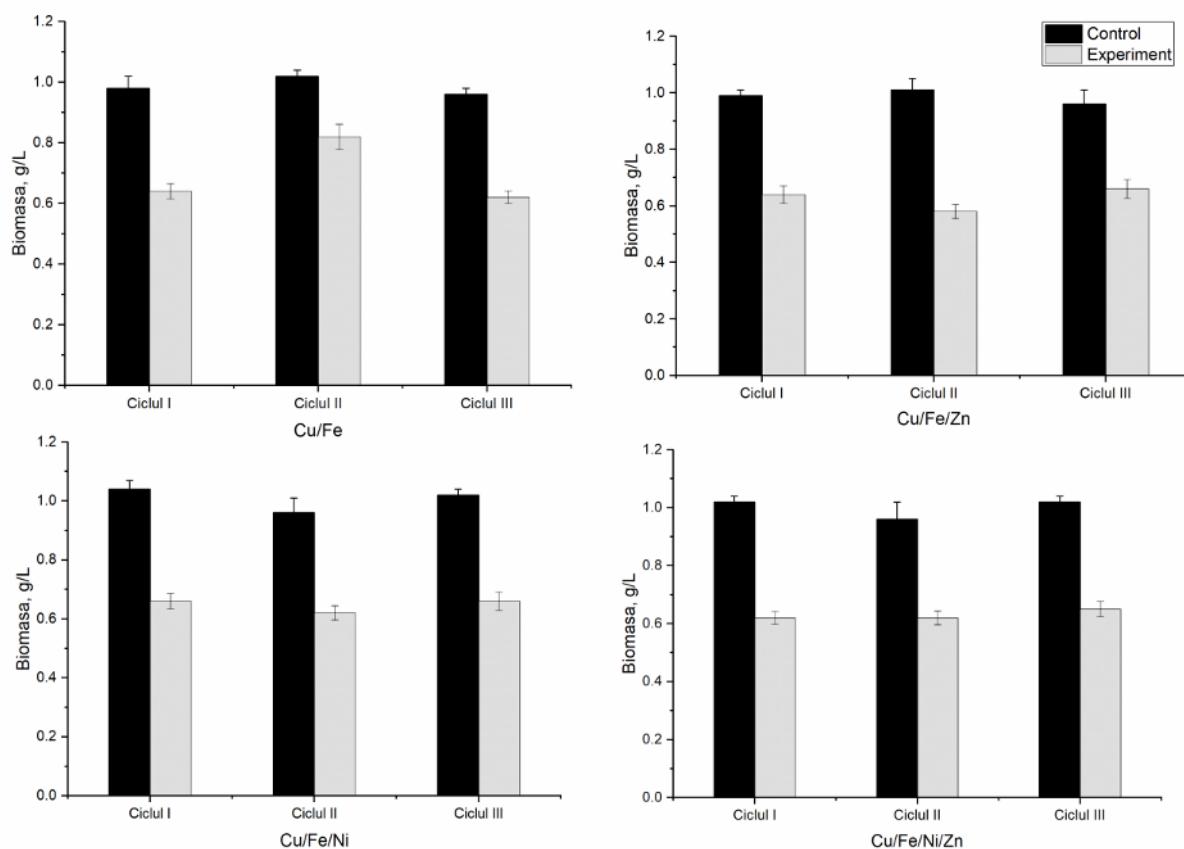
**Tabelul.6.2. Compoziția chimică a sistemelor polimetalice diluate cu conținut de cupru**

Sistemul	Concentrația metalului, mg/l			
	Cu	Fe	Ni	Zn
Cu/Fe	2.5±0.02	1.25±0.01	-	-
Cu/Fe/Ni	2.5±0.03	1.25±0.008	0.5±0.007	-
Cu/Fe/Zn	2.5±0.03	1.25±0.012	-	0.5±0.03
Cu/Fe/Ni/Zn	2.5±0.03	1.25±0.016	0.5±0.004	0.5±0.05

În sistemele polimetalice cu concentrațiile indicate în tabelul 6.2. a fost posibil de a realiza cultivarea spirulinei pe durata a trei cicluri iterative, în fiecare dintre ele fiind monitorizată cantitatea de biomasă obținută, încărcătura de metale acumulate și compoziția biochimică a biomasei. Acumularea metalelor poate fi urmărită în anexe, figura A.6.2. Conform



datelor AAN, în sistemul Cu/Fe, conținutul de cupru crește semnificativ în primul ciclu, în al doilea ciclu a fost la nivelul primului și s-a redus în al treilea ciclu.



**Fig. 6.2. Biomasa de spirulină acumulată în trei cicluri de cultivare succesive în sisteme polimetalice: I) Cu/Fe, II) Cu/Fe/Zn, III) Cu/Fe/Ni și IV) Cu/Fe/Zn/Ni ( $C_{Cu}$  2.5 mg/l,  $C_{Fe}$  1.25 mg/l,  $C_{Ni}$  0.5 mg/l and  $C_{Zn}$  0.5 mg/l)**

Pentru ionii de fier s-a observat acumularea lor continuă în biomasa spirulinei pe parcursul a trei cicluri. În sistemul Cu/Fe/Ni, conținutul de cupru în biomasă după primul ciclu de cultivare a fost de  $1,2 \pm 0,06$  mg/g, apoi acumularea acestuia în biomasă scade până la  $0,5 \pm 0,03$  mg/g (al treilea ciclu). Conținutul de fier și nichel din biomasă a crescut de-a lungul ciclurilor în sistemele analizate. În sistemul Cu/Fe/Zn, cantitatea maximă de cupru a fost acumulată de biomasă în primul ciclu ( $1,1 \pm 0,06$  mg/g), în timp ce cantitățile maxime de fier ( $7,1 \pm 0,3$   $\mu$ g/g) și zinc ( $0,3 \pm 0,01$   $\mu$ g/g) - în al doilea ciclu, după care în al treilea ciclu cantitatea de metale acumulată de biomasă a fost redusă semnificativ. În sistemul Cu/Fe/Ni/Zn, cea mai mare acumulare de ioni de cupru și zinc a fost în primul ciclu, apoi conținutul lor în biomasă a fost redus. Ionii de fier și nichel au fost acumulați continuu în biomasă. Acumularea de ioni de cupru și nichel poate fi asociată cu fixarea lor intracelulară de către biomasa spirulinei pentru a reduce efectele toxice. Reducerea acumulării de zinc în cel de-al doilea ciclu în ambele sisteme care conțin zinc poate fi explicată în felul următor: ionii de cupru și de zinc pot fi transportați spre

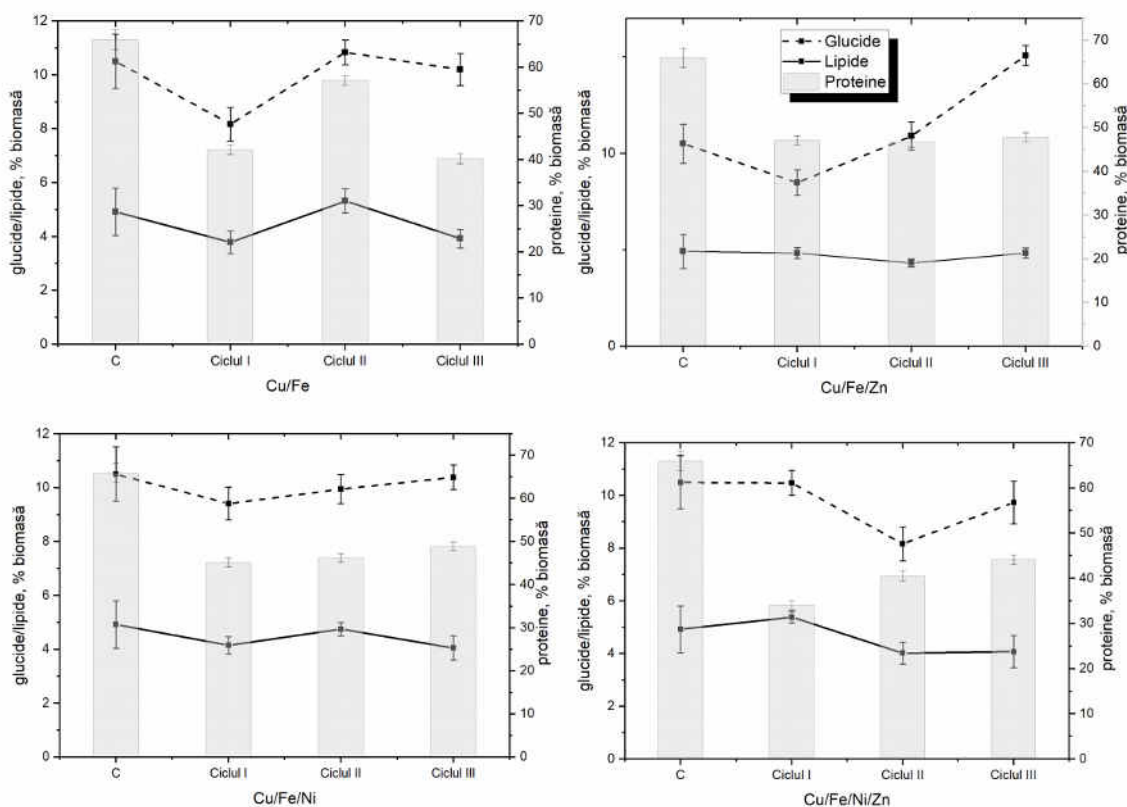
proteine prin ATPaze transportatoare de Cu în condiții de concentrație scăzută de ioni de cupru, în timp ce în condițiile creșterii concentrației de cupru, acesta înlocuiește ionii de zinc, care sunt expulzați prin mecanisme de eflux din celule [380].

Reducerea acumulării de cupru de către biomasa spirulinei în a treia variantă experimentală poate fi explicată prin adaptarea celulelor spirulinei la noile condiții de cultivare și excreția excesului de ioni de cupru din celule. Acumularea pronunțată a ionilor de fier în aproape toate sistemele studiate poate fi explicată prin chimia ionilor de fier, care la  $\text{pH} > 4,0$  sunt prezenți în soluție sub formă de hidroxizi. Astfel, mecanismul principal de îndepărtare a fierului din mediul nutritiv poate fi considerat microprecipitarea acestuia pe suprafața celulelor.

Cantitatea de biomasă obținută în ciclurile iterative în condiții de sisteme polimetalice este prezentată în figura 6.2. Conform datelor prezentate în această figură, scăderea concentrației ionilor metalici de patru ori în comparație cu prima variantă experimentală a provocat reducerea efectului toxic asupra cantității biomasei de spirulină acumulată. În sistemul Cu/Fe s-a observat creșterea productivității biomasei în al doilea ciclu de creștere a biomasei cu 28,1% față de primul ciclu. În al treilea ciclu productivitatea biomasei a scăzut la nivelul primului ciclu. Pentru alte sisteme, în toate ciclurile, cantitatea de biomasă a fost mai mică decât cea din control cu 20,5 - 42,6%.

Cantitatea principalelor macrocomponente ale biomasei de spirulină crescută în condițiile sistemelor polimetalice cu cupru este prezentată în figura 6.3. Cea mai pronunțată scădere a conținutului proteinelor a fost observată în sistemul Cu/Fe/Zn/Ni în primul ciclu, în timp ce în următoarele două cicluri valoarea acestui parametru a crescut ușor (Fig.6.3). În sistemele Cu/Fe/Ni și Cu/Fe/Zn, reducerea conținutului de proteine a avut loc similar cu cel descris mai sus. Ca și în varianta experimentală anterioară, în sistemul Cu/Fe, conținutul de proteine în al doilea ciclu a crescut cu 15% în comparație cu primul ciclu și a fost redus la nivelul primului ciclu în cel de-al treilea.

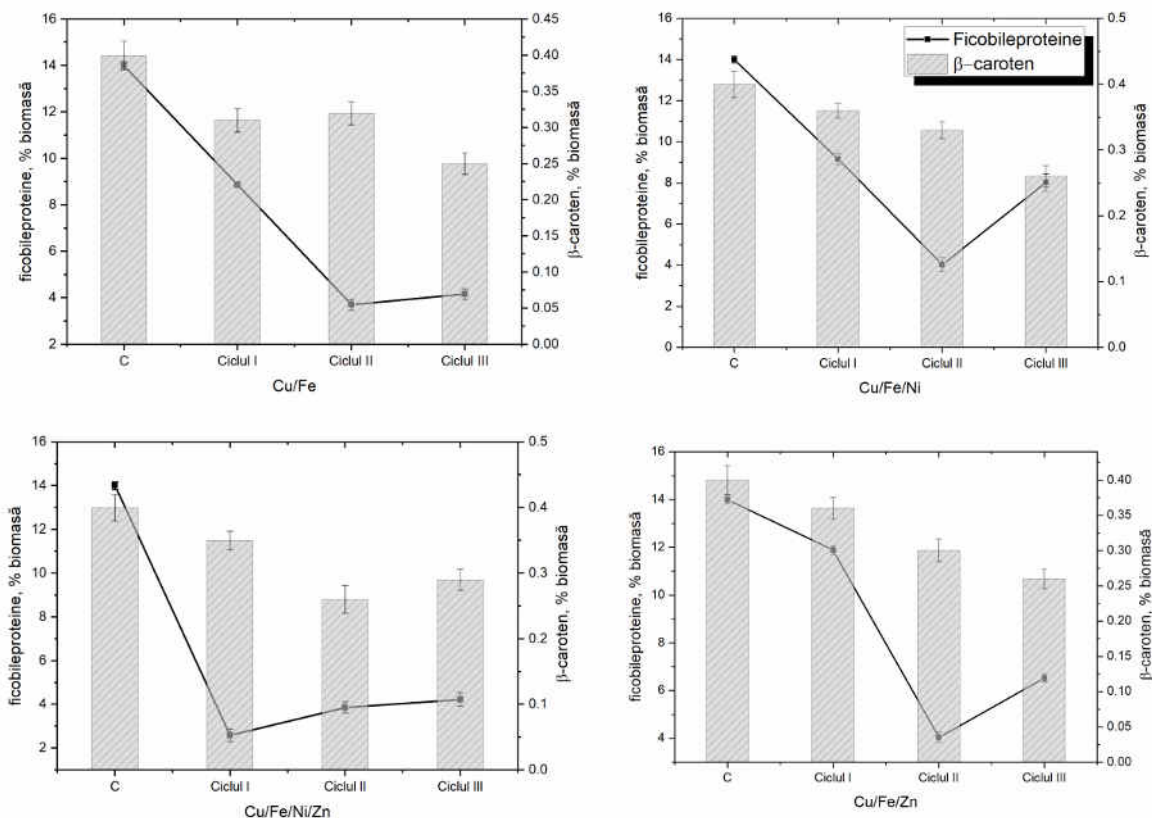
Conținutul de carbohidrați în biomasa spirulinei se modifică foarte diferit în funcție de sistemul și ciclul de creștere a biomasei. Astfel, în sistemul Cu/Fe, conținutul de carbohidrați a fost redus cu 22,2% în primul ciclu de creștere, iar în următoarele două cicluri acesta a crescut și a atins valorile caracteristice biomasei martor. În sistemul Cu/Fe/Zn, în primul ciclu conținutul de carbohidrați a scăzut cu 19,1%, în al doilea ciclu a fost la nivelul probei martor, iar în al treilea ciclu depășește valoarea de control cu 43,5%. În sistemul Cu/Fe/Ni, în primul ciclu conținutul de carbohidrați a scăzut ușor, în timp ce în următoarele două cicluri a fost la nivelul probei martor. În sistemul Cu/Fe/Ni/Zn, doar în al doilea ciclu are loc reducerea conținutului de carbohidrați, în primul și al treilea ciclu rămâne la nivel de control. Conținutul de lipide din sistemele studiate a fost la nivelul probei martor sau a crescut ușor.



**Fig. 6.3. Conținutul de proteine, carbohidrați și lipide din biomasa de spirulină cultivată în patru sisteme polimetalice cu cupru: I) Cu/Fe, II) Cu/Fe/Zn, III) Cu/Fe/Ni and IV) Cu/Fe/Zn/Ni ( $C_{Cu}$  2.5 mg/l,  $C_{Fe}$  1.25 mg/l,  $C_{Ni}$  0.5 mg/l și  $C_{Zn}$  0.5 mg/l)**

Conținutul de pigmenți în biomasa de spirulină crescută în cele trei cicluri repetate în condiții de sisteme polimetalice este prezentat în figura 6.4. Cel mai scăzut conținut de ficobiliproteine (2,5-4,2% din biomasa) a fost determinat în sistemul Cu/Fe/Zn/Ni. Cu toate acestea, trebuie menționat că această cantitate a fost semnificativ mai mare decât conținutul de ficobiliproteine în variantele cu concentrații mai mari de metale. Cel mai mare conținut de ficobiliproteine cu 11,8% (cu 15,1% mai mic decât la martor) a fost determinat în primul ciclu în sistemul Cu/Fe/Zn. Cu toate acestea, în următoarele cicluri, conținutul de ficobiliproteine a fost semnificativ redus. Scăderea conținutului de  $\beta$ -caroten a fost observată în toate sistemele polimetalice analizate cu 3 și 4 tipuri de metale și în toate cele trei cicluri de creștere succesivă a spirulinei. Cea mai pronunțată scădere a fost observată în ciclurile trei în toate sistemele polimetalice (cu 27,5-37,5%). Pentru sistemul Cu/Fe, conținutul de  $\beta$ -caroten a fost redus cu 22,5% în comparație cu martor, în timp ce în celelalte sisteme a fost la nivelul de control.

Am demonstrat că în condițiile de stres, induse de prezența ionilor metalici, s-a modificat compoziția biochimică a biomasei de spirulină. Un răspuns comun al cianobacteriilor la stres, inclusiv cel provocat de ionii metalici, este o modificare a nivelurilor de proteine implicate în procesele metabolice centrale [176].



**Fig. 6.4. Conținutul de ficobiliproteine și β-caroten în biomasa de spirulina crescută în condițiile a patru sisteme polimetalice: I) Cu/Fe, II) Cu/Fe/Zn, III) Cu/Fe/Ni and IV) Cu/Fe/Zn/Ni ( $C_{Cu}$  2.5 mg/l,  $C_{Fe}$  1,25 mg/l,  $C_{Ni}$  0.5 mg/l și  $C_{Zn}$  0.5mg/l)**

La concentrațiile mari ale ionilor metalici în mediul nutritiv în diferite combinații are loc reducerea semnificativă (cu 50-69%) a conținutului de proteine în toate sistemele la sfârșitul primului ciclu. În varianta experimentală cu sisteme polimetalice diluate, conținutul de proteine în toate sistemele a fost mai mic decât în proba martor cu 13,4-48,5%. Scăderea semnificativă a conținutului de proteine se explică printr-un exces de ioni de cupru în mediul de cultură, ceea ce duce la competiția acestuia cu alte metale pentru locurile lor de legare în proteine, ducând la o perturbare a funcției proteinelor și degradarea lor [211]. Ionii de cupru, zinc, fier din spirulina se acumulează în principal în fracții de proteine și carbohidrați [87]. Ionii de nichel prezenți în exces afectează în principal proteinele asociate cu fotosinteza și metabolismul carbonului.

Lipidele au fost singurele macromolecule, a căror cantitate a fost afectată nesemnificativ de prezența ionilor metalici în mediul de cultură. Scăderea conținutului de carbohidrați poate fi atribuită utilizării lor de către biomasa spirulinei ca sursă de carbon pentru biosinteza lipidelor. Astfel, procesul de peroxidare a lipidelor rezultat din prezența ionilor metalici în mediul de cultură este parțial compensat, ceea ce explică supraviețuirea unei anumite cantități de celule. În același timp, în unele dintre sistemele analizate s-a observat creșterea conținutului de carbohidrați, indicând activarea mecanismelor de protecție în celulele cianobacteriilor. Pigmenții

accesorii precum carotenoizii sau ficobiliproteinele, pe lângă absorbția luminii și transmiterea acesteia spre clorofilă, sunt responsabili pentru protecția biomasei împotriva stresului oxidativ, cantitatea lor fiind afectată în condițiile de sisteme polimetalice.

Adaptarea biomasei spirulinei la efluenții cu conținut de cupru a fost mai evidentă în sistemele cu concentrații relativ mici de metale, ceea ce indică asupra perspectivei utilizării biomasei spirulinei ca acumulator regenerabil pentru tratarea efluenților moderat poluați sau pentru post-epurarea apelor uzate.

Un studiu similar a fost realizat cu utilizarea spirulinei pentru bioacumularea metalelor din sisteme polimetalice cu conținut de crom. Suplimentar scopului de monitorizare a capacității de acumulare a metalelor și modificărilor biochimice în biomasa de spirulină în acest set de experiențe ne-am propus să evaluăm dependența procesului de acumulare de vârsta culturii care contactează cu efluenții ce conțin metalele de interes. Efluenții cu compoziție chimică și concentrație diferită de ioni metalici au fost modelați pe baza datelor obținute pentru efluenții galvanici reali [483]. Compoziția chimică a sistemelor modelate este prezentată în Tabelul 6.3.

**Tabelul. 6.3. Compoziția chimică a efluenților sintetici cu conținut de crom (VI)**

Sistemul	Concentrația metalului, mg/l				
	Cr	Fe	Ni	Zn	Cu
Cr/Fe	2.5	1.25	-	-	-
Cr/Fe/Ni	2.5	1.25	0.5	-	-
Cr/Fe/Ni/Zn	2.5	1.25	0.5	0.5	-
Cr/Fe/Ni/Zn/Cu	2.5	1.25	0.5	0.5	0.5

Au fost realizate două variante experimentale – prima cu adăugarea efluentului sintetic la a III-a zi de cultivare și a doua variantă - la a V-a zi. În prima variantă metalele au fost adăugate la faza de creștere exponențială, caracterizată prin multiplicarea rapidă a celulelor și sensibilitatea pronunțată la xenobiotice. În această fază nu numai că numărul de celule crește exponențial, dar și proprietățile tipice ale culturii se manifestă pe deplin.

Conform datelor AAN (Tabelul A.6.2 din compartimentul Anexe), biomasa spirulinei în timpul a trei cicluri de cultivare a acumulat de 7-20 de ori mai mult crom (VI) decât conținutul lui în biomasa martor. Este interesant de menționat că în toate sistemele studiate absorbția maximă de crom (VI) a avut loc în al doilea ciclu de creștere a biomasei, iar în cel de-al treilea ciclu acumularea metalului a scăzut. Cea mai mare cantitate de crom (VI) a fost acumulată în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn/Cu.

Acumularea fierului de către biomasa spirulinei a crescut continuu pe parcursul ciclurilor în toate sistemele. Pe parcursul a trei cicluri, biomasa de spirulină acumulat de 1,3-4,2 ori mai mult fier decât biomasa martor. Este bine cunoscut faptul că cianobacteriile au o dependență

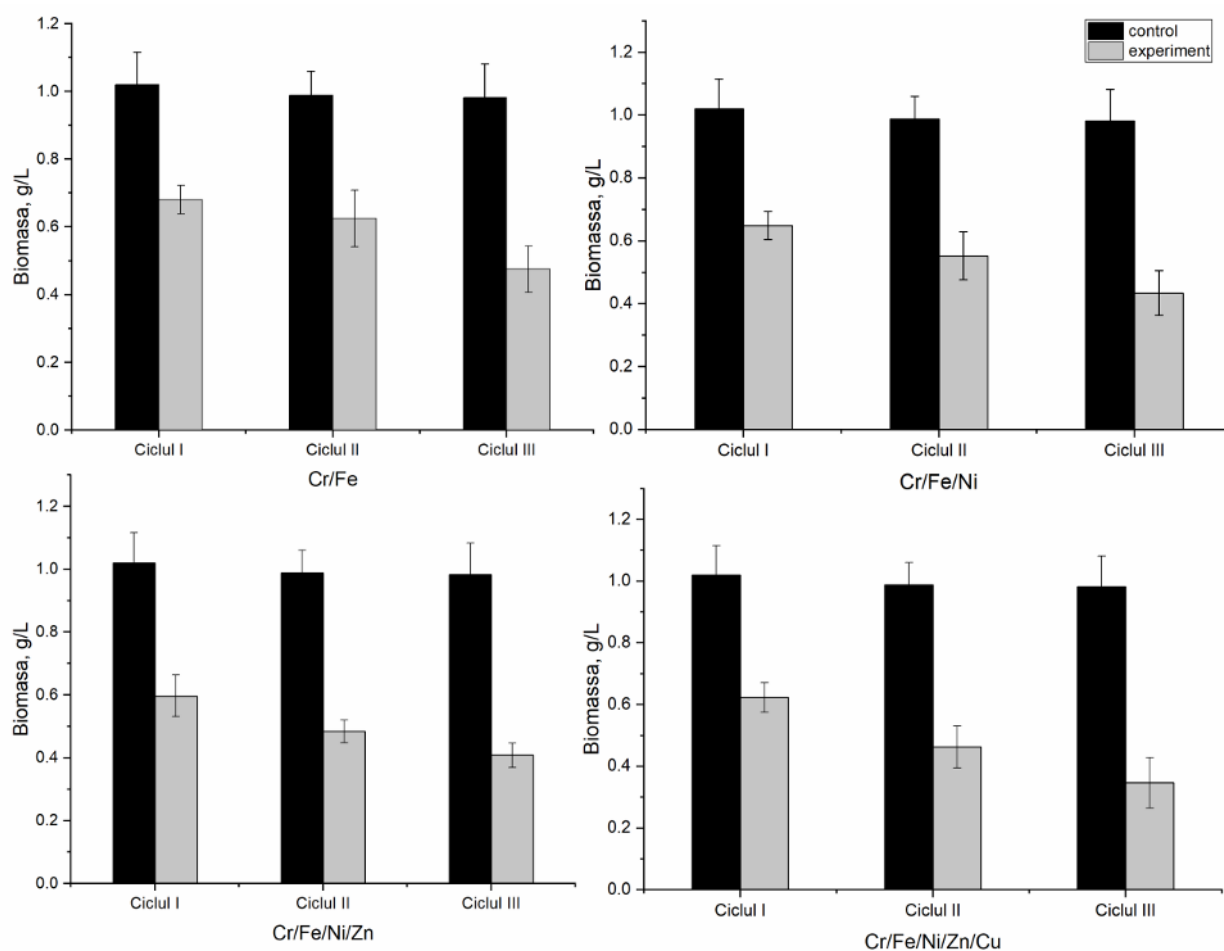
absolută de fier pentru creșterea și derularea optimă a proceselor fiziologice majore, în special a fotosintezei și fixării azotului. Deși fierul joacă un rol cheie în fiziologia cianobacteriană, un exces de fier intracelular liber este extrem de dăunător, deoarece catalizează formarea speciilor reactive de oxigen prin reacțiile Fenton, ducând la stres oxidativ [183].

În sistemul Cr/Fe/Ni/Zn, conținutul de zinc din biomasa încărcată cu metal a fost la nivelul matorului, în timp ce în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn/Cu conținutul său a crescut de 1,6 și, de 2,1 ori în al doilea și, respectiv, al treilea ciclu de cultură. Chiar și atunci când sistemul polimetalic conține cupru, acest metal nu a fost detectat în biomasa de *A. platensis*. Cel mai înalt nivel de acumulare a nichelului a fost observat în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn. Azeez și Banarjee (1991) au sugerat că toxicitatea nichelului pentru cianobacterii este asociată cu legarea acestuia de grupări asemănătoare sulfhidrilului și, în consecință, reducerea conținutului de proteine [52].

Întrucât scopul principal al cercetării a fost de a identifica posibilitatea de utilizare a reacțiilor de răspuns ale spirulinei la stresul oxidativ în scopul obținerii unui sorbent regenerabil, la finalul experiențelor a fost analizat efectul ionilor metalici asupra cantității biomasei și a principalilor parametri biochimici ai spirulinei. Datele prezentate în Fig. 6.5 arată că în toate sistemele studiate pe parcursul a trei cicluri de cultivare, cantitatea de biomasă produsă a fost semnificativ mai mică decât în control. Mai mult, cantitatea de biomasă a scăzut în fiecare sistem de la un ciclu la altul. De exemplu, în sistemul Cr/Fe, în primul ciclu de cultură biomasa a fost cu 33,3% mai mică decât la mator, în al doilea ciclu - cu 36,7%, iar în al treilea - cu 51,6%. Modele similare au fost observate pentru alte sisteme studiate, dar cea mai drastică reducere a biomasei a fost observată în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn/Cu, unde în primul ciclu reducerea biomasei a constituit 38,9%, în al doilea - 53,1%, iar în al treilea - 64,7% (Fig 6.5).

Conform lui Azeez și Banarjee (1988), cromul este mai puțin toxic pentru cianobacterii în comparație cu alte metale precum cuprul și nichelul, când sunt luați în considerare parametri precum productivitatea biomasei [53]. Cu toate acestea, prezența simultană a ionilor de crom, cupru și nichel a avut un efect negativ asupra acumulării de biomasă în cultura de spirulină. Astfel, reducerea biomasei în experimentele prezente și următoare poate fi explicată prin natura complexă a soluțiilor studiate și prezența în soluții a unor elemente precum cuprul și nichelul, care au prezentat o toxicitate ridicată pentru celulele de *Arthrospira platensis*.

În condițiile de stres, induse de prezența ionilor metalici în mediul de cultură, compoziția biochimică (conținutul de proteine, lipide și carbohidrați) a biomasei de spirulină se modifică semnificativ (Fig. 6.6). Proteinele sunt componentele principale ale biomasei de *Arthrospira platensis*. De foarte multe ori, răspunsul cianobacteriilor la stresul provocat de ionii metalici este exprimat prin reducerea conținutului de proteine [176].

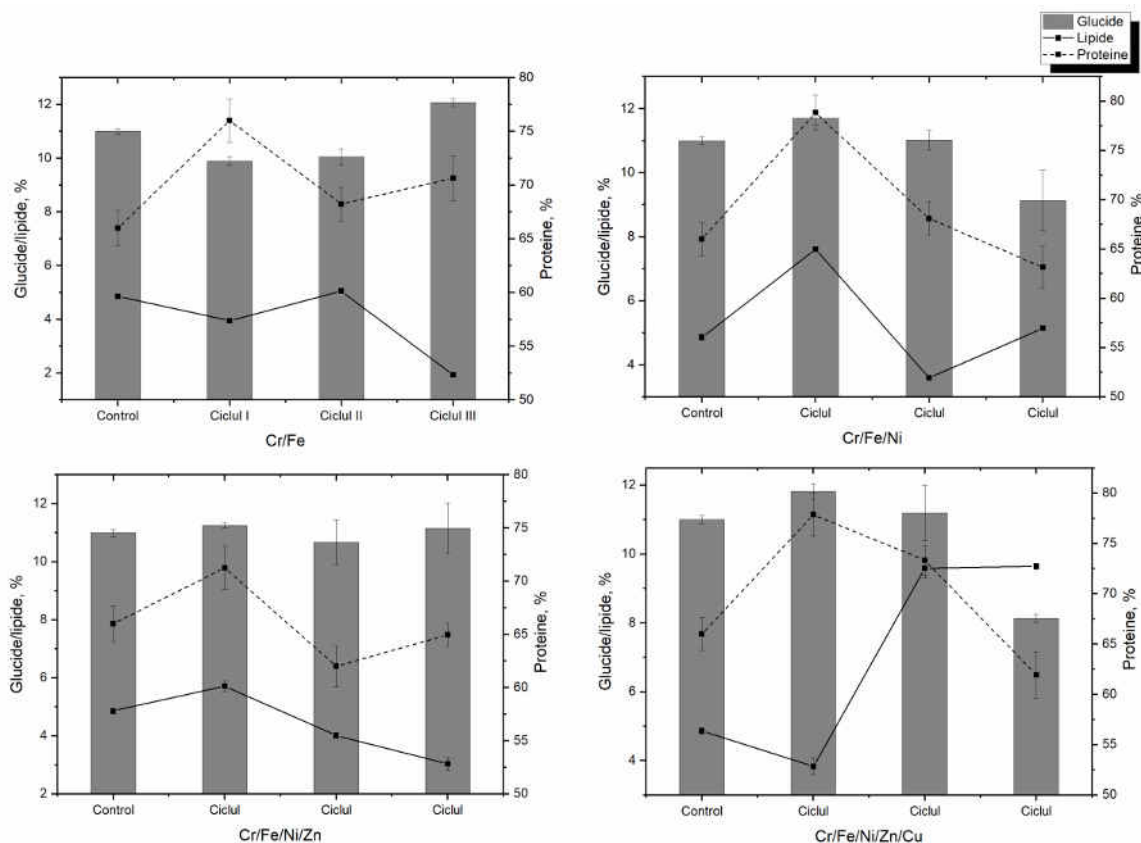


**Fig. 6.5. Biomasa de spirulină în patru sisteme analizate la adăugarea de ioni metalici în mediul de cultură în faza creșterii exponențială, mg/l:  $C_{iCr}$  2.5,  $C_{iFe}$  1.25,  $C_{iNi}$  0.5,  $C_{iZn}$  0.5 și  $C_{iCu}$  0.5**

Conform rezultatelor obținute, în timpul primului ciclu de cultivare, scăderea conținutului de proteine a fost observată în sistemele Cr/Fe/Ni/Zn și Cr/Fe/Ni/Zn/Cu (Fig. 6.6.). În al doilea ciclu de cultură, scăderea semnificativă a conținutului de proteine s-a produs în sistemul Cr/Fe/Ni (cu 29%), în timp ce în sistemele Cr/Fe/Ni/Zn și Cr/Fe/Ni/Zn/Cu conținutul acestora a fost mai mic decât în control cu 12,4% și 15,1%, respectiv. În al treilea ciclu de cultivare, conținutul de proteine din biomasă a fost foarte aproape de control în toate sistemele studiate și s-a menținut în limitele fiziologice caracteristice pentru spirulină.

Conținutul de carbohidrați în primul ciclu de cultivare a crescut cu 32,4-94,5% față de martor în toate sistemele studiate, în timp ce conținutul de lipide a scăzut cu 23,4-50,4%. Acest model a fost menținut în al doilea ciclu de cultivare doar pentru sistemul Cr/Fe, unde conținutul de carbohidrați a fost cu 24,2% mai mare decât la martor, în timp ce conținutul de lipide a scăzut cu 30,8%. În sistemele Cr/Fe/Ni și Cr/Fe/Ni/Zn, în al doilea ciclu de cultivare, conținutul de carbohidrați a fost redus cu 36,1 și 19,4%, iar conținutul de lipide cu 25,9 și, respectiv, 36,8%, comparativ cu martor. În sistemul Cr/Fe/Ni/Zn/Cu, conținutul de carbohidrați a fost la nivelul

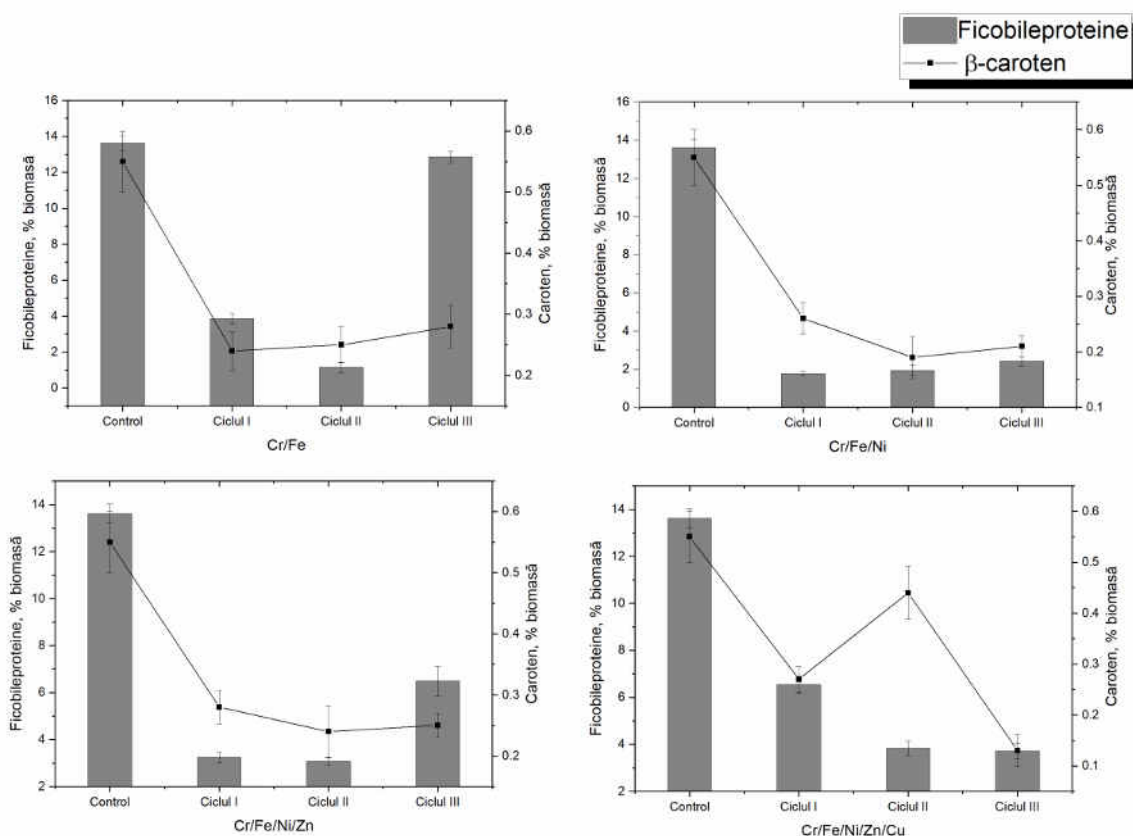
biomasei martor, în timp ce conținutul de lipide a fost cu 35,6% mai mic decât la martor. În al treilea ciclu de cultură, în sistemele Cr/Fe, Cr/Fe/Ni și Cr/Fe/Ni/Zn/Cu, a fost observată o creștere a conținutului de carbohidrați (cu 16,9; 61,7 și 54,2%) și o reducere a conținutului de lipide (cu 36,7, 34,5 și 36,8%). În sistemul Cr/Fe/Ni/Zn a rămas un nivel redus de carbohidrați (cu 20,5% mai mic decât la martor), dar s-a remarcat o creștere a conținutului de lipide (cu 18,7% față de martor).



**Fig. 6.6. Conținutul de proteine, lipide și carbohidrați din biomasa de spirulină în patru sisteme analizate la adăugarea de ioni metalici în mediul de cultură în faza creșterii exponențiale, mg/l:  $C_{iCr}$  2.5,  $C_{iFe}$  1.25,  $C_{iNi}$  0.5,  $C_{iZn}$  0.5 și  $C_{iCu}$  0.5**

Conținutul pigmentilor în biomasa de spirulină crescută în condiții de sisteme polimetalice este prezentat în figura 6.7. Carotenoizii și ficobiliproteinele, pigmentii accesorii ai spirulinei, sunt responsabili inclusiv de protecția biomasei împotriva stresului oxidativ. Conținutul de ficobiliproteine în biomasa de spirulină în toate sistemele studiate în timpul primelor două cicluri de cultivare a fost semnificativ mai scăzut decât în biomasa martor (cel puțin cu 51,9%). În sistemul Cr/Fe, unde în al doilea ciclu s-a înregistrat un conținut critic scăzut de ficobiline, în al treilea ciclu conținutul acestora a crescut semnificativ fiind comparabil cu nivelul acestor pigmenți în biomasa martor. În alte sisteme și anume Cr/Fe/Ni, Cr/Fe/Ni/Zn și Cr/Fe/Ni/Zn/Cu, în al treilea ciclu conținutul de ficobiliproteine a fost cu 52,5-82,4% mai mic decât în biomasa martor (Fig. 6.7).





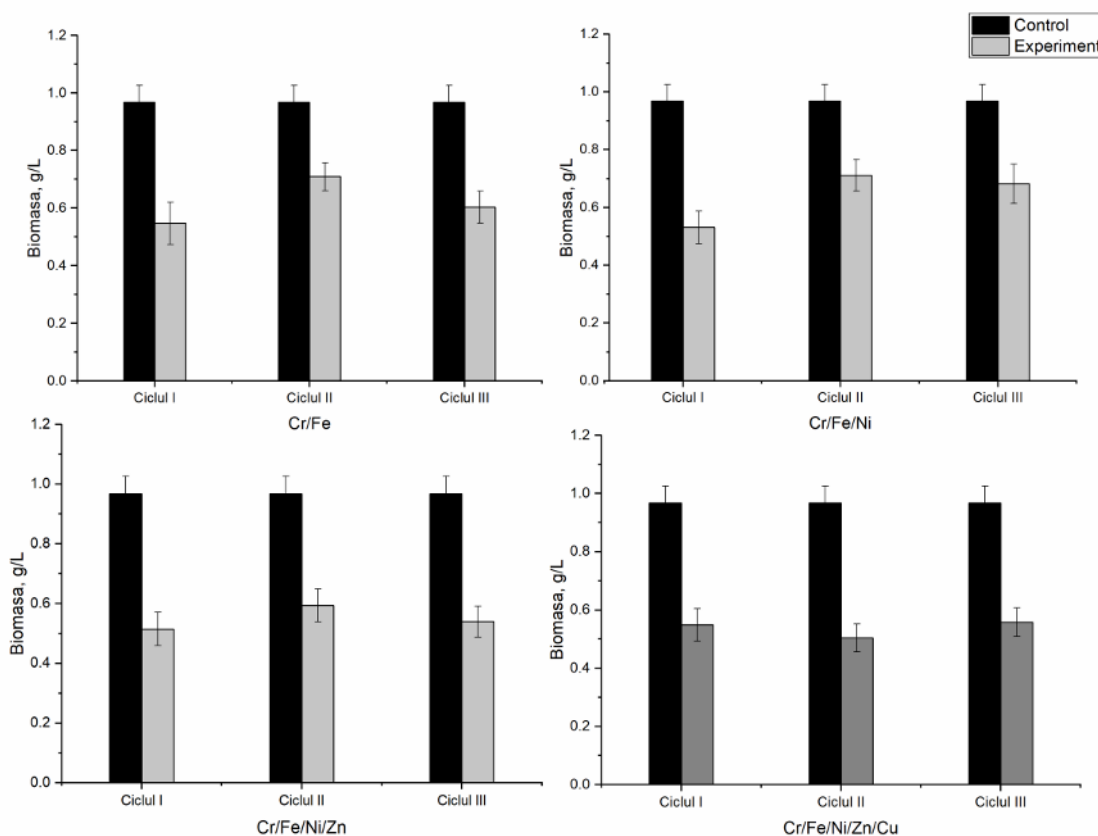
**Fig. 6.7. Conținutul pigmentilor secundari în biomasa de spirulină în patru sisteme analizate la adăugarea de ioni metalici în mediul de cultură în faza creșterii exponențiale, mg/l:  $C_{iCr}$  2.5,  $C_{iFe}$  1.25,  $C_{iNi}$  0.5,  $C_{iZn}$  0.5 și  $C_{iCu}$  0.5**

Conținutul de  $\beta$ -caroten în aproape toate sistemele analizate pe parcursul întregii perioade de cultivare a fost mai mic decât în biomasa martor cu cel puțin 26,3%, dar nu mai mult de 50%. Astfel, chiar și la concentrații mici, ionii metalici prezenți în sistemele studiate au provocat un efect toxic asupra culturii de *Arthrospira platensis*, exprimat prin scăderea biomasei acesteia și modificarea semnificativă a conținutului de carbohidrați și lipide, precum și reducerea conținutului de ficobiliproteine și  $\beta$ -caroten.

Adăugarea ionilor metalici la mediul de cultură în faza exponențială a creșterii spirulinei a avut efecte toxice asupra cianobacteriei. Pentru a reduce nivelul de toxicitate al metalelor în raport cu *Arthrospira platensis* în experimentele ulterioare, ionii metalici au fost adăugați în mediul de cultură în faza staționară, care se caracterizează prin rezistența pronunțată a culturii microbiene la substanțe toxice. Ca și în experimentul anterior, ionii metalici au fost adăugați în mediul de cultură conform schemei descrise în Tabelul 6.3.

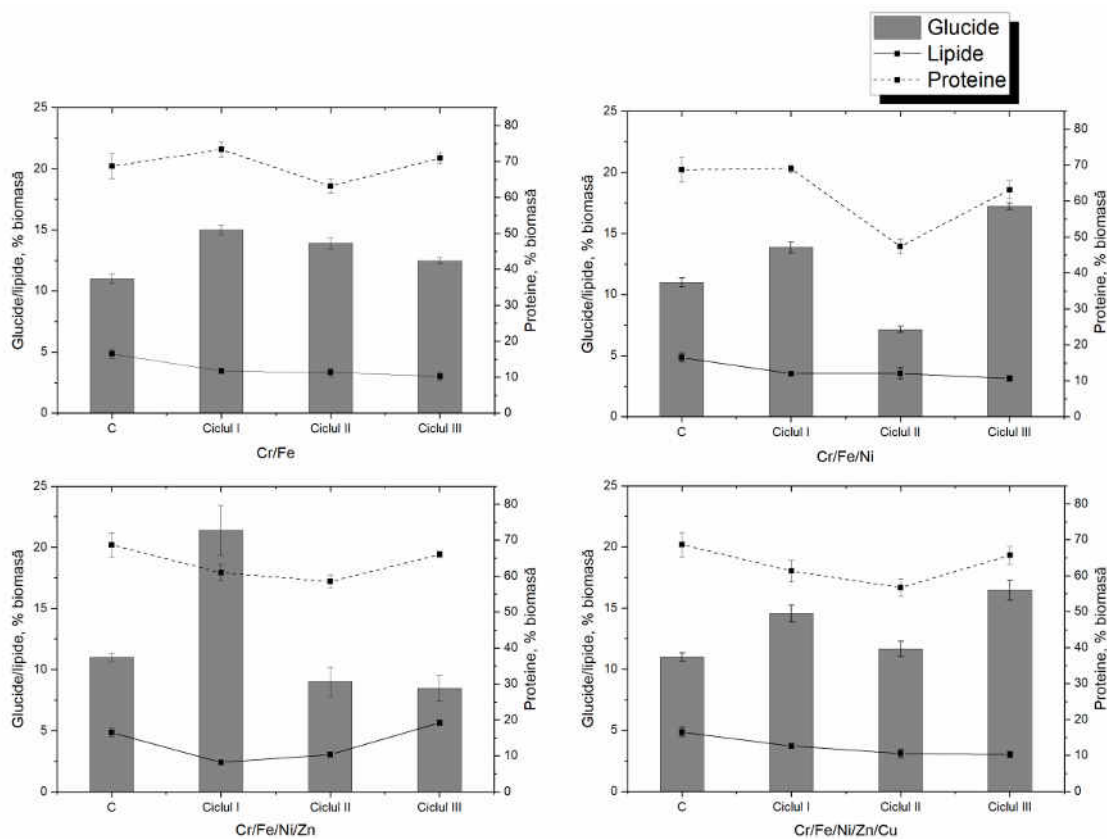
În primul ciclu de cultivare (Fig. 6.8), în toate sistemele studiate biomasa de *Arthrospira platensis* a scăzut cu peste 40% în comparație cu martor. În sistemele Cr/Fe și Cr/Fe/Ni, situația s-a îmbunătățit în al doilea ciclu, în timp ce în sistemele polimetalice Cr/Fe/Ni/Zn și

Cr/Fe/Ni/Zn/Cu cantitatea de biomasă nu s-a modificat semnificativ în timpul a trei cicluri experimentale.



**Fig. 6.8. Biomasa de spirulină în patru sisteme analizate la adăugarea de ioni metalici în mediul de cultură în faza staționară, mg/l:  $C_{iCr}$  2.5,  $C_{iFe}$  1.25,  $C_{iNi}$  0.5,  $C_{iZn}$  0.5 și  $C_{iCu}$  0.5**

Deși biomasa din sistemele studiate a fost redusă, conținutul de proteine a fost în limitele caracteristice biomasei martor de spirulină. În primul ciclu, creșterea conținutului de proteine cu 15,2-19,5% a fost observată în toate sistemele studiate (Fig. 6.9). Conținutul de carbohidrați s-a menținut la nivelul biomasei martor în cea mai mare parte a variantelor experimentale. În al treilea ciclu, în sistemele Cr/Fe/Ni și Cr/Fe/Ni/Zn/Cu s-a observat scăderea acestui parametru cu 25,5%. Conținutul de lipide din primul ciclu de cultură a crescut semnificativ (cu 56,6%) în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn și a scăzut (cu 21,2%) în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn/Cu. În al doilea ciclu, situația a fost inversă: în sistemul Cr/Fe/Zn conținutul de lipide a scăzut cu 25,2% față de martor, iar în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn/Cu acest parametru practic s-a dublat. În al treilea ciclu de cultură, o creștere a conținutului de lipide a fost observată doar în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn/Cu.

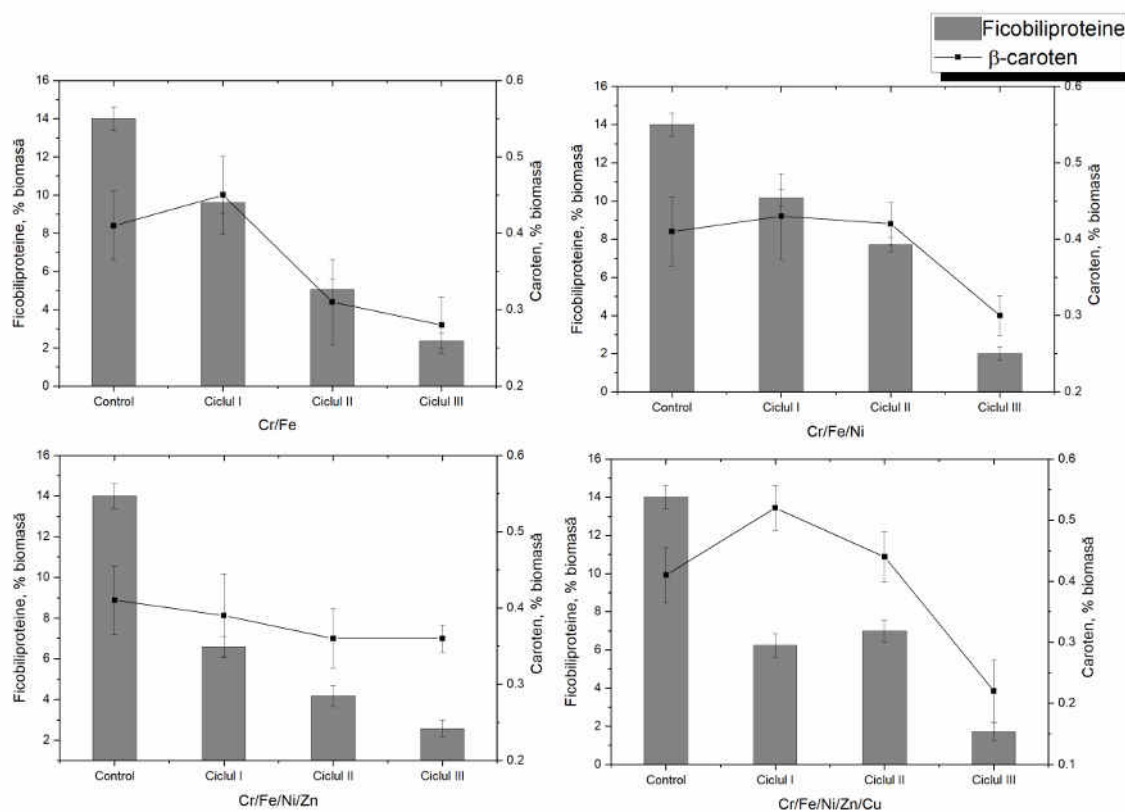


**Fig. 6.9. Conținutul de proteine, lipide și carbohidrați din biomasa de spirulină în patru sisteme analizate la adăugarea de ioni metalici în mediul de cultură în faza staționară, mg/l:  $C_{iCr}$  2.5,  $C_{iFe}$  1.25,  $C_{iNi}$  0.5,  $C_{iZn}$  0.5 și  $C_{iCu}$  0.5**

Conținutul de ficobiliproteine a scăzut semnificativ în toate sistemele experimentale, declinul fiind mai pronunțat de la ciclu la ciclu. La sfârșitul celui de-al treilea ciclu de cultură, conținutul de ficobiliproteine din biomasa de spirulină a fost cu 81-88% mai mic decât la martor (Fig. 6.10). Conținutul de  $\beta$ -caroten în primul ciclu de cultivare a fost la nivelul martorului în toate sistemele, cu excepția sistemului Cr/Fe/Ni/Zn/Cu, unde conținutul acestuia a crescut cu 26,8%. În al doilea ciclu de cultivare, diferența dintre conținutul de  $\beta$ -caroten în biomasa experimentală și martor a fost neglijabilă, în timp ce în al treilea ciclu, cu excepția sistemului Cr/Fe/Ni/Zn, conținutul de  $\beta$ -caroten a scăzut cu până la 42%.

Adăugarea ionilor metalici în mediul de cultură în diferite combinații a dus ulterior la acumularea acestora în biomasa (Tabelul A.6.3). În sistemul Cr/Fe, conținutul de crom din biomasa a crescut de 3,5-4,4 ori și cel al fierului de 1,1-1,9 ori în comparație cu martor. În primul ciclu de cultivare, conținutul de fier din biomasa a fost mai mic decât în martor, iar apoi a crescut continuu în următoarele două cicluri. În sistemul Cr/Fe/Ni, conținutul de fier din biomasa a crescut de-a lungul ciclurilor, în timp ce conținutul de crom și nichel a scăzut. În sistemul Cr/Fe/Ni/Zn s-a observat o creștere semnificativă a conținutului de metal în biomasa în primul ciclu, urmată de scăderea absorbției de ioni de metal în al doilea ciclu și o creștere în al treilea

ciclu de cultivare. În sistemul Cr/Fe/Ni/Zn/Cu s-a observat creșterea conținutului de fier și nichel pe parcursul ciclurilor. Conținutul de zinc din biomasa a crescut de la ciclu la ciclu, totuși, în al doilea și al treilea ciclu, cantitatea de zinc acumulată în biomasa a fost aproape aceeași. Conținutul de crom în biomasa a crescut de 5,5-8,9 ori și conținutul de cupru de 3-3,9 ori în comparație cu cantitatea lor din biomasa martor.



**Fig. 6.10. Conținutul pigmentilor secundari în biomasa de spirulină în patru sisteme analizate la adăugarea de ioni metalici în mediul de cultură în faza staționară, mg/l:  $C_{iCr}$  2.5,  $C_{iFe}$  1.25,  $C_{iNi}$  0.5,  $C_{iZn}$  0.5 și  $C_{iCu}$  0.5**

Comparând două faze ale ciclului vital al spirulinei, la care s-a realizat adăugarea ionilor metalici în mediul de cultură, s-a observat că la suplimentarea ionilor metalici în faza staționară a creșterii spirulinei, acumularea cromului de către biomasa a fost mai joasă decât la adăugarea acestuia în faza de creștere exponențială. Acumularea ionilor de fier, nichel, zinc și cupru a fost mai mare în cazul adăugării lor în sistem în faza staționară a ciclului vital.

În toate variantele experimentale, acumularea metalelor a fost asociată cu scăderea semnificativă a conținutului de ficobiliproteine și β-caroten în biomasa de spirulină, în timp ce creșterea conținutului de carbohidrați poate fi considerată drept o activare a mecanismului de protecție în celulele cianobacteriene în raport cu ionii metalici toxici. Toxicitatea ionilor metalici

pentru spirulină depinde de concentrația metalelor și de compoziția chimică a soluțiilor multicomponente.

Rezultatele obținute indică perspectiva utilizării biomasei de spirulină ca acumulator regenerabil pentru tratarea efluenților cu conținut de crom moderat poluați sau post-tratarea apelor uzate.

## **6.2. Particularitățile răspunsului cianobacteriei *Nostoc linckia* și acumularea de metale grele din sistemele multimetalice care conțin cupru și crom în cicluri iterative**

Poluarea cu metale grele se referă nu numai la mediul acvatic, ci și la cel edafic, de aceea am decis să verificăm posibilitatea utilizării în calitate de bioremediator a unei specii edafice, cu un posibil transfer al rezultatelor obținute în scopul remedierii *in situ*.

Pentru remedierea apelor și solurilor contaminate cu cupru/crom și alți ioni metalici, sunt luate în considerare mai multe grupuri de metode fizice, chimice și biologice. Aplicarea lor depinde de limitele de lucru ale proceselor (concentrații de poluanți, co-prezența altor metale sau deșeuri organice etc.). Astfel, metodele fizice sunt aplicabile pentru siturile puternic poluate și sunt foarte laborioase. Metodele chimice sunt în prezent foarte populare, în special datorită eficacității și vitezei lor, în timp ce bioremedierea este cea mai populară și intens cercetată metodă, datorită naturii sale ecologice și eficienței ridicate [47, 359].

Microorganismele pot elimina metalele grele din apă și sol prin mecanisme pasive, cum ar fi biosorbția, precum și prin mecanisme active, cum ar fi bioacumularea și secreția de siderofori. Pentru a evidenția aceste mecanisme au fost realizate cercetări cu utilizarea de monoculturi bacteriene, cum ar fi *Pseudomonas stutzeri*, *Stenotrophomonas maltophilia* etc. [173, 331] și consorții de bacterii reducătoare de sulf [56], bacterii nodulare radiculare [284], și asociații bacteriene rezistente la metale izolate din locurile poluate cu metalele de interes [249]. Mai puțin studiate în acest sens sunt cianobacteriile din sol. Aceste organisme sunt primii colonizatori ai ecosistemelor de sol și fac parte din crustele biologice ale solului din straturile de suprafață. Funcțiile acestor organisme în ecosistemul solului sunt diferite, principalele fiind fixarea azotului și carbonului. Cianobacteriile din sol contribuie la creșterea fertilității solului prin sintetizarea și eliberarea polimerilor organici. În plus, eliberarea de exopolizaharide în sol îmbunătățește stabilitatea solului [120]. În ultimii ani, s-a propus utilizarea cianobacteriilor ca instrument biotehnologic pentru remediere a ecosistemelor edafice, în special a celor afectate de niveluri înalte ale salinității [360]. De asemenea, a fost demonstrată eficiența unor cianobacterii, de exemplu *Nostoc muscorum* și *Anabaena subcylindrica* pentru acumularea de cupru, cobalt, plumb și mangan [153, 185, 366].

Prezența mai multor grupări funcționale pe suprafața capsulelor polizaharidice ale cianobacteriilor poate fi utilă pentru legarea metalelor, care nimeresc în sol și apă din diferite surse. *Nostoc linckia* este o specie de cianobacterie din sol care crește și în mediul acvatic și are capacitatea de a acumula metale din monosisteme metalice, cum sunt de exemplu cele cu crom sau nichel [485]. Aceste proprietăți sunt utile în procesul de identificare a organismelor de bioremediere, care pot fi utilizate la diferite tipuri de locuri contaminate, de exemplu în apă și la suprafața solului, ca în cazul nostocului.

Primul pas în identificarea bioremediatorilor, atât pentru purificarea solului, cât și a apei, este efectuarea de experimente în sisteme model, care pot cuantifica cu precizie performanța organismelor de a elimina metalele și alți poluanți. În cazul cianobacteriei *Nostoc linckia*, a doua etapă poate fi efectuată în medii acvatice și condiții de sol reale contaminate. Tehnologiile existente de colonizare a solului cu *Nostoc linckia*, capacitatea acestei specii de a crește activ în straturile superioare ale solului și de a forma cruste la suprafață, proprietățile sale de rezistență la secetă și cerințele minime de supraviețuire susțin posibilitatea utilizării cu succes a acestei cianobacterii pentru a remedia atât apa, cât și solul.

Scopul studiilor care vor fi descrise mai jos a fost de a evidenția efectele acțiunii repetate a cuprului/cromului în combinație cu alți ioni metalici asupra capacității de bioacumulare a metalelor și particularitățile răspunsului culturii la stresul oxidativ provocat de metale în condiții experimentale de sistem acvatic model.

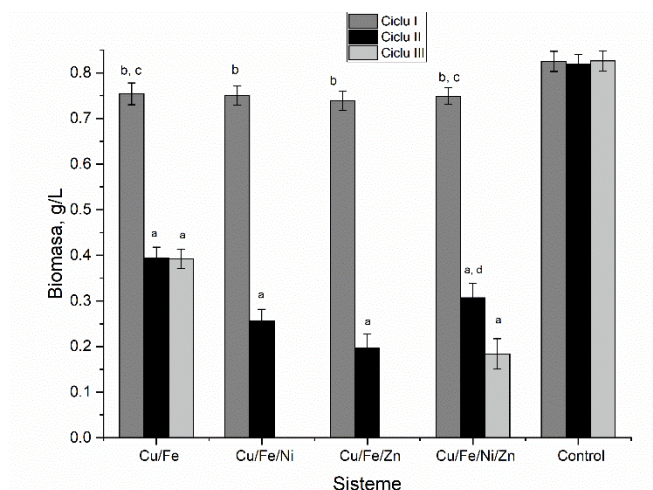
Acumularea de către cianobacteria *Nostoc linckia* a cuprului în asociere cu alte metale a fost realizată în sisteme bi- și polimetalice. Metalele au fost adăugate la mediul de cultură în a șasea zi de cultivare (faza de creștere exponențială) în concentrațiile indicate în Tabelul 6.4.

**Tabelul 6.4. Concentrația metalelor în sistemele multimetalice ce conțin cupru**

Sistemul	Concentrația metalelor, mg/l			
	Cu	Fe	Ni	Zn
Cu/Fe	2.5	2.0	-	-
Cu/Fe/Ni	2.5	2.0	0.5	-
Cu/Fe/Zn	2.5	2.0	0.5	0.5
Cu/Fe/Ni/Zn	2.5	2.0	0.5	0.5

Au fost realizate trei cicluri de creștere succesive a nostocului, pentru fiecare dintre ele fiind asigurate aceleași condiții și aceleași concentrații ale metalelor în sistemele polimetalice supuse procesului de bioremediere.

Biomasa de *Nostoc* a fost determinată la sfârșitul fiecăruia dintre cele trei cicluri de cultivare, iar rezultatele sunt trecute în figura 6.11.



**Fig 6.11. Biomasa de *Nostoc linckia* acumulată la finalul a trei cicluri de cultivare în sisteme model polimetalice (a— $p < 0.001$  pentru diferențele dintre martor și experiment, b— $p < 0.001$  pentru diferențele dintre primul și al doilea ciclu, c— $p < 0.001$  pentru diferențele dintre primul și al treilea ciclu, și d— $p < 0.001$  pentru diferențele dintre al doilea și al treilea ciclu).**

Biomasa probelor martor în toate cele trei cicluri de cultivare a fost între 0,819 și 0,825 g/l. În variantele experimentale, la sfârșitul primului ciclu de cultivare biomasa în toate sistemele multimetalice studiate a constituit 89,4-91,4% din biomasa martor. Situația s-a schimbat drastic în al doilea ciclu de cultivare. În calitate de inocul în acest ciclu a fost utilizată biomasa obținută la sfârșitul primului ciclu. În cel de-al doilea ciclu, biomasa acumulată la sfârșit a fost între 0,197 și 0,394 g/l, ceea ce este de 2,1-4,2 ori mai mică față de martor ( $p < 0,001$ ). Cel mai ridicat nivel de biomasă în al doilea ciclu a fost obținut în sistemul bimetalic Cu/Fe (0,394 g/l), urmat de sistemul cu patru componente Cu/Fe/Ni/Zn (0,307 g/l) și cu trei componente - sistemele Cu/Fe/Ni și Cu/Fe/Zn, cu 0,256 și 0,197 g/l, respectiv. Al treilea ciclu de cultivare a fost fatal pentru cultura de nostoc în două dintre cele patru sisteme studiate - Cu/Fe/Ni și Cu/Fe/Zn, în care a avut loc autoliza culturii de cianobacterie. În celelalte două sisteme care au asigurat supraviețuirea culturii de nostoc în al treilea ciclu de cultivare situația a fost diferită. Astfel, în sistemul Cu/Fe cantitatea de biomasă acumulată a fost la nivelul celui de-al doilea ciclu, iar în sistemul Cu/Fe/Ni/Zn acumularea de biomasă a continuat să scadă, fiind cu 40% mai mică față de al doilea ciclu și cu 78% mai mică decât în primul ciclu. Astfel, sistemele multimetalice cu conținut de cupru au condus la o reducere neesențială a productivității la *nostoc* în primul ciclu de cultură, dar au afectat-o semnificativ în ciclurile ulterioare, având ca rezultat o scădere semnificativă a biomasei sau chiar moartea culturii.

Rezultatele legate de acumularea de metale în biomasa de *nostoc* în cele patru sisteme polimetalice pe parcursul a trei cicluri de cultivare a cianobacteriei sunt prezentate în Figura

A.6.3 din compartimentul Anexe. Conținutul de cupru din biomasa de *nostoc* în condiții normale este de 32 mg/kg biomasă uscată. În prezența metalului în mediul nutritiv, cantitatea acestuia în biomasă crește impresionant. În funcție de sistemul analizat și de ciclul de cultivare, conținutul acestuia a variat de la 1720 la 10600 mg Cu/kg biomasă. În sistemul Cu/Fe, în primul ciclu de cultivare biomasa a acumulat 1720 mg/kg de cupru, ceea ce constituie aproximativ 50% din cuprul prezent în sistem. În al doilea ciclu, conținutul de cupru în biomasă a crescut de 2,6 ori față de primul ciclu și a fost de 4450 mg/kg ( $p < 0,001$ ). Creșterea acumulării de cupru a avut loc și în timpul celui de-al treilea ciclu de cultură. Astfel, la sfârșitul celui de-al treilea ciclu, cantitatea de cupru din biomasa de *nostoc* era de 5400 mg/kg, fiind semnificativ mai mare decât în ciclul al doilea ( $p < 0,001$ ). Această valoare în raport cu nivelul de productivitate și conținutul de cupru din sistem constituie 84% din cuprul introdus în sistem.

În sistemul Cu/Fe/Ni, la sfârșitul primului ciclu de cultivare, biomasa a acumulat 2120 mg/kg de cupru, nivelul de îndepărtare a cuprului din sistem în primul ciclu fiind de 51,9%. În al doilea ciclu de cultură, cantitatea de cupru acumulată în biomasă a fost de 6800 mg/kg, ceea ce corespunde cu îndepărtarea a 70% din ionii de cupru din sistem. Cel de-al treilea sistem Cu/Fe/Zn s-a comportat foarte similar exemplului descris. Astfel, la sfârșitul primului ciclu, conținutul de cupru din biomasa a fost de 2130 mg/g, corespunzător îndepărtării a 62% din cuprul prezent în sistem. La sfârșitul celui de-al doilea ciclu, conținutul de cupru în biomasă a crescut de 3,6 ori față de primul ciclu și a constituit 7700 mg/kg de biomasă, însă, datorită reducerii drastice a cantității de biomasă, eficiența eliminării cuprului a fost la nivelul primului ciclu.

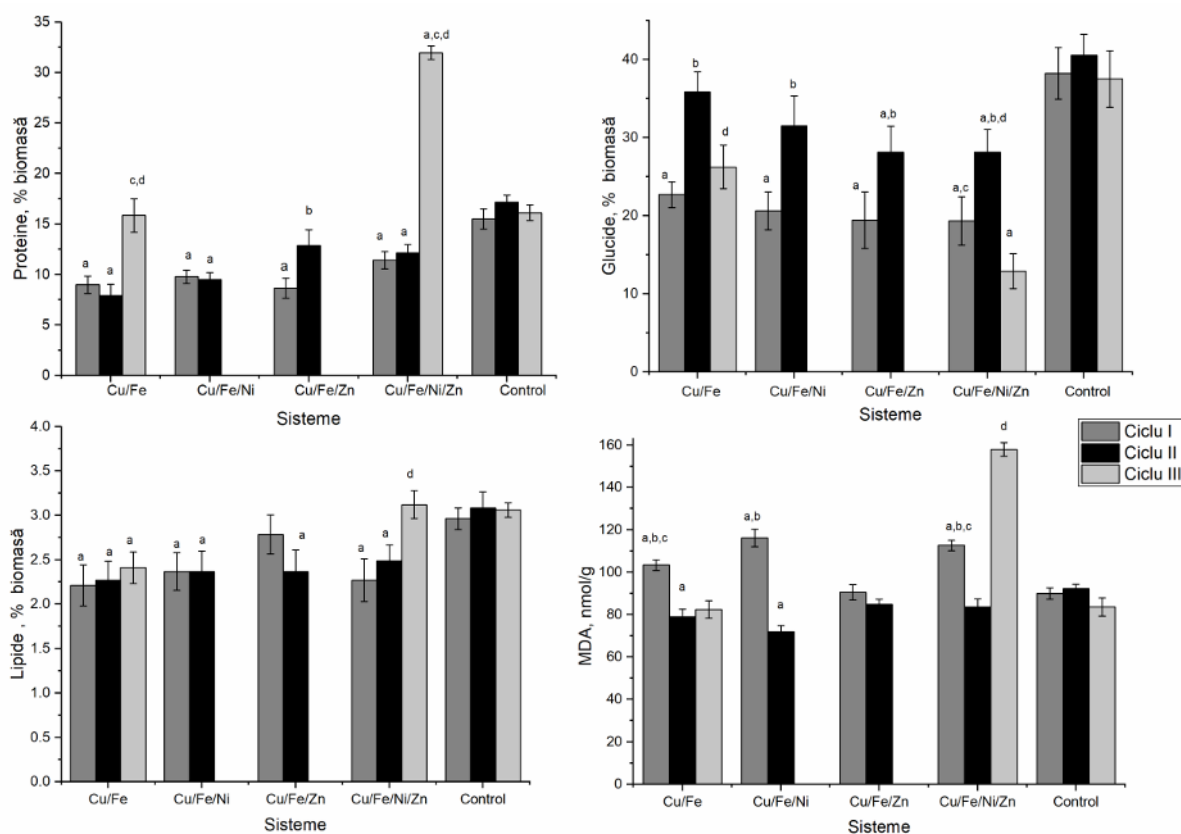
În cel de-al patrulea sistem (Cu/Fe/Ni/Zn), *nostocul* a acumulat cuprul cel mai eficient. Astfel, la sfârșitul primului ciclu de cultivare, conținutul de cupru din biomasă era de 2240 mg/kg, ceea ce corespunde îndepărtării a 67% din cuprul prezent în sistem. În al doilea ciclu de cultură, conținutul de metal în biomasă a atins valoarea de 7600 mg/kg și a fost de 3,4 ori mai mare decât în primul ciclu. În acest moment se atinge cea mai mare eficiență de îndepărtare a ionilor de cupru 93% din ionii metalici introduși în sistem. La sfârșitul celui de-al treilea ciclu de cultură s-a atins cea mai mare acumulare de cupru în biomasă – 10600 mg/kg, însă, datorită reducerii considerabile a cantității de biomasă, eficiența procesului de îndepărtare a scăzut la nivelul primului ciclu.

Biomasa a acumulat o cantitate semnificativă de fier în toate sistemele studiate, iar la fel ca în cazul cuprului, aceasta este acumularea crescută pe parcursul ciclurilor. În comparație cu acumularea de cupru și fier, acumularea de nichel a fost un proces mai puțin eficient, % din recuperarea sa maximă fiind de 42% în primul ciclu în sistemul Cu/Fe/Ni/Zn. Eficiența îndepărtării zincului în al doilea ciclu a fost de aproximativ 100% în ambele sisteme care au



inclus acest metal. Astfel, acumularea de cupru și alte metale prezente în sistem de către biomasa *Nostoc linckia* depinde în mod semnificativ de compoziția sistemului și de ciclul de creștere a culturii cianobacteriene.

Principalele componente structurale și funcționale ale biomasei de *Nostoc linckia* - proteine, carbohidrați și lipide - se modifică semnificativ în condițiile creșterii culturii cianobacteriene în sisteme multimetalice. Rezultatele obținute cu referire la aceste 3 grupuri de macromolecule sunt prezentate în figura 6.12.



**Figura 6.12. Proteinele totale, carbohidrații, lipidele și dialdehida malonică în biomasa de nostoc obținută în trei cicluri iterative de cultivare în sisteme polimetalice. (a— $p < 0.001$  pentru diferențele dintre martor și experiment, b— $p < 0.001$  pentru diferențele dintre primul și al doilea ciclu, c— $p < 0.001$  pentru diferențele dintre primul și al treilea ciclu, și d— $p < 0.001$  pentru diferențele dintre al doilea și al treilea ciclu).**

În cea mai mare parte a variantelor experimentale, se observă o scădere semnificativă a cantității totale de proteine din biomasa de nostoc. Conținutul de proteine în biomasa obținut în primul ciclu în toate cele patru sisteme multimetalice a variat între 8,7 și 11,4% din biomasa absolut uscată, ceea ce este cu 26,4-42,1% mai mic față de martor ( $p < 0,001$ ). Cea mai mică valoare a acestui parametru a fost caracteristică pentru sistemul Cu/Fe, iar cea mai mare - pentru sistemul Cu/Fe/Ni/Zn. Biomasa din al doilea ciclu de cultivare a conținut 7,9 - 12,9% din

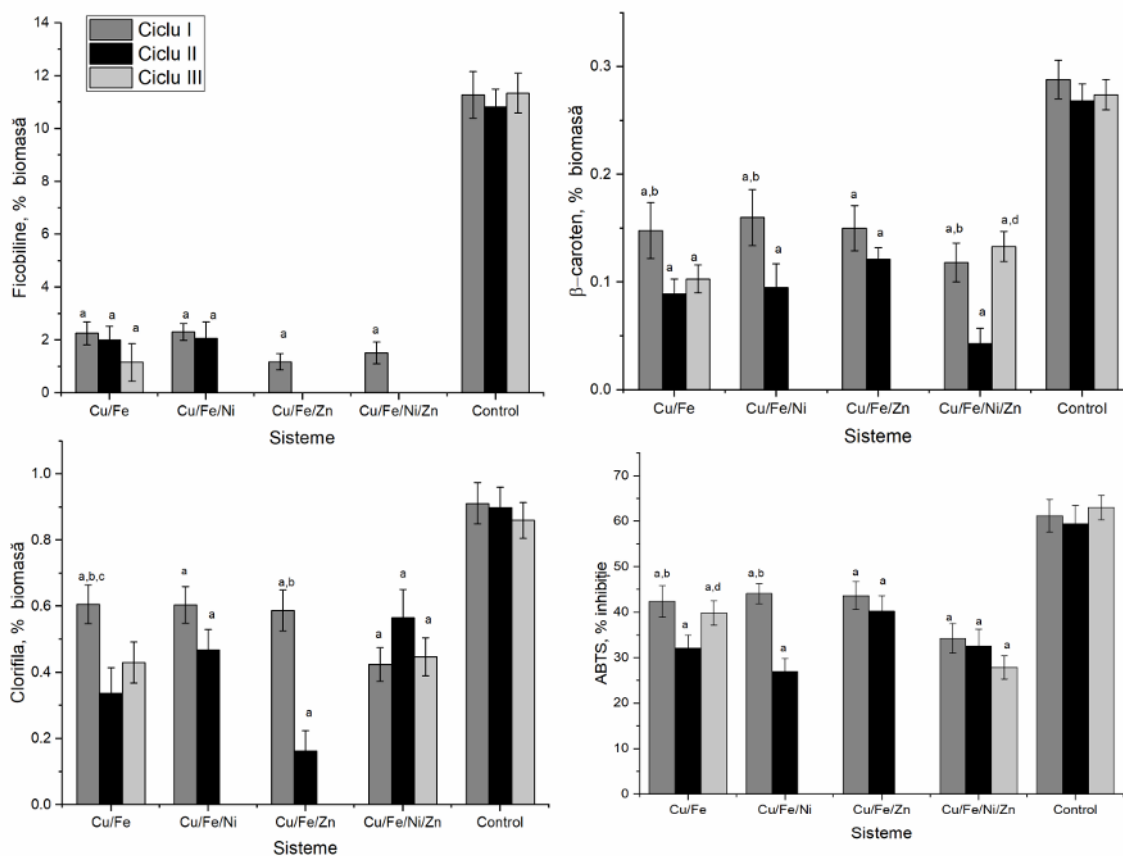
proteinele totale. Doar în sistemul Cu/Fe/Zn s-a observat o diferență semnificativă statistic ( $p < 0,005$ ) față de conținutul total de proteine din biomasa de nostoc obținută după primul ciclu de cultivare. În acest caz, cantitatea de proteine a crescut de la 8,6% în primul ciclu la 12,9% din biomasa în al doilea ciclu, dar a rămas cu 25% mai mică decât în biomasa martor ( $p < 0,01$ ). În celelalte trei sisteme, nu au existat diferențe semnificative statistic între conținutul de proteine din biomasa după primul și al doilea ciclu de cultivare a nostocului. Situația a fost complet diferită în cele două sisteme multimetalice în care cultura de nostoc a supraviețuit în al treilea ciclu. În sistemul Cu/Fe, biomasa de nostoc conținea 15,84% proteine totale, ceea ce este echivalent cu proba martor, în timp ce biomasa din sistemul Cu/Fe/Ni/Zn conținea o cantitate dublă de proteine față de martor - 31,9%.

Conținutul de carbohidrați din biomasa care crește în sistemele polimetalice s-a schimbat, de asemenea, semnificativ. La sfârșitul primului ciclu de cultivare în toate cele patru sisteme analizate, biomasa conținea cu 40,6-49,4% mai puțini carbohidrați în comparație cu martorul ( $p < 0,001$ ). În al doilea ciclu de cultură, biomasa de nostoc a acumulat mai mulți carbohidrați în comparație cu primul ciclu ( $p < 0,001$ ). Astfel, în sistemul Cu/Fe conținutul de carbohidrați atinge valoarea de 35,83% din biomasa, care nu diferă statistic de conținutul de carbohidrați din biomasa martor. În celelalte trei sisteme, conținutul de carbohidrați din biomasa de nostoc (28,1-31,48%) a fost mai mare față de primul ciclu de cultură și mai scăzut față de martor. În al treilea ciclu din sistemul Cu/Fe, biomasa de nostoc conținea 26,22% de carbohidrați în biomasa, ceea ce este comparabil cu conținutul lor din primul ciclu. În sistemul Cu/Fe/Ni/Zn, conținutul de carbohidrați din biomasa a fost de 12,88% biomasa, ceea ce a constituit 35% din valoarea lor în biomasa martor și a fost semnificativ mai mic decât în primele două cicluri de cultură ( $p < 0,001$ ).

Conținutul de lipide s-a schimbat, de asemenea, la creșterea nostocului în prezența metalelor. Cu două excepții, conținutul de lipide în variantele experimentale a scăzut cu 20,0-26,2% față de martor. În trei dintre cele patru sisteme, la sfârșitul primului ciclu de cultură, biomasa de nostoc conținea 2,21-2,37% lipide. Doar în sistemul Cu/Fe/Zn conținutul de lipide din biomasa nostoc la sfârșitul primului ciclu a fost la nivelul biomasei martor. În al doilea ciclu de cultură, conținutul de lipide din biomasa de nostoc în toate sistemele studiate a fost mai mic față de martor cu 19,2-26,3% ( $p < 0,001$ ), dar nu diferă statistic de primul ciclu. Cantitatea de dialdehidă malonică, care este un marker al stresului oxidativ, în biomasa de nostoc la sfârșitul primului ciclu de cultivare în trei sisteme a fost semnificativ mai mare față de martor și doar în sistemul Cu/Fe/Zn a fost la nivelul martorului. În al doilea ciclu de cultivare, conținutul de DAM în biomasa a scăzut semnificativ față de primul ciclu ( $p < 0,001$ ), dar a fost egal (sisteme Cu/Fe/Zn și Cu/Fe/Ni/Zn) sau ușor mai mic (sisteme Cu/Fe și Cu/Fe/Ni) decât în martor. În cel

de-al treilea ciclu de cultură, în biomasa de nostoc nivelul DAM în sistemului Cu/Fe a fost la nivelul biomasei martor, iar în sistemul Cu/Fe/Ni/Zn - cu 88,9% mai mare decât la control.

Componentele cele mai grav afectate ale biomasei de nostoc au fost ficobiliproteinele, al căror conținut a fost redus cu 79,5-100,0% (Figura 6.13).



**Figura 6.13. Conținutul de pigmenți și activitatea antioxidantă în biomasa de nostoc obținută în trei cicluri iterative de cultivare în sisteme polimetalice. (a— $p < 0.001$  pentru diferențele dintre martor și experiment, b— $p < 0.001$  pentru diferențele dintre primul și al doilea ciclu, c— $p < 0.001$  pentru diferențele dintre primul și al treilea ciclu, și d— $p < 0.001$  pentru diferențele dintre al doilea și al treilea ciclu).**

În primul ciclu de cultivare, biomasa de nostoc din toate sistemele analizate conținea cantități mici de ficobiliproteine. În al doilea ciclu de cultură, doar biomasa din sistemele Cu/Fe și Cu/Fe/Ni a conținut aproximativ 2% din ficobiliproteine, care au constituit 18,6-19,2% din valoarea caracteristică pentru martor. În al treilea ciclu, numai biomasa din sistemul Cu/Fe conținea 1,16% ficobiliproteine.

Conținutul de β-caroten din biomasa de nostoc a fost puternic afectat de metalele grele (Figura 6.13). Valorile obținute pentru variantele experimentale constituie 32,9-55,2% din valorile caracteristice biomasei martor. Modelul modificărilor observate în sisteme este aproximativ același și se exprimă prin scăderea progresivă a cantității de β-caroten din biomasa de nostoc obținută în al doilea ciclu de cultură. În al treilea ciclu, în biomasa de nostoc în

sistemul Cu/Fe conținutul de  $\beta$ -caroten a fost la nivelul celui de-al doilea ciclu, iar în sistemul Cu/Fe/Ni/Zn - la nivelul primului ciclu. Conținutul de clorofilă  $\alpha$  a fost redus semnificativ în toate probele experimentale (Figura 6.13). În primul ciclu, în biomasa de nostoc în cele patru sisteme conținutul de clorofilă a fost cu 33,4-53,4% mai mic comparativ cu martorul. În trei dintre sistemele studiate (Cu/Fe, Cu/Fe/Ni și Cu/Fe/Zn), conținutul de clorofilă în al doilea ciclu a scăzut față de primul ciclu și diferența față de martor era deja de 48,0 -81,9%. În sistemul Cu/Fe/Ni/Zn, conținutul de clorofilă din biomasa de nostoc în al treilea ciclu a crescut față de al doilea și a revenit la nivelul primului ciclu.

S-au observat modificări semnificative în activitatea antioxidantă a extractului etanolic din biomasa de nostoc în funcție de sistemul multimetalic și de ciclul de cultură analizat (figura 6.13). Valorile activității antioxidante obținute în variantele experimentale au fost semnificativ mai mici comparativ cu martor ( $p < 0,001$ ). La sfârșitul primului ciclu, activitatea extractelor obținute din biomasa de nostoc crescută în sistemele multimetalice constituie 34,2-44,1% de inhibare a radicalului cation ABTS, față de 61,2% caracteristică pentru biomasa martor. Activitatea extractelor obținute în al doilea ciclu de cultură a fost mai scăzută comparativ cu primul ciclu în sistemele Cu/Fe și Cu/Fe/Ni ( $p < 0,001$ ). În celelalte două sisteme, există o tendință de scădere a activității antioxidante, dar diferențele față de primul ciclu au fost nesemnificative statistic. În al treilea ciclu, extractul obținut din biomasa crescută în sistemul Cu/Fe a avut o activitate mai mare față de al doilea ciclu și egală cu primul ciclu. În sistemul Cu/Fe/Ni/Zn, activitatea extractului etanolic a scăzut continuu, iar diferența de activitate față de primul ciclu a fost semnificativă ( $p < 0,001$ ).

Un caz particular în acest ciclu experimental îl prezintă al treilea ciclu în sistemul Cu/Fe/Ni/Zn, în care a existat și al treilea ciclu de creștere a cianobacteriei. Cantitatea de biomasă obținută a fost foarte joasă și calitatea acesteia a fost diferită semnificativ - a fost caracterizată printr-o dublare a conținutului de proteine, o creștere moderată a conținutului de lipide și o creștere a DAM. Era evidentă o mobilizare a resurselor celulare pentru a face față efectelor stresului oxidativ.

Acest studiu realizat demonstrează posibilitatea utilizării cianobacteriei *Nostoc linckia* pentru bioremedierea siturilor contaminate cu cupru în asociere cu alte metale grele. Capacitatea mare de bioacumulare a metalelor, inclusiv a cuprului, cerințele minime de mediu, rezistența la secetă și alte condiții meteorologice ne fac să considerăm că această cianobacterie poate fi considerată un bun candidat pentru dezvoltarea tehnologiilor *in situ* de bioremediere a cuprului din solul contaminat.

La primul contact cu poluanții, toleranța ridicată la metalele grele din mediu a fost caracteristică nostocului. În aceste condiții, acumularea de metale în biomasa de nostoc a fost

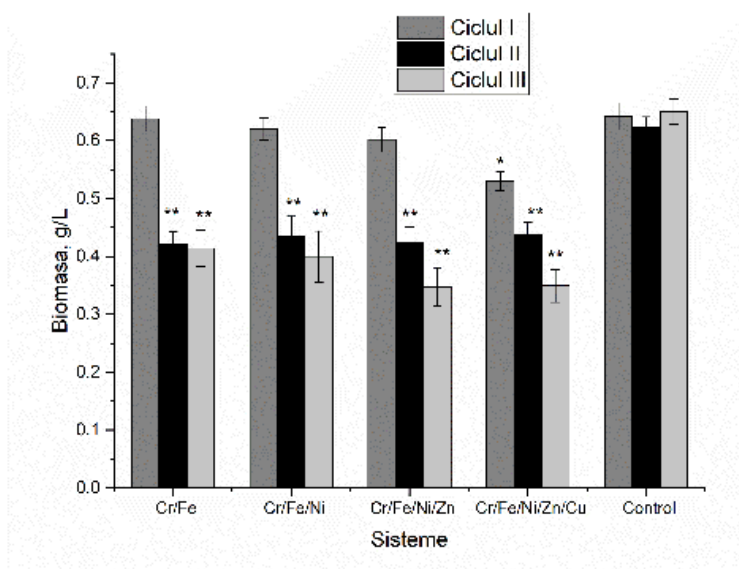
asociată cu reducerea conținutului de proteine, lipide și carbohidrați, degradarea pigmentilor și scăderea capacității antioxidante. Sub acțiunea repetată a poluanților, toleranța culturii a scăzut. Astfel, nostocul ar trebui utilizat mai degrabă pentru bioremedierea de urgență a situ-surilor contaminate cu efluenți care conțin cupru.

Un studiu, care a avut drept scop elucidarea posibilității de decontaminare a efluenților cu conținut de crom (VI) cu ajutorul cianobacteriei *Nostoc linckia* a fost realizat în conformitate cu designul experimental deja descris. Concentrațiile metalelor în sistemele artificiale de efluenți sunt prezentate în tabelul 6.5.

**Tabelul 6.5. Concentrația metalelor în sistemele multimetalice ce conțin crom (VI)**

Sisteme	Concentrația metalului, mg/l				
	Cr	Fe	Ni	Zn	Cu
Cr/Fe	2.5	2.0	-	-	-
Cr/Fe/Ni	2.5	2.0	0.5	-	-
Cr/Fe/Ni/Zn	2.5	2.0	0.5	0.5	-
Cr/Fe/Ni/Zn/Cu	2.5	2.0	0.5	0.5	0.5

Acumularea de biomasă este unul dintre principalii parametri care permit evaluarea nivelului de toxicitate a poluanților pentru microorganismele. Cantitatea de biomasă de *Nostoc linckia* acumulată în timpul fiecăruia dintre cele trei cicluri vitale iterative realizate este prezentată în Figura 6.14.



**Figura 6.14. Biomasa de *Nostoc linckia* obținută în timpul a trei cicluri de cultivare pe medii care conțin ioni metalici (\*p < 0,005; \*\*p < 0,001 pentru diferențele în raport cu matorul).**

Primul ciclu vital din toate sistemele polimetalice studiate a fost caracterizat de un nivel ridicat de productivitate a biomasei. În sistemele Cr/Fe, Cr/Fe/Ni și Cr/Fe/Ni/Zn, cantitatea de

biomasă nu s-a deosebit semnificativ de martor. În sistemul Cr/Fe/Ni/Zn/Cu, cantitatea de biomasă de nostoc acumulată la sfârșitul primului ciclu a fost cu 16,5% mai mică în comparație cu proba martor ( $p = 0,00138$ ). În al doilea ciclu de cultivare a *Nostoc linckia*, cantitatea de biomasă a fost destul de uniformă, dar semnificativ mai mică decât la martor (în medie cu 32–35%,  $p < 0,001$ ). În al doilea ciclu de cultivare, cultura de nostoc a prezentat o sensibilitate mai pronunțată în raport cu metalele grele din componența efluentului artificial, exprimată într-o scădere a productivității cu aproximativ o treime față de nivelul normal, indiferent de compoziția sistemului multimetalic. Al treilea ciclu de cultivare pentru sistemele Cr/Fe și Cr/Fe/Ni s-a încheiat cu același nivel de biomasă ca și în cel de-al doilea. În celelalte două sisteme, Cr/Fe/Ni/Zn și Cr/Fe/Ni/Zn/Cu, cantitatea de biomasă a continuat să scadă. Pentru aceste două sisteme, cantitatea biomasei la sfârșitul celui de-al treilea ciclu a scăzut în comparație cu al doilea ciclu cu 18%, respectiv 20%.

Bioacumularea metalelor în această experiență poate fi urmărită pe figura A6.4 din compartimentul Anexe. Cantitatea de crom în biomasa de nostoc în toate sistemele pe parcursul tuturor ciclurilor a fost la un nivel destul de ridicat, variind între 1190 și 3300  $\mu\text{g/g}$  biomasă uscată, în timp ce biomasa martor conține 3,4  $\mu\text{g/g}$  Cr. Pentru toate cele patru sisteme, cantitatea de crom acumulată de biomasa de nostoc în al doilea ciclu de cultură a fost cu 11-26% mai mare decât în primul ciclu. În al treilea ciclu, sistemele au fost diferite în acest sens. Astfel, în trei sisteme, Cr/Fe, Cr/Fe/Ni și Cr/Fe/Ni/Zn, capacitatea de acumulare a cromului a fost redusă în comparație cu al doilea ciclu și a fost comparabilă cu cea din primul ciclu, în timp ce în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn/Cu, absorbția cromului a fost la fel ca în cel de-al doilea ciclu. Nivelul maxim de acumulare de crom în biomasa de nostoc a fost de 3300  $\mu\text{g/g}$  și a fost atins la sfârșitul celui de-al doilea ciclu de cultivare în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn - de aproape 1000 de ori mai mare decât în biomasa martor.

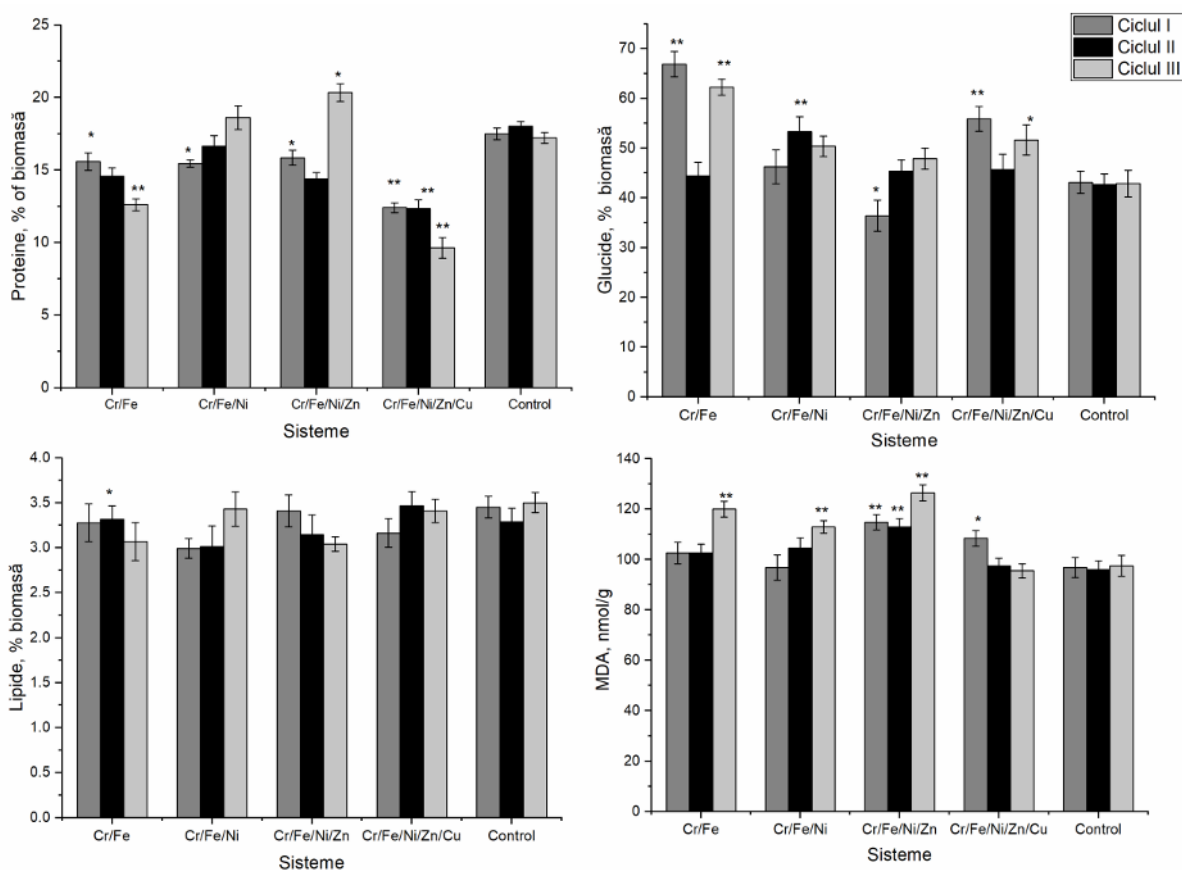
Fierul a fost al doilea element prezent în toate sistemele analizate. Cantitatea de fier acumulată în biomasa de nostoc crescută în sisteme multimetalice a fost de 3060–7100  $\mu\text{g/g}$ , ceea ce a fost semnificativ mai mare în comparație cu controlul, unde nivelul său a atins valoarea de 820  $\mu\text{g/g}$ . Acumularea fierului a crescut de la un ciclu de cultivare la altul în toate sistemele și în cadrul fiecărui ciclu acest parametru a fost destul de uniform. Astfel, în primul ciclu de cultivare, acumularea fierului în diferite sisteme a variat între 3060-3340  $\mu\text{g/g}$  fără diferențe semnificative statistic între variantele sistemului. Al doilea ciclu de creștere a nostocului s-a încheiat cu o acumulare de fier cu 49–89% mai mare decât în primul ciclu de cultură ( $p < 0,001$ ). În al treilea ciclu, absorbția fierului a crescut în trei dintre sistemele analizate, Cr/Fe/Ni, Cr/Fe/Ni/Zn și Cr/Fe/Ni/Zn/Cu; suma acumulată a fost cu 20,3–40,5% mai mare decât în al doilea ciclu ( $p < 0,005$ ). Nu au fost găsite diferențe semnificative în sistemul Cr/Fe între

absorbția de fier în ciclul al doilea și al treilea. Cantitatea de fier absorbită de biomasa de nostoc cultivată pe sisteme multimetalice a fost de 3,7–8,6 ori mai mare decât în biomasa martor, în timp ce capacitatea de a absorbi acest metal a fost mai puțin pronunțată în comparație cu cea a cromului.

Nichelul nu a fost detectat în biomasa de nostoc în condiții normale, iar în biomasa crescută pe trei sisteme multimetalice care conțin acest element a fost de 348–1110  $\mu\text{g/g}$ . Ca și în cazul fierului, absorbția de nichel a crescut pe parcursul ciclurilor. Zincul a fost prezent în două sisteme analizate, iar cantitatea acumulată de biomasa de nostoc a fost de 312–850  $\mu\text{g/g}$  și a crescut de la un ciclu la altul. Cantitatea de cupru din biomasa martor a fost de  $32 \pm 0,38$   $\mu\text{g/g}$ , iar în biomasa obținută pe un sistem multimetalic care conține cupru — 439–740  $\mu\text{g/g}$ , care a fost de 13,7–23,1 ori mai mare decât în control. În al doilea ciclu, acumularea cuprului a crescut cu 50,3% față de primul ciclu, iar între ciclul al doilea și al treilea nu au fost deosebiri în ceea ce ține de acumularea cuprului.

Compoziția biochimică a biomasei de *Nostoc linckia* suferă diverse modificări în funcție de sistemul analizat și de ciclul de cultivare. Cantitatea de proteine a scăzut după primul ciclu de cultivare în toate cele patru sisteme (Figura 6.15). În plus, dacă în sistemele Cr/Fe, Cr/Fe/Ni și Cr/Fe/Ni/Zn această scădere a fost moderată, până la 12% ( $p < 0,005$ ), atunci în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn/Cu reducerea cantității de proteine a fost cu 29% comparativ cu controlul. În al doilea ciclu, conținutul de proteine din biomasa de nostoc a fost la nivelul înregistrat în primul ciclu, fără diferențe semnificative. În schimb, s-au observat diferențe între sisteme în al treilea ciclu de cultură, când au fost observate două situații opuse: în sistemele Cr/Fe și Cr/Fe/Ni/Zn/Cu conținutul de proteine a scăzut cu 27%, respectiv 44% comparativ cu controlul, în timp ce în sistemele Cr/Fe/Ni și Cr/Fe/Ni/Zn acest parametru a atins nivelul de control (în sistemul Cr/Fe/Ni) sau a crescut cu 18% (în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn) în raport cu controlul ( $p < 0,005$ ). Trebuie remarcat faptul că cele mai serioase modificări ale conținutului de proteine au avut loc în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn/Cu, unde biomasa din toate cele trei cicluri de cultivare a avut un nivel de proteine constant scăzut (cu 29-44% comparativ cu controlul).

O scădere a cantității de carbohidrați din biomasa nostoc cu 16% ( $p < 0,005$ ) a fost înregistrată doar în primul ciclu de cultivare în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn (Figura 6.15). În alte cazuri, cantitatea de carbohidrați a fost la nivelul controlului sau a depășit-o cu până la 55%. Cea mai mare cantitate de carbohidrați a fost acumulată în biomasa de nostoc în sistemul Cr/Fe, în timpul primului și al treilea ciclu, ajungând la 66% din biomasă. În sistemul Cr/Fe/Ni/Zn/Cu, în timpul ciclurilor I și III, a fost sintetizată o cantitate semnificativă de carbohidrați, care a depășit nivelul controlului cu 29,5% și, respectiv, 20,4%.



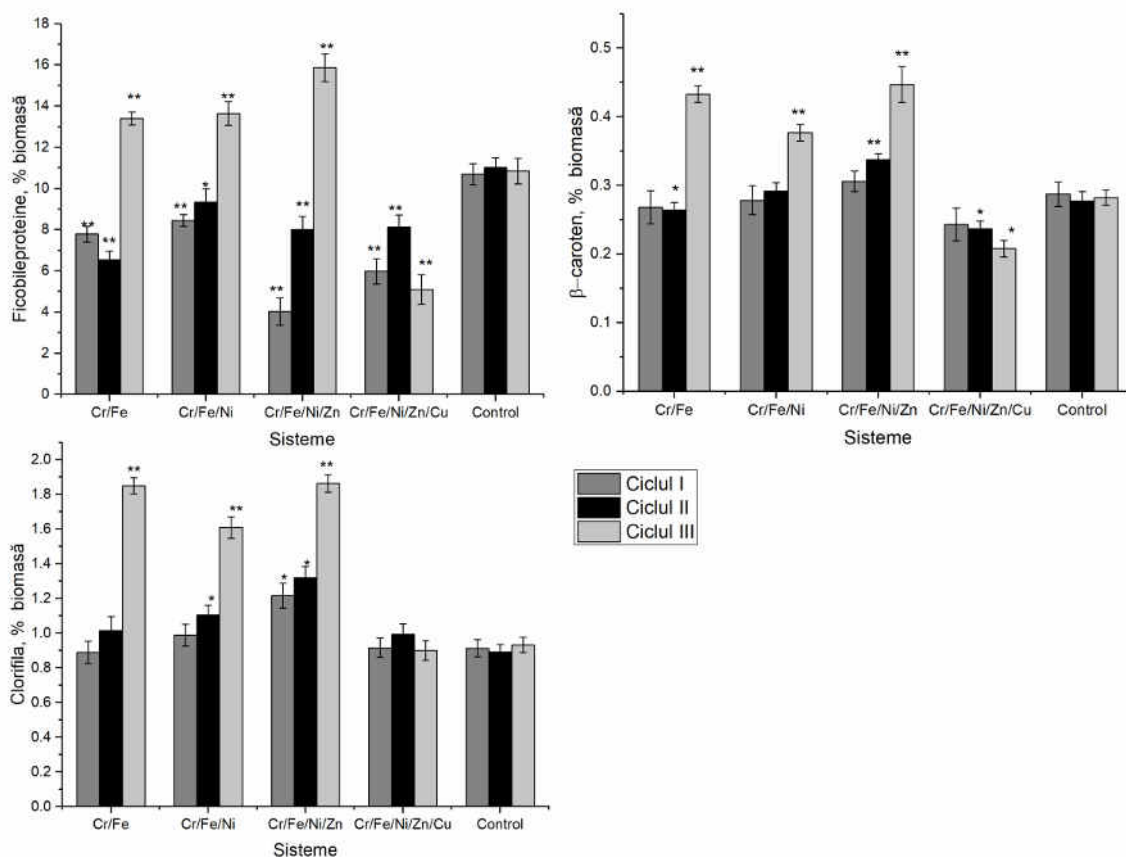
**Figura 6.15. Compoziția biochimică (proteine totale, carbohidrați, lipide și dildehidă malonică) a biomasei de *Nostoc linckia* la finalul a trei cicluri de cultivare pe medii, ce conțin sisteme multimetalice. (\* $p < 0,005$ ; \*\*  $p < 0,001$  pentru diferențele în raport cu martorul).**

Cantitatea de lipide practic nu s-a modificat la contactul cu mediile care conțin metale grele, rămânând la nivelul de 3,0–3,5% din biomasa uscată (Figura 6.15). Dialdehida malonică a fost la un nivel adecvat în biomasa de nostoc în intervalul de la 95,5 la 126,4 nM/g biomasă (Figura 6.15). În toate ciclurile de cultivare, valorile DAM care depășesc semnificativ conținutul în biomasa mator au fost înregistrate în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn. Nivelul de dialdehidă malonică în al treilea ciclu în sistemele Cr/Fe, Cr/Fe/Ni și Cr/Fe/Ni/Zn a fost cu 15,8–29,7% mai mare decât în proba mator.

Pigmenții sunt componente celulare, care de obicei răspund rapid la acțiunea factorilor de stres. Biomasa de nostoc conține trei grupuri de pigmenți: ficobiliproteine, clorofilă și pigmenți carotenoizi. Modificarea conținutului lor în biomasă în sistemele multimetalice este prezentată în Figura 6.16. Cea mai pronunțată modificare a conținutului de ficobiliproteine a avut loc în timpul primelor două cicluri de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* în sisteme multimetalice. La sfârșitul acestor două cicluri, în toate sistemele studiate, conținutul de ficobiliproteine totale a fost cu 15,2–62,4% mai mic decât la mator. În al treilea ciclu de cultivare au fost observate două situații diferite. Astfel, în sistemele multimetalice Cr/Fe, Cr/Fe/Ni și Cr/Fe/Ni/Zn, cantitatea de



ficobiliproteine a crescut semnificativ, depășind nivelul matorului cu 23,7–46,3%, în timp ce în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn/Cu, aceasta a scăzut atât în comparație cu controlul, cât și în comparație cu ciclurile I și II.



**Figura 6.16. Conținutul de pigmenți (ficobiliproteine, clorofilă  $\alpha$ ,  $\beta$ -caroten) în biomasa de *Nostoc linckia* la finalul a trei cicluri de cultivare pe medii ce conțin sisteme multimetale. (\* $p < 0,005$ ; \*\*  $p < 0,001$  pentru diferențele în raport cu matorul).**

Cea mai interesantă situație a fost observată în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn, unde la sfârșitul primului ciclu s-a înregistrat cel mai scăzut conținut de ficobiliproteine din biomasa de nostoc (cu o reducere de peste 60% față de mator). Apoi, în al doilea ciclu, s-a observat o creștere a acestui parametru față de ciclul I, dar nu s-a ajuns la valorile matorului (cu 17,3%). În al treilea ciclu, pigmenții ficobiliproteici aproape și-au dublat conținutul în biomasă în comparație cu al doilea ciclu. Aceasta a fost valoarea maximă a parametrului în cadrul experimentului (46,3% mai mult decât în proba mator).

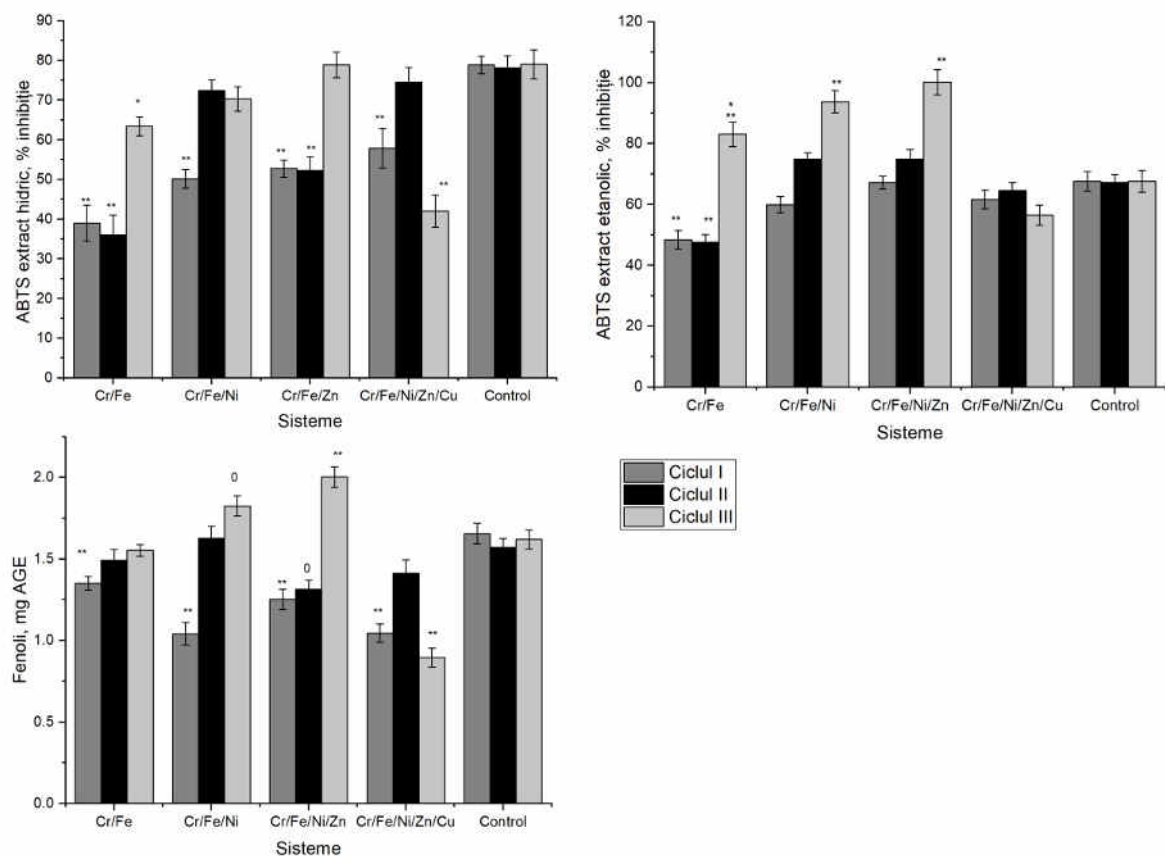
Cantitatea de clorofilă din biomasa de nostoc în timpul ciclurilor I și II a fost la nivelul matorului în sistemele Cr/Fe, Cr/Fe/Ni și Cr/Fe/Ni/Zn/Cu, iar în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn - cu 33,3% și, respectiv, 47,8%, mai mare decât la mator ( $p < 0,005$ ). La sfârșitul celui de-al treilea ciclu de cultivare, cantitatea de clorofilă din biomasa obținută în sistemele Cr/Fe, Cr/Fe/Ni și Cr/Fe/Ni/Zn a fost de 1,7–2,0 ori mai mare decât în biomasa mator. Doar în sistemul

Cr/Fe/Ni/Zn/Cu, conținutul de clorofilă din biomasa de nostoc nu s-a modificat în timpul a trei cicluri de cultivare în comparație cu martorul.

Pentru  $\beta$ -caroten, s-a observat același model de răspuns. În sistemele Cr/Fe și Cr/Fe/Ni, conținutul de  $\beta$ -caroten în biomasă în primele două cicluri de cultivare, precum și în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn în primul ciclu a fost la nivel de control. Biomasa din ciclul II din sistemul care conține cupru conținea cu 21,8% mai mult  $\beta$ -caroten în comparație cu martorul ( $p < 0,01$ ). În al treilea ciclu de creștere a nostocului, a avut loc o creștere a cantității de  $\beta$ -caroten în cele trei sisteme studiate Cr/Fe, Cr/Fe/Ni și Cr/Fe/Ni/Zn cu 15,4%, 33,5% și 58,5%, respectiv, comparativ cu controlul. În sistemul Cr/Fe/Ni/Zn/Cu s-a observat o scădere a conținutului de  $\beta$ -caroten cu 14,5%, și, respectiv, 26,3%, în ciclurile II și III ( $p < 0,005$ ).

Activitatea antioxidantă a biomasei de nostoc obținută în diferite sisteme multimetalice s-a schimbat, de asemenea (Figura 6.17). Activitatea antioxidantă a extractelor hidrice din biomasa de *Nostoc linckia* crescută în condițiile sistemelor polimetalice Cr/Fe și Cr/Fe/Ni a fost mai joasă decât la martor în toate cele trei cicluri de cultivare. În sistemul Cr/Fe, a fost observată o scădere semnificativă a activității antioxidante. În ciclurile I și II, capacitatea de a reduce cationul radical ABTS<sup>•+</sup> a fost mai mică decât la martor cu 50,5% și, respectiv, 53,9%, iar în ciclul III — cu 19,7% ( $p < 0,005$ ). Biomasa obținută în primul ciclu în sistemul Cr/Fe/Ni a prezentat o activitate antioxidantă (extract hidric) cu 36,4% mai mică decât martorul. În următoarele două cicluri, acest parametru a crescut, dar nu a atins nivelul optimal. În sistemul Cr/Fe/Ni/Zn, biomasa după primele două cicluri a avut o activitate antioxidantă a componentelor solubile în apă cu aproximativ 33% mai mică comparativ cu martorul, în timp ce după al treilea ciclu a fost egală cu martorul. Sistemul Cr/Fe/Ni/Zn/Cu în primul și al treilea ciclu a produs biomasă de nostoc, a cărei activitate a componentelor solubile în apă a fost cu 16,6%, respectiv 46,8%, mai mică decât la martor, iar în al doilea ciclu valoarea acestui parametru a fost la nivelul controlului.

Activitatea antioxidantă a extractelor etanolice din biomasa de nostoc s-a schimbat, de asemenea, în funcție de sistem și de ciclul de cultivare (Figura 6.17), fiind observată atât scăderea, cât și creșterea acestui parametru. În sistemul Cr/Fe s-a observat o scădere a activității antioxidante a componentelor alcool-solubile în primele două cicluri (cu aproximativ 30%,  $p < 0,001$ ). Cea mai mare creștere a activității antioxidante cu 22,9–48,2% în comparație cu martorul a fost obținută pentru biomasa de nostoc în al treilea ciclu de cultivare, în trei sisteme analizate Cr/Fe, Cr/Fe/Ni și Cr/Fe/Ni/Zn. În sistemul Cr/Fe/Ni/Zn/Cu s-a observat scăderea activității antioxidante a extractelor etanolice față de control.



**Fig. 6.17. Activitatea antioxidantă (% inhibiție ABTS<sup>+</sup>) a extractelor hidrice și etanolicе și conținutul fenolic din biomasa de *Nostoc linckia* la finalul a trei cicluri de cultivare pe medii ce conțin sisteme multimetalice. (\* $p < 0,005$ ; \*\*  $p < 0,001$  pentru diferențele în raport cu martorul).**

Conținutul de compuși fenolici din biomasa de *Nostoc linckia*, care prezintă în mare parte activitate antioxidantă, s-a schimbat și în prezența metalelor grele în sisteme (Figura 6.17). Cantitatea de fenoli din biomasa primului ciclu, indiferent de sistem, a scăzut cu 18,5–24,4% comparativ cu martor ( $p < 0,001$ ). În al doilea ciclu, cu excepția sistemului Cr/Fe/Ni/Zn, unde s-a înregistrat o ușoară scădere a conținutului de compuși fenolici (cu 16,4%,  $p < 0,01$ ), valorile acestui parametru în alte sisteme au fost aproape la nivelul biomasei martorului. În ciclul III, biomasa crescută în sistemele Cr/Fe și Cr/Fe/Ni conținea o cantitate de fenoli foarte apropiată de cea din martor, în timp ce în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn acest parametru a fost cu 23,6% mai mare decât în martor ( $p < 0,001$ ), iar în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn/Cu a fost cu 44,7% mai mic decât la martor ( $p < 0,001$ ).

*Nostoc linckia* este o cianobacterie filamentoasă care fixează azot și populează atât mediul acvatic, cât și solul. În sol, diferite specii de *Nostoc* pot face parte din crusta biologică a solului sau pot fi libere [320, 450]. Celulele cianobacteriene vii sunt folosite ca un bio-fertilizator simplu, ieftin și eficient, care poate îmbunătăți proprietățile fizico-chimice ale solului prin îmbogățirea acestuia cu carbon, azot și fosfor disponibil [409].

Pe baza celor de mai sus, există două moduri în care biomasa cianobacteriei *Nostoc linckia* poate fi utilizată pentru bioremedierea solului: introducerea culturii în sol prin pulverizare și aplicarea culturii de *Nostoc linckia* imobilizate pe un purtător neutru. În primul caz, este necesară asigurarea umidității pentru dezvoltarea coloniilor de *Nostoc*, care va realiza remedierea solului la suprafață și la o adâncime de 1–5 cm. În condiții de umiditate scăzută, *Nostoc linckia* formează cruste ușor de îndepărtat, care pot fi colectate sau, atunci când rămân pe sol cu o creștere a umidității, activitatea lor vitală se reia (ceea ce corespunde ciclului II și III al experimentului). În al doilea caz se poate aplica tehnologia utilizării microorganismelor imobilizate în condiții de sol. Este evident că pentru aplicarea în practică sunt necesare cercetări suplimentare, iar tehnologiile de remediere vor fi aplicabile pentru bioremedierea siturilor limitate. Cu toate acestea, capacitatea mare de bioacumulare față de ioni metalici, precum și creșterea specifică cu formarea crustei la suprafață și rezistența la secetă fac din această cianobacterie un candidat important pentru dezvoltarea tehnologiilor de bioremediere a solurilor contaminate cu metale grele, în special Cr(VI).

### **6.3. Capacitatea de bioacumulare a metalelor grele și pământurilor rare de către *Arthrospira platensis***

Utilizând în calitate de obiect de studiu cianobacteria *Arthrospira platensis*, au fost realizate și alte studii de bioremediere a efluenților poluați cu metale, dar și de recuperare a unor elemente tehnologic valoroase din mediul înconjurător. Cercetări asemănătoare cu cele descrise în subcapitolele 6.1 și 6.2 au fost efectuate, având în vedere bioremedierea în sisteme polimetalice cu conținut dominant de zinc și de nichel. De asemenea, au fost realizate cercetări în vederea acumulării de litiu în biomasa de spirulină și de recuperare a unor pământuri rare din soluții diluate. Rezultatele semnificative din punct de vedere al scopului acestui capitol sunt integrate în tabelul 6.6.

În cazul sistemelor mono- și policomponente cu conținut dominant de nichel, performanța de bioacumulare a metalelor de către *Arthrospira platensis* a fost urmărită timp de patru cicluri de creștere iterative. De rând cu capacitatea de bioacumulare a metalelor au fost monitorizați și numeroși parametri productivi și biochimici ai cianobacteriei, dintre care aici sunt prezentați doar doi parametri de bază – cantitatea de biomasă și nivelul de dialdehidă malonică, în termeni de direcție de modificare a acestora.

Acumularea metalelor în biomasa de spirulină, ca și în cazul sistemelor cu conținut dominant de cupru și crom, a depins de compoziția efluentului și de concentrațiile ionilor metalici. Acumularea de nichel în biomasă a fost direct proporțională cu concentrația acestuia în efluenți, iar absorbția maximă (1310 mg/kg de biomasă) a fost atinsă în sistemul Ni/Cr/Fe. În

aceiași sistem, biomasa a acumulat de 110 ori mai mult crom și de 4,7 ori mai mult fier decât controlul. Cea mai mare acumulare de cupru (2870 mg/kg) a fost realizată în sistemul Ni/Cu/Zn/Mo și zinc (1860 mg/kg) — în sistemul Ni/Cu/Zn/Sr.

**Tabelul 6.6. Capacitatea cianobacteriei *Arthrospira platensis* de a acumula diferite elemente din efluenți mono- și policomponenți**

Elementul /elementele	Concentrația elementului, mg/l	Direcția de variere a biomasei	Direcția de variere a DAM	Capacitatea de bioacumulare, mg/kg sau %	Referință la publicație
Zn	2,5-10,0	Nu se modifică	Crește	90 - 16000	[486]
Zn/Cu/Sr	Zn 2,5-10,0 Cu 1,0-5,0 Sr 0,5-2,0	Scade	Crește	Zn 250.0-20000.0 Cu 125.0-500.0 Sr 5.0-50.0-	
Zn/Cu/Ni	Zn 2,5-10,0 Cu 0,5-2,0 Ni 0,5-2,0	Nu se modifică semnificativ	Crește	Zn 750.0-20500.0 Cu 60.0-250.0 Ni 40.0-240.0	
Zn/Cu/Sr/Ba	Zn 2,5-10,0 Cu 0,5-2,0 Ni 0,5-2,0 Ba 0,5-1,0	Scade	Crește	Zn 120.0-22500.0 Cu 125.0-500.0 Sr 5.0-50.0 Ba 60.0-25.00	
Ni	2,5-10	Nu se modifică	Crește	50-250	[101]
Ni/Cr/Fe	Ni 2,5-10 Cr 1,0-5,0 Fe 1,0-5,0	Scade	Crește	Ni 50.0-1310.0 Cr 1.05-110.0 Fe 2500.0-17000.0	
Ni/Cu/Sr/Zn	Ni 2,5-10 Cu 0,5-1,0 Sr 1,0-5,0 Zn 0,5-2,0	Scade în unele variante	Crește	Ni 60.0-51.00 Cu 70.0-820.0 Sr 105.0-1370.0 Zn 20.0-1860.0	
Ni/Cu/Zn/Mo	Ni 2,5-10 Cu 1,0-5,0 Zn 0,5-2,0 Mo 0,5	Scade în unele variante	Crește	Ni 40.0-480.0 Cu 50.0-2870.0 Zn 20.0-1750.0 Mo 3,5-4,4	
Li	5-500	Nu se modifică semnificativ	Crește	50.0-2500.0	[104]
La	10-30	Crește	Nu se modifică semnificativ	88-95%	[487]
Dy	10-30	Crește	Crește	85-90%	
Tb	10-30	Nu se modifică semnificativ	Scade	<20%	
Yb	10-30	Scade	Crește	<20%	
Sm	10-30	Nu se modifică semnificativ	Scade	42-97%	
Nd	10-30	Nu se modifică semnificativ	Crește	46-86%	

Cantitatea de biomasă obținută în aceste sisteme metalice a fost la nivelul martorului sau moderat mai joasă, în special la finalul primului ciclu de cultivare. În același timp, cantitatea de dialdehidă malonică în toate variantele experimentale a depășit semnificativ martorul. Astfel, parametri de productivitate și markerii stresului oxidativ, împreună cu capacitatea înaltă de

bioacumulare a metalelor permit să afirmăm că *Arthrospira platensis* poate fi considerată în bioremedierea apelor uzate poluate cu compoziție complexă și conținut dominant de nichel.

În altă serie de experiențe a fost investigat efectul zincului în diferite combinații cu alte metale asupra capacității de acumulare a biomasei de *Arthrospira platensis* și asupra productivității și compoziției biochimice a biomasei obținute la creșterea cianobacteriei pe medii ce includ sistemele polimetalice studiate. Au fost modelate patru sisteme care conțin Zn(II), dintre care un sistem monocomponent cu zinc, două sisteme trimetalice Zn/Cu/Sr; Zn/Cu/Ni și un sistem cu patru metale - Zn/Cu/Sr/Ba, concentrațiile metalelor fiind setate la trei niveluri diferite, într-un diapazon indicat în tabelul 6.6. Sistemele studiate au fost introduse în mediul de cultură în a cincea zi de creștere a biomasei. Spirulina a prezentat o capacitate înaltă de acumulare pentru toți ionii metalici prezenți în sistemele analizate. Deoarece metalele au fost adăugate la începutul fazei de creștere staționară, contactul cu biomasa a fost de numai 24 de ore, chiar și la cea mai mare concentrație de metal din sisteme, acumularea de biomasă de *Arthrospira platensis* a fost redusă cu cel mult 11,2%. În biomasa de *Arthrospira platensis* crescută în prezența sistemelor multimetalice care conțin Zn a fost exprimat indicatorul specific al stresului oxidativ – dialdehida malonică. Și în cazul efluenților contaminați cu metale, dominat fiind zincul, spirulina poate fi considerată un acumulator și bioremediator eficient.

Un caz separat prezintă cercetările orientate spre obținerea biomasei de spirulină îmbogățită cu litiu. În experimentele de bioacumulare, în mediul nutritiv pentru *Arthrospira platensis* a fost adăugat litiu în intervalul de concentrații de 5-500 mg/l la inoculare și în a treia zi de cultivare (faza exponențială de creștere). A fost studiat efectul litiului asupra cantității de biomasă și compoziției sale biochimice. Cantitatea de biomasă nu a fost influențată de acțiunea litiului, în timp ce conținutul de dialdehidă malonică a crescut. În același timp alți parametri biochimici ai spirulinei au fost în limitele normale, astfel putem afirma că biomasa de *Arthrospira platensis* s-a dovedit a fi o matrice excelentă pentru producerea de suplimente alimentare care conțin litiu.

Au fost evaluate creșterea *Arthrospira platensis* și modificările fiziologice ale biomasei sub efectele a șase elemente de pământ rare Dy, Sm, Tb, La, Nd și Yb. Elementele au fost testate prin trei concentrații de 10, 20 și 30 mg/l. Conform datelor analizei cantităților de elemente ale pământurilor rare în biomasa de spirulină, capacitatea de acumulare a cianobacteriei față de elementele studiate se modifică în următoarea ordine La > Dy > Nd > Sm > Yb > Tb. Rezultatele arată că ionii Dy și La stimulează creșterea biomasei, iar ionii Yb o inhibă, în timp ce ionii Sm, Tb și Nd nu afectează acumularea de biomasă. Elementele provoacă o creștere a conținutului de MDA din biomasa spirulinei. Modificările activității antioxidante sub încărcături metalice aplicate relevă un stres moderat la spirulina expusă contactului cu pământurile rare, astfel că

cinobacteria *A. platensis* poate fi utilizată cu succes pentru bioremedierea apei naturale contaminate cu aceste elemente, precum și pentru recuperarea lor din efluenții industriali slab poluați.

#### 6.4. Concluzii la capitolul 6.

Cercetările descrise în acest capitol vin să completeze lipsa datelor cu referire la posibilitatea de aplicare a culturilor vii de cianobacterii (spirulină și nostoc) în calitate de bioremediatori ai apelor reziduale cu conținut de metale grele în condiții de contact repetat cu efluenți contaminați. În acest scop au fost realizate experiențe, care au inclus trei cicluri iterative de cultivare, diferite sisteme bi- și polimetalice și diferite regimuri de interacțiune a culturilor cianobacteriene cu metalele luate în studiu. Rezultatele obținute ne-au permis să stabilim că cianobacteriile utilizează diferite strategii de acumulare a metalelor din medii în funcție de faza de creștere a culturii la care are loc contactul celulelor cu efluenții contaminați. Astfel, de exemplu, cromul și fierul sunt acumulate de către cultura de spirulină în cantitate semnificativ mai mare când biomasa interacționează cu ionii metalici în faza de creștere exponențială, în timp ce nichelul, cuprul și zincul se acumulează mai activ atunci când contactul are loc în faza staționară. Astfel, pentru a dezvolta o tehnologie eficientă de îndepărtare a metalelor din apele uzate, este necesar să se țină cont atât de compoziția chimică a efluenților, cât și de vârsta fiziologică a culturilor care interacționează cu poluanții.

Cercetările realizate au evidențiat și unele particularități specifice celor două obiecte fiziologice antrenate în studiu. Astfel, nostocul se caracterizează printr-o toleranță foarte înaltă la primul contact cu poluanții polimetalice ce conțin cupru comparativ cu spirulina. În schimb, la acțiunea repetată a poluanților, toleranța culturii de nostoc scade mai pronunțat decât a celei de spirulină. Astfel, nostocul este un obiect care poate oferi mai multe beneficii în bioremedierea de urgență a situsurilor poluate cu cupru în asociere cu alte metale, în timp ce spirulina este mai indicată pentru bioremedierea sistemică. Este interesant faptul că în cazul sistemelor polimetalice cu conținut de crom, nostocul își păstrează un nivel înalt de toleranță față de stresul creat de metale pe durata a 3 cicluri consecutive și o componentă nealterată în mod serios a biomasei. Menținerea calității biomasei de nostoc în condiții de stres cauzat de prezența metalelor este asigurată de o creștere a conținutului de compuși cu acțiune antioxidantă.

În baza celor expuse mai sus pot fi formulate următoarele concluzii:

1. Cianobacteriile *Arthrospira platensis* și *Nostoc linckia* se caracterizează prin capacitate înaltă de bioacumulare a metalelor grele din apele reziduale cu conținut redus de poluanți, concentrând ionii toxici (de exemplu de cupru) în celule, unde

conținutul final ajunge să depășească de mii de ori nivelul normal al acestor elemente în celule.

2. În cazul decontaminării efluenților contaminați cu cupru, cianobacteria *Nostoc linckia* este eficientă în calitate de bioremediator de urgență cu realizarea unui ciclu de remediere, iar *Arthrospira platensis* este mai eficientă ca biotemediator sistemic cu realizarea a cel puțin trei cicluri iterative.
3. În dependență de componența efluenților contaminați se poate obține o îndepărtare maximală a metalelor ținând cont de particularitățile specifice de răspuns al culturilor la starea de stres oxidativ. De exemplu, prin contactul efluenților cu culturi de diferite vârste fiziologice se poate obține îndepărtarea preferențială a cromului și fierului sau a cuprului și nichelului.
4. Contactul culturilor cianobacteriene cu contaminații metalici în faza creșterii exponențiale produce modificări mai profunde atât la nivel de cantitate de biomasă, cât și la nivel de acumulare a produselor degradării oxidative a acesteia.
5. Eficiența culturilor cianobacteriene în calitate de bioremediatori este determinată de eficiența sistemelor antioxidante ale celulelor, care înlătură parțial efectele negative ale stresului oxidativ provocat de metalele grele.
6. Rezultatele obținute indică perspectiva utilizării biomasei de spirulină și nostoc în calitate de bioacumulator regenerabil pentru tratarea efluenților moderat poluați cu metale grele sau pentru post-tratarea apelor uzate.
7. Datorită capacității mari de bioacumulare a metalelor și a unui model de creștere specific cu formarea de cruste pe suprafața solului, cianobacteria edafică *Nostoc linckia* este un candidat important pentru bioremedierea solului contaminat cu Cr și Cu în combinație cu alte metale.
8. *Arthrospira platensis* este o matrice potrivită pentru obținerea suplimentelor cu conținut de litiu, dar și pentru recuperarea pământurilor rare din efluenți contaminați cu cantități mici ale acestor elemente.

Rezultatele și concluziile prezentate mai sus au fost expuse în multiple publicații, inclusiv în ediții științifice indexate Wos și Scopus [82, 84, 85, 87, 101-104, 106, 107, 484, 486, 487, 490].



## **7. MANAGEMENTUL STRESULUI OXIDATIV ÎN CADRUL TEHNOLOGIILOR DE CULTIVARE A OBIECTELOR FICOLOGICE DE INTERES INDUSTRIAL. GENERALITĂȚI, MECANISME, APLICAȚII**

Producția ficologică devine din ce în ce mai atractivă datorită mai multor avantaje, dintre care unul este utilizarea unor suprafețe foarte compacte pentru procesul de cultivare. De asemenea, biomasa microalgelor și cianobacteriilor este o sursă profitabilă de proteine, polizaharide, lipide, pigmenți și alte produse cu activitate biologică ridicată. Aceste beneficii determină interesul evident al biotehnologiilor pentru cultivarea în masă a microalgelor și cianobacteriilor în bioreactoare de diferite tipuri. Cultivarea în condiții industriale este asociată cu stresul oxidativ, iar acest lucru poate compromite calitatea biomasei. Din aceste motive, stresul asociat cu acumularea de radicali liberi și produse ale degradării oxidative a macromoleculor este considerată o provocare majoră, un factor de risc economic, precum și un risc pentru sănătatea umană. În același timp, un stres moderat poate fi asociat cu anumite beneficii pentru culturile industriale de microalge și cianobacterii, care ar permite creșterea producției de biomasă, o acumulare mai rapidă de polizaharide, modificarea în direcția necesară a conținutului de pigmenți etc. Utilizând stresul oxidativ moderat în calitate de instrument biotehnologic este important de a păstra un echilibru adecvat între beneficiul oferit și riscurile de securitate asociate.

În cele ce urmează, sunt scoase în evidență unele generalități și mecanisme de instalare a stresului oxidativ în culturile ficologice, modalități de identificare și gestionare a acestei stări în scopul obținerii produselor ficologice valoroase și sigure pentru consum.

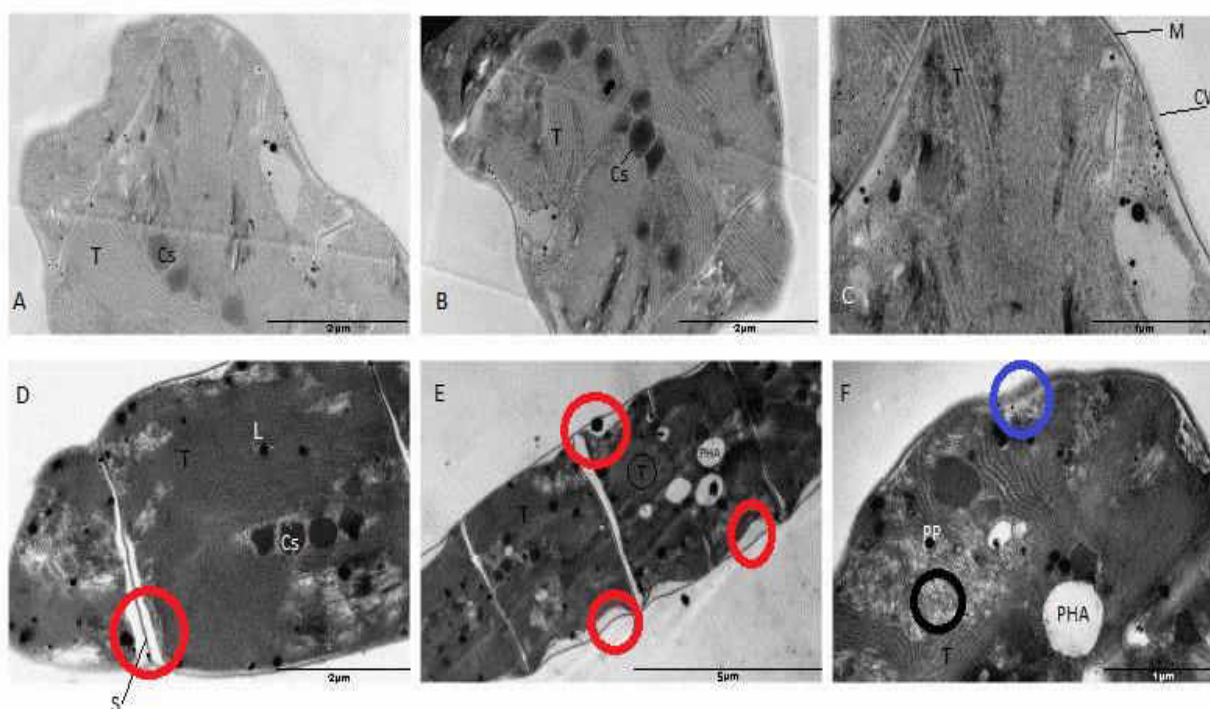
### **7.1. Mecanisme comune de instalare a stresului oxidativ de diferită etiologie**

#### ***7.1.1. Modificări ultrastructurale asociate cu starea de stres oxidativ la spirulină***

În capitolele anterioare am vorbit în special despre modificări ale nivelului de productivitate, componență biochimică și activitate antioxidantă în diferite tipuri de stres la culturile ficologice. Este cert că în anumite condiții, în special acolo unde se observă o acumulare masivă de produse ale degradării oxidative a macromoleculor, să apară și modificări morfologice la nivel macro și microstructural. Schimbarea culorii culturii generată de modificarea cantitative și calitative a pigmentilor, modificarea dimensiunilor celulelor sau a filamentelor, formarea de conglomerate celulare atipice culturii – sunt fenomene răspândite, ușor observabile și descrise suficient de detaliat de mulți cercetători. În această lucrare ne-am axat pe identificarea unor modificări ultrastructurale comune în stări de stres de diferită proveniență în cultura de *Arthrospira platensis*. Trei stări diferite de stres oxidativ au fost analizate în cele ce urmează:

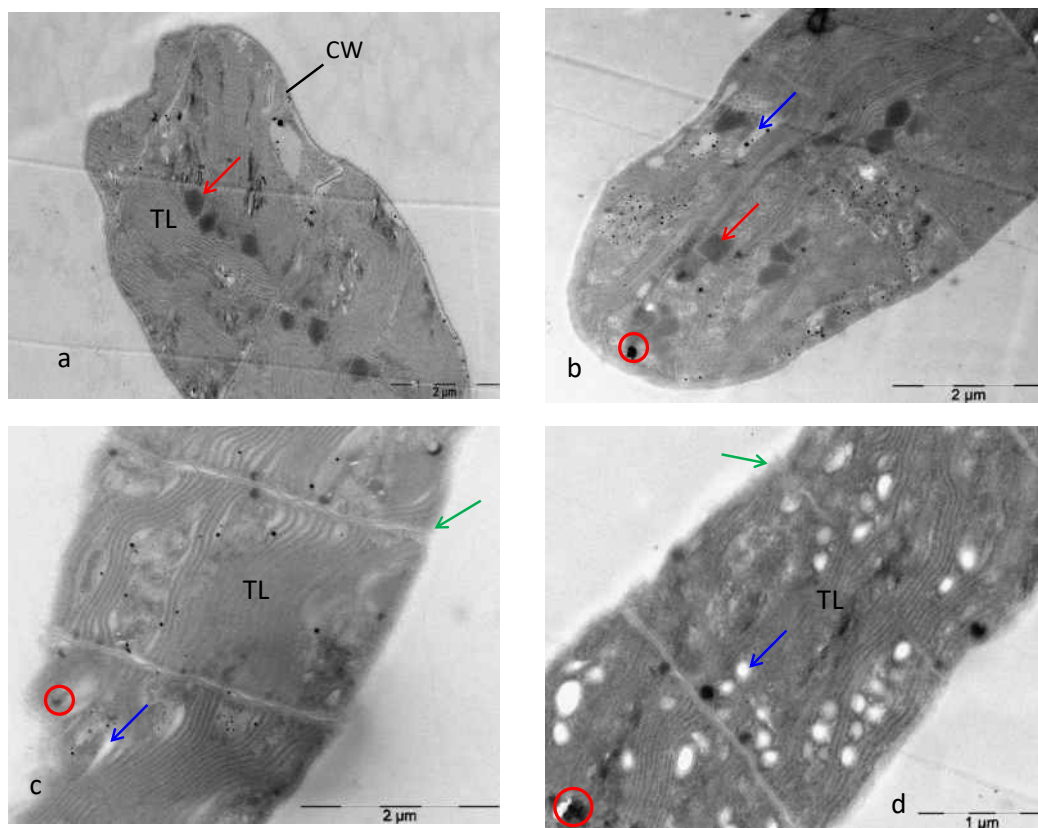
stresul oxidativ în nanobiosinteză; stresul oxidativ hipotermic; stresul oxidativ generat de xenobiotice (metale – Zn, Co, Cu, Mo, Ni, nanoparticule de aur și argint, etanol).

În figura 7.1 pot fi urmărite modificările care au loc în ultrastructura celulelor *A. platensis* pe durata procesului de bionanosinteză a nanoparticulelor de seleniu pornind de la soluția de selenit de sodiu. În figura 7.1. A,B,C se poate observa ultrastructura tipică a spirulinei. Cele mai semnificative structuri caracteristice citoplasmei celulare sunt tilacoizii aranjați compact, bine structurați cu membrane ușor vizualizabile. Se observă un număr mare de carboxizomi - corpi de incluziune poliedrici care conțin enzima ribulozo-1,5-difosfat carboxilază/oxigenază (RuBisCO), responsabilă pentru fixarea dioxidului de carbon în spirulina. Citoplasma este densă și aderă strâns la membrana citoplasmatică. Peretele celular este strâns atașat de membrana citoplasmatică, este dens și bine vizibil. Capsula polizaharidică este compactă și subțire. Pe durata procesului de nanobiosinteză a nanoparticulelor de seleniu s-au produs modificări ale structurii spirulinei, principalele fiind scăderea gradului de compactizare a tilacoizilor, apariția unor spații translucide între membrana citoplasmatică și peretele celular, apariția unor corpi polifosfați mari și polihidroxicanoații (care sunt o formă de stocare a rezervelor de carbon), decompactizarea peretelui celular.



**Fig. 7.1. Ultrastructura celulelor *A. platensis* în proces de nanobiosinteză. A,B,C – martor, D,E,F – celule în care are loc nanobiosinteză SeNP. Cs- carboxizomi; T – tilacoizi; M- membrană; CW – peretele celular; L- incluziuni de lipide; PHA – polihidroxicanoați; PP- corpi polifosfat; S – sept; cercurile negre –dezorganizarea tilacoizilor, cercurile roșii – spațiul dintre membrana celulară și peretele celular/septul intercelular, cerc albastru – modificarea peretelui celular/densității exopolizaharidelor.**

Modificările ultrastructurale la contactul cu nanoparticulele de aur și argint produse industrial sunt prezentate în figura 7.2 (b, c, d). Sub influența nanoparticulelor, capsula exopolizaharidică devine difuză și se îngroașă vizibil. Tilacoizii din celulele martorului sunt prezentați de un număr mare de lamele dense. Nanoparticulele produc o decompactizare parțială a tilacoizilor. În biomasa martorului și biomasa care a contactat cu o concentrație de 0,05  $\mu\text{M}$  nanoparticule de argint a fost observat un număr mare de carboxizomi. În variantele cu nanoparticule de aur în concentrație de 0,05  $\mu\text{M}$  și nanoparticule de argint în concentrație de 0,5  $\mu\text{M}$  carboxizomii nu se vizualizează, ceea ce indică o posibilă scădere a eficienței ribulozo-1,5-difosfat carboxilazei și, în consecință, a fixării carbonului. Este cunoscut că eficiența ribulozo-1,5-difosfat carboxilazei este destul de redusă, iar compartimentarea enzimei în structuri carboxizomice prezintă mecanismul de eficientizare a fixării carbonului din dioxidul de carbon disponibil.



**Fig. 7.2.** Ultrastructura celulelor *A. platensis* în contact cu nanoparticule de aur și argint. a) martor, b) expuse la 0.05  $\mu\text{M}$  AgNP, c) expuse la 0.05  $\mu\text{M}$  AuNPs, și d) expuse la 0.5  $\mu\text{M}$  AgNPs (săgeata roșie indică carboxizomii; săgeata albastră – spații vacuolizate; săgeata verde – rupturi de membrană, săgeata neagră – capsula polizaharidică, TL – tilacoizi, CW – perete celular, cercul roșu – aglomerare de nanoparticule).

Conform imaginilor, nanoparticulele de argint și aur, la contactul lor cu celulele de *Arthrospira platensis* au provocat o vacuolizare pronunțată a citoplasmei, în special cele de argint la concentrație de 0,5 μM. Contactul cu nanoparticule duce la eliberarea unei cantități mai mari de polimeri extracelulari care formează un strat mai gros de exopolizaharide. După cum s-a menționat anterior, straturile externe de polizaharide joacă un rol protector împotriva compușilor toxici, inclusiv a nanoparticulelor. Imagini tipice pentru stresul provocat de metalele grele și alcool etilic în concentrație de 4 ml/l sunt prezentate în anexa 7, fig. A7.1.

Imaginile prezentate mai sus reflectă modificările tipice care au fost identificate pe parcursul monitorizării ultrastructurii la *Arthrospira platensis* în condiții de stres oxidativ. Per total au fost analizate 251 imagini pentru diferite stări de stres oxidativ și 60 imagini pentru cultura de spirulină în condiții optime. Rezultatele identificării devierilor de la normă sunt generalizate în tabelul 7.1.

**Tabelul 7.1. Frecvența modificărilor ultrastructurale la *Arthrospira platensis* în condiții de stres oxidativ**

Tip de modificare	Tip de stres						% modificări	
	Martor, N=60	Hipotermie, 20°C, N=45	Xenobiotice			Nano-biosinteză, N=45	Martor	Condiții de stres
			Etanol, N=18	Nanoparticule, N=39	Metale grele, N=44			
Dezorganizarea tilacoizilor	3	2	16	24	38	21	5% (3/60)	40.2% (101/251)
Lipsa carboxizomilor	4	5	2	12	18	14	6.7% (4/60)	20.3% (51/251)
Deteriorarea învelișurilor celulare	2	3	4	6	14	8	3.3% (2/60)	13.9% (35/251)
Plazmoliză	0	0	0	4	5	17	0	10.4% (26/251)
PHA	8	4	2	28	28	21	13.% (8/60)	33.1% (83/251)
Vacuolizare	4	6	4	31	26	19	6.7% (4/60)	34.3% (86/251)

Din cele observate putem afirma că doar hipotermia moderată nu provoacă modificări ultrastructurale semnificative la spirulină, în timp ce stresul pe durata nanobiosintezei, contactului cu nanoparticulele și metalele grele, interacțiunii cu etanolul, duce la multiple abateri structurale de la normă. Cele mai frecvente modificări sunt dezorganizări ale sistemului de membrane fotosintetice. Ținând cont de faptul că practic în toate variantele de stres avem o creștere semnificativă a conținutului de dialdehidă malonică în celule, care este un produs final al

degradării oxidative a lipidelor, vizualizarea dezorganizărilor tilacoidale este o confirmare a faptului că ținta radicalilor liberi formați ca rezultat al stresului sunt în primul rând membranele celulare. În cazul tilacoizilor vorbim despre membrane funcționale, dar stresul provoacă și deteriorări ale membranelor structurale, în cazul procariotelor aceasta fiind membrana celulară. Cu toate că acest tip de dezorganizare ultrastructurală sub formă de ruptură de membrană celulară se întâlnește mai rar, el este totuși prezent în special în cazul stresului provocat de metale grele cu valență variabilă (Cu, Fe), ceea ce este în concordanță cu teoria de formare a radicalilor liberi și declanșarea reacțiilor Haber-Weiss și Fenton.

Modificările asociate cu carboxizomii și granulele de polihidroxicianoați indică asupra modificărilor care intervin în metabolismul glucidelor, care în situații de stres este orientat spre acumulare de rezerve de carbon și energie ori formare de structuri de protecție și bariere fizice. Vacuolizarea excesivă a celulelor de spirulină este un fenomen, care este natural pentru celulele bătrâne, în proces de autoliză, sau prezintă un mecanism de evitare a condițiilor nocive prin tendința de ridicare la interfața mediu acvatic/aer. În cazul contactului cu metalele grele, fenomenul este întâlnit mai des și reflectă cel mai probabil comportamentul de evitare.

### ***7.1.2. Modificări ale expresiei genelor asociate cu stresul și efectele lor fiziologice la *Arthrospira platensis****

În cadrul studiului de față una dintre sarcini a fost de a evidenția modificarea expresiei unor gene asociate cu răspunsul generalizat la condițiile de stres. În acest scop, în condiții de stres a fost măsurată abundența transcripțională a genelor proteinei de șoc termic (*hsp90*), glutamat sintetazei (cunoscută și ca glutamin oxoglutarat aminotransferază - *GOGAT*), fier-superoxid dismutazei (*FeSOD*), peroxidazei (*POD*), subunității mari Rubisco (*rbcL*), peroxiredoxinei (*per*) și proteinei reglatoare a absorbției ferului (*fur*).

Cercetările anterioare au arătat că celulele cianobacteriene pot modifica expresia unui număr de gene ca răspuns la condiții stresante, cum ar fi genele care codifică proteinele de șoc termic sau genele implicate în activitatea metabolică și producerea de enzime antioxidante [222, 277, 309].

Genele proteinelor FeSOD și POD codifică două dintre cele mai importante enzime antioxidante de primă linie ale spirulinei - superoxid dismutază fier componentă și peroxidază. Prima enzimă catalizează reacția de dismutare a radicalului superoxid în peroxid de hidrogen, iar peroxidazele - reacția de descompunere a peroxidului în apă și oxigen. În lipsa catalazei, spirulina conține un alt grup de enzime implicate în metabolismul peroxidului de hidrogen - peroxidazele nonhemice, numite peroxiredoxine. Aceste proteine omniprezente sunt capabile să reducă

hidroperoxizii organici și anorganici cu electroni furnizați în principal de NADPH sau NADH, și diferite proteine [365]. Gena *per* la *Arthrospira* este expresată în condiții de stres oxidativ ca răspuns la prezența peroxidului de hidrogen [382].

Pe lângă producerea de enzime antioxidante, mecanismele de apărare ale cianobacteriilor în relație cu factorii de stres provoacă includerea altor gene asociate cu răspunsul la stres, cum ar fi genele proteinelor de șoc termic (*hsp*), ribulozo bisofosfat carboxilaza/oxigenaza (Rubisco), glutamat sintază GOGAT [215]. Proteinele șocului termic (*hsp*) sunt implicate nu numai în cazul stresului termic, ci și în alte forme de stres, deoarece asigură stabilitatea proteinelor și evitarea plierii lor greșite [146, 215, 270, 333].

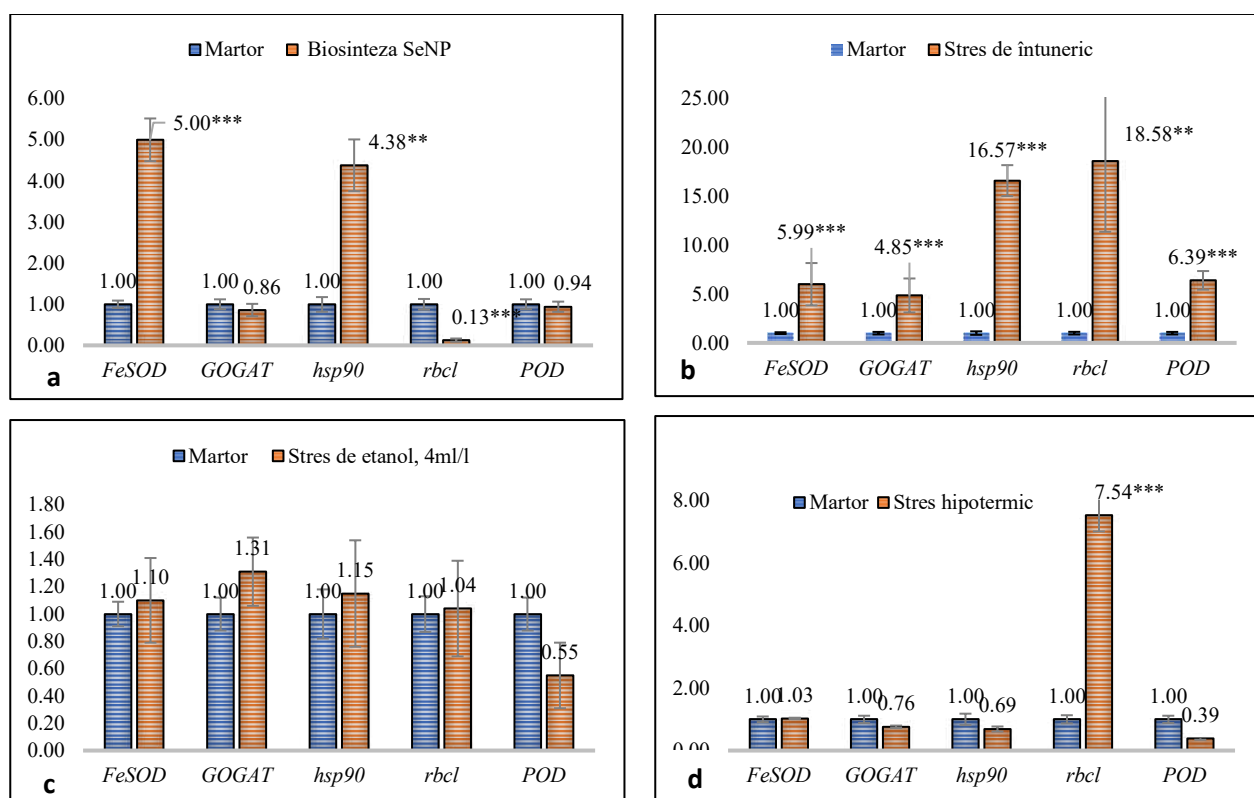
În multe situații de stres se observă superexpresia genelor *hsp*. De exemplu, reglarea ascendentă a *hsp90* a fost observată la cultivarea spirulinei la temperaturi mai mici sau mai mari decât cea optimă [215]. Rolul proteinelor șocului termic în adaptarea la condițiile de stres oxidativ cauzat de factori fizici (radiații) și chimici (acțiunea metil viologenului) a fost demonstrat, de exemplu, la *Synechococcus* sp. [209].

Gena *rbcL* este implicată în asigurarea creșterii organismelor fotosintetice și a activității metabolice necesare pentru menținerea vieții, la fel ca gena *GOGAT*, care codifică enzima glutamat sintaza [146, 215, 270, 333]. *rbcL* este implicată direct în asimilarea carbonului, asigurând astfel procesul de fotosinteză și creșterea organismului, iar *GOGAT* catalizează reacția de formare a glutamatului din glutamină și 2-oxoglutarat. Modificarea nivelului de expresie a *rbcL* se observă la cianobacterii în diferite condiții de stres oxidativ, de exemplu în condiții de temperaturi scăzute sau stres osmotic [299].

Proteina reglatoare a absorbției fierului (FUR– ferric uptake regulator) este o moleculă reglatoare, care se găsește la majoritatea procariotelor, inclusiv la spirulină. Deși proteina FUR este cunoscută în mod special pentru reglarea mai multor gene sensibile la fier, aceasta este implicată într-o varietate de căi metabolice [234]. FUR, direct sau indirect, controlează expresia genelor enzimelor antioxidante, care asigură protecția împotriva SRO. Deși rolul FUR ca represor este bine documentat, există dovezi emergente care demonstrează că aceasta poate activa și ca un activator al genelor menționate [436].

Nivelul de expresie a genelor de interes a fost studiat în diferite condiții de stres: stres de întuneric; stres hipotermic moderat; stres provocat de diferite xenobiotice (pământuri rare și etanol); stres pe durata nanobiosintezei SeNP (figura 7.3). Figura 7.3a reprezintă diferența dintre cultura martor și cea supusă procesului de nanobiosinteză a SeNP în ceea ce ține de expresia a cinci dintre genele de interes descrise mai sus. Creșterea expresiei relative a genei FeSOD este previzibilă în condiții de stres. În studiul de față, condițiile de stres nu au fost confirmate prin

monitorizarea modificărilor producției de biomasă sau a modificărilor parametrilor biochimici. În schimb, creșterea de 5 ori a expresiei FeSOD în comparație cu controlul poate fi considerată o dovadă a unui stres oxidativ nefavorabil în celulele *A. platensis* care realizează nanosinteza SeNP. Situația se poate complica în timp, deoarece nivelul de expresie al peroxidazelor a rămas la nivelul matorului, aceste enzime fiind responsabile de îndepărtarea produsului de reacție (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) format ca urmare a activității superoxid dismutazei. În condiții de sinteză a SeNP în celulele de *A. platensis* s-a observat o creștere a abundenței transcripționale a *hsp90* (de 4,4 ori față de mator), ceea ce indică necesitatea menținerii stabilității proteinelor celulare în condiții de stres. În același timp, abundența transcripțională a genei *rbcl*, din contra, a scăzut puternic, de 7,7 ori față de mator. Astfel, modificarea expresiei a trei gene asociate cu stresul din cele 5 studiate confirmă faptul că cultura de *A. platensis* a fost expusă unui stres cauzat de prezența selenitului de sodiu în calitate de precursor și realizarea nanobiosintezei SeNP, deși aparent cultura cianobacteriană s-a dezvoltat normal [99].



**Fig.7.3. Diferența de expresie relativă a genelor asociate răspunsului la stresul oxidativ, între mator și situația de stres la *Arthrospira platensis*: a – biosinteza nanoparticulelor de Se; b – stres de întuneric (24 ore); c- stres de etanol (4 ml/l); d -stres hipotermic 20°C**  
 (\*\* - p< 0.01, \*\*\* - p< 0.001)

Figura 7.3b prezintă rezultatele cu referire la modificarea expresiei genelor de interes în celulele *A. platensis* care au fost supuse condițiilor de întuneric pe durata a 24 ore. Această situație

este unică din punct de vedere a nivelului de expresie a genelor implicate în răspunsul la situația de stres oxidativ comparativ cu toate celelalte situații analizate prin mărirea semnificativă a abundenței transcripționale pentru toate cele 5 gene analizate. O atare stare a lucrurilor este asociată cu dereglarea principalului proces vital realizat de cianobacterie – fotosinteza, dispariția pigmentilor carotenoizi și dereglarea tuturor proceselor de asimilare și de îndepărtare a speciilor reactive ale oxigenului. O situație total opusă se atestă în cazul stresului provocat de etanol, adăugat în cantitate de 4 ml/l de mediu. În acest caz nu au fost observate devieri semnificative din punct de vedere statistic de la nivelul normal de expresie a celor 5 gene (Figura 7.3c). În cazul stresului hipotermic moderat se modifică nivelul de expresie a două dintre genele monitorizate – scade abundența transcripțională a genei *POD* de aproape 3 ori și crește expresia genei *rbcL* de 7,5 ori (figura 7.3d).

Expresia genelor asociate cu protecția antioxidantă la spirulină a fost studiată în cazul acumulării a unor pământuri rare în biomasă. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 7.2.

**Tabel 7.2. Expresia relativă a genelor asociate cu stresul în condițiile contactului spirulinei cu pământuri rare**

Factorul de stres	Diferența de expresie relativă a genelor față de control						
	<i>FeSOD</i>	<i>POD</i>	<i>GOGAT</i>	<i>rbcL</i>	<i>Hsp90</i>	<i>per</i>	<i>fur</i>
Gd	0.91	0.61*	0.08***	4.01***	0.27**	0.26**	0.50
Ho	1.25	0.80	0.07***	5.80***	0.38**	0.37**	0.17**
Nb	1.47***	0.88	0.28***	4.83***	0.84	0.53	0.18***
Pr	1.52**	0.94	0.21***	4.79***	0.39**	0.47*	0.35*
Y	1.68***	0.60*	0.10***	7.00***	0.44**	0.36**	0.09***

\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001

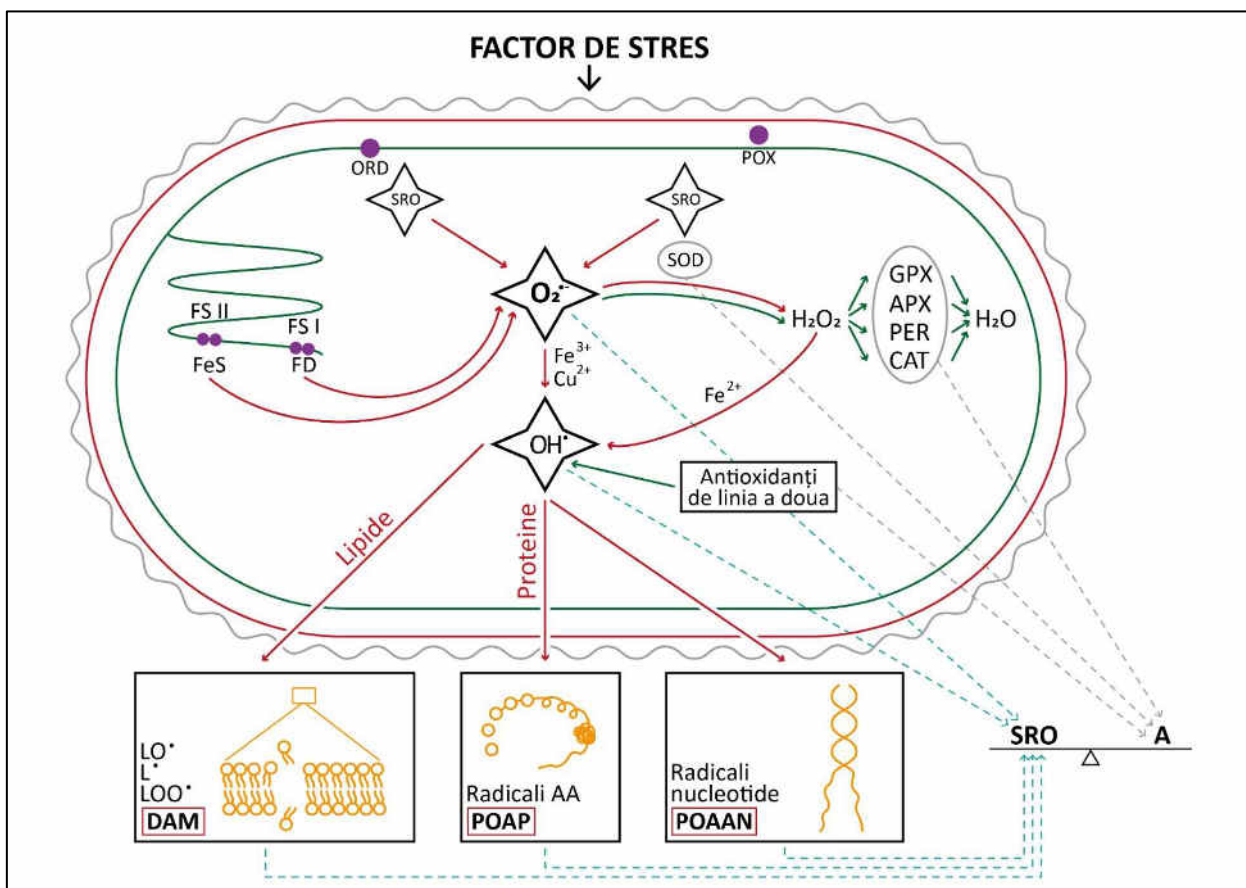
Pentru două dintre genele expresia cărora a fost cuantificată în toate 5 variante experimentale abundența transcripțională s-a schimbat conform aceluiași algoritm: expresia *GOGAT* a scăzut de 3-12 ori, iar expresia *rbcL* a crescut de 4 -7 ori. Expresia genelor *POD*, *hsp90*, *per* și *fur*, de asemenea, a scăzut în toate variantele experimentale, doar că în unele dintre cazuri diferențele nu sunt veridice din punct de vedere statistic (tabelul 7.2).

Este evident că toate modificările care se produc în celulele supuse acțiunii stresului de orice origine, au la bază mecanisme complicate moleculare de intervenție în căile metabolice generale. Scopul acestei lucrări nu este de a descifra în genere mecanismele de apariție, instalare și propagare a stresului, ci de identificare a unor elemente particulare ale acestor mecanisme cu valoare biotehnologică, adică care pot fi presupuse, identificate și gestionate în cadrul tehnologiilor de obținere a biomasei ficologice valoroase și sigure pentru consum.

În unele dintre cazurile examinate, efectele diferitor tipuri de stres sunt explicate printr-o dezechilibrare a statutului antioxidant al spirulinei prin supraexpresia genelor unor enzime din



prima linie de protecție antioxidantă și subexpresia altor gene ale enzimelor din același grup. În special, atrage atenție creșterea nivelului de expresie a FeSOD, activitatea produsului de translare a căreia este formarea de peroxid de hidrogen și, în același timp, diminuarea nivelului de expresie a genelor, produsele cărora asigură detoxifierea celulelor prin înlăturarea peroxizilor. Schematic, apariția acestui dezechilibru și consecințele lui pot fi urmărite în figura 7.4.

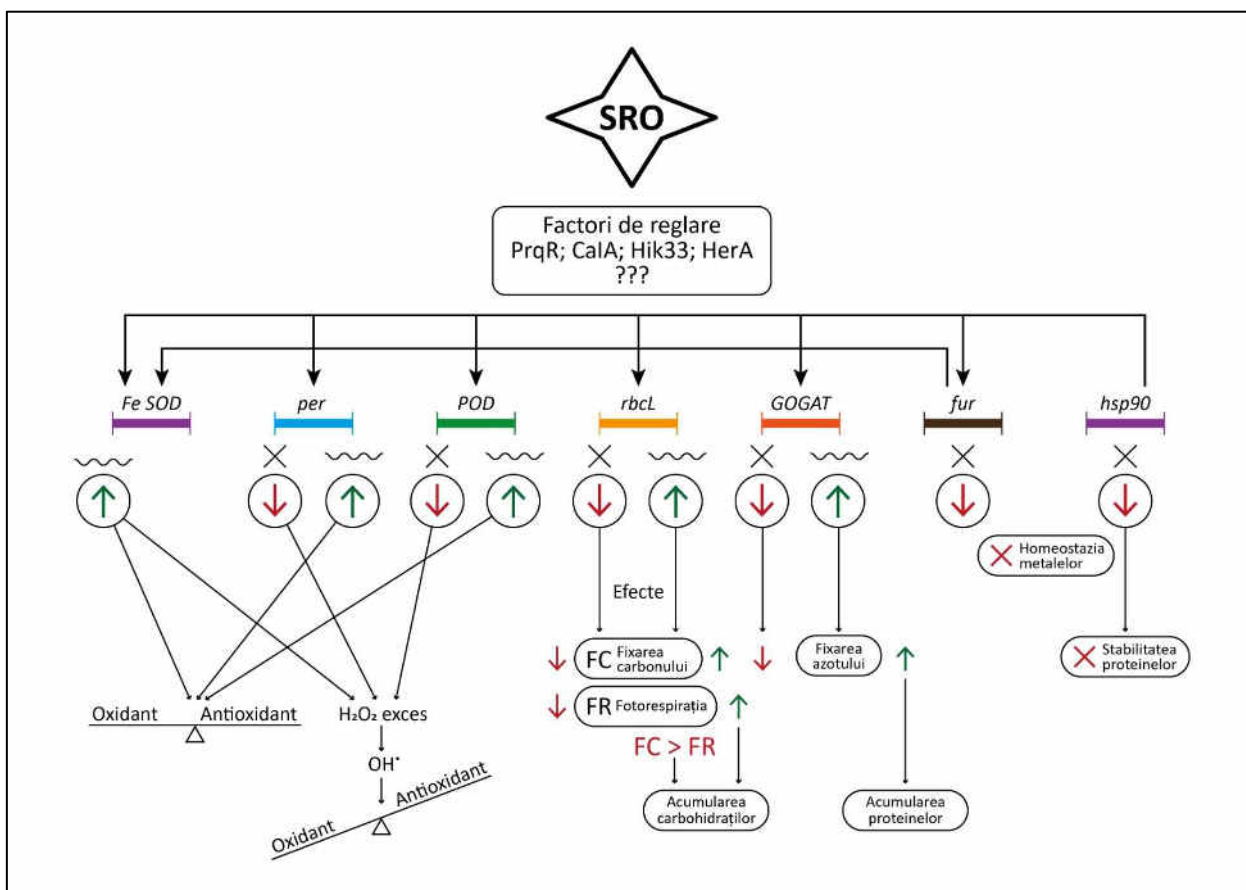


**Fig.7.4. Apariția și consecințele dezechilibrului activității enzimelor antioxidante primare la *Arthrospira platensis* (explicațiile sunt în text)**

Superoxidradicalul este printre primele specii reactive care se formează în celule ca răspuns la acțiunea diferitor factori, dar și ca urmare a proceselor fiziologice normale din celulă. Cele mai active centre de formare a acestei SRO la microalge și cianobacterii sunt oxidoreductaza membranei citoplasmice, peroxidaza apoplastică, clusterelor FeS și ferredoxina fotosistemelor I și II. O parte din radicalul superoxid este consumată în reacțiile de transducție de semnal, o altă parte este utilizată în calitate de substrat de superoxid dismutază. În rezultatul acestei reacții se formează peroxidul de hidrogen, care este neutralizat de catalază, dar și de o serie de alte enzime (glutathion peroxidaza, ascorbat peroxidaza, peroxidoxina), implicate în neutralizarea și altor tipuri de peroxizi, decât cel de oxigen. În cazul unei activități înalte a superoxid dismutazei fără o creștere coordonată a activității enzimelor implicate în degradarea peroxidului de hidrogen, acesta

din urmă generează radicalul hidroxil prin intermediul reacțiilor de oxidoreducere cu implicarea metalelor cu grad de oxidare variabil (preferențial  $Fe^{2+}$ ). De asemenea, în condițiile prezenței în mediul celular a metalelor cu valență variabilă, în special a  $Fe^{3+}$  și  $Cu^{2+}$ , o parte din radicalul superoxid nu ajunge să fie preluat de superoxidismutază, ci este implicat în reacțiile Fenton și Haber-Weiss cu formarea radicalului hidroxil. Antioxidanții din linia a doua de protecție pot înlătura excesul de SRO în stări fiziologice normale. În condiții de stres, excesul de SRO duce la aceea că sunt atacate toate tipurile de macromolecule strategice pentru celulă, proces ce finalizează cu formarea produselor de oxidare profundă a biopolimerilor și cu dezechilibrarea redox, care duce la instalarea stării de stres oxidativ (figura 7.4).

Modificarea expresiei genelor asociate răspunsului la stres amplifică efectele fiziologice ale stresului prin afectarea multiplelor procese vitale în celulele cianobacteriene (figura 7.5).



**Fig.7.5. Modificările expresiei unor gene asociate cu stresul și efectele lor fiziologice la cianobacteria *Arthrospira platensis* (explicațiile sunt în text)**

Gena proteinei șocului termic *hsp90* în 7 din cele 9 situații de stres studiate în această lucrare a fost caracterizată prin abundență transcripțională redusă comparativ cu martorul. Așa cum produsul translațional al acestei gene este responsabil de stabilitatea multiplelor proteine structurale și funcționale și de formarea corectă a structurilor terțiare și cuaternare proteice,

presupunem că subexpresia ei are efecte asupra tuturor celorlalte produse ale genelor asociate cu stresul. Expresia redusă a *hsp90* poate duce la reducerea stabilității și asamblarea eronată a structurilor superioare ale proteinelor, inclusiv a enzimelor căilor metabolice de bază și ar putea contribui semnificativ la manifestarea efectelor generalizate ale stresului în celulele afectate.

O altă genă pentru care s-a constatat o expresie redusă comparativ cu martorul a fost gena proteinei reglatoare a absorbției fierului - *fur*. Proteina reglatoare a absorbției de fier este responsabilă de menținerea echilibrului metalelor în celule și poate afecta expresia altor gene, care au în situsul de reglare poziția specifică pentru legarea fierului. Dintre genele asociate cu stresul studiate de noi la această categorie se referă gena *FeSOD*, care poate fi afectată de dezechilibrul metalelor ca rezultat al subexpresiei genei *fur*.

În condiții de stres, nivelul de expresie a *GOGAT* în majoritatea cazurilor studiate a scăzut și doar în cazul stresului de întuneric a fost observată creșterea lui. Scăderea semnificativă a abundenței transcripționale pentru *GOGAT* este asociată cu o scădere a eficienței asimilării azotului și deci, cu o diminuare a producției primare la microorganismele fotosintezante. În condițiile creșterii nivelului de expresie a *GOGAT* are loc o asimilare eficientă a azotului, care se exprimă în creșterea conținutului de proteine în biomasă, fapt foarte important pentru spirulină, care este un superproducător de proteină ideală.

Mărirea abundenței transcripționale a *rbcL*, produsul căreia este responsabil de asimilarea carbonului anorganic, poate fi o dovadă a reorientării metabolismului cianobacterian în direcția sintezei de carbohidrați atât în calitate de rezervă de energie, cât și ca structură de protecție. Cu toate acestea, produsul transcripțional *rbcL* este responsabil și de fotorespirație. Așa cum nivelul de transcripție al genei poate atât să crească, cât și să scadă, efectele fiziologice generate pot fi foarte diferite. Indiferent de direcția de modificare a abundenței transcripționale *rbcL*, atunci când intensitatea procesului de fixare a carbonului domină asupra intensității procesului de fotorespirație, în celule are loc acumularea rezervelor de carbohidrați.

## **7.2. Identificarea și caracterizarea stării de stres în baza intensității proceselor oxidative**

Activitatea vitală normală în celulele cianobacteriilor și microalgelor prezintă o permanentă interacțiune dintre procesul de formare a radicalilor liberi și speciilor reactive și procesul de eliminare a SRO. Între aceste două fluxuri orientate în sensuri inverse există un echilibru dinamic, care în anumite circumstanțe este încălcat. Condiții ale dezechilibrului descris sunt mai multe, principalele fiind inducerea autooxidării compușilor endogeni în proporții care depășesc normalitatea; acțiunea unor compuși exogeni, care sunt oxidați ei înșiși în celulele

microalgelor și cianobacteriilor sau provoacă oxidarea compușilor endogeni; epuizarea rezervei de antioxidanți sau blocarea mecanismelor de sinteză a lor; producerea insuficientă sau activitatea joasă a enzimelor antioxidante ș.a. Starea caracterizată prin dezechilibru dintre formarea și distrugerea speciilor reactive ale oxigenului este definită drept stres oxidativ. În același timp, se consideră că pentru a defini clar starea de stres oxidativ este necesar de a prezenta și unele dovezi ale modificărilor fiziologice care se produc la nivel de răspuns celular în raport cu acțiunea deteriorantă a speciilor reactive ale oxigenului. Cele mai elocvente modificări în acest sens în experiențele realizate sunt cele asociate cu modificarea activității enzimelor antioxidante, cu atât mai mult că acestea pot fi analizate atât din punct de vedere al activității enzimatică nemijlocite, cât și a expresiei genelor acestor enzime. Mai mult, modificarea activității enzimelor antioxidante în calitate de dovadă a manifestării stresului oxidativ este luată în considerare de cercetători cu referire la diferite organisme vii, care fac parte din diverse grupuri sistematice [279].

Din punct de vedere tehnologic, în procesul de cultivare a cianobacteriilor și microalgelor și de realizare a controlului de calitate a biomasei, este important de a identifica dependențe între anumiți parametri productivi și markerii stresului, care să fie ușor de identificat prin analize de rutină, simple și reproductibile. În scopul realizării acestui obiectiv au fost analizate rezultatele obținute pe durata monitorizării ciclurilor vitale la *Spirulină*, *Nostoc* și *Porfiridium* în laborator și producere industrială, în condiții optime și în condiții de stres hipotermic, de fotoperiodism, și stres metalic. Menționăm că în cazurile analizate stresul instalat în culturi a fost identificat preferențial prin deviații de la martor ale activității antioxidante, mărirea cantității de dialdehidă malonică și modificarea cantității unor macrocomponente ale biomasei de microalge și cianobacterii, și nu prin scăderea drastică a productivității. Rezultatele analizei corelaționale pentru datele obținute pentru loturile martor a celor 3 culturi ficologice în condiții de laborator și de producere industrială sunt prezentate în tabelul 7.3. În condiții optime pe durata ciclului vital cantitatea markerului stresului oxidativ- DAM, corelează strâns cu cantitatea lipidelor în biomasă. Acest lucru este firesc, așa cum DAM este un produs final al degradării lipidelor – proces ce are loc la un anumit nivel controlat de mecanisme moleculare fine în condiții fiziologice normale – atunci cantitatea de lipide potențial supuse oxidării determină nivelul produsului obținut în această reacție. În linii generale, vorbim despre sinteza compensatorie de lipide necesară pentru repararea membranelor structurale și funcționale deteriorate prin procese fiziologice naturale.

Corelația dintre DAM și biomasă poate fi explicată prin faptul că analiza s-a efectuat pe un set de date colectate în dinamică, pe durata ciclului vital, iar creșterea cantității de biomasă se produce odată cu ”îmbătrânirea” culturilor. Procesele autooxidative sunt mai pronunțate la finalul fazei de creștere exponențială și în faza staționară, când cantitatea de biomasă, de asemenea, este

maximală. Astfel, corelația dintre acești doi parametri este determinată de varierea valorilor acestor parametri sub influența aceluiași fenomene mai degrabă, decât de faptul că acești parametri sunt determinați/influențați unul de celălalt.

**Tabelul 7.3. Corelația dintre valorile principalilor parametri monitorizați pe lotul total de probe martor în dinamică pe durata ciclului vital pentru tulpinile *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11, *Nostoc linckia* CNMN-CB-03, *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01 (în baza datelor din anexa 4)**

	<i>Biomasa</i>	<i>Proteine</i>	<i>Lipide</i>	<i>Glucide</i>	<i>Ficobiline</i>	<i>DAM</i>	<i>ABTS h</i>	<i>ABTS h/e</i>	<i>ABTS e</i>	<i>Fenoli</i>
Biomasa	1.000									
Proteine	-0.463	1.000								
Lipide	0.966	-0.526	1.000							
Glucide	-0.215	-0.670	-0.175	1.000						
Ficobiline	-0.298	0.907	-0.353	-0.805	1.000					
DAM	0.893	-0.442	0.938	-0.218	-0.264	1.000				
ABTS h	0.023	-0.688	0.058	0.776	-0.772	0.021	1.000			
ABTS h/e	0.340	-0.425	0.434	0.468	-0.481	0.316	0.149	1.000		
ABTS e	-0.198	-0.232	0.066	0.117	-0.531	-0.363	-0.183	0.422	1.000	
Fenoli	0.098	0.279	0.196	0.074	0.035	-0.544	-0.354	0.310	-0.035	1.000

A fost demonstrat anterior că hipertermia și fotoperiodism sunt factori, care provoacă o stare de stres care poate fi tolerată cu ușurință de către culturile de cianobacterii atât în condiții de laborator, cât și în condiții de producere industrială. La nivel fiziologic, acesta se manifestă prin modificări statistic semnificative ale mai multor parametri ai culturilor, dar în același timp aceste modificări sunt foarte aproape de valorile normale pentru tulpinile studiate. Pentru loturile experimentale, în cazul acestor două tipuri de stres a fost realizat același tip de analiză corelațională ca și pentru lotul martor, iar rezultatele sunt prezentate în tabelul 7.4.

Menționăm, în primul rând, lipsa corelărilor identificate în cazul loturilor martor dintre markerul DAM pe de o parte și cantitatea de lipide / biomasă pe de altă parte. Aceasta înseamnă că cantitatea DAM nu mai este determinată doar de procesele naturale care au loc pe durata ciclului vital al cianobacteriilor, ci este rezultatul unei stări clare de stres. În același timp, apare corelația strânsă negativă între DAM și proteine – situație care se identifică în special în condiții de acțiune a factorilor nocivi asupra culturilor de cianobacterii și microalge (Rudi ș.a., 2020). În acest caz, coeficientul de corelație este  $r=-0.621$  ( $p<0.05$ ).

Și mai puternică este această corelație, dacă pentru analiză sunt luate doar datele obținute pentru cele două tipuri de stres, două culturi, în condiții de laborator. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 7.5.

**Tabelul 7.4. Corelațiile dintre valorile principalilor parametri monitorizați pe lotul total de probe stres termic și de fotoperiodism în dinamică pe durata ciclului vital în laborator și în producere pentru tulpinile *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 și *Nostoc linckia* CNMN-CB-03 (în baza datelor din anexa 4)**

	<i>Bioma- sa</i>	<i>Protei- ne</i>	<i>Lipi- de</i>	<i>Gluci- de</i>	<i>Ficobi- line</i>	<i>DAM</i>	<i>ABTS h</i>	<i>ABTS h/e</i>	<i>ABTS e</i>	<i>Fe- noli</i>
Biomasa	1.000									
Proteine	-0.230	1.000								
Lipide	0.381	-0.220	1.000							
Glucide	0.051	-0.865	0.067	1.000						
Ficobiline	0.413	-0.485	0.139	0.222	1.000					
DAM	0.021	-0.621	0.191	0.725	-0.008	1.000				
ABTS h	0.011	0.173	-0.14	-0.213	-0.021	-0.09	1.000			
ABTS h/e	-0.296	-0.254	0.097	0.380	-0.201	0.475	-0.16	1.000		
ABTS e	0.309	-0.110	0.157	0.061	0.453	-0.06	0.266	-0.23	1.000	
Fenoli	-0.031	-0.531	0.159	0.662	0.249	0.625	-0.04	0.466	0.355	1.000

**Tabelul 7.5. Corelațiile dintre valorile principalilor parametri monitorizați pe eșantionul total de probe stres termic și de fotoperiodism în dinamică pe durata ciclului vital în laborator pentru tulpinile *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11, *Nostoc linckia* CNMN-CB-03, *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01 (în baza datelor din anexa 4)**

	<i>Bioma- sa</i>	<i>Protei- ne</i>	<i>Lipide</i>	<i>Gluci- de</i>	<i>Ficobi- line</i>	<i>DAM</i>	<i>ABTS h</i>	<i>ABTS h/e</i>	<i>ABTS e</i>	<i>Fenoli</i>
Biomasa	1.000									
Proteine	-0.235	1.000								
Lipide	-0.021	-0.208	1.000							
Glucide	0.231	-0.904	-0.05	1.000						
Ficobiline	-0.046	-0.700	0.415	0.550	1.000					
DAM	0.511	-0.825	0.194	0.820	0.459	1.000				
ABTS h	0.272	0.155	0.046	-0.03	-0.049	0.150	1.000			
ABTS h/e	-0.308	-0.330	0.027	0.392	0.149	0.356	0.005	1.000		
ABTS e	0.032	-0.209	0.096	0.228	0.380	0.153	0.430	-0.03	1.000	
Fenoli	-0.009	-0.740	0.138	0.813	0.594	0.660	0.148	0.533	0.447	1

Pentru datele colectate în condiții de laborator atât valoarea coeficientului de corelație cât și nivelul de semnificație sunt mai mari:  $r=-0.825(p<0.01)$ . Rezultatele analizei corelaționale pentru datele din experiențele de monitorizare a parametrilor productivi și de activitate antioxidantă la 3 culturi ficologice în condiții de stres provocat de ionii de cupru, în condiții de laborator și producere sunt prezentate în tabelul 7.6.

Aparent, rezultatele obținute par a fi foarte apropiate de cele caracteristice situației pentru lotul martorilor din experiențele cu stres indus. Avem corelări strânse pozitive între DAM pe de o parte și biomasă / lipide pe de altă parte. Doar că spre deosebire de martor, în cazul stresului indus

de cupru corelările respective sunt determinate de alte fenomene. Cupru este un inductor recunoscut al acumulării de lipide în biomasa cianobacteriilor și microalgeilor. În acest caz lipidele acumulate în celule au preponderent funcții de rezervă, față de funcția structurală. De exemplu, în cazul spirulinei, în celule predomină membranele funcționale – cele tilacoidale. Cu toate acestea, în pofida unei cantități înalte de lipide în biomasă, membranele tilacoidale sunt decompactizate, și mai puține, zone mari ale citoplasmei fiind lipsite de ele (poate fi vizualizat pe imaginile TEM, anexa 7). În acest caz starea de stres poate fi identificată prin corelația strânsă negativă dintre DAM și valorile testului ABTS (extract hidro-etanolic),  $r=0.774$  ( $p<0.05$ ). Această dependență corelațională pare a fi clară din punct de vedere cauză-efect și ar putea fi un criteriu valoros pentru identificarea stărilor de stres în culturile ficologice. Cel mai probabil această situație poate fi asociată cu epuizarea rezervelor de compuși cu efect antioxidant (scăderea valorilor testului ABTS) și intensificarea proceselor de peroxidare în lipsa protectorilor (creșterea valorilor testului TBARS).

**Tabelul 7.6. Corelațiile dintre valorile principalilor parametri monitorizați pe eșantionul total de probe stres provocat de prezența cuprului în dinamică pe durata ciclului vital pentru tulpinile *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11, *Nostoc linckia* CNMN-CB-03, *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01 (în baza datelor din anexa 4)**

	<i>Biomasa</i>	<i>Proteine</i>	<i>Lipide</i>	<i>Glucide</i>	<i>Ficobiline</i>	<i>DAM</i>	<i>ABTS h</i>	<i>ABTSh/e</i>
Biomasa	1.000							
Proteine	-0.350	1.000						
Lipide	0.961	-0.298	1.000					
Glucide	-0.440	-0.633	-0.476	1.000				
Ficobiline	-0.068	0.760	-0.112	-0.690	1.000			
DAM	0.900	-0.324	0.956	-0.400	-0.155	1.000		
ABTS h	-0.022	-0.086	-0.107	0.255	-0.291	-0.246	1.000	
ABTS h/e	-0.812	0.884	-0.821	-0.249	0.769	-0.774	-0.211	1.000

Menționăm, că analiza corelațională realizată s-a bazat pe datele obținute în dinamică pe durata ciclului vital al culturilor ficologice de importanță biotehnologică. Rezultatele obținute prezintă interes pentru monitorizarea proceselor atunci când este aplicat un factor de stres de o intensitate cunoscută (o singură valoare), iar efectul se urmărește în derulare, pe durata unui ciclu tehnologic. Acestea ne pot sugera intervalul de timp în care starea de stres poate fi gestionată eficient de cultură, și momentul indicat pentru colectarea biomasei în scopul garantării siguranței produsului finit.

Utilizarea diferitor compuși cu efect stimulator devine tot mai des un element indispensabil al biotehnologiilor, care urmăresc scopul sintezei dirijate a compușilor cu activitate biologică înaltă de către microalge și cianobacterii. Aplicând diferite substanțe active, se poate obține atât mărirea cantității de biomasă, cât și modificarea semnificativă în direcția dorită a componentei biochimice a acestei biomase. Dacă anterior în asemenea cercetări se urmărea doar obținerea unui efect maxim din punct de vedere cantitativ cu referire la produsul dorit, acum se pune clar sarcina de a urmări siguranța acestuia. Astfel, în cazul cercetărilor orientate spre identificarea dozelor optime de stimulatori aplicați este insuficient de a avea în calitate de indicator de monitorizare doar un singur parametru – cel de interes. Este necesar cel puțin încă un parametru care să caracterizeze starea de stres oxidativ în cultură.

Scopul cercetărilor realizate în continuare a constat în verificarea aplicării parametrului corelației negative între DAM și valorile testului ABTS, despre care am vorbit anterior, în experiențele de identificare a valorilor optime ale stimulatorilor pe exemplul utilizării nanoparticulelor metalice de dimensiuni mici în scopul obținerii biomasei cu conținut înalt de lipide. Figura 7.6 include rezultatele obținute în cadrul a 4 experiențe de testare a efectelor nanoparticulelor de aur, argint și cupru asupra spirulinei și a celor de argint asupra dunaliei.

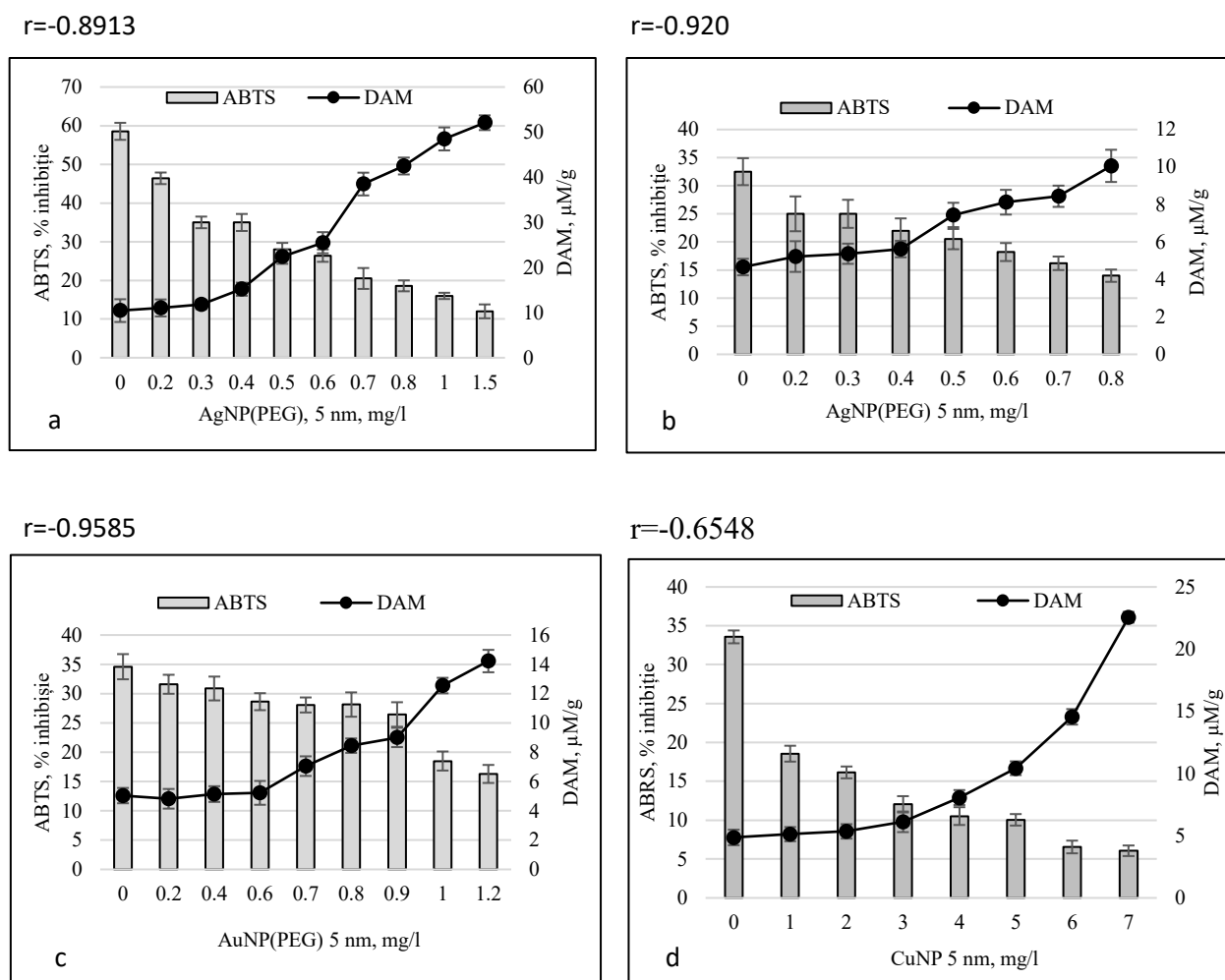
Pentru fiecare tip de nanoparticule a fost identificat un diapazon de concentrații în care stimulatorul are efectele dorite asupra culturilor ficologice. Pe acest diapazon de concentrații, care diferă în dependență de cultură și tip de nanoparticule, s-au realizat experiențe de acumulare, iar la finalul acestora, în afară de parametrul de interes (în cazul nostru cantitatea de lipide în biomasă) se măsoară cantitatea de DAM și valorile testului ABTS pentru extractul hidro-etanolic de 55%. Rezultatele obținute arată că avem o corelație strânsă negativă între cei doi parametri studiați în cazul nanoparticulelor de aur și argint, cu un nivel înalt de semnificație ( $p < 0.001$ ). În cazul nanoparticulelor de cupru, de asemenea, se atestă o relație invers proporțională între cantitatea de DAM și valorile testului ABTS.

Din punct de vedere tehnologic, este indicat de a alege concentrațiile stimulatorului în jurul zonei de valori minime pentru ambii parametri. În baza acestui principiu au fost elaborate și brevetate 4 procedee de cultivare a spirulinei și dunaliei în scopul obținerii de biomasă cu un conținut înalt de lipide. Procedeele vor fi descrise în următorul subcapitol.

Clasificarea stărilor de stres este un lucru extrem de dificil, abordat de cercetători din diverse domenii – de la biologie moleculară la medicină personalizată, pe marginea căruia încă nu există un consens. Una dintre cele mai reușite clasificări din punct de vedere biotehnologic este cea propusă de Lushchak [279]. Cu toate că este o clasificare bazată pe mecanisme identificate și descifrate pentru celulele eucariote animale, în esență sa reflectă clar fenomenele asociate cu



stresul atât la cianobacterii, cât și la microalge. Conform acestei teorii, în conformitate cu nivelul de intensitate a stresului se conturează 3 tipuri de stres: stres de intensitate înaltă; stres de intensitate intermediară și stres de intensitate joasă. Nivelul de intensitate a stresului, la rândul său, este determinat de căile de semnalizare implicate în declanșarea stresului; produsul molecular (molecular outcome) și produsul fiziologic (physiological outcome) generat în condițiile de stres.



**Fig. 7.6. Relația dintre valorile DAM și valorile testului ABTS, extract hidro-etanolic, la contactul culturilor ficologice cu diferite concentrații de nanoparticule: a – *Dunaliella salina*, AgNP, 5 nm; b – *Arthrospira platensis*, AgNP, 5 nm; c - *Arthrospira platensis*, AuNP, 5 nm; d - *Arthrospira platensis*, CuNP, 5 nm**

Căile de semnalizare se consideră că există în stresul de intensitate joasă și intermediară. Pentru cianobacterii și microalge există numeroase cercetări care au permis identificarea unor căi de semnalizare în condiții de stres oxidativ de diferită genă. Astfel, în prezent în calitate de semnalizatori în condiții de stres sunt considerați factorii Sigma, sistemele cu două componente, regulatorii transcripționali și ARNs-ului reglator care acționează fie separat, fie în combinație,

inducând răspunsuri adecvate la stres [349]. Cunoașterea căilor și mecanismelor de semnalizare în caz de stres sunt importante pentru asigurarea unui suport solid cercetărilor biotehnologice, dar sunt încă departe de finalizare, astfel că, la nivel practic, clasificarea intensității stresului se face în baza celorlalte două criterii. În conformitate cu acestea, *stresul oxidativ de intensitate joasă* se caracterizează la nivel de produs molecular prin modificarea cantității și activității enzimelor antioxidante, iar la nivel de produs fiziologic – prin manifestarea unui răspuns adaptiv.

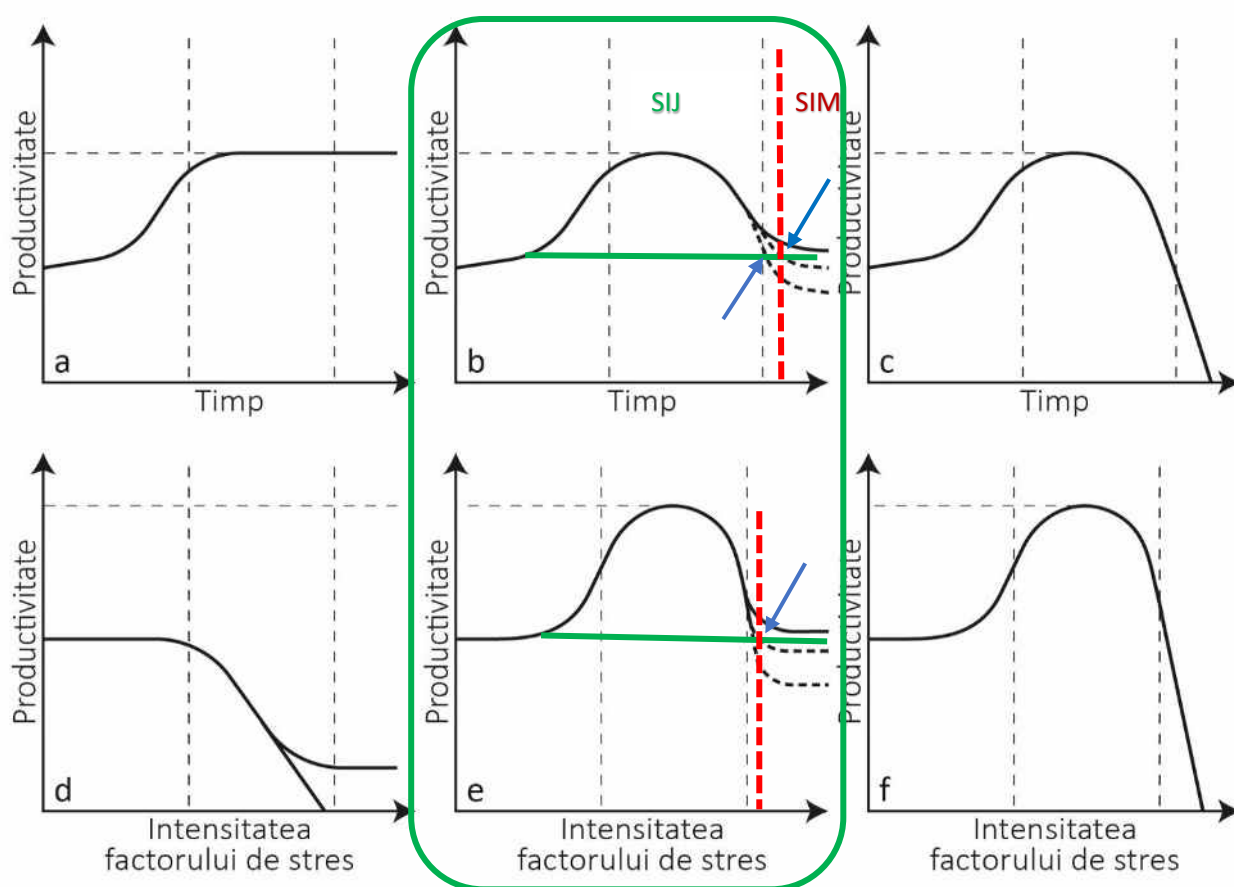
*Stresul oxidativ de intensitate intermediară* se caracterizează la nivel de produs molecular suplimentar enzimelor antioxidante, prin modificări la nivel de manifestare a proteinelor șocului termic și altor factori prooxidanți. La nivel de produs fiziologic, în cazul acestui tip de stres se manifestă un răspuns combinat: adaptare și daune produse.

*Stresul oxidativ de intensitate înaltă* are în calitate de produs fiziologic moartea celulară, și deci nu prezintă interes din punct de vedere al aplicării lui în calitate de instrument biotehnologic. Astfel, situațiile de stres de intensitate joasă și intermediară au fost cele luate în considerare la elaborarea procedeelelor biotehnologice. În figura 7.7 sunt prezentate patternuri de derulare a stresului oxidativ în dependență de timp (a-c) sau în dependență de intensitatea factorului de stres (d-f), care au fost elaborate în baza rezultatelor prezentate în această lucrare.

Figura 7.7, a-c, reflectă situația în care asupra culturii ficologice se acționează cu un anumit factor de stres, în scopul de a obține un produs final (biomasă sau componente ale biomasei) într-o cantitate mai mare și reprezintă esența procedeelelor de stimulare care sunt aplicate la etapa actuală în ficobiotehnologie. Deci din start, este clar că nu așteptăm un răspuns negativ din partea culturilor, factorul aplicat nefiind nociv sau cu efect toxic major. În această situație, pe durata ciclului de cultivare a microalgelor și cianobacteriilor, în dependență de natura factorului aplicat se observă 3 situații diferite: creșterea parametrului productiv de interes până la un anumit nivel și menținerea lui până la finalul ciclului de cultivare (fig.7.7.a); creșterea valorii factorului până la un anumit nivel, după care urmează o scădere a acestuia până la nivelul inițial sau apropiat de acesta (fig.7.7.b) și creșterea valorii factorului productiv până la un anumit nivel, urmată de o cădere sub limita de acceptare (fig.7.7.c). Toate situațiile descrise implică posibilitate de implementare în ficobiotehnologie, oferind un interval de timp pe durata căruia este posibil de a colecta produsul în cantitatea pronosticată și de calitate dorită.

Intensitatea optimă a factorului aplicat în situațiile descrise poate fi identificată prin experiențe cu valori variabile ale acestuia. Figura 7.7.d-f reflectă alte 3 patternuri de răspuns a culturilor ficologice la acțiunea factorilor de stres cu intensitate variabilă. Astfel, este posibil ca factorul testat să nu posede potențial stimulator, și atunci derulează situația descrisă în figura 7.7.d.

Creșterea intensității factorului în anumite limite nu produce modificarea parametrului de interes, după care efectul generat devine negativ, iar valoarea parametrului de interes scade.



**Figura 7.7. Patternuri de derulare a stresului oxidativ la cianobacterii și microalge: a, b,c – în timp, după acțiunea factorului de stres de intensitate cunoscută; d,e,f – la finalul ciclului vital în dependență de intensitatea factorului de stres**

Situațiile descrise în figura 7.7.e-f scot în evidență o zonă de intensitate a factorului în care sunt manifestate reacții benefice – creșterea valorii parametrului de interes. Această zonă poate fi identificată în condiții de aplicare a unui stimulator veritabil (fig.7.7.e), când după această zonă, creșterea intensității factorului duce la o scădere a valorilor parametrului de interes până la valoarea inițială sau una apropiată de aceasta. În această situație este posibil de delimitat stresul de intensitate joasă de cel de intensitate intermediară, identificând așa numitul *punct zero echivalent* [279]. De asemenea, o zonă de concentrații preferențiale este definită și în cazul când se manifestă efectul hormesis a substanței testate. După zona de stimulare urmează o cădere a valorilor parametrului sub valoarea lui inițială (fig.7.7.f). Prezintă interes situațiile descrise în

figura 7.7 e și 7.7 f, când pot fi identificate valori ale intensității factorului de stres care asigură o cantitate maximă de produs.

În figura 7.7, în chenar verde sunt luate patternurile cele mai favorabile pentru aplicare în ficobiotehnologie în scopul obținerii unui produs calitativ și sigur. Cu linie verde orizontală este indicat nivelul parametrului până la aplicarea factorului de stres/factorului stimulator. Cu linie punctată roșie este dată limita de timp sau intensitatea factorului de stres la care valoarea parametrului monitorizat revine la valoarea de până la aplicarea stresului. Săgețile albastre indică punctele echivalente zero, care servesc ca puncte de delimitare dintre stresul de intensitate joasă (SIJ) și stresul de intensitate medie (SIM). Zona caracteristică stresului de intensitate joasă este domeniul în care pot fi aplicate biotehnologiile de obținere a produsului ficologic nativ – biomasă de calitate prestabilă. Zona caracteristică stresului de intensitate intermediară, de asemenea, își are aplicațiile sale în biotehnologie – în această zonă se produc procesele de biofuncționalizare, bionanosinteză și bioremediere.

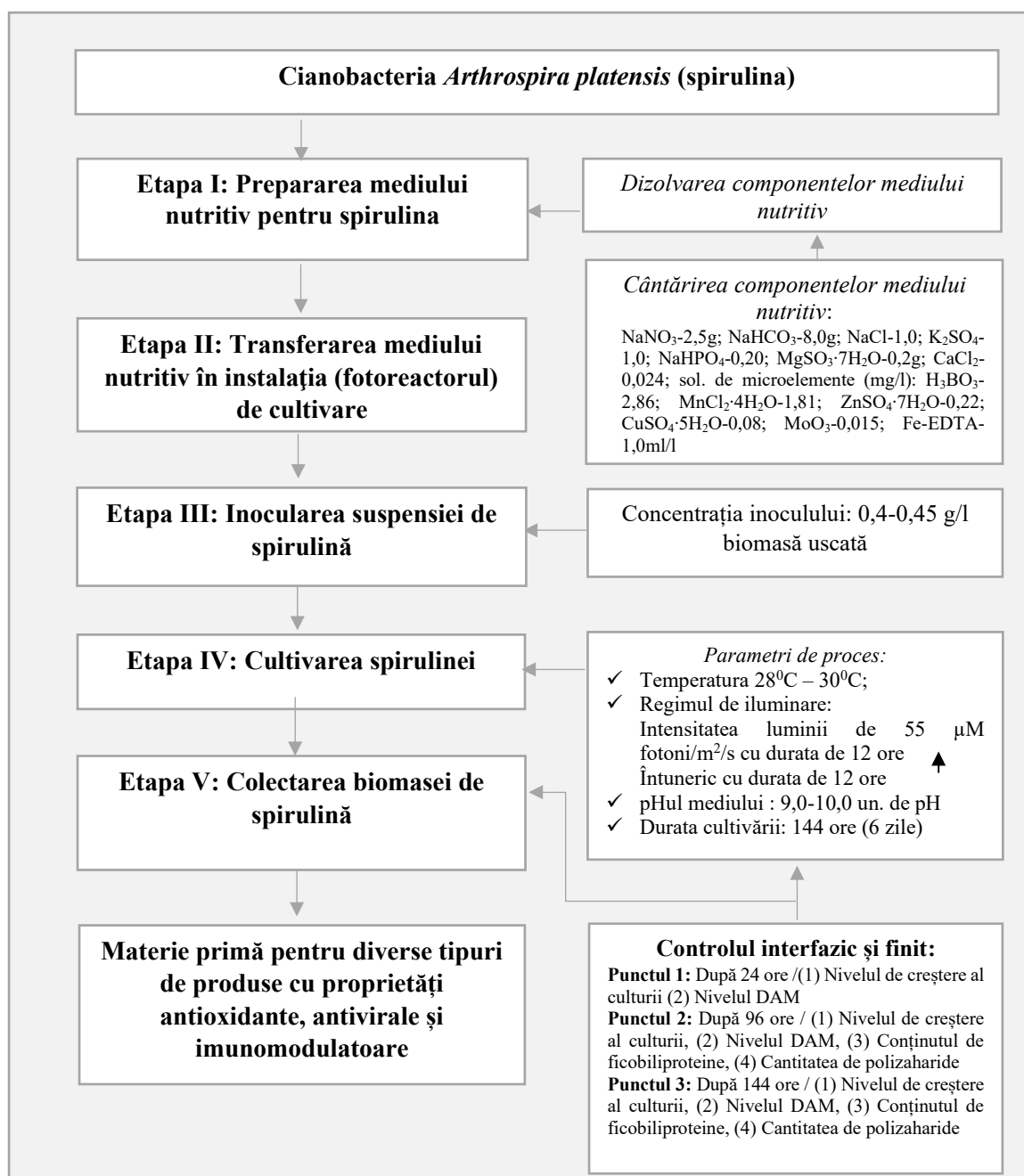
### **7.3. Aplicații ale stresului oxidativ în ficobiotehnologie**

Principiile de instalare și derulare a stresului oxidativ identificate și descrise anterior au fost aplicate pentru elaborarea mai multor procedee biotehnologice, unele dintre care sunt prezentate în continuare. Toate procedeele se bazează pe rezultatele prezentate anterior, în capitolele 4-7 și au stat la baza unor brevete de invenție obținute și implementate în practica de producere ficologică la întreprinderea cu profil biotehnologic și farmaceutic Ficotehfarm.

#### ***7.3.1 Procedeu de dirijare a conținutului de compuși biologic activi (ficobiliproteinele și polizaharidele) la cultivarea în condiții industriale a spirulinei***

În Figura 7.8 este redată schema procedurii de dirijare a conținutului de ficobiliproteine și polizaharide în procesul de cultivare industrială a cianobacteriei *A. platensis* (spirulina). Conform rezultatelor analizate în capitolul 4, p. 4.2, pentru a dirija sinteza ficobiliproteinelor și polizaharidelor în procesul de cultivare industrială a spirulinei, poate fi aplicat în calitate de instrument biotehnologic *stresul bazat pe aplicarea fotoperiodismului*: 12 ore lumină: 12 ore întuneric. Acest tip de stres apreciat ca fiind de intensitate joasă asigură obținerea începând cu ziua a 6-a și până la sfârșitul ciclului de creștere industrială a spirulinei – ziua a 10-a, atât a unei cantități mai mare de biomasă, cât și cu conținut înalt de ficobiliproteine și polizaharide. Cu toate acestea, markerul cheie al siguranței calității biomasei – dialdehida malonică, în același interval de cultivare al spirulinei (ziua 6-10) crește, ceea ce defavorizează biomasa în calitatea ei de materie

primă pentru obținerea principiilor active cu proprietăți antioxidante, antivirale și imunomodulatoare.



**Fig. 7. 8. Schema de derulare a procedurii de dirijare a conținutului de biomasă, ficobiliproteine și polizaharide în procesul de cultivare industrială a cianobacteriei *A. platensis* (spirulina)**

Nivelurile DAM demonstrează că finalul ciclului de producere industrială a biomasei de spirulină cu cantități sporite de ficobiliproteine (17,07%) și polizaharide (17,9) poate servi ziua a 6-a, în care se determină cele mai scăzute niveluri de DAM – 5,64μM/g biomasă (comparativ cu ziua a 10-a – 7,696 μM/g biomasă). Un ciclu de producere a materiei prime biotehnologice cu 4

zile mai redus, de asemenea este un avantaj tehnologic. Procedul propus se realizează conform următoarelor etape tehnologice și succesiuni de proceduri operaționale: Etapa I: Prepararea mediului nutritiv pentru spirulină; Etapa II: Transferarea mediului nutritiv în instalația (fotoreactorul) de cultivare; Etapa III: Inocularea suspensiei de spirulină; Etapa III: Cultivarea spirulinei în scopul producerii de biomasă, ficobiliproteine și polizaharide – materie primă pentru diverse tipuri de produse cu proprietăți antioxidante, antivirale și imunomodulatoare; Etapa V: Colectarea biomasei de spirulină. Succesiunile operaționale pentru fiecare dintre etapele fluxului tehnologic sunt incluse în Anexa 8.

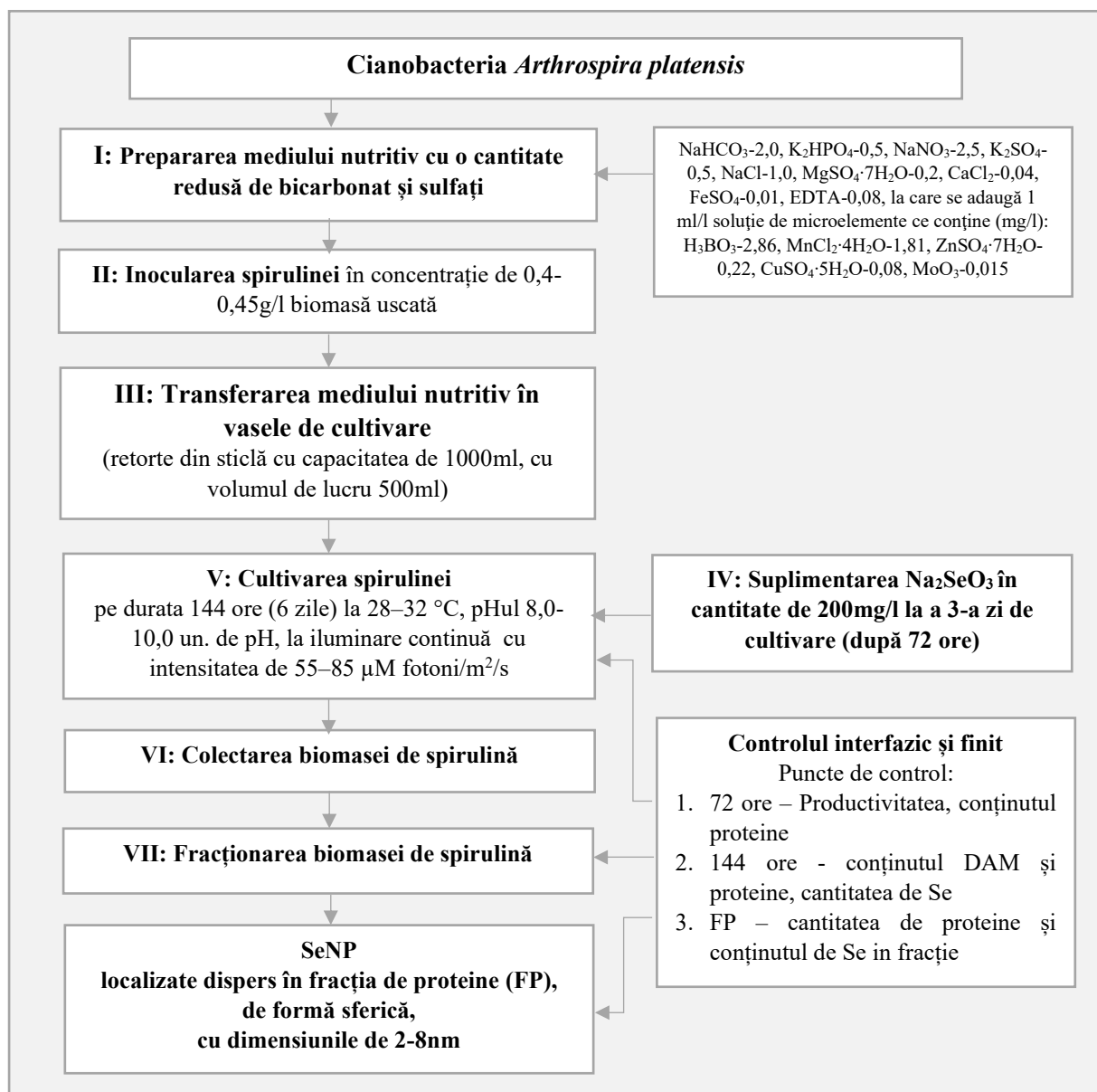
### ***7.3.2 Procedee de biosinteză a nanoparticulelor de argint (AgNP) și seleniu (SeNP) cu ajutorul obiectelor de interes ficologic***

În continuare sunt generalizate procedeele de biosinteză a nanoparticulelor de seleniu și argint cu ajutorul cianobacteriilor și microalgelor de interes ficologic. În Figura 7.9. este redat procedul de biosinteză a nanoparticulelor de seleniu în procesul de creștere a culturii de spirulină.

*Procedul de biosinteză a nanoparticulelor de seleniu* include realizarea etapelor: (1) prepararea variantei de mediu nutritiv SP-1 cu o cantitate redusă de bicarbonat de sodiu și sulfați:  $\text{NaHCO}_3$ -2,0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -0,5,  $\text{NaNO}_3$ -2,5,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ -0,5,  $\text{NaCl}$ -1,0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2,  $\text{CaCl}_2$ -0,04,  $\text{FeSO}_4$ -0,01, EDTA-0,08, la care se adaugă 1 ml/l soluție de microelemente ce conține (mg/l):  $\text{H}_3\text{BO}_3$ -2,86,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -1,81,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,22,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,08,  $\text{MoO}_3$ -0,015; (2) inocularea în mediul nutritiv a spirulinei reieșind din calculul de 0,4-0,45g/l biomasă uscată; (3) transferarea culturii de spirulină a câte 500 ml în retorte de cultivare din sticlă cu volumul total de 1000 ml; (4) cultivarea spirulinei timp de 144 ore (6 zile) la temperatura de 28–32 °C, pH-ul 8,0-10,0, la iluminare continuă cu intensitatea de 55–85  $\mu\text{M}$  fotoni/ $\text{m}^2/\text{s}$ . Cultura se supune agitării în fiecare zi pe durata a două ore. (5) Biosinteza nanoparticulelor de seleniu de către cultura vie de spirulină începând din ziua a treia de cultivare (72 ore) prin adăugarea sursei de seleniu – selenitul de sodiu în cantitate de 200mg/l; (6) colectarea biomasei de spirulină; (7) fracționarea biomasei cu obținerea fracției de proteine ca site de localizare a nanoparticulelor de seleniu formate prin biosinteză de către cultura vie de spirulină.

Pentru controlul interfazic și final în cadrul procedului sunt prestabilite 3 puncte: 1. după 72 ore cu determinarea conținutului de proteine și a nivelului de creștere a culturii; 2. după 144 ore cu estimarea conținutului DAM, proteine și cantității de seleniu în biomasa colectată și 3. în fracția proteică a biomasei cu determinarea cantității de proteine și conținutului de seleniu în aceasta. Procedul cu aplicarea tehnicii de biosinteză a nanoparticulelor de seleniu de către cultura

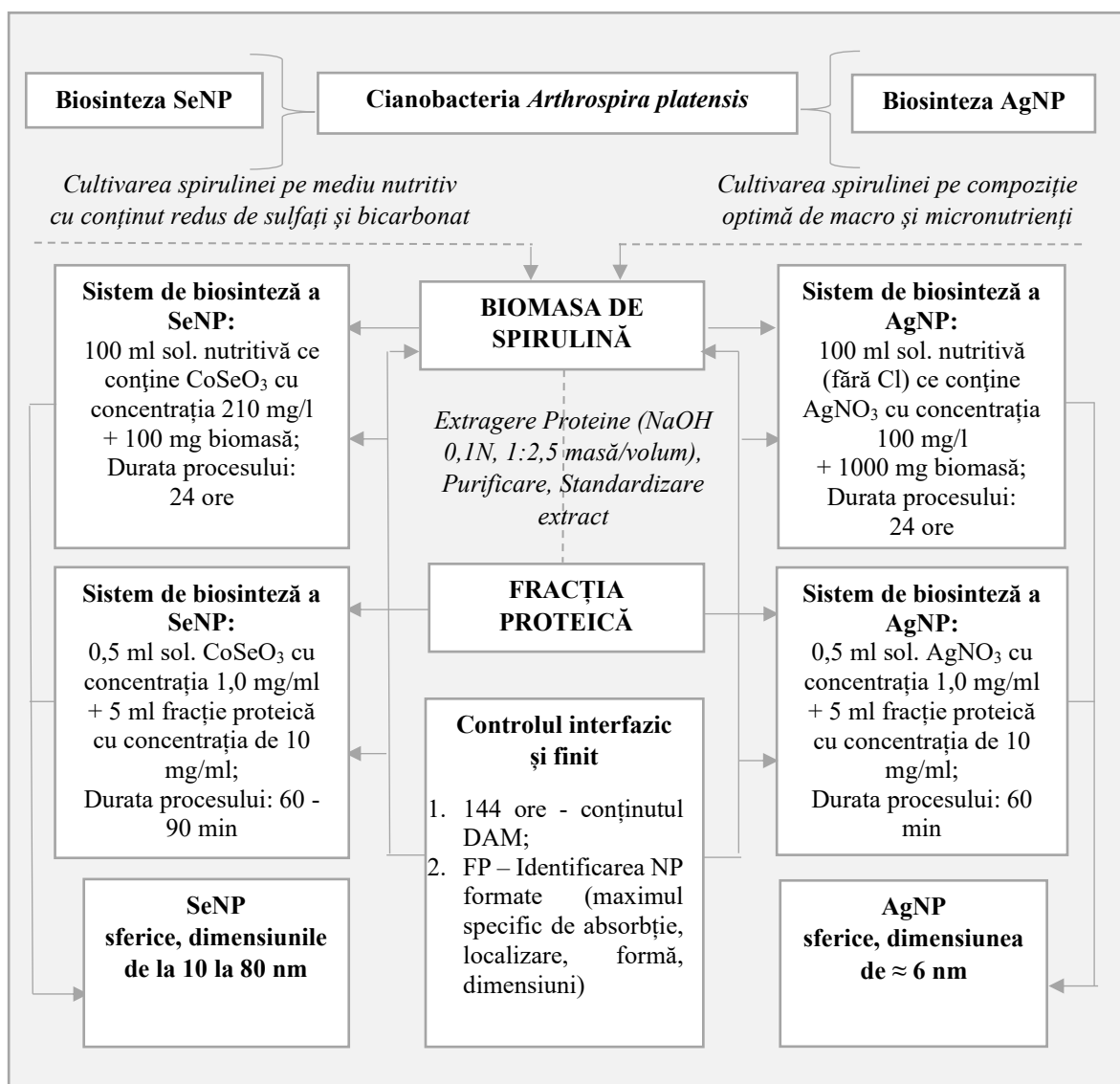
vie de spirulină asigură biosinteza acestui tip de nanoparticule cu localizarea lor în fracția proteică a spirulinei, de formă sferică, dispersate, cu dimensiunea de 2-8 nm.



**Fig 7.9. Procedeu de biosinteză a nanoparticulelor de seleniu cu implicarea culturii vii de spirulină**

*Procedee de biosinteză a nanoparticulelor de argint sau seleniu cu utilizarea biomasei și fracțiilor biologic active din spirulina* pot fi realizate în baza schemei generalizate din figura 7.10. Acest tip de procedee de biosinteză a nanoparticulelor de argint sau seleniu include realizarea a patru componente tehnologice: 1) obținerea biomasei prin cultivarea spirulinei pe mediu nutritiv mineral cu compoziția optimă de macro- și micronutrienți în condiții și la parametri optimali de temperatură, pH și iluminare pe durata a 6 zile (144 ore) și colectarea biomasei; 2) obținerea

fracției proteice din biomasa de spirulină; 3) realizarea biosintezei de nanoparticule de argint sau seleniu utilizând biomasa în calitate de matrice și 4) efectuarea procesului de biosinteză a nanoparticulelor de argint sau seleniu pe fracția proteică derivată din spirulina în calitate de suport; 5) Controlul interfazic și final este efectuat prin: 1. Determinarea în biomasa de spirulină sau în fracțiile biologic active a nivelului markerului de siguranță – DAM, și 2. Estimarea conținutului de DAM, identificarea maximelor de absorbție pentru Ag sau Se în nanoparticulele formate la finalul procesului de biosinteză. Aplicarea procedeeilor cu implicarea biomasei și a fracției proteice din spirulină asigură: formarea nanoparticulelor de Ag sferice cu dimensiunile de aproximativ 6 nm și a nanoparticulelor de Se sferice cu dimensiunile de la 10 la 80 nm.



**Fig. 7.10. Schema generalizată a proceselor de biosinteză a nanoparticulelor de argint sau seleniu cu implicarea biomasei și fracțiilor biologic active din spirulina**



Biosinteza AgNP sau a SeNP poate fi realizată și cu utilizarea în calitate de suport a biomasei și fracției polizaharidice obținute din cianobacteria *Nostoc linckia*, conform schemei din Figura 7.11.



**Fig. 7.11. Etapele de derulare a proceselor de biosinteză a AgNP sau a SeNP pe suport de biomasă și polizaharide din *Nostoc linckia***

Prima componentă tehnologică a procedeelor propuse constă în obținerea biomasei de nostoc. În acest scop, nostocul se cultivă pe mediul mineral Gromov 6 ce conține: macroelemente, g/l - KNO<sub>3</sub> - 0,5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,45, NaHCO<sub>3</sub> - 0,05, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,1, CaCl<sub>2</sub> - 0,11 și microelemente, mg/l - ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,05, MnSO<sub>4</sub> - 2,0, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - 0,85,

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 2,25,  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 4,0,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot \text{H}_2\text{O}$  - 0,009, EDTA - 4,75 cu agitare zilnică timp de două ore, la iluminare continuă cu intensitatea de  $37 \mu\text{M}$  fotoni/ $\text{m}^2/\text{s}$ , la temperatura de 25-30°C, pH-ul de 6,0–7,0 un. de pH. În faza staționară, a 10-a zi de cultivare, biomasa de nostoc se separă de mediul de cultură prin centrifugare. Biomasa se spală cu o soluție de acetat de amoniu de 3,5% pentru a înlătura surplusul de săruri de pe suprafața masei celulare, iar în cazul  $\text{Ag}^+$  pentru a evita reacția acestuia cu ionii de  $\text{Cl}^-$  și  $\text{PO}_4^{3-}$ . Frația de polizaharide sulfatate se obține prin adăugarea la biomasă a  $\text{H}_2\text{O}$  distilată în raport de 1:3 masă/volum, fierberea amestecului la temperatura de 100°C timp de 1 oră, răcirea și centrifugarea, acidularea supernatantului cu sol. 0,5N HCl până la pH 3,8-4,0, pentru înlăturarea proteinelor prin precipitare izoelectrică, centrifugarea și purificarea fracției lichide pe  $\text{Al}_2\text{O}_3$  bazic până la înlăturarea colorației verzi-albastre. Se verifică pH-ul ca valoarea să fie 7-8 și concentrația după substanța uscată de 10mg/ml.

Procesele de biosinteză a AgNP sau SeNP respectă următoarele succesiuni și parametri:

I: Biosinteza AgNP:

1. *Sistemul Ag + biomasa de nostoc*: 300 mg biomasă se resuspendează în 100ml (retorte Erlenmeyer cu capacitatea de 250ml) soluție apoasă de  $\text{AgNO}_3$  cu concentrația de 100mg/l. Mixul reactant se supune agitării la temperatura de 28-30°C pentru 24 ore.

2. *Sistemul Ag + polizaharidele din nostoc*: la 5ml extract de polizaharide sulfatate cu concentrația de 10mg/ml se adaugă 0,5ml sol.  $\text{AgNO}_3$  de 10mg/ml. Mixul reactant se supune agitării la temperatura de 28-30°C timp de 6 ore.

II: Biosinteza SeNP:

1. *Sistemul Se + biomasa de nostoc*: 500 mg biomasă se resuspendează în 100ml (retorte Erlenmeyer cu capacitatea de 250ml) soluție apoasă de  $\text{CoSeO}_3$  de 100mg/l. Mixul reactant se agită la temperatura de 28-30°C pe durata a 24 ore.

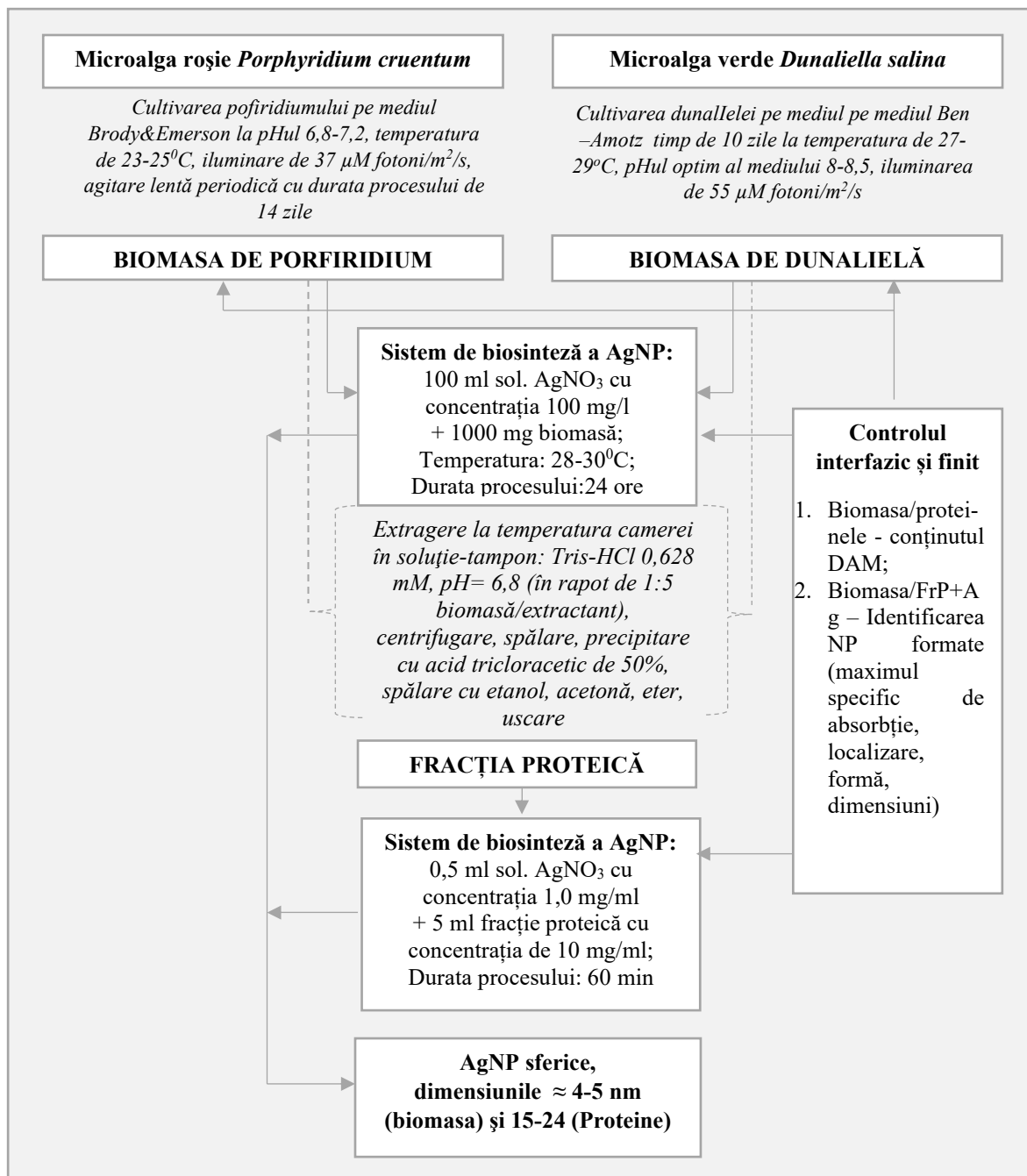
2. *Sistemul Se + polizaharidele din nostoc*: la 5ml extract de polizaharide sulfatate cu concentrația de 10mg/ml se adaugă 0,5ml sol.  $\text{CoSeO}_3$  de 10mg/ml. Mixul reactant se supune agitării la temperatura de 28-30°C timp de 120 min.

Controlul interfazic și finit în cadrul procedurilor se realizează în biomasa colectată și fracția de polizaharide derivată din nostoc prin determinarea nivelului markerului de stres – DAM (p.1) și în nanoparticulele de Ag sau Se formate la finalul procesului de biosinteză prin (p. 2) – se determină conținutul de DAM, se identifică maximele de absorbție pentru Ag sau Se.

Procedeele asigură formarea nanoparticulelor de argint de formă sferică cu dimensiunile de 4-5nm, iar polizaharidele - formarea AgNP de natură cristalină cu dimensiunile de 12-30nm

Nanoparticulele de seleniu formate pe matrice de biomasă și polizaharide din nostoc sunt de formă sferică cu dimensiunile între 4-5nm.

În Figura 7.12 sunt prezentate procedeele de biosinteză a nanoparticulelor de argint cu utilizarea biomasei și fracțiilor biologic active de origine microalgală, procedee elaborate pe baza algei roșii *Porphyridium cruentum* și algei verzi *Dunaliella salina*.



**Fig. 7.12. Procedee de biosinteză a nanoparticulelor de argint cu utilizarea biomasei și fracției proteice a algei roșii *Porphyridium cruentum* și algei verzi *Dunaliella salina***

Componenta de obținere a biomasei microalgale include etapele:

I: Obținerea biomasei de porfiridium: Pentru obținerea biomasei, microalga roșie *Porphyridium cruentum* se inoculează în cantitate de 0,5-0,6 g/l biomasă uscată în mediul nutritiv Brody&Emerson cu următoarea compoziție: macroelemente (g/l): KCl - 16,04, NaCl - 12,52, KNO<sub>3</sub>-1,24, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O - 2,5, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O - 0,25, KI - 0,05, KBr - 0,05, FeEDTA - 1,0 ml, și microelemente (mg/l): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>- - 2,86, MnCl<sub>2</sub> · 7H<sub>2</sub>O - 1,81, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O - 0,22, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O - 0,08; MoO<sub>3</sub> - 0,015. Cultivarea se efectuează la pH-ul 6,8-7,2, temperatura de 23-25<sup>0</sup>C, iluminare de 37 μM fotoni/m<sup>2</sup>/s, agitare lentă periodică cu durata procesului de 14 zile. La acest termen, biomasa se separă de mediul de cultură prin centrifugare, se spală de săruri pentru a evita reacția ionilor de Ag<sup>+</sup> cu ionii de Cl<sup>-</sup> cu soluție de acetat de amoniu de 3,5%, se standardizează la concentrația de 100mg/ml.

II: Obținerea biomasei de dunalielă se realizează prin cultivarea algei pe mediul Ben - Amotz cu următoarea componență: *macroelemente în g/l*: NaCl - 120; NaNO<sub>3</sub> - 0,5; NaHCO<sub>3</sub> - 2,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0,05; MgSO<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,75; Fe-EDTA - 0,05 ml; *soluția de microelemente 1ml/l, ce conține în mg/l*: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-2,86; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O-1,81; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O-0,08; MoO<sub>3</sub>-0,015. Pe durata cultivării timp de 10 zile se respectă parametrii și condițiile de cultivare: cantitatea de cultură start (inocul) - 0,4-0,45g/l biomasă uscată; temperatura de 27-29<sup>0</sup>C, pH-ul optim al mediului 8-8,5 un. de pH, iluminarea de 55 μM fotoni/m<sup>2</sup>/s. La finalul cultivării, biomasa se separă de mediul de cultură prin centrifugare, se spală cu soluție de acetat de amoniu de 3,3-4,5% și soluție de hidroxid de amoniu de 4,4-8,8% în scopul înlăturării clorurii de sodiu și a ionilor bivalenți. Biomasa se standardizează la concentrația de 100mg/ml.

III: Obținerea fracției de proteine din biomasa de porfiridium/dunalielă: Proteinele se extrag la temperatura camerei în soluție-tampon: Tris-HCl 0,628 mM, pH= 6,8 (în raport de 1:5 biomasă/extractant). La 100,00 ml Tris-HCl se adaugă 5,00 ml glicerină, 1,00 ml β-mercaptoetanol, 0,10 g Trilon B și 0,50 g acid ascorbic 0,03%, se agită timp de 30 min., se centrifugează 15 min la 7000-10000 rot/min. Supernatantul se colectează, iar sedimentul se spală de 2 ori cu extragent proteic. Proteinele se precipită cu acid tricloracetic de 50%, până la concentrația finală de 5%, se spală cu etanol, acetonă, eter și se usucă.

#### IV: Biosinteza AgNP:

1. *Sistemul Ag + biomasa porfiridium/dunalielă*: 1000 mg biomasă microalgală se resuspendează în 100ml (retorte Erlenmeyer cu capacitatea de 250ml) soluție apoasă de AgNO<sub>3</sub> cu concentrația de 100mg/l. Mixul se supune agitării la temperatura de 28-30<sup>0</sup>C pe durata 24 ore.

2. *Sistemul Ag + proteinele din porfiridium/dunalelă*: la 5ml extract de proteine microalgale cu concentrația de 10mg/ml se adaugă 0,5ml sol. AgNO<sub>3</sub> de 10mg/ml. Mixul se supune agitării la temperatura de 28-30<sup>0</sup>C pe 6 ore.

Punctul 1 al controlului interfazic și finit la executarea acestor procedee prevede determinarea conținutului markerului de stres DAM în biomasa de porfiridium/dunalielă și în proteinele microalgale, iar punctul 2 de control – determinarea DAM, înregistrarea maximului de absorbție pentru Ag, efectuarea TEM (pentru a determina forma și dimensiunile) a nanoparticulelor de Ag biosintetizate pe suport de biomasă sau proteine microalgale.

Sistemele constituite în cadrul procedeelelor propuse asigură formarea AgNP de formă sferică (în ambele cazuri) cu dimensiunile de 4-5nm (biomasa) și de 15-24nm (proteine).

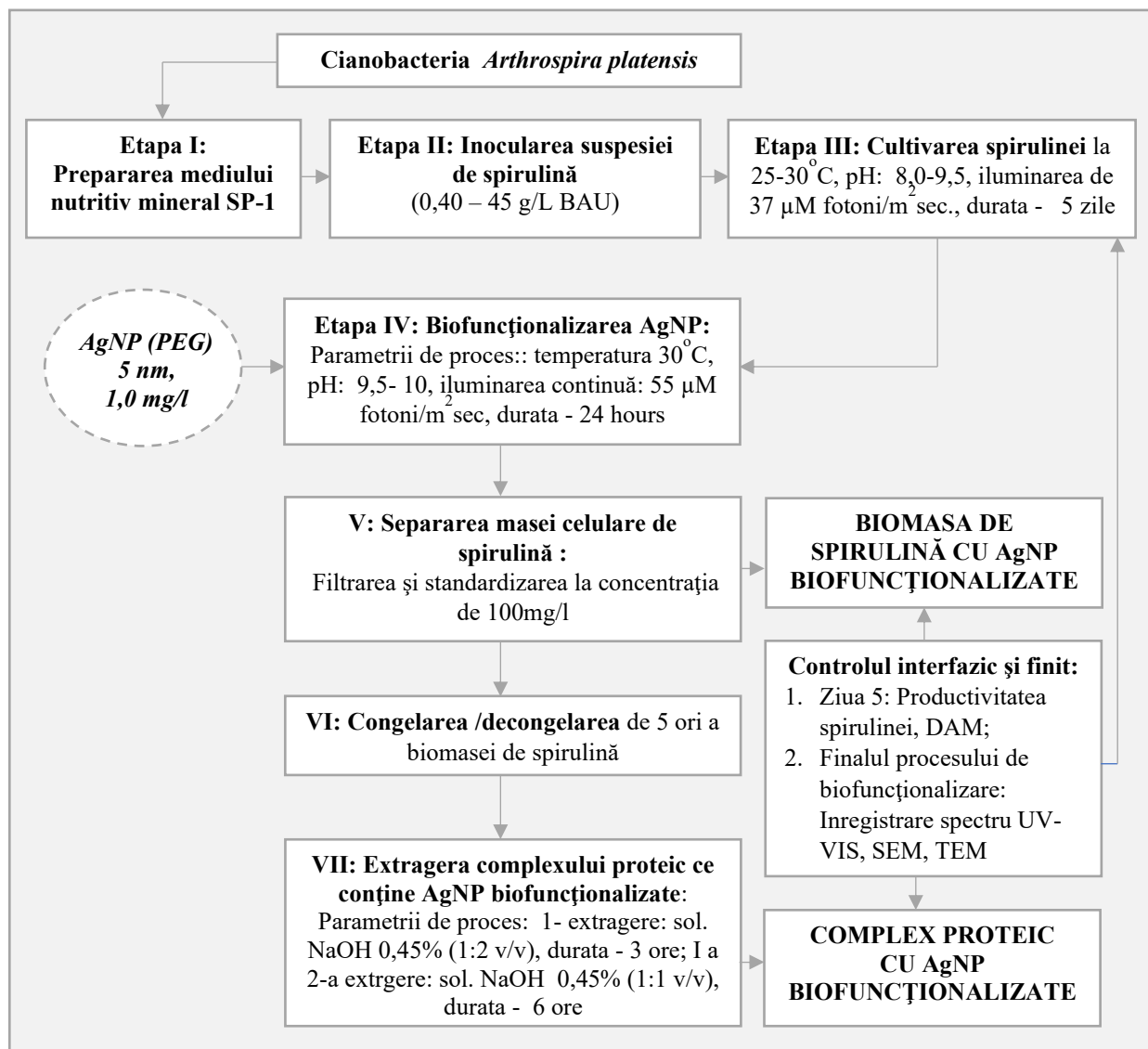
### ***7.3.3 Procedeu de biofuncționalizare a nanoparticulelor de argint (AgNP) cu ajutorul cianobacteriei *Arthrospira platensis****

Un impediment important în utilizarea nanoparticulelor metalice de sinteză inginerescă rămâne a fi toxicitatea înaltă și instabilitatea lor, care poate fi înlăturată prin mecanismul de adăugare a biomoleculilor. Pentru biofuncționalizarea nanoparticulelor de argint noi propunem spirulina, principalii compuși biologic activi ai căreia sunt proteinele complete care conțin toți aminoacizii esențiali și non esențiali. Aceste biomolecule pot acapara nanoparticulele de argint de sinteză inginerescă, atenuând nu doar toxicitatea, dar și amplifică efectele lor biologice.

A fost elaborat un procedeu de biofuncționalizare a nanoparticulelor de argint de producere industrială cu ajutorul spirulinei, care poate fi urmărit în figura 7.13.

Procedeu de biofuncționalizare pe modelul nanoparticulelor de argint stabilizate în polietilenglicol – AgNP(PEG) pe care-l propunem noi include etapele: (1) Prepararea mediului nutritiv mineral SP-1 care conține în cantități optime macro- și micronutrienții care asigură necesitățile fiziologice ale culturii de spirulină și acumularea de biomasă și a proteinelor; (2) Introducerea inoculului de spirulină în concentrație de 0,4-045g/l biomasă uscată (3) *Cultivarea spirulinei* care se realizează în vase de cultivare cu capacitatea de 1000 ml, cu volumul de lucru de 500 ml, cu respectarea pe durata a 48 ore a temperaturii de 25-28°C, pH-ului optim al mediului de 8-9, iluminării continue de 37 μM fotoni/m<sup>2</sup>sec și a temperaturii de 30-32°C, pH-ului 9-10 și intensității iluminării de 55 μMfotoni/m<sup>2</sup>sec pentru următoarele 96 ore; (4) Executarea procesului de biofuncționalizare cu implicarea biomasei cîn calitate de complex biologic activ integru prin suplimentarea la cultura de spirulină în a 5-a zi de cultivare (120 ore) a nanoparticulelor de argint stabilizate în polietilen glicol - AgNP(PEG) cu dimensiunea de 5 nm în cantitate de 1,0 mg/l cultură

și cultivarea cianobacteriei timp de 24 de ore; (5) Separarea la finalizarea procesului de biofuncționalizare (a 6-a zi de cultivare/144 ore) a masei celulare de spirulină de mediul de cultivare prin procedura de filtrare, determinarea cantitativă și standardizarea la concentrația de 100mg/ml a conținutului de biomasă, congelarea/decongelarea de 5 ori a biomasei;



**Fig. 7.13. Etapele procesului de biofuncționalizare a AgNP(PEG) de către cultura de *Arthrospira platensis***

(6) Obținerea din biomasa de spirulină a complexului proteic ce conține nanoparticule de argint biofuncționalizate prin extragere cu NaOH de 0,45%, aplicat la biomasă în raport de 1:2 masă/volum, timp de 3 ore prin agitare permanentă. După centrifugare la 500g timp de 15 min, supernatantul se separă. Procedura se repetă cu restul de biomasă la care se adaugă NaOH de 0,45% în raport de 1:1 masă/volum, durata de extragere de 6 ore. După centrifugare la 500g timp de 15 min, supernatantul se separă. Ambele extracte se împreunează și se determină cantitatea de

proteine care constituie 58 - 62%; Controlul interfazic și finit se efectuează în următoarele puncte critice a procesului de biofuncționalizare: punctul 1: ziua a 5-a – se determină conținutul DAM și nivelul creșterii spirulinei; punctul 2: finalul procesului de bifuncționalizare - se înregistrează spectrele de absorbție (UV-VIS) pentru a determina prezența AgNP biofuncționalizate, se vizualizează prezența AgNP (TEM) biofuncționalizate. Capturarea AgNP de către celulele spirulinei în cadrul procedurii propus, se confirmă prin maximumul de absorbție la 473 nm determinat în extractul proteic și prin imaginea SEM a celulelor de spirulină. Astfel, procedeul propus asigură obținerea nanoparticulelor de argint biofuncționalizate și permite extinderea ariei de utilizare a biomoleculelor din spirulina, în vederea obținerii noilor materii farmaceutice.

#### **7.3.4 Procedee de obținere a biomasei ficologice cu conținut înalt de lipide (Brevete 4542MD, 4543 MD, 4714 MD, 4796 MD)**

În Figura 7.14 sunt generalizate procedeele de stimulare a lipidelor la cianobacteria *Arthrospira platensis*, la cultivarea căreia în acest scop au fost aplicate AgNP, sau AuNP, sau CuNP în concentrații stimulative de proces.

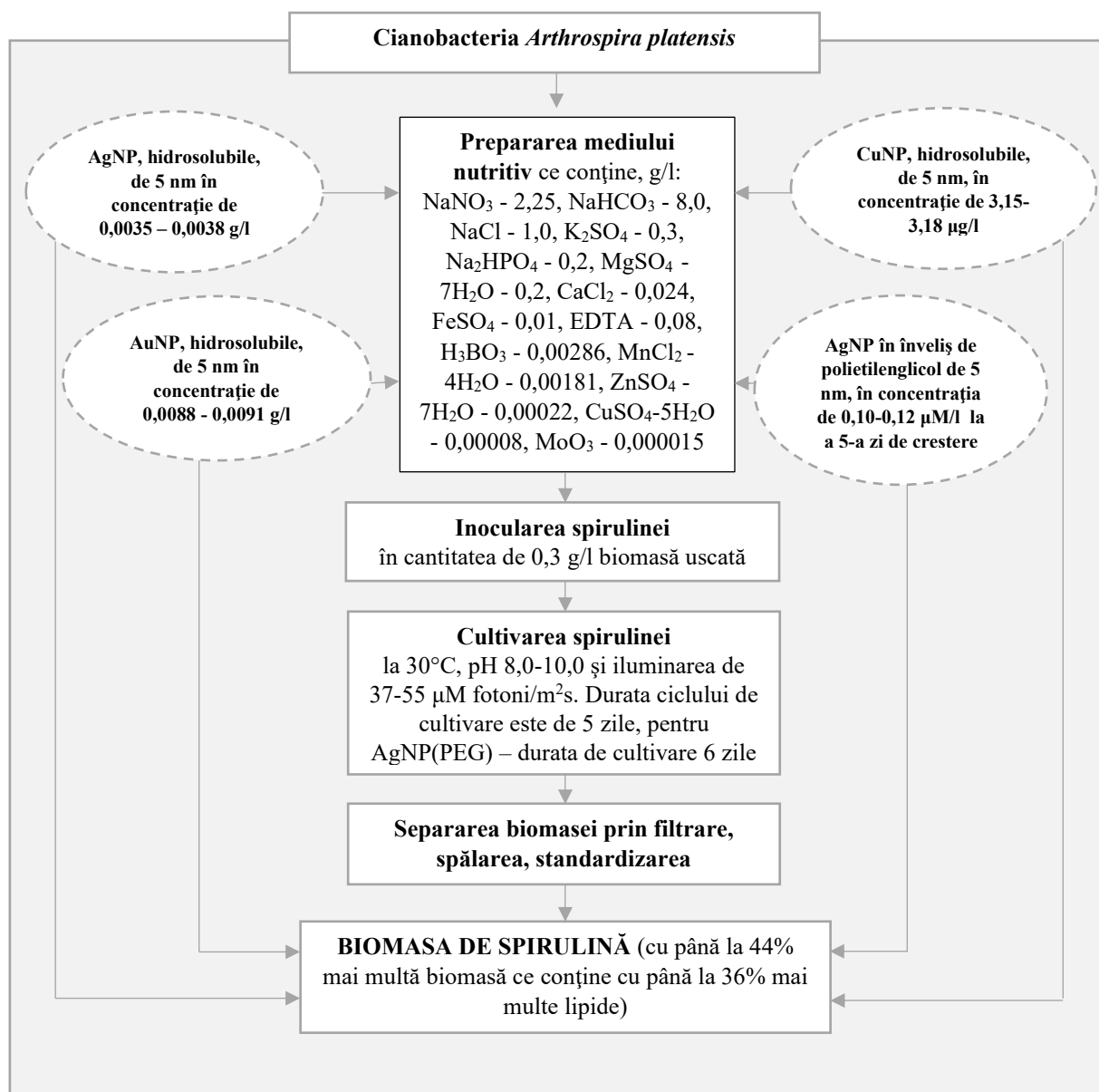
Etaple și succesiunea de realizare a procedurilor sunt următoarele. Pentru cianobacteria *Arthrospira platensis* se utilizează și se prepară în scopul cultivării mediul nutritiv ce conține, g/l: NaNO<sub>3</sub> - 2,25, NaHCO<sub>3</sub> - 8,0, NaCl - 1,0, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 0,3, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,2, MgSO<sub>4</sub> - 7H<sub>2</sub>O - 0,2, CaCl<sub>2</sub> - 0,024, FeSO<sub>4</sub> - 0,01, EDTA - 0,08, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - 0,00286, MnCl<sub>2</sub> - 4H<sub>2</sub>O - 0,00181, ZnSO<sub>4</sub> - 7H<sub>2</sub>O - 0,00022, CuSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O - 0,00008, MoO<sub>3</sub> - 0,000015. La mediul preparat se adaugă (cu excepția procedurii 4\*):

- Nanoparticule de argint, cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 0,0035 - 0,0038 g/l (Brevet 4542);
- Nanoparticule de aur cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 0,0088 - 0,0091 g/l (Brevet 4543);
- Nanoparticule de cupru, hidrosolubile, cu dimensiunea de 5 nm, în concentrație de 3,15-3,18 μg/l (Brevet 4714)
- \*Nanoparticulele Ag în înveliș de polietilenglicol, cu dimensiunea de până la 5 nm în concentrație de 0,10-0,12 μM/l se adaugă la cultura de spirulină în a 5-a zi de cultivare (Brevet 4796).

Cultura start este suspensia de spirulină în cantitatea de 0,3 g/l biomasă uscată.

Spirulina se cultivă în baloane Erlenmeyer a câte 500 ml și volumul de lucru de 250 ml la temperatura de 30°C, pH 8,0-10,0 și iluminarea de 37-55 μM fotoni/m<sup>2</sup>s în regim continuu. Durata ciclului de cultivare este de 5 zile pentru primele 3 procedee și de 6 zile pentru procedeul 4.

La finalul ciclului de cultivare, biomasa de spirulină se colectează, se spală de surplusul de săruri cu soluție de acetat de amoniu de 1,5%, se standardizează la concentrația de 10mg/ml și se determină conținutul compușilor de interes.



**Fig. 7.14. Procedee de stimulare a biosintezei lipidelor la cianobacteria *Arthrospira platensis* cu aplicarea nanoparticulelor de argint, nanoparticulelor de aur, sau nanoparticulelor de cupru**

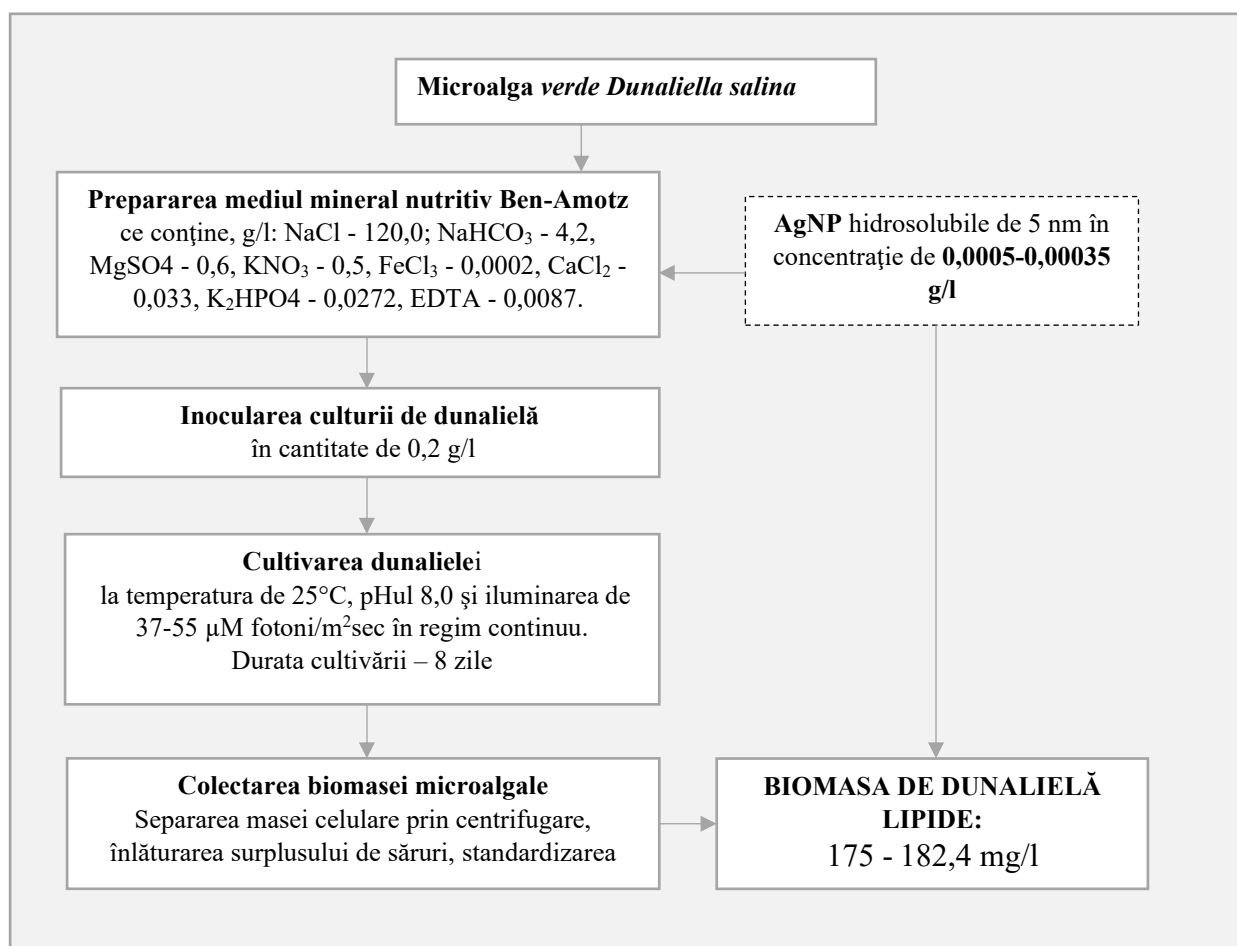
Primele 3 procedee asigură majorarea producerii de biomasă cu 30-44% și a conținutului de lipide în biomasă cu 23-36%, iar aplicarea procedeului 4 asigură și o reducere semnificativă a



valorilor dialdehidei malonice, care sunt la nivelul biomasei de spirulina cultivată în lipsa nanoparticulelor, cu păstrarea efectului de stimulare a activității biosintetice de către nanoparticulele de argint în înveliș de polietilenglicol.

În Figura 7.15 este prezentată succesiunea etapelor procedeeului de stimulare a conținutului de lipide la cultivarea microalgei *Dunaliella salina* cu nanoparticule de argint (*Brevet 4598 MD*).

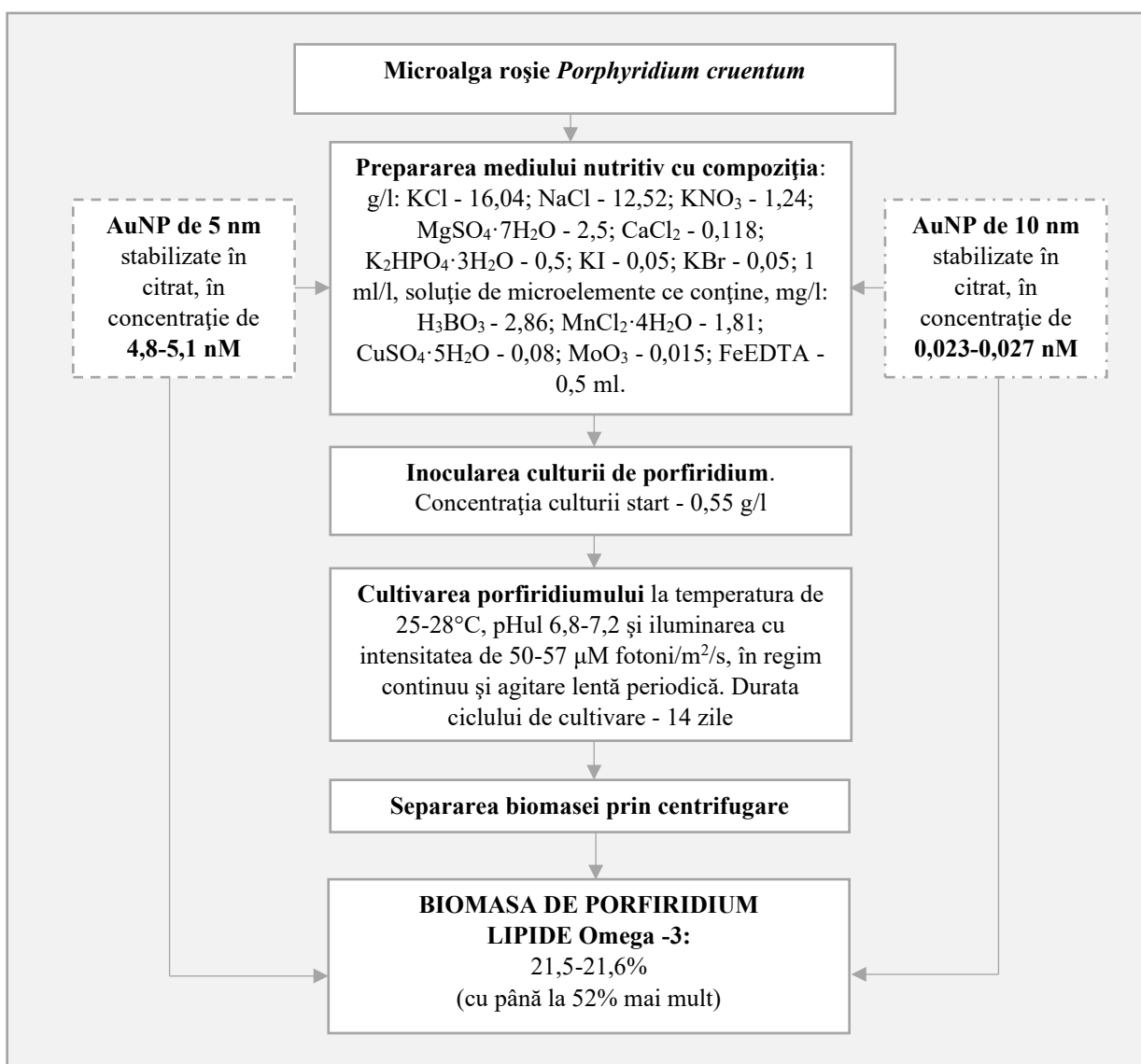
Conform procedeeului, mai întâi se prepară mediul mineral nutritiv Ben-Amotz ce conține, g/l: NaCl - 120,0; NaHCO<sub>3</sub> - 4,2, MgSO<sub>4</sub> - 0,6, KNO<sub>3</sub> - 0,5, FeCl<sub>3</sub> - 0,0002, CaCl<sub>2</sub> - 0,033, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,0272, EDTA - 0,0087. La mediul preparat se adaugă nanoparticule de Ag hidrosolubile cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 0,0005-0,00035 g/l. Se inoculează cultura de dunalielă. Cultura start este suspensia de *Dunaliella salina* în cantitate de 0,2 g/l. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmeyer cu volumul de 500 ml și volumul de lucru de 300 ml la temperatura de 25°C, pH-ul 8,0 și iluminarea de 3000 - 4000 lx în regim continuu. La finalul ciclului de cultivare – ziua a 8-a, se colectează biomasa microalgală și se determină conținutul de lipide.



**Figura 7.15. Etapele procedeeului de stimulare a conținutului de lipide la cultivarea microalgei verzi *Dunaliella salina* cu nanoparticule de argint**

Realizarea la cultivarea dunaliei a procedurii propus asigură obținerea în valoare absolută a 175 - 182,4 mg/l lipide. Acest rezultat se datorează efectului nanoparticulelor de Ag, care datorită dimensiunilor mici (5 nm) pătrund rapid în celule și stimulează reproducerea celulară, drept urmare durata ciclului de cultivare se reduce de la 10 zile (regim standard de cultivare) la 8 zile. Contactul nanoparticulelor cu membrana celulară induce stimularea producerii lipidelor.

În schema din Figura 7.16 sunt generalizate etapele procedurilor de cultivare a microalgei roșii *Porphyridium cruentum* în scopul producerii de biomasă cu un conținut sporit de lipide omega-3 (Brevet 4849 MD; Brevet 4859 MD).



**Figura 7.16. Etapele procedurilor de cultivare a microalgei roșii *Porphyridium cumentum* în scopul producerii de biomasă cu un conținut sporit de lipide omega-3**

În calitate de stimulatori în procedeele propuse s-au aplicat nanoparticulele de aur stabilizate în citrat - AuNP (citrat) cu dimensiunea de 5nm și cu dimensiunea de 10 nm cu efecte

de stimulare a biosintezei lipidelor la diferite concentrații. Conform procedeeleor, la prima etapă se prepară mediul nutritiv ce conține macroelemente, g/l: KCl - 16,04; NaCl - 12,52; KNO<sub>3</sub> - 1,24; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 2,5; CaCl<sub>2</sub> - 0,118; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O - 0,5; KI - 0,05; KBr - 0,05; 1 ml/l, soluție de microelemente ce conține, mg/l: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - 2,86; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O - 1,81; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O - 0,08; MoO<sub>3</sub> - 0,015; FeEDTA - 0,5 ml. La etapa a doua la mediul preparat se adaugă:

- Procedeeul 1: nanoparticule de aur cu dimensiunea de 5 nm stabilizate în citrat, în concentrație de 4,8-5,1 nM (Brevet 4849 MD);
- Procedeeul 2: nanoparticule de aur cu dimensiunea de 10 nm stabilizate în citrat, în concentrație de 0,023-0,027 nM (Brevet 4859 MD).

La etapa a treia se inoculează cultura de porfiridium. Cultura start este suspensia de *Porphyridium cruentum* în cantitatea de 0,55 g/l.

Cultivarea microalgei (etapa a 4-a) se efectuează în baloane Erlenmeyer a câte 100 ml cu volumul suspensiei de 50 ml, la temperatura de 25-28°C, pH-ul 6,8-7,2 și iluminarea cu intensitatea de 50-57 μM fotoni/m<sup>2</sup>/s, în regim continuu și agitare lentă periodică. Durata ciclului de cultivare este de 14 zile.

La finalul ciclului de cultivare (etapa a 5-a), biomasa de porfiridium se colectează, se spală de surplusul de săruri, se standardizează la concentrația de 10mg/ml și se determină conținutul de lipide.

Procedeele asigură o sporire cu 39% (procedeeul 2) și cu 52% (procedeeul 1) a conținutului de lipide în biomasa de *Porphyridium cruentum*. Biomasa obținută conform procedeeleor poate fi utilizată ca materie primă pentru obținerea produselor polivalente pe bază de lipide omega-3.

### ***7.3.5 Procedee de bioremediere a efluenților moderat poluați cu metale cu ajutorul cianobacteriilor *Arthrospira platensis* și *Nostoc linckia****

Cianobacteriile *Arthrospira platensis* și *Nostoc linckia* sunt de perspectivă în calitate de sorbenți regenerabili pentru tratarea efluenților moderat poluați sau post-tratarea apelor uzate. Capacitatea de recuperare a spirulinei sau nostocului din efluenții care conțin în special cupru sau crom, și/sau alte metale sunt procese complexe care depind de forma metalului, cantitatea și concentrația acestuia, de adaptarea culturilor la tipul de efluent.

În Figura 7.17 sunt generalizate etapele unor modele de procedee de recuperare a Cu(II), Cr(II), Fe(III), Ni(II) și Zn(II) din sisteme ce conțin cantități moderate de aceste metale de către cianobacteriile *Arthrospira platensis* și *Nostoc linckia*.

Etapele acestor procese sunt următoarele:

Etapa I – include prepararea mediilor nutritive: pentru *Arthrospira platensis* mediul de cultivare ce conține (g/l): NaNO<sub>3</sub> - 2.5; NaHCO<sub>3</sub> - 2.0; NaCl - 1.0; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 0.6; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0.2; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O - 0.2; pentru *Nostoc linckia* se prepară mediul nutritiv cu compoziția: (g/l): KNO<sub>3</sub> - 0,5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,45, NaHCO<sub>3</sub> - 0,05, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0.1, CaCl<sub>2</sub> - 0,11.

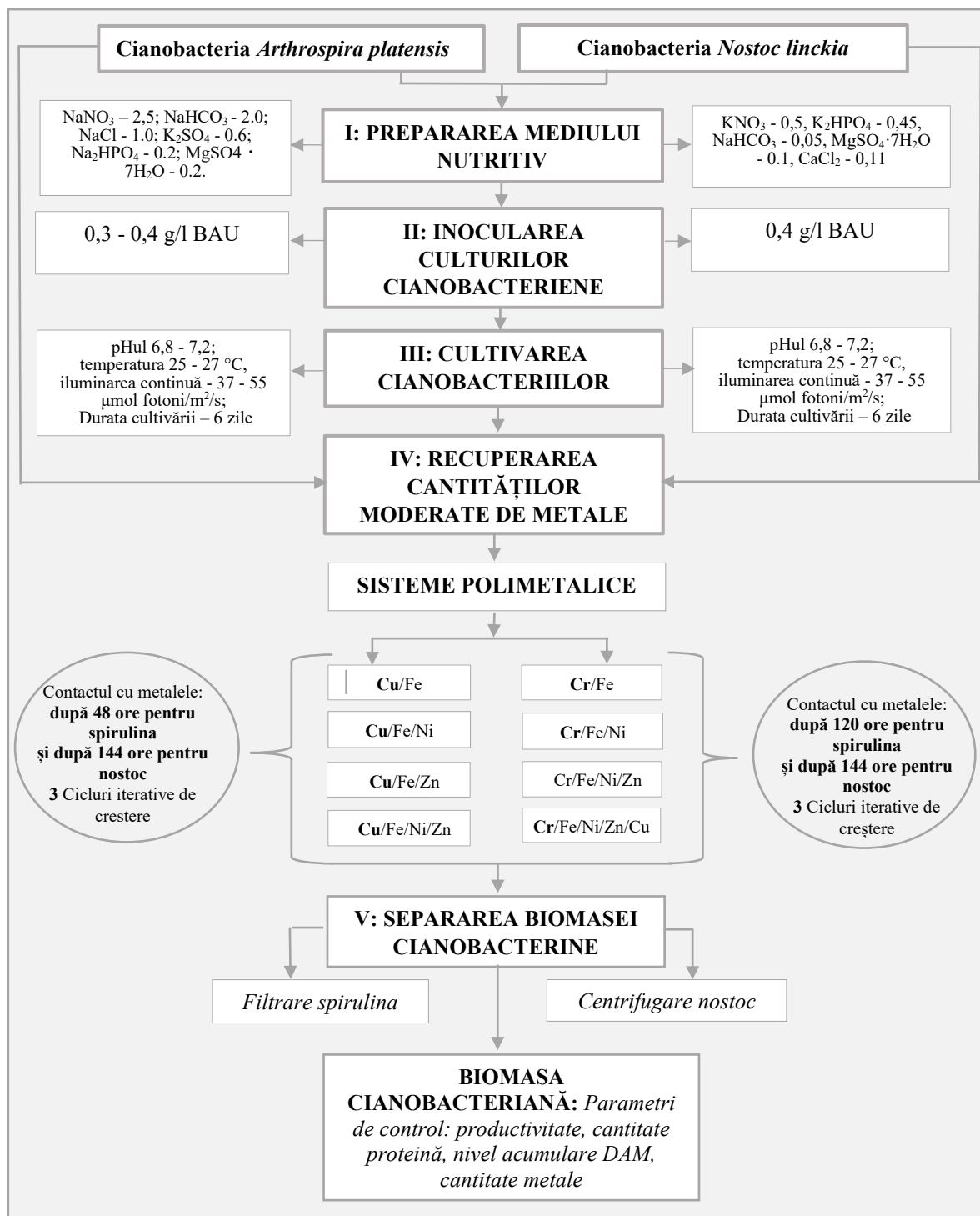


Figura 7.17. Etapele unor modele de procedee de recuperare a Cu(II), Cr(II), Fe(III), Ni(II) și Zn(II) din sisteme ce conțin cantități moderate de aceste metale de către cianobacteriile *Arthrospira platensis* și *Nostoc linckia*.

Etapa II – include inocularea culturilor cianobacteriene: *Nostoc linckia* se inoculează în cantitate de 0,4 g/l BAU; *Arthrospira platensis* se inoculează în concentrația celulelor de 0,3-0,4 g/l BAU.

Etapa III – prevede cultivarea spirulinei sau a nostocului în condiții și la parametri optimali specifici de creștere pentru fiecare dintre culturile utilizate:

a) Cultivarea spirulinei se efectuează la pH-ul mediului de 8,0 - 10,0 un. de pH, temperatura de 28 - 30°C, iluminarea continuă cu intensitatea de 37 - 55  $\mu\text{M}$  fotoni/ $\text{m}^2/\text{s}$  și agitare periodică. Durata cultivării – 6 zile;

b) Cultivarea nostocului se realizează la pH-ul mediului în limitele 6,8 - 7,2 un. de pH, temperatura de 25 - 27 °C, iluminarea continuă cu intensitatea de 37 - 55  $\mu\text{M}$  fotoni/ $\text{m}^2/\text{s}$  și agitare periodică. Durata cultivării – 12 zile.

Etapa IV – executarea procesului de recuperare a metalelor din efluenți contaminați cu cantități moderate de Cu (II) și Cr (VI), Fe (III), Ni (II) și Zn (II).

#### **Exemple de sisteme polimetalice în care poate fi realizată bioremedierea:**

##### **Pentru spirulina:**

1. Cu/Fe; Cu/Fe/Ni; Cu/Fe/Zn; Cu/Fe/Ni/Zn, ce conțin Cu (II) - 2,5 - 10mg/l, Fe - 1,25-5mg/l, Zn -0,5-2,0 mg/l, Ni - 0,5-2,0mg/l;
2. Cr (II): Cr /Fe; Cr/Fe/Ni; Cr/Fe/Ni/Zn; Cr/Fe/Ni/Zn/Cu, ce conțin Cu (II) - 2,5 - 10mg/l, Fe - 2,5-10mg/l, Zn -2,5-10mg/l, Ni - 2,5-10mg/l

##### **Pentru nostoc:**

1. Cu/Fe; Cu/Fe/Ni; Cu/Fe/Zn; Cu/Fe/Ni/Zn, ce conțin Cu (II) - 2,5 mg/l, Fe 2,0 mg/l, Zn - 0,5mg/l, Ni - 0,5mg/l;
2. Cr (II): Cr/Fe; Cr/Fe/Ni; Cr/Fe/Ni/Zn; Cr/Fe/Ni/Zn/Cu, ce conțin Cu (II) - 2,5mg/l, Fe - 2,0 mg/l, Zn -0,5mg/l, Ni – 0,5 mg/l, Cu – 0,5mg/l.

1) Pentru *Arthrospira platensis*, recuperarea cantităților moderate de cupru, crom și alte metale este eficientă în 3 cicluri iterative. Acest proces se realizează conform algoritmului: Contactul spirulinei cu efluenții moderat contaminați cu Cu, Cr, Fe, Zn, Ni se efectuează la a 3-a zi de creștere (Cr) și la 5-a zi de creștere (Cu), cultura este în contact cu metalele pe durata a 96 ore (Cr) și 24 ore (Cu). La finalul ciclului de creștere (a 6-a zi: 144 ore), masa celulară de spirulina se separă de mediul de cultivare prin filtrare (ciclul I), se inoculează (*procedură descrisă la etapa II*) pe un mediu nutritiv nou (*compoziție descrisă la etapa I*) și se supune cultivării timp de 2 zile (Cr) și 5 zile (Cu) la parametrii și în condițiile optime specifice culturii (*descrie la etapa III*). La a a 3-a zi (Cr) și a 5-a zi de creștere, spirulina se supune contactului repetat cu metalele

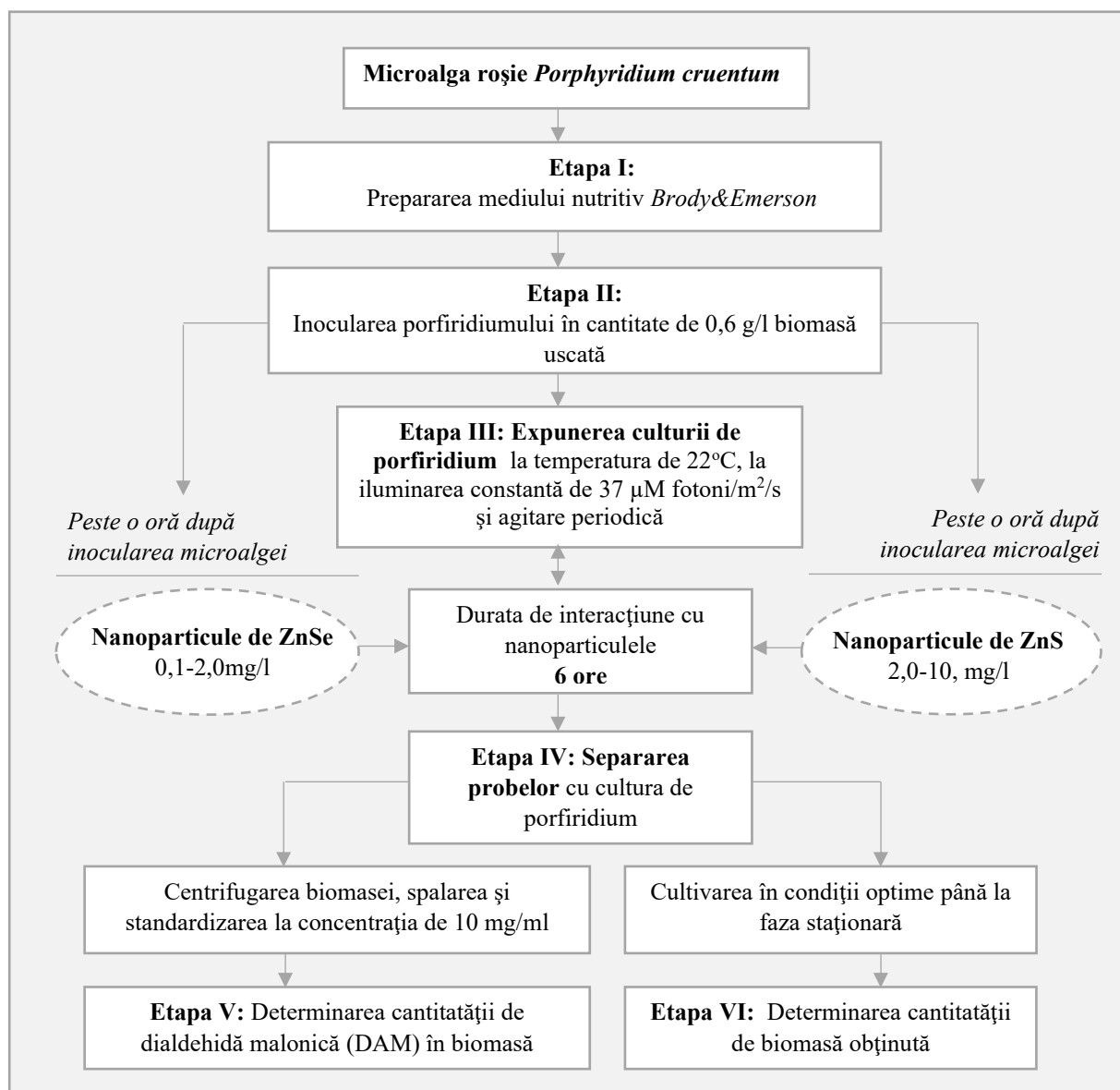
pe durata a 96 ore (Cr) și 24 ore (Cu), după care biomasa se separă de mediul de creștere (ciclul II) și se inoculează (*procedeu descris la etapa II*) iarăși într-un mediu nutritiv (*compoziție redată la etapa I*), pe care se crește timp de 2 zile (Cr) și 5 zile (Cu), după care pentru a 3-a oară se spune contactului cu metalele pentru 96 ore (Cr) și 24 ore (Cu), la expirarea cărora, masa de spirulina se separă de mediul de cultură prin filtrare (ciclul III). Parametrii de control monitorizați în biomasă după filtrare (etapa V) la finalul fiecărui ciclu sunt următorii: productivitatea, principalii indici biochimici (cantitatea de proteină și DAM), cantitățile de metale.

- 2) Pentru *Nostoc linckia*, contactul cu metalele se efectuează la a 6-a zi de cultivare (după 144 ore de creștere) atât pentru efluenții ce conțin într-o cantitate mai mare Cu, cât și pentru cei ce conțin în concentrații mai mari Cr (VI). După executarea contactului cu efluenții contaminați cu multimetale, cultura de nostoc se cultivă pe durata a încă 6 zile și la a 12-zi – finalul ciclului de cultivare, masa celulară de nostoc se separă de mediul de cultivare prin centrifugare (ciclul I) și se inoculează într-un mediu nou preparat, procesul de recuperare de către cultura de nostoc a metalelor din efluenți contaminați cu multe metale descris se efectuează pe durata a încă 2 cicluri de creștere a cianobacteriei. La finalul fiecărui ciclu (etapa V) se monitorizează aceiași parametri de control ca și pentru spirulina.

### **7.3.6. Procedeu de determinare a toxicității nanoparticulelor cu ajutorul microalgei roșii *Porphyridium cruentum* (Brevet 4200 MD)**

Stabilirea toxicității nanoparticulelor cu ajutorul indicatorilor biologici în baza activității antioxidante a biomasei poate fi utilizată în calitate de parte componentă a sistemelor de monitorizare a calității mediului și a inofensivității proceselor tehnologice de sinteză și utilizare a nanoparticulelor. Sistemele hibride nanomateriale – microorganisme, oferă posibilitatea de a stabili perfect toxicitatea nanoparticulelor asupra organismului și al posibilelor efecte benefice ale lor. Microalgele oferă facilități enorme în modelarea diferitor efecte și stabilirea mecanismelor de acțiune a diferitor compuși asupra proceselor vitale din celulă, de aceea anume aceste obiecte acvatice sunt obiecte model foarte comode pentru stabilirea posibilelor efecte toxice.

Procedeu elaborat pe care-l propunem este un procedeu de apreciere a toxicității nanoparticulelor pe modelul nanoparticulelor de ZnSe și ZnS cu ajutorul microalgei roșii *Porphyridium cruentum* și se realizează în câteva etape. Modul de realizare a procedurii poate fi urmărit în figura 7.18.



**Fig. 7.18. Etapele procedurii de apreciere a toxicității nanoparticulelor cu ajutorul microalgei roșii *Porphyridium cruentum***

La prima etapă se prepară mediul nutritiv cu următoarea componență, g/l: NaCl – 7,0; KCl – 7,5; MgSO<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O – 1,8; Ca(NO<sub>3</sub>)·4H<sub>2</sub>O – 0,15; KBr – 0,05; KI – 0,05; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,2 și 1,0 ml/l soluție de microelemente, ce conține, mg/l: FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O – 2,7; NaVO<sub>3</sub> – 0,05; ZnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O – 0,02; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O – 0,05; MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O – 0,3; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0,6; MoO<sub>3</sub> – 0,02.

La etapa a doua, în mediul preparat se adaugă inocul de *Porphyridium cruentum* în cantitate de 0,6 g/l biomasă uscată.

La etapa a treia, cultura se expune la temperatura de 22°C, la iluminarea constantă de 37 μM fotoni/m<sup>2</sup>/s și agitare periodică. Peste o oră după inocularea microalgei la suspensia celulară se adaugă:

- 1) nanoparticule de ZnSe (cu dimensiunea de 3-5 nm) în cantități de 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l (Varianta 1 de procedeu)

Sau:

- 2) nanoparticule de ZnS (cu dimensiunea de 30-35 nm) în cantități de 2, 4, 6, 8, 10 mg/l.

Probele cu nanoparticule se expun pentru 6 ore, pentru a realiza interacțiunea celulelor porfiridiumului cu nanoparticulele. Proba martor se expune condițiilor similare în lipsa nanoparticulelor.

La etapa a 4-a, după 6 ore de interacțiune probele se separă în două. Din prima porție biomasa de microalgă se separă de mediul nutritiv prin centrifugare, se spală cu soluție izotonică de acetat de amoniu și se standardizează la concentrația de 10 mg/ml. Probele din a doua porție se lasă să parcurgă întreg ciclul de cultivare al porfiridiumului.

La etapa a 5-a, în biomasa primei porții se determină cantitatea de dialdehidă malonică conform următoarei proceduri: la probele de biomasă (1 ml biomasă standardizată) se adaugă 1 ml acid tiobarbituric 0,67% și 1 ml acid tricloracetic 15%, după care probele se supun incubării pentru 1 oră la 95°C. Probele se răcesc pe gheață timp de 5 min și se centrifughează timp de 15 min la 3000 g. Concentrația dialdehidei malonice se măsoară la 532 nm, iar calculul se efectuează cu utilizarea coeficientului extincției molare a complexului dialdehidei malonice calculat la proteină sau % inhibiție față de proba martor pozitiv. Cantitatea de dialdehidă malonică DAM se calculează după formula:

$$C = \text{Abs} \cdot f / K, \quad (7.1)$$

unde:

C – concentrația dialdehidei malonice, mol/ml;

Abs – absorbanta probei la lungimea de undă de 532 nm;

f – coeficientul de diluție;

K – coeficientul de extincție DAM ( $1,56 \cdot 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ).

Valorile calculate pentru probele experimentale se raportează la valoarea DAM în proba martor și se exprimă în % M. Sunt considerate toxice concentrațiile de nanoparticule de ZnSe sau ZnS care provoacă creșterea veridică din punct de vedere statistic a conținutului de dialdehidă malonică în biomasă.

La etapa a 6-a, în a doua porție a probelor care este lăsată pentru a parcurge întregul ciclu de dezvoltare a culturii, la începutul etapei staționare de creștere se apreciază cantitatea de biomasă obținută pentru a confirma rezultatele obținute prin aplicarea procedurii propus.

Conform procedurii propus creșterea conținutului de DAM în biomasa de microalgă, după 6 ore de contact cu nanoparticulele de ZnSe în concentrații de la 0,5 mg/l în sus (Varianta 1



de procedeu) sau cu nanoparticulele de ZnS în concentrații care depășesc valoarea de 4 mg/l (variante 2 de procedeu), se asociază cu o scădere a cantității de biomasă care se acumulează la finele ciclului de creștere a culturii.

Procedeul elaborat confirmă posibilitatea aprecierii precoce a nivelului de toxicitate al nanoparticulelor în baza testului de determinare a produselor peroxidării. Aprecierea cantității de biomasă la finele ciclului de cultivare a culturii de *Porphyridium cruentum* a fost efectuată doar pentru a confirma veridicitatea testului de apreciere a DAM în biomasă și nu reprezintă o parte componentă a procedeeului propus.

#### **7.4 Concluzii la capitolul 7**

Stresul oxidativ este un fenomen inevitabil în tehnologiile de cultivare a microalgelor și cianobacteriilor, fiind generat de intervențiile în procesele vitale ale obiectelor de interes biotehnologic în scopul obținerii unui efect economic maxim. Aplicarea diferitor regimuri termice și de iluminare, modificarea componenței mediului nutritiv în dependență de scop, introducerea stimulatorilor – toate acestea intervin în procesele vitale normale ale microalgelor și cianobacteriilor, generând dezechilibru între procesul de formare a radicalilor liberi și cel de îndepărtare a lor din celule. Mecanismele fundamentale de instalare a stării de stres oxidativ, care au valență biotehnologică, constau în modificarea abundenței transcripționale a genelor asociate cu protecția antioxidantă. Acest fenomen duce la un dezechilibru al proceselor metabolice, care se reflectă în modificarea componenței biochimice, degradarea unor componente structurale și funcționale, acumularea produselor degradării oxidative a macromoleculilor și deteriorarea fizică a structurilor celulare. În dependență de profunzimea modificărilor generate la nivel molecular și fiziologic, stresul oxidativ care poate fi aplicat în biotehnologie se clasifică în stres de intensitate joasă și stres de intensitate intermediară. Din punct de vedere biotehnologic, stres de intensitate joasă poate fi considerată situația, când cultura ficologică manifestă modificări adaptive, fără elemente de alterare a componentelor și structurilor celulare. Dintre situațiile luate în calcul în această lucrare, un asemenea tip de stres poate fi considerat stresul de fotoperiodism, stresul de hiper- și hipotermie moderată și stresul provocat de prezența etanolului în mediu. Stresul provocat de prezența xenobioticelor, un caz particular al căruia este nanobiosinteza și biofuncționalizarea nanoparticulelor, este un stres care poate fi clasificat mai degrabă ca unul de intensitate intermediară, fiind prezente și dovezi clare ale daunelor provocate la nivel de celulă. În cazul aplicării stimulatorilor biologici pentru creșterea productivității culturilor de microalge și cianobacterii, trecerea de la un tip de intensitate joasă la unul de intensitate medie ar putea fi identificat prin compararea efectului produs cu valoarea inițială a parametrului monitorizat – adică

identificarea *punctului echivalent zero*. În cazul când procedeul biotehnologic este elaborat în scopul utilizării biomasei integrale, este important ca procesul biotehnologic să aibă loc în zona stresului de intensitate joasă. În cazul când biomasa este destinată extragerii unor componente specifice sau pentru alte aplicații decât consumul uman, în condițiile unui control de calitate procesele biotehnologice pot fi derulate și în zona unui stres oxidativ de intensitate intermediară.

Identificarea punctelor de aplicare a factorilor de stimulare/stres poate fi realizată empiric prin aplicarea schemelor experimentale sau prin estimare în baza unor corelații între valorile parametrilor de control, importante din punct de vedere a mecanismelor implicate în protecția antioxidantă. O confirmare a corectitudinii estimărilor făcute pot fi considerate procedeele biotehnologice elaborate pe baza lor (procedeele de obținere a biomasei ficologice cu conținut înalt de lipide), dar și implementarea acestor elaborări în condiții reale.

Rezultatele expuse în acest capitol pot fi formulate în următoarele concluzii:

1. În condiții de stres oxidativ în cultura de *Arthrospira platensis* are loc modificarea abundenței transcripționale a genelor asociate cu răspunsul celular, ceea ce duce la scăderea capacității de adaptare a spirulinei.
2. Scăderea capacității de adaptare a spirulinei în condiții de stres oxidativ este confirmată prin modificări ultrastructurale importante, ce denotă procese destructive, cum ar fi decompactizarea membranelor tilacoidale, reducerea numărului de carboxizomi, formarea rezervelor celulare, deteriorarea învelișurilor celulare, vacuolizarea intensă a citoplasmei.
3. În calitate de indici ai stării de stres oxidativ în culturile ficologice pot fi luate în considerare diferite tipuri de corelații între nivelul markerului stresului oxidativ-dialdehida malonică și alți parametri biochimici ai biomasei, inclusiv cei ai activității antioxidante.
4. Corelația invers proporțională dintre nivelul DAM și activitatea antioxidantă a extractelor hidro-etanolice din biomasă este utilă în identificarea concentrațiilor optime ale stimulatoarelor utilizați în procedeele biotehnologice cu implicarea microalgelor și cianobacteriilor.
5. Procedeele noi de obținere a produselor biotehnologice valoroase (biomasă cu conținut înalt de ficobiliproteine, carbohidrați, lipide; nanoparticule de biosinteză, nanoparticule biofuncționalizate) elaborate în baza reacțiilor de răspuns a culturilor ficologice la stresul oxidativ sunt eficiente și simplu de realizat în condiții de producere industrială.

Cele menționate mai sus au fost expuse în numeroase publicații științifice și brevete de invenții [17-19, 24-27, 64, 88, 92, 93, 114-116].

## CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Teza de doctorat habilitat „**Stresul oxidativ în ficobiotehnologie – mecanisme și procedee de reglare**” este dedicată studiului fenomenelor asociate cu stresul oxidativ la microalge și cianobacterii de interes biotehnologic și posibilității de aplicare a lor în calitate de instrument util în componența procedeelelor de creștere a culturilor ficologice în scopul obținerii biomasei și altor produse valoroase, inclusiv nanoparticule.

Stresul oxidativ este inevitabil atunci când ne referim la creșterea în condiții industriale a microalgelor și cianobacteriilor. Acesta este provocat de componentele mediului nutritiv, densitatea înaltă a celulelor în reactoarele de creștere, procedeele biotehnologice aplicate, cum ar fi agitarea, modificarea intensității luminii, temperaturii, umidității, aplicarea stimulatoarelor ș.a. Ca rezultat, în celulele microalgelor și cianobacteriilor se produc mai multe specii reactive ale oxigenului, decât ar fi specific condițiilor naturale de dezvoltare a acestor organisme.

În anumite limite, stresul de intensitate joasă și medie poate avea efecte benefice asupra culturilor ficologice, fiind asociat cu intensificarea anumitor procese biosintetice, care duc la o productivitate mai mare și un conținut sporit al unor compuși valoroși ai biomasei. Sistemele de protecție antioxidantă reușesc să elimine produșii toxici, asigurând astfel o calitate superioară atât a biomasei, cât și a produselor derivate din ea. În aceste condiții, stresul oxidativ poate fi considerat un instrument biotehnologic comod, care permite obținerea unei biomase ficologice cu conținut programat de compuși bioactivi.

Chiar și în condiții optime, microalgele și cianobacteriile au un nivel diferit de rezistență la stresul oxidativ, în dependență de faza ciclului vital la care se află cultura. Acest lucru poate fi aplicat cu succes în biotehnologie, făcând posibilă atenuarea sau amplificarea unor efecte induse de stimulatori, inhibitori ori factori fizici. Cunoașterea particularităților răspunsului celular la diferite tipuri de acțiuni în dependență de faza ciclului de dezvoltare a culturii este esențială pentru elaborarea unor procedee biotehnologice eficiente și sigure de obținere a unei biomase ficologice de calitate înaltă. Cu toate cele spuse, stresul oxidativ în calitate de instrument biotehnologic trebuie aplicat cu mare atenție, deoarece echilibrul beneficiu-daună este destul de fragil și poate fi ușor distorsionat.

Stresul oxidativ este un instrument important în bionanotehnologie. Producerea speciilor reactive ale oxigenului la contactul microalgelor și cianobacteriilor cu ionii metalici activează mecanismele implicate în reducerea acestora cu formarea de nanoparticule și sechestrarea lor în diferite compartimente celulare. Capacitatea culturilor de microalge și cianobacterii de a diminua efectele stresului oxidativ provocat de diferiți poluanți, inclusiv metale grele stă la baza procesului

de sechestrare a poluanților în interiorul celulelor. Astfel, obiectele ficologice studiate pot fi considerate drept acumulatori naturali și pot servi scopului de bioremediere a mediului acvatic poluat.

Aceleași mecanisme de detoxifiere, în cazul contactului celulelor cu nanoparticulele produse industrial asigură biofuncționalizarea acestora în biomasa ficologică, proces ce modifică proprietățile nanoparticulelor, biodisponibilitatea și biocompatibilitate lor cu celulele și țesuturile animale. Nanoparticulele biofuncționalizate sunt de mare perspectivă atât în diagnostica cât și în tratamentul unor maladii grave, cum ar fi cancerul. Biomasa ficologică cu conținut de nanoparticule biofuncționalizate oferă multiple beneficii, valorificând proprietățile curative ale biomasei, dar și proprietățile unice ale nanomaterialelor.

Realizarea acestei lucrări s-a soldat cu identificarea elementelor comune și a particularităților răspunsului culturilor studiate la diferite tipuri de stres de diferită intensitate. Aceste cunoștințe noi au permis de a stabili punctele de aplicare a factorilor de stres în scopul obținerii unor rezultate pronosticate și de a elabora procedee și tehnologii, care permit obținerea biomasei ficologice, caracterizată nu doar prin componentă biochimică valoroasă, ci și printr-un nivel adecvat de siguranță pentru uzul uman și animal.

Aspectele elucidate pe parcursul realizării tezei de doctor habilitat pot fi exprimate prin următoarele concluzii:

1. Monitorizarea oscilațiilor activității antioxidante și ale parametrilor biochimici ai biomasei pe durata ciclului vital al microalgelor (*Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina*, *Porphyridium cruentum*) și cianobacteriilor (*Arthrospira platensis*, *Nostoc linckia*) a permis identificarea perioadelor de vulnerabilitate a culturilor, care în mare măsură sunt asociate cu modificarea stării funcționale a culturii și corespund în special cu trecerea de la o fază a ciclului vital la alta. Aceste cunoștințe fundamentează forma și modul de aplicare a diferitor procedee biotehnologice de stimulare a culturilor ficologice în scopul obținerii unei biomase valoroase, sigure pentru consumul uman.
2. Analiza rezultatelor obținute pe parcursul studiului influenței diferitor tipuri de stres (termic, de iluminare, osmotic și chimic) asupra a mai multor obiecte ficologice (*Arthrospira platensis*, *Nostoc linckia*, *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina*, *Porphyridium cruentum*) a condus la evidențierea elementelor comune ale răspunsului celular, care se exprimă în modificarea unor parametri cuantificabili: toate tipurile de stres studiate sunt asociate cu creșterea cantității de DAM în biomasă, cu modificarea activității

antioxidante și a activității enzimelor din primă linie de protecție contra SRO. În funcție de tulpină, tipul de stres și de intensitatea lui, valorile parametrilor care reflectă statutul antioxidant al biomasei pot crește sau scădea.

3. Corelarea efectelor benefice ale stresului indus (de exemplu, a stresului de iluminare) exprimat prin anumite avantaje tehnologice, cum ar fi creșterea producției de biomasă și cantități înalte de ficobiliproteine și carbohidrați, cu valorile markerilor de stres indică asupra necesității unui control riguros al siguranței biomasei ficologice. Atunci când scopul producerii nu este utilizarea biomasei integrale, ci extracția anumitor componente bioactive (ex. ficobiliproteine, polizaharide), stresul moderat poate fi aplicat cu succes ca soluție tehnologică simplă, ieftină și eficientă.
4. Studiul influenței nanoparticulelor de diferită natură (puncte cuantice - CdSe, CdS, ZnS; nanoparticule de aur și argint stabilizate în polimeri organici) asupra culturilor de microalge și cianobacterii a permis evidențierea acelorași elemente comune ale răspunsului la stres, exprimate prin modificarea parametrilor statutului antioxidant al biomasei, ceea ce indică asupra rolului de factor de stres, pe care îl au aceste structuri. Inducerea stării de stres ca rezultat al contactului dintre nanoparticule și celulele microalgelor și cianobacteriilor declanșează mecanismele de protecție celulară, care stau la baza procesului de biofuncționalizare a nanoparticulelor de sinteză industrială.
5. Rezultatele obținute au demonstrat capacitatea culturilor vii de microalge (*Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina*, *Porphyridium cruentum*) și cianobacterii (*Arthrospira platensis*, *Nostoc linckia*) de a realiza biosinteza de nanoparticule pornind de la ioni cu potențial toxic (de exemplu  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{SeO}_3^{-2}$ ), iar modificările biochimice și cele ale activității antioxidante a biomasei ficologice pe durata procesului demonstrează elocvent, că biosinteza nanoparticulelor are la bază puterea de reducere a matricei de sinteză folosită.
6. Capacitatea înaltă de acumulare a metalelor grele din apele reziduale cu conținut jos de poluanți, în baza mecanismelor de contracarare a stresului de către *Arthrospira platensis* și *Nostoc linckia*, evidențiată în cadrul cercetărilor cu aplicarea sistemelor polimetalice cu conținut de Cu, Cr, Ni, Zn, Fe, în cicluri iterative, permite de a nominaliza aceste cianobacterii în calitate de bioacumulatori naturali, care pot concentra metalele grele în celule, cu factor de concentrare x1000. Astfel, modelarea sistemelor de bioremediere prin varierea parametrilor de proces (componenta chimică a efluenților, vârsta culturii,

numărul de cicluri iterative) este garanția succesului în cadrul tehnologiilor de post-tratare a efluenților contaminați cu metale grele.

7. Rezultatele obținute pe durata monitorizării abundenței transcripționale a genelor asociate cu răspunsul celular la stres în cultura de *Arthrospira platensis* au permis de a evidenția un dezechilibru clar în activitatea sistemului de protecție antioxidantă de prima linie. Astfel, odată cu creșterea abundenței transcripționale a genei FeSOD scade expresia relativă a genelor peroxidazelor (*POD*) și peroxidoxinei (*per*). De asemenea, se reduce expresia relativă a genei proteinei reguloare a absorbției fierului (*fur*), proteinei șocului termic (*hsp90*), genei glutamatsintazei (*GOGAT*), modificarea nivelului de expresie relativă a genei subunității mari RUBISCO (*rbcL*), ceea ce are drept urmare modificarea metabolismului carbonului și azotului, dezorganizarea structurilor proteice superioare, modificarea aportului de metale, iar în final duce la scăderea capacității de adaptare a spirulinei, confirmată și prin modificări ultrastructurale importante.
8. Analiza corelațională care a avut la bază datele normalizate ale multiplelor experiențe de inducere a stării de stres în culturile de microalge (*Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina*, *Porphyridium cruentum*) și cianobacterii (*Arthrospira platensis*, *Nostoc linckia*) a scos în evidență că în calitate de indici ai stării de stres oxidativ în culturile ficologice pot fi luate în considerare diferite tipuri de relații între nivelul markerului stresului oxidativ - dialdehida malonică și parametrii biochimici ai biomasei (proteine, lipide, carbohidrați), inclusiv cei ai activității antioxidante. Astfel, corelația inversă dintre nivelul DAM și activitatea antioxidantă a extractelor hidro-etanolice din biomasă este utilă în identificarea concentrațiilor optime ale stimulatorilor utilizați în procedeele biotehnologice cu implicarea microalgelor și cianobacteriilor.
9. Generalizarea rezultatelor obținute în cadrul acestui studiu a permis identificarea parametrilor, care fundamentează clasificarea tipurilor de stres în baza intensității acestuia. Astfel, pentru domeniul ficobiotehnologiei este relevant stresul oxidativ de intensitate joasă, caracterizat prin modificarea expresiei genelor enzimelor antioxidante de prima linie și reacții fiziologice de adaptare; precum și stresul oxidativ de intensitate medie, caracterizat prin modificarea expresiei multiplelor gene asociate cu stresul și prin manifestări destructive moderate la nivel fiziologic.
10. În baza analizei rezultatelor obținute, în calitate de linie de delimitare dintre stresul oxidativ de intensitate joasă și stresul oxidativ de intensitate intermediară, ultimul

prezentând pericol pentru tehnologiile ficologice orientate spre producerea de biomasă, este util de a aplica momentul de timp sau intensitatea factorului, în care efectul pozitiv asupra parametrului monitorizat descrește până la un nivel egal sau apropiat cu cel care a fost caracteristic culturii până la aplicarea factorului de stres.

11. Studiul realizat **confirmă ipoteza**, care a stat la baza acestei lucrări: răspunsul la stresul oxidativ indus **este** un instrument util pentru obținerea biomasei ficologice prețioase cu conținut dirijat, pentru biosinteza și biofuncționalizarea nanoparticulelor și pentru bioremedierea mediului poluat. Aplicarea acestui instrument este oportună în condițiile menținerii echilibrului între efectele benefice obținute și acumularea speciilor reactive.

**Problema științifică importantă soluționată în lucrare** constă în fundamentarea prin dovezi a posibilității aplicării răspunsului microalgelor și cianobacteriilor la stresul oxidativ indus în calitate de instrument biotehnologic, ceea ce a condus la elaborarea procedeele originale de biosinteză a nanoparticulelor, inclusiv a celor biofuncționalizate; obținere a biomasei ficologice calitative și sigure, cu un conținut dirijat de compuși bioactivi; bioremediere a efluenților contaminați cu metale grele, ceea ce a conturat o direcție nouă de cercetare: *stresul ca instrument în ficobiotehnologie*.

**Aportul personal.** Elaborarea conceptului lucrării, descrierea rezultatelor, analiza datelor cu caracter integrativ, generalizarea rezultatelor și formularea concluziilor au fost realizate de către autoare. Planificarea experiențelor și efectuarea lor, analiza datelor experimentale, elaborarea publicațiilor științifice în baza acestor rezultate au fost realizate în colaborare cu echipa laboratorului Ficobiotehnologie al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie și colegii din alte instituții din Moldova și de peste hotare. În publicații autoarei îi revine cota-parte în corespundere cu lista autorilor și contribuția menționată în fiecare lucrare.

### **Recomandări practice**

1. Se recomandă corelarea procedeele de stimulare a productivității și acumulării de substanțe biologice active de către microalge și cianobacterii cu particularitățile fiziologice în dependență de faza ciclului cultural în care se produce intervenția; Introducerea obligatorie în fluxul biotehnologic de producere a biomasei ficologice a controlului de siguranță în baza markerilor stresului oxidativ în tandem cu indicatorii biochimici cu care au fost identificate corelații puternice.

2. Se recomandă spre implementare 8 procedee de biosinteză a nanoparticulelor de argint cu utilizarea culturilor vii, biomasei și fracțiilor biologice active de *Arthrospira platensis*, *Nostoc linckia*, *Dunaliella salina* și *Porphyridium cruentum* conform schemelor elaborate.
3. Se recomandă spre implementare 5 procedee de biosinteză a nanoparticulelor de seleniu cu utilizarea culturilor vii, biomasei și fracțiilor biologice active de *Arthrospira platensis*, *Nostoc linckia* conform schemelor elaborate.
4. Se recomandă spre implementare 4 procedee de obținere a biomasei ficologice cu conținut înalt de lipide în baza utilizării nanoparticulelor pe post de stimulatori, conform brevetelor MD 4542, 4543, 4714, 4796.
5. Se recomandă spre implementare procedeul de testare a toxicității nanoparticulelor pentru organismele acvatice conform brevetului de invenție MD 4200.
6. Se recomandă spre implementare modelul de decontaminare a efluenților poluați cu cantități moderate de metale grele cu utilizarea culturilor cianobacteriilor *Arthrospira platensis* și *Nostoc linckia*.



## BIBLIOGRAFIE:

în limba română:

1. **CEPOI, L.** Particularitățile manifestării stresului oxidativ indus de cupru (II) la *Spirulina platensis*. In: *Akademios*. 2017, nr. 4, pp. 39-44. ISSN 1857-0461.
2. **CEPOI, L.** Pigmenții fotosintetici la *Porphyridium cruentum* în condiții de stres oxidativ indus. In: *Akademios*. 2014, vol. 4, nr. 35, pp.116-120. ISSN 1857-0461.
3. **CEPOI, L.** Statutul antioxidant în corelare cu componența biochimică a biomasei unor microalge în condiții de tehnologii intensive. In: *Actual Problems in Modern Phycology: fifth ed. intern. conf., 3-5 nov. 2014*. Chișinău: CEP USM, 2014, pp. 30-37. ISBN 978-9975-71-577-5.
4. **CEPOI, L.** *Stresul oxidativ și efectele lui asupra cianobacteriilor și microalgelor de interes biotehologic*. Chișinău: „Artpoligraf”, 2021. 260 p. ISBN 978-9975-62-444-2.
5. **CEPOI, L., ș.a.** Activitatea antioxidantă a *Haematococcus pluvialis* la diferite etape ale ciclului vital în prezența compușilor coordinați ai Co cu bazele Schiff. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2013, nr. 1(319), pp. 126-136. ISSN 1857- 064X.
6. **CEPOI, L., ș.a.** Conținutul pigmentilor și activitatea antioxidantă la *Arthrospira platensis* în condiții de stres termic. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2017, nr. 3(333), pp. 136-144. ISSN 1857-064X.
7. **CEPOI, L., ș.a.** Modificarea conținutului unor compuși biologic activi la *Spirulina platensis* în condiții de stres de iluminare indus. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții*. 2018, vol. 2(35), pp. 95-103. ISSN 1857-064X.
8. **CEPOI, L., ș.a.** Dialdehida malonică – un potențial marker al toxicității nanoparticulelor în mediul acvatic. In: *One Health and Risk Management*. 2020, nr. 1, pp. 64-71. doi: 10.5281/zenodo.3701197, ISSN 2587-3458.
9. IAȚCO, I.U. Tehnologii de obținere a preparatelor lipidice din biomasa algei verzi *Dunaliella salina*: tz. de doct. în biologie. Chisinau, 2012, 168p.
10. MISCU, V. Biotehnologii de obținere a preparatelor pe bază de astaxantină din *Haematococcus pluvialis* flotoz CNW-AV-05: tz. de doct. în biologie. Chișinău, 2010, 158p.
11. RUDI, L., **CEPOI, L., ș.a.** Unele aspecte ale aplicării nanoparticulelor de aur în biotehnologia microalgei *Porphyridium cruentum*. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2021, nr. 2(344), p. 126-132. ISSN 1857-064X.
12. RUDI, L., **CEPOI, L., ș.a.** Unele particularități ale răspunsului microalgei *Porphyridium cruentum* la acțiunea nanoparticulelor de argint și aur stabilizate în citrat. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2022, nr. 1(345), pp. 79-86. ISSN 1857-064X.
13. RUDI, L., **CEPOI, L., ș.a.** Producerea de biomasă și carotenoizi de către alga verde *Haematococcus pluvialis* pe durata ciclului vital sub influența metalocomplexelor Co (II) cu bazele Schiff. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții*. 2014, nr. 2(323), pp. 163-171. ISSN 1857-064X.
14. RUDI, L., **CEPOI, L., ș.a.** Determinarea dependenței corelaționale dintre valorile testului ABTS și conținutul de carotenoizi în extractele etanolice din biomasa algei verzi *Haematococcus pluvialis*. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții*. 2013, nr. 3(321), pp. 146-153. ISSN 1857-064X.
15. RUDI, L., CHIRIAC, T., **CEPOI, L., MISCU, V., RUDIC, V.** *Factorii tehnologici și calitatea biomasei de spirulină*. Chișinău: „Artpoligraf”, 2020. 242p. ISBN 978-9975-3462-8-3.
16. RUDI, L., CHIRIAC, T., **CEPOI, L., MISCU, V., VALUȚA, A., DJUR, S., RUDIC, V.** *Metode de analiză în ficobiotehologie*. Ghid metodic. 2020. Chișinău: „Artpoligraf”. 101p. doi: <https://doi.org/10.52757/9789975346290>, ISBN 978-9975-3462-9-0.
17. RUDI, L., **CEPOI, L., ș.a.** *Procedeu de cultivare a cianobacteriei Spirulina platensis*. Brevet de invenție 4796 C1 C12N 1/20 (2006.01). Institutul de Microbiologie și Biotehnologie. Nr. depozit a 2021 0009. Data depozit 26.02.2021. Publicat 28.02.2022. In: BOPI 2022, nr. 2, pp. 61-62.
18. RUDI, L., CHIRIAC, T., **CEPOI, L., ș.a.** *Procedeu de cultivare a cianobacteriei Spirulina platensis*. Brevet de invenție 4714 C1 C12N 1/20 (2006.01). Institutul de Microbiologie și

- Biotehnologie. Nr. depozit a 2019 0041. Data depozit 22.05.2019. Publicat 30.09.2020. In: BOPI 2020, nr. 9, p. 54.
19. RUDI, L., CHIRIAC, T., **CEPOI, L.**, ș.a. *Procedeu de cultivare a microalgei Porphyridium cruentum*. Brevet de invenție 4849 B1 C12N 1/12 (2006.01). Institutul de Microbiologie și Biotehnologie. Nr. depozit a 2022 0010. Data depozit 16.02.2022. Publicat 31.03.2023. In: BOPI 2023, nr. 3, p. 53.
  20. RUDIC, V., RUDI, L., CHIRIAC, T., **CEPOI, L.**, ș.a. Relevanța testului TBARS în determinarea stresului oxidativ la *Arthrospira platensis* pe durata ciclului de cultivare. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2016, nr. 3(330), pp.143-149. ISSN 1857-064X.
  21. RUDIC, V., RUDI, L., CHIRIAC, T., CODREANU, S., DUMBRĂVEANU, V., DJUR, S., **CEPOI, L.**, ș.a. Dinamica modificării componenței biochimice a spirulinei pe durata cultivării în condiții de laborator în dependență de regimul de iluminare. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții*. 2015, nr. 3(327), pp. 142-149. ISSN 1857-064X.
  22. RUDIC, V., RUDI, L., CHIRIAC, T., CODREANU, S., DUMBRĂVEANU, V., DJUR, S., **CEPOI, L.**, ș.a. Activitatea antioxidantă în biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* pe durata cultivării în dependență de iluminare. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2015, nr. 3(327), pp. 156-162. ISSN 1857-064X.
  23. RUDIC, V., RUDI, L., **CEPOI, L.**, ș.a. Influența stresului oxidativ indus asupra componenței și activității antioxidante a biomasei de *Spirulina platensis*. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2015, nr. 1(325), pp. 146-153. 1857-064X.
  24. RUDIC, V., **CEPOI, L.**, ș.a. *Procedeu de apreciere a toxicității nanoparticulelor cu ajutorul microalgei roșii Porphyridium cruentum*. Brevet de invenție 4200 C1 B82Y 5/00 (2011.01) Institutul de Microbiologie și Biotehnologie. Nr. depozit a 2012 0058. Data depozit 05.07.2012. Publicat 28.02.2013. In: BOPI 2013, nr. 2, pp. 22-23.
  25. RUDIC, V., RUDI, L., MAFTEI, E., CHIRIAC, T., **CEPOI, L.**, ș.a. *Procedeu de cultivare a microalgei Dunaliella salina CNMN-AV-01*. Brevet de invenție 4598 C1 C12N 1/12 (2006.01). Institutul de Microbiologie și Biotehnologie. Nr. depozit a 2018 0039. Data depozit 15.05.2018. Publicat 31.10.2018. In: BOPI 2018, nr. 10, pp. 46-47.
  26. RUDIC, V., RUDI, L., ZINICOVSCAIA, I., CHIRIAC, T., **CEPOI, L.**, ș.a. *Procedeu de cultivare a cianobacteriei Spirulina platensis*. Brevet de invenție 4543 C1 C12N 1/12 (2006.01). Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei. Nr. depozit a 2017 0018. Data depozit 15.02.2017. Publicat 31.12.2017. In: BOPI 2017, nr. 12, pp. 41-42.
  27. RUDIC, V., RUDI, L., ZINICOVSCAIA, I., CHIRIAC, T., **CEPOI, L.** ș.a. *Procedeu de cultivare a cianobacteriei Spirulina platensis*. Brevet de invenție 4542 C1 C12N 1/12 (2006.01). Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei. Nr. depozit a 2017 0017. Data depozit 15.02.2017. Publicat 31.12.2017. In: BOPI 2017, nr. 12, pp. 40-41.
  28. SADOVNIC, D. *Tehnologii de obținere a preparatelor antioxidante și antiradicalice din biomasa algei roșii Porphyridium cruentum CNM-AR-01*: tz. de doct. în biologie. Chisinau, 2014, 159 p.
  29. SADOVNIC, D., **CEPOI, L.**, ș.a. Activitatea antioxidantă a preparatului etanolic în baza biomasei de *Porphyridium cruentum*. In: *Actual Problems in Modern Phycology: fifth ed. intern. conf.*, 3-5 nov. 2014. Chișinău: CEP USM, 2014, pp. 89-94. ISBN 978-9975-71-577-5.
  30. VALUȚA, A. *Biotehnologia cultivării cianobacteriei Nostoc linckia – sursă de antioxidanți*: tz. de doct. în biologie. Chisinau, 2015. 159 p.

în limba engleză:

31. ABD EL BAKY, H.H., EL BAZ, K.F., EL-LATIFE, S. Induction of sulfated polysaccharides in *Spirulina platensis* as response to nitrogen concentration and its biological evaluation. In: *Journal of Aquaculture Research & Development*. 2013, vol. 5(01), pp. 1-8. doi:10.4172/2155-

- 9546.1000206, ISSN 2155-9546.
32. ABD EL BAKY, H.H., EL BAZ, F.K., EL-BAROTY, G.S. Enhancement of antioxidant production in *Spirulina platensis* under oxidative stress. In: *Acta Physiologiae Plantarum*. 2009, vol. 31(3), pp. 623-631. doi:10.1007/s11738-009-0273-8, ISSN (online) 1861-1664.
  33. ABED, R.M.M., DOBRETISOV, S., SUDESH, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. In: *Journal of Applied Microbiology*. 2009, vol. 106(1), pp. 1-12. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2008.03918.x>, ISSN 1365-2672, 1364-5072.
  34. ABINANDAN, S., SUBASHCHANDRABOSE, S.R., VENKATESWARLU, K., MEGHARAJ, M. Soil microalgae and cyanobacteria: The biotechnological potential in the maintenance of soil fertility and health. In: *Critical Reviews in Biotechnology*. 2019, vol. 39(8), pp. 981-998. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1654972>, ISSN 0738-8551, 1549-7801.
  35. AFZAL, B. et al. Screening of cyanobacterial strains for the selenium nanoparticles synthesis and their anti-oxidant activity. In: *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019, vol. 21, Article ID 101307. doi:10.1016/j.bcab.2019.101307, ISSN 1878-8181.
  36. AFZAL, B., FATMA, T. Selenium nanoparticles: Green synthesis and exploitation. In: PATEL, J.K., PATHAK, Y.V., eds. *Emerging Technologies for Nanoparticle Manufacturing*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2021, pp. 473-484. doi:10.1007/978-3-030-50703-9\_22, ISBN 978-3-030-50702-2.
  37. AJITHA, V. et al. Effects of zinc and mercury on ROS-mediated oxidative stress-induced physiological impairments and antioxidant responses in the microalga *Chlorella vulgaris*. In: *Environmental Science and Pollution Research*. 2021, vol. 28(25), pp. 32475-32492. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12950-6>, ISSN 0944-1344, 1614-7499.
  38. ALIPOUR, S. et al. Green synthesis of selenium nanoparticles by cyanobacterium *Spirulina platensis* (abdf2224): Cultivation condition quality controls. In: *BioMed Research International*. 2021, vol. 2021, Article ID 6635297. doi: 10.1155/2021/6635297, ISSN 2314-6141.
  39. ALMENDINGER, M. et al. Characterization of selected microalgae and cyanobacteria as sources of compounds with antioxidant capacity. In: *Algal Research*. 2021, vol. 53, 102168. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102168>, ISSN 22119264.
  40. AL-RASHED SARAH, A. et al. Evaluation of radical scavenging system in two microalgae in response to interactive stresses of UV-B radiation and nitrogen starvation. In: *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2016, vol. 23(6), pp. 706-712. doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.06.010, ISSN (online) 1319-562X.
  41. AMIN, M.E., AZAB, M.M., HANORA, A.M, ABDALLA, S. Antifungal activity of silver nanoparticles on Fluconazole resistant Dermatophytes identified by (GACA)<sub>4</sub> and isolated from primary school children suffering from *Tinea Capitis* in Ismailia-Egypt. In: *Cellular and Molecular Biology*. 2017, vol. 63, pp. 63-67. <https://doi.org/10.14715/cmb.2017.63.11.12>, ISSN (online) 1165-158X.
  42. ANDERSSON, B. et al. The fluctuating cell-specific light environment and its effects on cyanobacterial physiology. In: *Plant Physiology*. 2019, vol. 181(2), pp. 547-564. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00480>, ISSN (online) 1532-2548.
  43. ANDREEVA, N.A., MELNIKOV, V.V., SNARSKAYA, D.D. The role of cyanobacteria in marine ecosystems. In: *Russian Journal of Marine Biology*. 2020, vol. 46(3), pp. 154-165. <https://doi.org/10.1134/S1063074020030025>, ISSN (online) 1608-3377.
  44. ANDREYEV, A.YU., KUSHNAREVA, YU.E., STARKOV, A.A. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. In: *Biochemistry (Moscow)*. 2005, vol. 70, nr. 2, pp. 200-214. ISSN (online) 1608-3040.
  45. ANDRIOPOULOS, V. et al. Total phenolic content, biomass composition, and antioxidant activity of selected marine microalgal species with potential as aquaculture feed. In: *Antioxidants*. 2022, vol. 11(7), 1320. doi.org/10.3390/antiox11071320, ISSN 2076-3921.
  46. APEL, K., HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. In: *Annual Review of Plant Biology*. 2004, vol. 55, pp. 373-399. ISSN 1545-2123, 1543-5008.

47. APORI, O.S., HANYABUI, E., ASIAMAH, Y.J. Remediation technology for copper contaminated soil: A review. In: *Ain Shams Engineering Journal*. 2018, nr. 1, pp. 1-7. doi:10.9734/asrj/2018/v1i326338, ISSN (online) 2090-4495.
48. ARASIMOWICZ, M., FLORYSZAK-WIECZOREK, J. Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses. In: *Plant Science*. 2007, vol. 172(5), pp. 876-887. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.02.005>, ISSN 1873-2259, 0168-9452.
49. ARUL, D. et al. Antibacterial efficacy of silver nanoparticles and ethyl acetate's metabolites of the potent halophilic (marine) bacterium, *Bacillus cereus* A30 on multidrug resistant bacteria. In: *Pathogens and Global Health*. 2017, vol. 111, pp. 367-382. <https://doi.org/10.1080/20477724.2017.1390829>, ISSN (online) 2047-7724.
50. ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their function. In: *Plant Physiology*. 2006, vol. 141(2), pp. 391-396. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082040>, ISSN 0176-1617, 1618-1328.
51. ASAN-OZUSAGLAM, M., CAKMAK, Y.S., KAYA, M. Bioactivity and antioxidant capacity of *Anabaenopsis* sp. (Cyanobacteria) extracts. In: *Journal of Algal Biomass Utilisation*. 2013, vol. 4, nr. 3, pp. 50-58. ISSN 2229-6905.
52. AZEEZ, P. A., BANERJEE, D. K. Nickel uptake and toxicity in cyanobacteria. In: *Toxicological & Environmental Chemistry*. 1991, vol. 30(1-2), pp. 43-50. <https://doi.org/10.1080/02772249109357639>, ISSN 0277-2248.
53. AZEEZ, P.A., BANERJEE, D.K. Effect of chromium on cyanobacteria and its accumulation. In: *Toxicological & Environmental Chemistry*. 1988, vol. 16(3), pp. 229-240. <https://doi.org/10.1080/02772248809357261>, ISSN 0277-2248.
54. BABELE, P. K., KUMAR, J., CHATURVEDI, V. Proteomic de-regulation in cyanobacteria in response to abiotic stresses. In: *Frontiers in Microbiology*. 2019, vol. 10, 1315. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01315>, ISSN 1664-302X.
55. BAFGHI, M.H. et al. Biosynthesis of selenium nanoparticles by *Aspergillus flavus* and *Candida albicans* for antifungal applications. In: *Micro & Nano Letters*. 2021, vol. 16, pp. 656-669. <https://doi.org/10.1049/mna2.12096>, ISSN 1750-0443.
56. BAI, H. et al. Bioremediation of copper-containing wastewater by sulfate reducing bacteria coupled with iron. In: *Journal of Environmental Management*. 2013, vol. 129, pp. 350-356. doi:10.1016/j.jenvman.2013.06.050, ISSN (online) 1095-8630.
57. BANASIUK, R. et al. Synthesis of antimicrobial silver nanoparticles through a photomediated reaction in an aqueous environment. In: *International Journal of Nanomedicine*. 2016, vol. 11, pp. 315-324. <https://doi.org/10.2147/IJN.S93611>, ISSN (online) 1174-2013.
58. BANERJEE, M. et al. Functional and mechanistic insights into the differential effect of the toxicant Se(IV) in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. In: *Aquatic Toxicology*. 2021, vol. 236, Article ID 105839. doi: 10.1016/j.aquatox.2021.105839, ISSN (online) 1879-1514.
59. BECZE, A., CEPOI, L., SIMEDRU, D., RUDI, L., CHIRIAC, T., RUDIC, V. Study regarding the influence of the salinity stress on the antioxidant capacity of *Arthrospira platensis*. In: *Agricultura*. 2017, vol. 103, nr. 3-4, pp. 12-16. <https://doi.org/10.15835/agrisp.v103i3-4.12836>, ISSN 1221-5317.
60. BERMAN-FRANK, I., LUNDGREN, P., FALKOWSKI, P. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. In: *Research in Microbiology*. 2003, vol. 154(3), pp. 157-164. doi: 10.1016/S0923-2508(03)00029-9, ISSN 0923-2508.
61. BHARADWAJ, S.V.V., RAM, S., PANCHA, I., MISHRA, S. Recent trends in strain improvement for production of biofuels from microalgae. In: *Microalgae cultivation for biofuels production*. Elsevier, 2020, pp. 211-225. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00014-X>, ISBN 978-0-12-817536-1.
62. BHATTACHARJEE, S. ROS and oxidative stress: Origin and implication. In: S., BHATTACHARJEE, ed. *Reactive oxygen species in plant biology*. India: Springer, 2019 pp. 1-31. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-3941-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-81-322-3941-3_1), ISBN 978-81-322-3939-0 978-81-322-3941-3.

63. BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. et al. Effects of light intensity and temperature on *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) with straight and coiled trichomes: growth rate and morphology. In: *Brazilian Journal of Biology*. 2012, vol. 72(2), pp. 343-351. doi: 10.1590/s1519-69842012000200016, ISSN 1678-4375.
64. BIVOL, C., BECZE, A., CEPOI, L., RUDI, L., CHIRIAC, T., SIMEDRU, D. Temperature-induced expression of fatty acids desaturase genes in *Arthrospira platensis*. In: *Abstract Book of the European Workshop on the molecular biology of cyanobacteria, tenth ed., 20-24 aug. 2017*. Cluj-Napoca, România, p.123.
65. BORTOLINI, D. G. et al. Functional properties of bioactive compounds from *Spirulina spp.*: Current status and future trends. In: *Food Chemistry: Molecular Sciences*. 2022, vol. 5:100134. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100134>, ISSN 2666-5662.
66. BOUMA-GREGSON, K. et al. Impacts of microbial assemblage and environmental conditions on the distribution of anatoxin-a producing cyanobacteria within a river network. In: *The ISME Journal*. 2019, vol. 13(6), pp. 1618-1634. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0374-3>, ISSN 1751-7362, 1751-7370.
67. BRAND, M.D. et al. Mitochondrial superoxide: Production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. In: *Free Radical Biology and Medicine*. 2004, vol. 37(6), pp. 755-767. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.05.034, ISSN 0891-5849.
68. BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C.L.W.T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. In: *LWT-Food Science and Technology*. 1995, vol. 28, pp. 25-30. doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5, ISSN 0023-6463.
69. BRAYNER, R. et al. Cyanobacteria as bioreactors for the synthesis of Au, Ag, Pd, and Pt nanoparticles via an enzyme mediated route. In: *Journal for Nanoscience and Nanotechnology*. 2007, vol. 7, pp. 2696-2708. doi: 10.1166/jnn.2007.600, ISSN (online) 1533-4899.
70. BREMUS, C. et al. The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. In: *Journal of Biotechnology*. 2006, vol 124(1), pp. 196-205. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.01.010, ISSN 0168-1656, ISSN 1873-4863.
71. BROWN, G.C., BORUTAITE, V., There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. In: *Mitochondrion*. 2012, vol. 12(1), pp.1-4. doi: 10.1016/j.mito.2011.02.001, ISSN 1567-7249.
72. BUNDSCHUH, M. et al. Nanoparticles in the environment: Where do we come from, where do we go to? In: *Environmental Sciences Europe*. 2018, vol. 30(1): 6. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0132-6>, ISSN 2190-4715.
73. BUONOCORE, G., PERRONE, S., TATARANNO, M.L. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. In: *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 2010, vol. 15, pp. 186-190. doi: 10.1016/j.siny.2010.04.003, ISSN 1744-165X.
74. BURCHARDT, A.D. et al. Effects of silver nanoparticles in diatom *Thalassiosira pseudonana* and cyanobacterium *Synechococcus* sp. In: *Environmental Science and Technology*. 2012, vol. 46, pp. 11336-11344. <https://doi.org/10.1021/es300989e>, ISSN (online) 1520-5851.
75. CALDERÓN-JIMÉNEZ, B. et al. Silver nanoparticles: technological advances, societal impacts and metrological challenges. In: *Frontiers in Chemistry*. 2017, vol. 5:6. doi: 10.3389/fchem.2017.00006, ISSN (online) 2296-2646.
76. CAMERON, H., MATA, M.T., RIQUELME, C. The effect of heavy metals on the viability of *Tetraselmis Marina* AC16-MESO and an evaluation of the potential use of this microalga in bioremediation. In: *PeerJ*. 2018, vol. 6, e5295. doi:10.7717/peerj.5295, ISSN 2167-8359.
77. CAREY, C.C. et al. Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. In: *Water Research*. 2012, vol. 46(5), pp. 1394-1407. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.016>, ISSN 0043-1354.
78. CAROCHO, M. et al. A review on anti- oxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds. Screening and analysis methodologies and future perspectives. In: *Food and Chemical Toxicology*. 2013, vol. 51, pp. 15-25. doi: 10.1016/j.fct.2012.09.021, ISSN 0278-6915.

79. CASAS-ARROJO, V. et al. Immunomodulatory, antioxidant activity and cytotoxic effect of sulfated polysaccharides from *Porphyridium cruentum* (S.F. Gray) Nägeli. In: *Biomolecules*. 2021, vol. 11(4), Article ID 488. doi.org/10.3390/biom11040488, ISSN (online) 2218-273X.
80. CASSIER-CHAUVAT, C., BLANC-GARIN, V., CHAUVAT, F. Genetic, genomics, and responses to stresses in Cyanobacteria: Biotechnological implications. In: *Genes*. 2021, vol. 12(4), 500. https://doi.org/10.3390/genes12040500, ISSN 2073-4425.
81. CAVALLETTI, E. et al. Copper effect on microalgae: Toxicity and bioremediation strategies. In: *Toxics*. 2022, vol. 10(9), 527. https://doi.org/10.3390/toxics10090527, ISSN 2305-6304.
82. CEPOI L, ZINICOVSCAIA Inga. *Spirulina platensis* as a model object for the environmental bioremediation studies. In: KONUR, O. ed. *Handbook of algal sciences, technology and medicine*. London Elsevier: Academic Press, 2020, pp. 629-640. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818305-2.00039-5, ISBN 978-0-12-818305-2.
83. CEPOI, L. Environmental and technological stresses and their management in Cyanobacteria. In: MISHRA, A.K., TIWARI, D.N., RAI, A.N. eds. *Cyanobacteria from basic science to applications*. 1st edition, Elsevier: Academic Press, 2019, p.217-244. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00011-8, ISBN 978-0-12-914667-5.
84. CEPOI, L., et.al. Metals removal by cyanobacteria and accumulation in biomass. In: ZINICOVSCAIA, I., CEPOI, L. eds. *Cyanobacteria for Bioremediation of Wastewaters*. Cham: Springer International Publishing. 2016, pp. 61-111. ISBN 978-3-319-26751-7.
85. CEPOI, L. et al. Spirulina as a raw material for products containing trace elements. In: *Recent Advances in Trace Elements*. Chichester. UK: John Wiley & Sons Ltd. 2018, pp. 403-420. http://doi.wiley.com/10.1002/9781119133780.ch19, ISBN 9781119133773.
86. CEPOI, L., et.al. Productivity and content of biologically active compounds during *Spirulina platensis* cultivation in the presence of gold nanoparticles (AuNPs). In: *Proceedings of the International Scientific Conference on Microbial Biotechnology: fourth ed. of conf., 11-12 oct. 2018*, Chişinău: „Artpoligraf”, 2018, p. 151. ISBN 978-9975-3178-8-7.
87. CEPOI, L., et.al. Spirulina as a raw material for products containing trace elements. In: CHOJNACKA, K., SAEID, A. eds. *Recent Advances in Trace Elements*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. 2016, pp. 403-420. ISBN (online) 9781119133780.
88. CEPOI, L., GOLAN, I., GRYGANSKYI, A. P. Phylogenetical approach for the search of valuable metabolic products in cyanobacteria. In: *Abstract Book of the International Congress of Geneticists and Breeders from the Republic of Moldova: tenth ed., 28 june - 1 July 2015*. Chişinău: CEP USM, 2015, p. 279. ISBN 978-9975-933-56-8.
89. CEPOI, L., et.al. Antioxidants of algae for food industry. In: *Abstract Book of the International Symposium EuroAliment: eight ed. 07-08 sept. 2017*, Galaţi: Galati University Press, 2017, pp.104-105.
90. CEPOI, L., et.al. Microalgae as possible silver “nanofactories”. In: *Proceedings of the International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering ICNBME-2013: second ed., 18-20 april 2013*, Chisinau: ASM, 2013, pp. 433-434. ISBN 978-981-287-736-9.
91. CEPOI, L., RUDI, L., CHIRIAC, T. Les microalgues et les cyanobacteries pour une alimentation saine. In: *Securite alimentare, nutrition et agriculture durable, Actes du Colloque Francophone interdisciplinaire, 19-20 oct. 2018*, Universite Technique de Moldova, Chisinau, Republique de Moldova, p. 28-29. ISBN 978-9975-87-428-1.
92. CEPOI, L., et.al. Red microalgae *Porphyridium cruentum* - marker of nanoparticle toxicity. In: *Actual problems of protection and sustainable use of the animal world diversity: eighteen ed. intern. conf. of zoologists, 10-12 oct. 2013*, Chisinau: „Elan Poligraf”, 2013, pp.198-199. ISBN 978-9975-66-361-8.
93. CEPOI, L., et al. Changes in biochemical composition of *Porphyridium cruentum* upon exposure to silver nanoparticles. In: *Modern biotechnologies – Solutions to the challenges of the contemporary world: nat. sci. symp. with intern. particip., 20-21 mai 2021*, Chisinau: „Artpoligraf”, 2021, p. 46. ISBN 978-9975-3498-7-1.

94. **CEPOI, L., et al.** Silver nanoparticles as stimulators in biotechnology of *Porphyridium cruentum*. In: *Program and Abstract Book of the International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering ICNBME-2021: fifth ed., 3-5 nov. 2021*, Chisinau: Pontos (Europress SRL), 2021, p.106. ISBN 978-9975-72-592-7.
95. **CEPOI, L., et al.** Antioxidative activity and  $\beta$ -carotene synthesis in biomass of green algae *Dunaliella salina*. In: *Proceedings of the International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, dedicated to the 70th anniversary of foundation of first research institutions and 55th anniversary of the inauguration of the Academy of Sciences of Moldova: third ed., 12-13 oct. 2016*, Chişinău: „Artpoligraf”, 2016, p. 179. ISBN 978-9975-3129-3-6.
96. **CEPOI, L., et al.** Silver nanoparticles as stimulators in biotechnology of *Porphyridium cruentum*. In: *International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering ICNMBE 2021: IFMBE Proceedings*, vol.87, Springer Cham., pp.530-536. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-92328-0\\_68](https://doi.org/10.1007/978-3-030-92328-0_68).
97. **CEPOI, L., et al.** Biochemical changes in microalga *Porphyridium cruentum* associated with silver nanoparticles biosynthesis. In: *Archives of Microbiology*. 2021, vol. 203, pp. 1547-1554. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02143-z>, ISSN 1432-072X.
98. **CEPOI, L., et al.** The action of Zn(II) acetate on adaptive capacity of spirulina in response to changes in the light regime. In: *Proceedings of the International Scientific Conference on Microbial Biotechnology: fourth ed., 11-12 oct. 2018*, Chişinău: „Artpoligraf”, 2018, p. 84. ISBN 978-9975-3178-8-7.
99. **CEPOI, L., et al.** Modification of some structural and functional parameters of living culture of *Arthrospira platensis* as the result of selenium nanoparticle biosynthesis. In: *Materials*. 2023, vol. 16, 852. <https://doi.org/10.3390/ma16020852>, ISSN 1996-1944.
100. **CEPOI, L., et al.** Changes in the *Dunaliella salina* biomass composition during silver nanoparticles formation. In: *Nanotechnology for Environmental Engineering*. 2022, vol. 7, pp. 235-243. <https://doi.org/10.1007/s41204-022-00218-4>, ISSN: 2365-6379, 2365-6387.
101. **CEPOI, L., et al.** Assessment of metal accumulation by and its adaptation to iterative action of nickel mono- and polymetallic synthetic effluents. In: *Microorganisms*. 2022, vol. 10(5), Article ID 1041. [doi.org/10.3390/microorganisms10051041](https://doi.org/10.3390/microorganisms10051041), ISSN (online) 2076-2607.
102. **CEPOI, L., et al.** *Spirulina platensis* as renewable accumulator for heavy metals accumulation from multi-element synthetic effluents. In: *Environmental Science and Pollution Research*. 2020, vol. 27, nr. 25, pp. 31793-31811. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09447-z>, ISSN (online) 1614-7499.
103. **CEPOI, L., et al.** Growth and heavy metals accumulation by *Spirulina platensis* biomass from multicomponent copper containing synthetic effluents during repeated cultivation cycles. In: *Ecological Engineering*. 2020, vol. 142, 105637. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2019.105637>, ISSN 1872-6992, 0925-8574.
104. **CEPOI, L., et al.** Biomass of *Arthrospira platensis* enriched with lithium by bioaccumulation and biosorption process. In: *Food Bioscience*. 2021, vol. 41, 100950. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100950>, ISSN 2212-4292.
105. **CEPOI, L., et al.** Effects of PEG-coated silver and gold nanoparticles on *Spirulina platensis* biomass during its growth in a closed system. In: *Coatings*. 2020, vol. 10, 717. <https://doi.org/10.3390/coatings10080717>, ISSN 2079-6412.
106. **CEPOI, L., et al.** Peculiarities of the edaphic cyanobacterium *Nostoc linckia* culture response and heavy metal accumulation from copper-containing multimetal systems. In: *Toxics*. 2022, vol. 10, 113. <https://doi.org/10.3390/toxics10030113>, ISSN 2305-6304.
107. **CEPOI, L., et al.** Bioremediation capacity of edaphic cyanobacteria *Nostoc linckia* for chromium in association with other heavy-metals-contaminated soils. In: *Environments*. 2022, vol. 9, 1. <https://doi.org/10.3390/environments9010001>, ISSN 2076-3298.
108. **CEPOI, L., et al.** Biochemical changes in cyanobacteria during the synthesis of silver nanoparticles. In: *Canadian Journal of Microbiology*. 2015, vol. 61, pp. 13-21. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0450>, ISSN (online) 1480-3275.



109. **CEPOI, L., TAȘCA, I.** Biochemical and morphological changes in spirulina during selenium nanoparticle biosynthesis. In: *Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community: nat. conf. with intern. particip., 21-22 oct. 2019*. Chisinau: „Biotehdesign”, 2019, pp. 61-62. ISBN 978-9975-108-83-6.
110. **CEPOI, L.** Antioxidant activity in *Arthrospira platensis* cells during the vital cycle in standard and stress condition. In: *Proceedings of the International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, dedicated to the 70th anniversary of foundation of first research institutions and 55th anniversary of the inauguration of the Academy of Sciences of Moldova: third ed., 12-13 oct. 2016*. Chișinău: „Artpoligraf”, 2016, p. 28. ISBN 978-9975-3129-3-6.
111. **CEPOI, L.** Antioxidant activity in *Haematococcus pluvialis* cells during the vital cycle. In: *Proceedings of the International Scientific Conference on Microbial Biotechnology: second ed., 9-10 oct. 2014*. Chișinău: „Elena-V.I.”, 2014, pp. 25-29. ISBN 978-9975-4432-8-9.
112. **CEPOI, L.** Copper compounds as stress factors and regulators in phycobiotechnology. In: *Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community: nat. conf. with intern. particip., 29-30 sept. 2022*. Chisinau: Editura USM, 2022, p. 230. ISBN 978-9975-159-80-7.
113. **CEPOI, L.** Environmental and technological stresses and their management in Cyanobacteria. In: MISHRA, A.K., TIWARI, D.N., RAI, A.N. eds. *Cyanobacteria from Basic Science to Applications*. 1st edition. Amsterdam: Elsevier Inc., 2019, pp. 217-244. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00011-8>, ISBN 978-012814668-2, 978-012814667-5.
114. **CEPOI, L.** Induced oxidative stress – a biotechnological tool in phycobiotechnology. In: *Proceedings of the International Scientific Conference on Microbial Biotechnology: fourth ed., 11-12 oct. 2018*. Chișinău: „Artpoligraf”, 2018, p. 88. ISBN 978-9975-3178-8-7.
115. **CEPOI, L.** Technological stress and the quality of spirulina biomass. In: *Abstract Book of the International Congress of Geneticists and Breeders from the Republic of Moldova: eleventh ed., 15-16 june 2021*. Chișinău: CEP USM, 2021, p.148. ISBN 978-9975-152-13-6.
116. **CEPOI, L.** The influence of oxidative stress on the quality of phycological biomass. In: *Advances in Modern Phycology: sixth ed. intern. conf., 15-17 may 2019*. Kyiv, Ukraine. p. 26-28. ISBN: 978-966-02-8876-8.
117. CHAIKLAHAN, R. et al. Polysaccharide extraction from *Spirulina* sp. and its antioxidant capacity. In: *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013, vol. 58, pp.73-78. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.046>, ISSN (online) 1879-0003.
118. CHAILLAN, F. et al. Role of cyanobacteria in the biodegradation of crude oil by a tropical cyanobacterial mat. In: *Chemosphere*. 2006, vol. 62(10), pp. 1574-1582. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.06.050, ISSN 0045-6535.
119. CHALOUPKA, K., MALAM, Y., SEIFALIAN, A.M. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. In: *Trends in Biotechnology*. 2010, vol. 28, pp. 580-588. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.07.006>, ISSN (online) 1879-2096.
120. CHAMIZO, S. et al. Cyanobacteria inoculation improves soil stability and fertility on different textured soils: gaining insights for applicability in soil restoration. In: *Frontiers in Environmental Science*. 2018, vol. 6, pp. 49. doi:10.3389/fenvs.2018.00049, ISSN (online) 2296-665X.
121. CHAVAN, R.B., BHATTACHARJEE, M.B. Role of alginate and oxalic acid in ameliorating Se toxicity in *Hapalosiphon cyanobacterium*. In: *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2016, vol. 5(11), pp. 132-139. <http://dx.doi.org/10.20546/ijemas.2016.511.015>, ISSN (online) 2319-7706.
122. CHAVOSHI, Z.Z., SHARIATI, M. Lipid production in *Dunaliella salina* under autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic conditions. In: *Biologia* (Bratislava). 2019, vol. 74, pp. 1579-1590. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00336-6>, ISSN (online) 1336-9563.



123. CHECA, J., ARAN, J. M. Reactive oxygen species: Drivers of physiological and pathological processes. In: *Journal of Inflammation Research*. 2020, vol. 13, pp. 1057-1073. <https://doi.org/10.2147/JIR.S275595>, ISSN 1178-7031.
124. CHEN, N. et al. Inhibitory effects of silver nanoparticles against adenovirus type 3 in vitro. In: *Journal Virological Methods*. 2013, vol. 193, pp. 470-477. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.020>, ISSN (online) 1879-0984.
125. CHEN, Y., VAIDYANATHAN, S. Simultaneous assay of pigments, carbohydrates, proteins and lipids in microalgae. In: *Analytica Chimica Acta*. 2013, vol. 776, pp. 31-40. doi: 10.1016/j.aca.2013.03.005, ISSN (online). 1873-4324.
126. CHERCHI, C., GU, A.Z. Impact of titanium dioxide nanomaterials on nitrogen fixation rate and intracellular nitrogen storage in *Anabaena variabilis*. In: *Environmental Science & Technology*. 2010, vol. 44, pp. 8302-8307. doi: 10.1021/es101658p, ISSN (online) 1520-5851.
127. CHIORCEA-PAQUIM, A., ENACHE, T.A., DE SOUZA GIL, E., OLIVEIRA-BRETT, A.M. Natural phenolic antioxidants electrochemistry: Towards a new food science methodology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2020, vol. 19(4), pp. 1680-1726. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12566>, ISSN 1541-4337, 1541-4337.
128. CHIRIAC, T., RUDI, L., CEPOI, L., ROTARI, I., DJUR (MAXACOVA), S. Toxicity of Cu and Cd nanoparticles to *Spirulina platensis*. In: *Abstract Book of the International Congress of Geneticists and Breeders from the Republic of Moldova: eleventh ed., 15-16 june 2021*. Chişinău: CEP USM, 2021, p.149. ISBN 978-9975-152-13-6.
129. CHISTI, Y. Microalgae biotechnology: A brief introduction. In: JACOB-LOPES, E., MARONEZE, M.M., QUEIROZ, M.I., ZEPKA, L.Q., eds. *Handbook of microalgae-based processes and products. Fundamentals and advances in energy, food, feed, fertilizer, and bioactive compounds*. Elsevier: Academic Press, 2020, pp. 3-23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818536-0.00001-4>, ISBN 978-0-12-818539-0.
130. CHOI, D.W., LENINGER-MULLER, B., WELLMAN, M. et al. Cytochrom P-450-mediated differential oxidative modification of proteins: albumin, apolipoprotein E, and CYP2E1 as targets. In: *Journal of Toxicology and Environmental Health A*. 2004, vol. 67, pp. 2061-2071. doi: 10.1080/15287390490514895, ISSN 1528-7394, 1087-2620.
131. CHOUDHARY, M. et al. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2007, vol. 66(2), pp. 204-209. doi: 10.1016/j.ecoenv.2006.02.002, ISSN (online) 1090-2414.
132. CHOUYYOK, W. et al. Selective removal of copper (II) from natural waters by nanoporous sorbents functionalized with chelating diamines. In: *Environmental Science & Technology*. 2010, vol. 44(16), pp. 6390-6395. doi: 10.1021/es101165c, ISSN (online) 1520-8551.
133. CIRÉS, S. et al. Temperature-dependent dispersal strategies of *Aphanizomenon ovalisporum* (Nostocales, Cyanobacteria): implications for the annual life cycle. In: *Microbial Ecology*. 2013, vol. 65(1), pp. 12-21. doi: 10.1007/s00248-012-0109-8, ISSN 00953628, 1432184X.
134. CIRULIS, J.T., SCOTT, J.A., ROSS, G.M. Management of oxidative stress by microalgae. In: *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2013, vol. 91(1), pp. 15-21. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0249>, ISSN 0008-4212, 1205-7541.
135. CONA, A., et al. Functions of amine oxidases in plant development and defence. In: *Trends in Plant Science*. 2006, vol. 11, nr. 2, pp. 80-88. doi: 10.1016/j.tplants.2005.12.009, ISSN 1878-4372.
136. COULOMBIER, N., JAUFFRAIS, T., LÉBOUVIER, N. Antioxidant compounds from microalgae: A review. In: *Marine Drugs*. 2021, vol. 19(10):549. doi: 10.3390/md19100549, ISSN 1660-3397.
137. CUELLAR-BERMUDEZ, S. P. et al. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. In: *Microbial*

- Biotechnology*. 2014, vol. 8(2), pp. 190-209. doi:10.1111/1751-7915.12167, ISSN 17517915, 17517907.
138. CUELLAR-BERMUDEZ, S.P. et al. Effects of light intensity and carbon dioxide on lipids and fatty acids produced by *Synechocystis* sp. *PCC6803* during continuous flow. In: *Algal Research*. 2015, vol. 12, pp. 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.018>, ISSN 2211-9264.
  139. DANESI, E.D.G. et al. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. In: *Biomass and Bioenergy*. 2004, vol. 26(4), pp.329-335. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(03\)00127-2](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(03)00127-2), ISSN 0961-9534.
  140. DANGI, A.K., SHARMA, B., HILL, R.T., SHUKLA, P. Bioremediation through microbes: systems biology and metabolic engineering approach. In: *Critical Reviews in Biotechnology*. 2019, vol. 39(1), pp. 79-98. doi:10.1080/07388551.2018.1500997, ISBN (online) 978-3-319-44535-9.
  141. de GREY, A.D.N.J. HO<sub>2</sub>\*: The forgotten radical. In: *DNA and Cell Biology*. 2002, vol. 21(4), pp. 251-257. <https://doi.org/10.1089/104454902753759672>, ISSN 1044-5498.
  142. de LORENZO, VICTOR. Biodegradation and bioremediation: An introduction. In: Robert J. STEFFAN, ed. *Consequences of microbial interactions with hydrocarbons, oils, and lipids: biodegradation and bioremediation*. Switzerland: Springer, 2019, pp. 1-20. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-44535-9>, ISBN 978-3-540-77584-3.
  143. DEBOWSKI, M. et al. Microalgae cultivation technologies as an opportunity for bioenergetic system development - advantages and limitations. In: *Sustainability*. 2020, vol. 12(23), 9980. <https://doi.org/10.3390/su12239980>, ISSN 2071-1050.
  144. DEL MONDO, et al.. Insights into phenolic compounds from microalgae: Structural variety and complex beneficial activities from health to nutraceuticals. In: *Critical Reviews in Biotechnology*. 2021, vol. 41(2), pp. 155-171. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1874284>, ISSN 0738-8551, 1549-7801.
  145. DEL RÍO, L.A., LÓPEZ-HUERTAS, E. ROS Generation in peroxisomes and its role in cell signaling. In: *Plant and Cell Physiology*. 2016, pcw076. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw076>, ISSN 0032-0781, 1471-9053.
  146. DENG, Y. et al. Molecular cloning and expression analysis of RbcL CDNA from the bloom-forming green alga *Chaetomorpha Valida* (Cladophorales, Chlorophyta). In: *Journal of Applied Phycology*. 2014, vol. 26, pp. 1853-1861. doi:10.1007/s10811-013-0208-z, ISSN (online) 1573-5176.
  147. DEVIRAM, G. et al. Applications of microalgal and cyanobacterial biomass on a way to safe, cleaner and a sustainable environment. In: *Journal of Cleaner Production*. 2020, 253, 119770. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119770>, ISSN 0959-6526.
  148. DI CAPRIO, F., et al. Extracellular and intracellular phenol production by microalgae during photoautotrophic batch cultivation. In: *New Biotechnology*. 2021, vol. 62, pp. 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.12.003>, ISSN 1871-6784.
  149. DIAS, L.M.S. et al. Uncovering the use of fucoxanthin and phycobiliproteins into solid matrices to increase their emission quantum yield and photostability. In: *Applied Sciences*. 2022, vol. 12(12), 5839. <https://doi.org/10.3390/app12125839>, ISSN 2076-3417.
  150. DIKO, C.S. et al. Optimal synthesis conditions and characterization of selenium nanoparticles in *Trichoderma* sp. WL-Go culture broth. In: *Materials Chemistry and Physics*. 2020, vol. 246, Article ID 122583. doi:10.1016/j.matchemphys.2019.122583, ISSN (online) 0254-0584.
  151. DURACKOVÁ, Z. Oxidants, antioxidants and oxidative stress. In: GVOZDJÁKOVÁ, A., ed. *Mitochondrial Medicine*. New York: Springer Science + Business Media, 2008, p. 19-54. ISBN: 978-1-4020-6713-6.
  152. ELLEUCH, J. et al. Potential of three local marine microalgae from Tunisian coasts for cadmium, lead and chromium removals. In: *Science of The Total Environment*. 2021, 799, 149464. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149464>, ISSN 0048-9697.

153. EL-SHEEKH, M.M., et.al Growth and heavy metals removal efficiency of *Nostoc Muscorum* and *Anabaena subcylindrica* in sewage and industrial wastewater effluents. In: *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2005, vol. 19, pp. 357-365. doi:10.1016/j.etap.2004.09.005, ISSN (online) 1872-7077.
154. EMAD, A. SHALABY, M. M. SHANAB SANAA, SINGH VIKRAMJIT. Salt stress enhancement of antioxidant and antiviral efficiency of *Spirulina platensis*. In: *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010, vol. 4(24), pp. 2622-3262. doi:10.5897/JMPR09.300, ISSN 1996-0875.
155. ESCARCEGA-GONZALEZ, C.E. et al. In vivo antimicrobial activity of silver nanoparticles produced via a green chemistry synthesis using *Acacia rigidula* as a reducing and capping agent. In: *International Journal of Nanomedicine*. 2018, vol. 13, pp. 2349-2363. <https://doi.org/10.2147/IJN.S160605>, ISSN (online) 1174-2013.
156. FAL, S. et al. Salt induced oxidative stress alters physiological, biochemical and metabolomic responses of green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Heliyon*. 2022, vol. 8(1), e08811. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08811>, ISSN 2405-8440.
157. FERNÁNDEZ, F.G.A. et al. The role of microalgae in the bioeconomy. In: *New Biotechnology*. 2021, vol. 61, pp. 99-107. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.11.011>, ISSN 1871-6784.
158. FERNÁNDEZ-SEVILLA, J.M., ACIÉN FERNÁNDEZ, F.G., MOLINA GRIMA, E., Biotechnological production of lutein and its applications. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, vol. 86(1), pp. 27-40. doi: 10.1007/s00253-009-2420-y, ISSN (online) 1432-0614.
159. FERRO, C., FLORINDO, H.F., SANTOS, H.A. Selenium nanoparticles for biomedical applications: from development and characterization to therapeutics. In: *Advanced Healthcare Materials*. 2021, vol. 10, Article ID 2100598. doi.org/10.1002/adhm.202100598, ISSN (online) 2192-2659.
160. FLECK, R.A. et al. Comparative study of antioxidant protection in cryopreserved unicellular algae *Euglena gracilis* and *Haematococcus pluvialis*. In: *Cryo Letters*. 2003, vol. 24, nr. 4, pp. 213-228. ISSN 0143-2044.
161. FOCSAN, M. et al. Formation of size and shape tunable gold nanoparticles in solution by bio-assisted synthesis with bovine serum albumin in native and denaturated state. In: *Materials Chemistry and Physics*. 2011, vol. 129(3), pp. 939-942. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2011.05.041>, ISSN (online) 1879-3312.
162. FOYER, C. H., HANKE, G. ROS production and signalling in chloroplasts: Cornerstones and evolving concepts. In: *The Plant Journal*. 2022, vol. 111(3), pp. 642-661. <https://doi.org/10.1111/tpj.15856>, ISSN 0960-7412, 1365-313X.
163. FREEMAN, E.C., CREED, I.F., JONES, B., BERGSTRÖM, A. Global changes may be promoting a rise in select cyanobacteria in nutrient-poor northern lakes. In: *Global Change Biology*. 2020, vol. 26(9), pp. 4966-4987. <https://doi.org/10.1111/gcb.15189>, ISSN (online) 1365-2486.
164. FULEKAR, M.H. Bioremediation technology for hazardous wastes - recent advances. In: FULEKAR, M.N. ed. *Bioremediation Technology*. Netherlands, Dordrecht: Springer, 2010, pp. 135-166. doi.org/10.1007/978-90-481-3678-0\_5, ISBN 978-9048136773.
165. GABER, A. et al. Glutathione peroxidase-like protein of *Synechocystis* PCC 6803 confers tolerance to oxidative and environmental stresses in transgenic *Arabidopsis*. In: *Physiologia Plantarum*. 2006, vol. 128, pp. 251-262. ISSN 0031-9317, 1399-3054.
166. GAIKWAD, S. et al. Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. In: *International Journal of Nanomedicine*. 2013, vol. 8, pp. 4303-4314. <https://doi.org/10.2147/IJN.S50070>, ISSN (online) 1178-2013.
167. GALASSO, C. et al. On the neuroprotective role of astaxanthin: New perspectives? In: *Marine Drugs*. 2018, vol. 16, 247. <https://doi.org/10.3390/md16080247>, ISSN 1660-3397.

168. GAN, L. et al. Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles by a halotolerant *Bacillus endophyticus* SCU-L. In: *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 2018, vol. 1(7). <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1476880>, ISSN (online) 1532-2297.
169. GAO, Q.T., TAM, N.F.Y. Growth, photosynthesis and antioxidant responses of two microalgal species, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum* to nonylphenol stress. In: *Chemosphere*. 2010, vol. 82(3), pp. 346-354. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.10.010, ISSN 0045-6535.
170. GAUTHIER, M.R., SENHORINHO, G.N.A., SCOTT, J.A. Microalgae under environmental stress as a source of antioxidants. In: *Algal Research*. 2020, vol. 52, 102104. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102104>, ISSN 22119264.
171. GENOVA, M.L. et al. The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology. *Annals of New York Academy of Sciences*. 2004, vol. 1011, pp. 86-100. doi: 10.1007/978-3-662-41088-2\_10, ISSN 0028-7113.
172. GEOFFRION, L.D. et al. Naked selenium nanoparticles for antibacterial and anticancer treatments. In: *ACS Omega*. 2020, vol. 5, pp. 2660-2669. doi:10.1021/acsomega.9b03172, ISSN (online) 2470-1343.
173. GHOSH, A., SAHA, P.D. Optimization of copper bioremediation by *Stenotrophomonas Maltophilia* PD2. In: *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2013, vol. 1, pp. 159-163. doi:10.1016/j.jece.2013.04.012, ISSN (online) 2213-3437.
174. GIANNUZZI, L. Cyanobacteria growth kinetics. In: Y., KEUNG WONG, ed. *Algae*. IntechOpen, 2019, 70 p. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81545>, ISBN 978-1-83880-562-3 978-1-83880-563-0.
175. GILL, S.S., TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. In: *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010, vol. 48, pp.909-930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016, ISSN 0981-9428.
176. GINER-LAMIA, J. et al. Extracellular proteins: novel key components of metal resistance in cyanobacteria? In: *Frontiers in Microbiology*. 2016, vol. 7:878. doi: 10.3389/fmicb.2016.00878, ISSN (online) 1664-302X.
177. GIORDANINO, M.V.F. et al. Influence of temperature and UVR on photosynthesis and morphology of four species of cyanobacteria. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2011, vol. 103(1), pp. 68-77. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2011.01.013, ISSN 1011-1344.
178. GOIRIS, K. et al. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. In: *Journal of Applied Phycology*. 2012, vol. 24(6), pp. 1477-1486. doi:10.1007/s10811-012-9804-6, ISSN 1573-5176, 0921-8971.
179. GOLD Nanoparticles Market Size, Share & Trends Analysis Report by End-use (Electronics, Medical & Dentistry, Catalysis), By Region, And Segment Forecast, 2023-2030. San Francisco, USA. Report ID: 978-1-68038-312-6., <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/gold-nanoparticles-industry>
180. GOLUBEV, A.A. et al. Colorimetric evaluation of the viability of the microalga *Dunaliella salina* as a test tool for nanomaterial toxicity. In: *Toxicological Sciences*. 2016, vol. 151(1), pp. 115–125. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw023>, ISSN 1096-0929.
181. GOMAA, M., ALI, M.M.A. Enhancement of microalgal biomass, lipid production and biodiesel characteristics by mixotrophic cultivation using enzymatically hydrolyzed chitin waste. In: *Biomass and Bioenergy*. 2021, 154, 106251. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106251>, ISSN 0961-9534.
182. GONGI, W., CORDEIRO, N., PINCHETTI, J.L.G., OUADA, H.B. Functional, rheological, and antioxidant properties of extracellular polymeric substances produced by a thermophilic cyanobacterium *Leptolyngbya sp.* In: *Journal of Applied Phycology*. 2022, vol. 34(3), pp. 1423-1434. <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02695-1>, ISSN 0921-8971, 1573-5176.

183. GONZÁLEZ, A. et al. The challenge of iron stress in cyanobacteria. In: TIWARI Archana ed. *Cyanobacteria. Intech Open*. 2018, pp. 148. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76720>, ISBN 978-1-78923-705-4.
184. GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C., BALLESTEROS, M. Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. In: *Biotechnology Advances*. 2012, vol. 30(6), pp. 1655-1661. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.07.003>, ISSN (online) 1873-1899.
185. GOSWAMI, S. et al. Zn(II) and Cu(II) removal by *Nostoc muscorum*: A cyanobacterium isolated from a coal mining pit in Chiehruphi, Meghalaya, India. In: *Canadian Journal of Microbiology*. 2015, vol. 61, pp. 209-215. doi:10.1139/cjm-2014-0599.20, ISSN (online) 1480-3275.
186. GOUGET, B. et al. Resistance, accumulation and transformation of selenium by the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 after exposure to inorganic Se(VI) or Se(IV). In: *Radiochimica Acta*. 2005, vol. 93, pp. 683-689. doi:10.1524/ract.2005.93.11.683, ISSN 0033-8230.
187. GOVINDARAJU, K., BASHA, SK., KUMAR, VG., SINGARAVELU, G. Silver, gold and bimetallic nanoparticles production using single-cell protein (*Spirulina platensis*) Geitler. In: *Journal of Materials Science*. 2008, vol. 43, pp. 5115-5122. doi:10.1007/s10853-008-2745-4, ISSN (online) 1573-4803.
188. GROSS, E. et al. Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006, vol. 103(2), pp. 299-304. doi: 10.1073/pnas.0506448103, ISSN 0027-8424, 0744-2831.
189. GUEDES, A.C. et al. Optimization of ABTS radical cation assay specifically for determination of antioxidant capacity of intracellular extracts of microalgae and cyanobacteria. In: *Food Chemistry*. 2013, vol. 138(1), pp. 638-643. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.09.106, ISSN 0308-8146.
190. GUERMAZI, W., et al. Physiological and biochemical responses in microalgae *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* and *Phormidium versicolor* NCC466 exposed to high salinity and irradiation. In: *Life*. 2023, vol. 13(2), 313. <https://doi.org/10.3390/life13020313>, ISSN 2075-1729.
191. GUERREIRO, C. et al. New insights into the oral interactions of different families of phenolic compounds: Deepening the astringency mouthfeels. In: *Food Chemistry*. 2022, vol. 375, 131642. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131642> ISSN 03088146.
192. GYULKHANDANYAN, A.V., PENNEFATHER, P.S. Shift in the localization of sites of hydrogen peroxide production in brain mitochondria by mitochondrial stress. In: *Journal of Neurochemistry*. 2004, vol. 90(2), pp. 405-421. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02489.x, ISSN 0022-3042.
193. HABIB, M.A.B., et al. *A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish*. FAO Fisheries and Aquaculture Circular. No. 1034. Rome, FAO, 2008, 33p. ISBN 978-92-5-106106-0.
194. HADWAN, M.H., ABED, H.N. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. In: *Data in Brief*. 2016, vol. 6, pp. 194-199. doi.org/10.1016/j.dib.2015.12.012, ISSN 2352-3409.
195. HAMED, S. et al. Silver nanoparticles: antimicrobial activity, cytotoxicity, and synergism with N-acetyl cysteine. In: *Journal of Basic Microbiology*, 2017, vol. 57(8), pp. 659-668. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700087>, ISSN (online) 0233-111X.
196. HAMED, S.M. et al. Evaluation of the phycoremediation potential of microalgae for captan removal: Comprehensive analysis on toxicity, detoxification and antioxidants modulation. In: *Journal of Hazardous Materials*. 2022, 427, 128177. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.128177>, ISSN 0304-3894.

197. HASSAN, S. et al. Identification and characterization of the novel bioactive compounds from microalgae and cyanobacteria for pharmaceutical and nutraceutical applications. In: *Journal of Basic Microbiology*. 2022, vol. 62(9), pp. 999-1029. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100477>, ISSN 0233-111X, 1521-4028.
198. HASSANEN EMAN, I. et al. The effect of different concentrations of gold nanoparticles on growth performance, toxicopathological and immunological parameters of broiler chickens. In: *Bioscience Reports*. 2020, vol. 40(3):BSR20194296. <https://doi.org/10.1042/BSR20194296>, ISSN (online) 1573-4935.
199. HAYS, S.G., DUCAT, D.C. Engineering cyanobacteria as photosynthetic feedstock factories. In: *Photosynthesis Research*. 2015, vol. 123(3), pp. 285-295. doi: 10.1007/s11120-014-9980-0, ISSN 1573-5079, 0166-8595.
200. HE, A., DEAN, J.M., LODHI, I.J. Peroxisomes as cellular adaptors to metabolic and environmental stress. In: *Trends in Cell Biology*. 2021, vol. 31(8), pp. 656-670. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.02.005>, ISSN 0962-8924.
201. HE, Y.Y, KLISCH, M, HÄDER, D.P. Adaptation of cyanobacteria to UV-B stress correlated with oxidative stress and oxidative damage. In: *Photochemistry and Photobiology*. 2002, vol. 76(2), pp. 188-96. doi: 10.1562/0031-8655(2002)076<0188:aoctub>2.0.co;2, ISSN 1751-1097.
202. HE, Y.-Y., & HÄDER, D.-P. Reactive oxygen species and UV-B: Effect on cyanobacteria. In: *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2002 1(10), pp.729–736. <https://doi.org/10.1039/b110365m>, ISSN 1474-905X, 1474-9092
203. .HEE-SUN KOOK, K.K. The effect of blue-light-emitting diodes on antioxidant properties and resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. In: *Journal of Plant Pathology and Microbiology*. 2013, vol. 4(9), Article ID 1000203. doi: 10.4172/2157-7471.1000203, ISSN 2157-7471.
204. HERNÁNDEZ, I. et al. Antioxidant defenses against drought stress. In: R., AROCA, ed. *Plant Responses To Drought Stress*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2012, pp. 231-258. doi: 10.1007/978-3-642-32653-0\_9, ISBN 978-3-642-32652-3.
205. HERRERO, M. et al. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. In: *Food Chemistry*. 2005, vol. 93, p. 417-423. doi:10.1016/j.foodchem.2004.09.037, ISSN 1873-7072, 0308-8146.
206. HEYNO, E., et al. Oxygen activation at the plasma membrane: relation between superoxide and hydroxyl radical production by isolated membranes. In: *Planta*. 2011, vol. 234, nr. 1, pp. 35-45. doi: 10.1007/s00425-011-1379-y, ISSN 1432-2048, 0032-0935.
207. HIRST, J., KING, M. S., PRYDE, K. R. The production of reactive oxygen species by complex I. In: *Biochemical Society Transactions*. 2008, vol. 36, pp. 976-980. doi: 10.1042/BST0360976, ISSN 1470-8752, 0300-5127.
208. HORVÁTH, H., et al. Extraction methods for phycocyanin determination in freshwater filamentous cyanobacteria and their application in a shallow lake. In: *European Journal of Phycology*. 2013, vol. 48(3), pp. 278-286. doi: 10.1080/09670262.2013.821525, ISSN (online) 1469-4433.
209. HOSSAIN, MD.M., NAKAMOTO, H. Role for the cyanobacterial htpg in protection from oxidative stress. In: *Current Microbiology*. 2003, vol. 46, pp. 70-76. doi:10.1007/s00284-002-3831-5, ISSN (online) 1432-0991.
210. HU, H. et al. Efficient removal of copper from wastewater by using mechanically activated calcium carbonate. In: *Journal of Environmental Management*. 2017, vol. 203(1), pp. 1-7 doi: 10.1016/j.jenvman.2017.07.066, ISSN (online) 1095-8630.
211. HUERTAS, M.J. et al. Metals in cyanobacteria: Analysis of the copper, nickel, cobalt and arsenic homeostasis mechanisms. In: *Life (Basel)*. 2014, vol. 4(4), pp. 865-886. doi: 10.3390/life4040865, ISSN (online) 2075-1729.
212. INOUE, M. et al. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. In: *Current Medical Chemistry*. 2003, vol. 10, pp. 2495-2505. doi: 10.2174/0929867033456477, ISSN 0929-8673, 1875-533X.

213. IRAVANI, S., et al. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. In: *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2014, vol. 9(6), pp. 385-406. ISSN (online) 2078-7685.
214. ISMAIEL, M.M.S., EL-AYOUTY, Y.M., PIERCEY-NORMORE, M. Role of pH on antioxidants production by *Spirulina (Arthrospira) platensis*. In: *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016, vol. 47(2), pp.298-304. doi: 10.1016/j.bjm.2016.01.003, ISSN 1678-4405.
215. ISMAIEL, M.M.S., PIERCEY-NORMORE, M.D. Gene transcription and antioxidants production in *Arthrospira (Spirulina) Platensis* grown under temperature variation. In: *Journal of Applied Microbiology*. 2021, vol. 130, pp. 891-900. doi:10.1111/jam.14821, ISSN (online) 1365-2672.
216. JAESCHKE, H. Antioxidant defense mechanisms. comprehensive toxicology. (Second Edition), 2010, vol. 9, pp, 319-337.
217. JAHNS, P., HOLZWARATH, A.R. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. In: *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012, vol. 1817, pp.182-193. doi: 10.1016/j.bbabi.2011.04.012, ISSN 1872-8006, 0304-4165.
218. JAIME, L., et al. Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD. In: *Journal of Separation Science*. 2005, vol. 28(16), pp. 2111-2119. doi: 10.1002/jssc.200500185, ISSN (online) 1615-9314.
219. JAKUBCZYK, K. et al. Reactive oxygen species - Sources, functions, oxidative damage. In: *Polski Mercuriusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*. 2020, vol. 48(284), pp. 124-127. ISSN 1426-9686.
220. JAKUBOWSKA, N., SZELĄG-WASIELEWSKA, E. Toxic picoplanktonic cyanobacteria - Review. In: *Marine Drugs*, 2015, vol. 13(3), pp. 1497-1518. doi: 10.3390/md13031497, ISSN 1660-3397.
221. JAVANBAKHT, V., ALAVI, S.A., ZILOUEI, H. Mechanisms of heavy metal removal using microorganisms as biosorbent. In: *Water Science & Technology*. 2014, vol. 69(9), pp. 1775-1787. doi: 10.2166/wst.2013.718, ISSN (online) 0273-1223.
222. JEAMTON, W. et al. A combined stress response analysis of *Spirulina Platensis* in terms of global differentially expressed proteins, and mRNA levels and stability of fatty acid biosynthesis genes: combined stress response analysis of *Spirulina platensis*. In: *FEMS Microbiology Letters*. 2008, vol. 281, pp. 121-131. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01100.x, ISSN (online) 1574-6968.
223. JESUS RAPOSO, M.F., MORAIS, R.M.S.C., MORAIS, A.M.M.B. Health application of bioactive compounds from marine microalgae. In: *Life Sciences*. 2013, vol. 93, pp. 479-486. doi: 10.1016/j.lfs.2013.08.002, ISSN 0024-3205.
224. JEZEK, P., HLAVAT, L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues and organism. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2005, vol. 37, pp. 2478-2503.
225. JIMENEZ-LOPEZ, C. et al. Main bioactive phenolic compounds in marine algae and their mechanisms of action supporting potential health benefits. In: *Food Chemistry*. 2021, vol. 341:128262. doi:10.1016/j.foodchem.2020.128262, ISSN 0308-8146.
226. JONES, D.P. Redefining oxidative stress. In: *Antioxidants & Redox Signaling*, 2006, vol. 8, nr. 9-10, pp.1865-1879. doi: 10.1089/ars.2006.8.1865, ISSN 1557-7716.
227. KALABEGISHVILI, T.L. et al. Synthesis of gold nanoparticles by some strains of *Arthrobacter* genera. In: *Journal of Material Sciences and Engineering*. 2012, vol. A2(2), pp. 164-173. ISSN 2169-0022.
228. KANCHEVA, V.D. Phenolic antioxidants – radical-scavenging and chain-breaking activity: a comparative study. In: *The European Journal of Lipid Science & Technology*. 2009, vol. 111(11), pp. 1072-1089. doi:10.1002/ejlt.200900005, ISSN (online)1438-9312.



229. KANG, N. K. et al. Enhancing lipid productivity of *Chlorella vulgaris* using oxidative stress by TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2014, vol. 31(5), pp. 861-867. doi.org/10.1007/s11814-013-0258-6, ISSN (online) 1975-7220.
230. KARAWITA, R. et al. Protective effect of enzymatic extracts from microalgae against DNA damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In: *Marine Biotechnology*. 2007, vol. 9, pp. 479-490. doi: 10.1007/s10126-007-9007-3, ISSN 1436-2236, 1436-2228.
231. KÄRKÖNEN, A., KUCHITSU, K. Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. In: *Phytochemistry*. 2015, vol. 112, pp. 22-32. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.09.016, ISSN 00319422.
232. KARSTEN, U., Defense strategies of algae and cyanobacteria against solar ultraviolet radiation. In: AMSLER, C.D. eds. *Algal Chemical Ecology*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2008, pp. 273-296. https://doi.org/10.1007/978-3-540-74181-7\_13, ISBN 978-3-540-74181-7.
233. KATO, Y. et al. Metabolomics-based engineering for biofuel and bio-based chemical production in microalgae and cyanobacteria: A review. In: *Bioresource Technology*. 2022, vol. 344: 126196. doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126196, ISSN (online) 1873-2976.
234. KAUSHIK, M.S., et al. Ferric uptake regulator (FUR) protein: Properties and implications in cyanobacteria. In: *Annals of Microbiology*. 2016, vol. 66(1), pp. 61-75. https://doi.org/10.1007/s13213-015-1134-x, ISSN 1590-4261, 1869-2044.
235. KEPEKÇI, R.A., SAYGIDEGER, S.D. Enhancement of phenolic compound production in *Spirulina platensis* by two-step batch mode cultivation. In: *Journal of Applied Phycology*, 2012, vol. 24, pp. 897-905. doi:10.1007/s10811-011-9710-3, ISSN 1573-5176, 0921-8971.
236. KHANNA-CHOPRA, R. Leaf senescence and abiotic stresses share reactive oxygenspecies-mediated chloroplast degradation. In: *Protoplasma*. 2012, 249(3), pp. 469-481 doi: 10.1007/s00709-011-0308-z, ISSN 1615-6102, 0033-183X.
237. KHURANA, A. et al. Therapeutic applications of selenium nanoparticles. In: *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019, vol. 111, pp. 802-812. doi: 10.1016/j.biopha.2018.12.146, ISSN 0753-3322.
238. KIM, M.J., CIANI, S., SCHACHTMAN, D.P., A peroxidase contributes to ROS production during *Arabidopsis* root response to potassium deficiency. In: *Molecular Plant*, 2010, vol. 3, nr. 2, pp. 420-427. doi: 10.1093/mp/ssp121, ISSN 1674-2052.
239. KINI, S., et al. Algae and cyanobacteria as a source of novel bioactive compounds for biomedical applications. In: *Advances in Cyanobacterial Biology*. Elsevier, 2020, pp. 173-194. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819311-2.00012-7, ISBN 978-0-12-819311-2.
240. KLEIN, B.C. et al. Microalgae as natural sources for antioxidative compounds. In: *Journal of Applied Phycology*. 2012, vol. 24, nr. 5, 1133–1139. doi:10.1007/s10811-011-9743-7, ISSN 1573-5176, 0921-8971.
241. KONDO, T., ISHIURA, M. The circadian clock of cyanobacteria. In: *BioEssays*, 2000, vol. 22(1), pp. 10-15. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(200001)22:1<10::AID-BIES4>3.0.CO;2-A, ISSN 0265-9247, 1521-1878.
242. KONÍČKOVÁ, R. et al. Anti-cancer effects of blue-green alga *Spirulina platensis*, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds. In: *Annals of Hepatology*. 2014, vol. 13(2), pp. 273–283. doi:10.1016/S1665-2681(19)30891-9, ISSN 1665-2681.
243. KOVALESKI, G. et al. Extraction and purification of phycobiliproteins from algae and their applications. In: *Frontiers in Chemistry*. 2022, 10, 1065355. https://doi.org/10.3389/fchem.2022.1065355, ISSN 2296-2646.
244. KRULWICH, T.A. et al. Adaptive mechanisms of extreme alkaliphiles. In: HORIKOSHI K. ed. *Extremophiles Handbook*. Tokyo: Springer. 2011, pp.119-139. ISBN (online) 978-4-431-53898-1.
245. KRZEMIŃSKA, I. et al. Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. In: *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2014, vol. 37(4), pp. 735-741. doi: 10.1007/s00449-013-1044-x. ISSN 1615-7605, 1615-7591.



246. KUMAR, A.S. et al. Biosynthesis of gold and silver nanoparticles by natural precursor clove and their functionalisation with amine group. In: *Journal of Nanoparticles Researches*. 2010, vol. 12, pp. 1667-1675. doi:10.1007/s11051-009-9835-3, ISSN 1388-0764.
247. KUMAR, C.S. et al. Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds - a review. In: *Journal of Food Science and Technology*. 2008, vol. 45, pp. 1-13. ISSN 2472-6419.
248. KUMAR, M. et al. Biochemical responses of red alga *Gracilaria corticata*, (*Gracilariales*, *Rhodophyta*) to salinity induced oxidative stress. In: *Journal of Experimental Biology and Ecology*. 2010, vol. 391, pp. 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.06.001>, ISSN 0022-0981.
249. KUMAR, M. et al. An efficient approach towards the bioremediation of copper, cobalt, and nickel contaminated field samples. In: *Journal of Soils and Sediments*. 2016, vol. 16, pp. 2118-2127. doi:10.1007/s11368-016-1398-1, ISSN (online) 1439-0108.
250. KURASHVILI, M. et al. Blue-green alga spirulina as a tool against water pollution by 1,1'-(2,2,2-trichloroethane-1,1-diyl)bis(4-chlorobenzene) (DDT). In: *Annals of Agrarian Science*. 2018, vol. 6(4), pp. 405-409. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2018.07.005>, ISSN (online) 1512-1887.
251. KURD, F., SAMAVATI, V. Water soluble polysaccharides from *Spirulina platensis*: Extraction and in vitro anti-cancer activity. In: *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015, vol. 74, pp. 498-506. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.005>, ISSN (online) 1879-0003.
252. LAKEY-BEITIA, J., et al. Carotenoids as novel therapeutic molecules against neurodegenerative disorders: Chemistry and molecular docking analysis. In: *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, vol. 20, 5553. <https://doi.org/10.3390/ijms20225553>, ISSN 1422-0067, 1422-0067.
253. LAMBERT, A.J., BRAND, M.D. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:Ubiquinone oxidoreductase (Complex I). In: *Journal of Biological Chemistry*. 2004, vol. 279, pp. 39414-39420. ISSN 1083-351X.
254. LAN, S. et al. Effects of light and temperature on open cultivation of desert cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. In: *Bioresource Technology*, 2015, vol. 182, pp.144-150. doi: 10.1016/j.biortech.2015.02.002, ISSN 0960-8524, 1873-2976. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25689308> [Accessed April 24, 2018].
255. LATIFI, A., RUIZ, M., ZHANG, C.C. Oxidative stress in cyanobacteria. In: *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, vol. 33(2), pp. 258-278. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00134.x>, ISSN 0168-6445.
256. LAU, N.S., MATSUI, M. ABDULLAH, A.A.A. Cyanobacteria: Photoautotrophic microbial factories for the sustainable synthesis of industrial products. In: *BioMed Research International*, 2015, p.754934. doi: 10.1155/2015/754934, ISSN 2314-6141.
257. LEE, J., SONG, C.H. Effect of reactive oxygen species on the endoplasmic reticulum and mitochondria during intracellular pathogen infection of mammalian cells. In: *Antioxidants*. 2021, vol. 10(6), 872. <https://doi.org/10.3390/antiox10060872>, ISSN 2076-3921.
258. LE-FEUVRE, R. et al. Biotechnology applied to *Haematococcus pluvialis* Fotow: challenges and prospects for the enhancement of astaxanthin accumulation. In: *Journal of Applied Phycology*. 2020, vol. 32, pp. 3831-3852. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02231-z>, ISSN 1573-5176, 0921-8971.
259. LEI, A. et al. Antioxidant responses of microalgal species to pyrene. In: *Journal of Applied Phycology*. 2006, vol. 18, pp. 67-78. doi:10.1007/s10811-005-9016-4, ISSN 1573-5176, 0921-8971.
260. LEMOINE, Y., SCHOEFS, B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. In: *Photosynthesis Research*. 2010, vol. 106, pp. 155-177. doi: 10.1007/s11120-010-9583-3, ISSN 1573-5079, 0166-8595.

261. LENGKE, F.M., FLEET, E.M., SOUTHAM, G. Biosynthesis of silver nanoparticles by filamentous cyanobacteria from a silver (I) nitrate complex. In: *Langmuir*. 2007, vol. 23(5), pp. 2694-2699. doi:10.1021/la0613124, ISSN (online) 1520-5827.
262. LENGKE, M.F. et al. Mechanisms of gold bioaccumulation by filamentous cyanobacteria from gold(III)-chloride complex. In: *Environmental Science & Technology*. 2006, vol. 40, pp. 6304-6309. doi:10.1021/es061040r, ISSN (online) 0013-936X.
263. LEONG, Y.K., CHANG, J.S. Bioremediation of heavy metals using microalgae: Recent advances and mechanisms. In: *Bioresource Technology*. 2020, 303, 122886. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122886>, ISSN 0960-8524.
264. LEYA, T. et al. Response of arctic snow and permafrost algae to high light and nitrogen stress by changes in pigment composition and applied aspects for biotechnology. In: *FEMS Microbiology Ecology*. 2009, vol. 67(3), pp. 432-443. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00641.x>, ISSN 1574-6941.
265. LI, M., KIM, C. Chloroplast ROS and stress signaling. In: *Plant Communications*. 2022, 3(1), 100264. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100264>, ISSN 2590-3462.
266. LI, S. et al. Advances in the production of bioactive substances from marine unicellular microalgae *Porphyridium spp.* In: *Bioresource Technology*. 2019, 292, 122048. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122048>, ISSN 0960-8524.
267. LIU, J. et al. Antioxidative capacity and enzyme activity in *Haematococcus pluvialis* cells exposed to superoxide free radicals. In: *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 2010, vol. 28, nr. 1, pp. 1-9. <https://doi.org/10.1007/s00343-010-9244-6>, ISSN 2523-3521, 2096-5508.
268. LIU, C. et al. Growth and antioxidant production of *Spirulina* in different NaCl concentrations. In: *Biotechnology Letters*. 2016, vol. 38(7), pp. 1089-1096. doi: 10.1007/s10529-016-2087-2, ISSN 1573-6776, 0141-5492.
269. LIU, D. et al. Engineering biology approaches for food and nutrient production by cyanobacteria. In: *Current Opinion in Biotechnology*. 2021, vol. 67, pp. 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.09.011>, ISSN 0958-1669.
270. LIU, L. et al. Molecular analyses of tomato GS, GOGAT and GDH gene families and their response to abiotic stresses. In: *Acta Physiologiae Plantarum*. 2016, vol. 38: 229. doi:10.1007/s11738-016-2251-2, ISSN (online) 1861-1664.
271. LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J.F. et al. Continuous microalgal cultivation for antioxidants production. In: *Molecules*. 2020, vol. 25(18), 4171. <https://doi.org/10.3390/molecules25184171>, ISSN 1420-3049.
272. LOWRY, O.H., ROSENBOUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *Journal of Biological Chemistry*. 1951, vol. 193(1), pp. 265-275. ISSN (online) 1083-351X.
273. LU, C., VONSHAK, A. Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. In: *Physiologia Plantarum*. 2002, vol. 114(3), pp. 405-413. doi: 10.1034/j.1399-3054.2002.1140310.x, ISSN 00319317, 13993054.
274. LU, Q., LI, H., XIAO, Y., LIU, H. A state-of-the-art review on the synthetic mechanisms, production technologies, and practical application of polyunsaturated fatty acids from microalgae. In: *Algal Research*. 2021, vol. 55: 102281. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102281>, ISSN (online) 2211-9264.
275. LU, T., et al. . Insights into the transcriptional responses of a microbial community to silver nanoparticles in a freshwater microcosm. In: *Environmental Pollution*, 2020, 258, 113727. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113727> ISSN 02697491
276. LU, T. et al. Pollutant toxicology with respect to microalgae and cyanobacteria. In: *Journal of Environmental Sciences*. 2021, vol. 99, pp. 175-186. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.06.033>, ISSN 1001-0742.
277. LUDWIG, M., BRYANT, D.A. *Synechococcus* Sp. Strain PCC 7002 transcriptome: acclimation to temperature, salinity, oxidative stress, and mixotrophic growth conditions. In:

- Frontiers in Microbiology*. 2012, vol. 3: 534. doi:10.3389/fmicb.2012.00354, ISSN (online) 1664-302X.
278. LUSHCHAK, V.I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. In: *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 2011, vol. 153, pp.175-190. doi: 10.1016/j.cbpc.2010.10.004, ISSN 1532-0456, 1878-1659.
279. LUSHCHAK, V.I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. In: *Chemico-Biological Interactions*. 2014, 224, pp. 164-175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>, ISSN 0009-2797.
280. MAGALHÃES, L.M., et.al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. In: *Analytica Chimica Acta*. 2008, vol. 613(1), pp. 1-19. doi:10.1016/j.aca.2008.02.047, ISSN 0003-2670.
281. MAGNANI, F., MATTEVI, A. Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases. In: *Current Opinion in Structural Biology*. 2019, vol. 59, pp. 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.03.001>, ISSN 0959440X.
282. MALLMANN, EJJ. et al. Atividade antifúngica de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde. In: *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2015, vol. 57, pp. 165-167. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000200011>, ISSN (online) 1678-9946.
283. MANIVANNAN, K., ANANTHARAMAN, P., BALASUBRAMANIAN, T.H. Evaluation of antioxidant properties of marine microalga *Chlorella marina* (Butcher, 1952). In: *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012, vol. 2(1), p.S342-S346. doi: 10.1016/S2221-1691(12)60185-3, ISSN 2221-1691, 2588-9222.
284. MANOHARI, R., YOGALAKSHMI, K.N. Optimization of copper (II) removal by response surface methodology using root nodule endophytic bacteria isolated from *Vigna Unguiculata*. In: *Water, Air, & Soil Pollution*. 2016, vol. 227, pp. 285. doi:10.1007/s11270-016-2964-2, ISSN (online) 0049-6979.
285. MANSOOR, S. et al. Reactive oxygen species in plants: from source to sink. In: *Antioxidants*. 2022, vol. 11(2), 225. <https://doi.org/10.3390/antiox11020225>, ISSN 2076-3921.
286. MARCOCCI, L. et al. The nitric oxide-scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract Egb 761. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1994, vol. 201(2), pp. 748-755. ISSN (online) 1090-2104.
287. MARQUES, C.R. Extremophilic microfactories: applications in metal and radionuclide bioremediation. In: *Frontiers in Microbiology*. 2018, vol. 9:1191. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01191>, ISSN (online) 1664-302X.
288. MARSALEK, B. et al. Multimodal action and selective toxicity of zerovalent iron nanoparticles against cyanobacteria. In: *Environmental Science and Technology*. 2012, vol. 46, pp. 2316-2323. <https://doi.org/10.1021/es2031483>, ISSN (online) 1664-302X.
289. LEEMA, J.T., et al. High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. In: *Bioresource Technology*. 2010, vol. 101(23), pp. 9221-9227. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.120, ISSN 0960-8524, 1873-2976.
290. MENZYANOVA, N.G. et al. Season variability of iron effects on periodic culture of microalgae *Dunaliella viridis* Teod. In: *Frontiers of Biology in China*. 2009, vol. 4 nr. 3, pp. 328-336. <https://doi.org/10.1007/s11515-009-0019-4>, ISSN (online) 1673-3622.
291. MILLER, G., SHULAEV, V., MITTLER, R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. In: *Physiologia Plantarum*. 2008, vol. 133, nr. 3, pp. 481-489. doi: 10.1111/j.1399-3054.2008.01090.x, ISSN 0031-9317, 1399-3054.
292. MISCU, V., CEPOI, L., CHIRIAC, T., RUDI, L., RUDIC, V. Potential use of gold and silver nanoparticles in phycobiotechnology. In: *Abstract Book of the International Congress of Geneticists and Breeders from the Republic of Moldova: eleventh ed., 15-16 June 2021, Chişinău: CEP USM, 2021, p. 157. ISBN 978-9975-152-13-6.*

293. MITTLER, R., et al. Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022, vol. 23(10), pp. 663-679. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00499-2>, ISSN 1471-0072, 1471-0080.
294. MOHITE, P., KUMAR, A.R., ZINJARDE, S. Relationship between salt tolerance and nanoparticle synthesis by *Williopsis saturnus* NCIM 3298. In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017, vol. 33:163. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2329-z>, ISSN (online) 0959-3993.
295. MOHSENAZAR, M. et al. Potential of microalgae and lactobacilli in biosynthesis of silver nanoparticles. In: *BioImpacts*, 2011, vol. 1, pp. 149-152. <https://doi.org/10.5681/bi.2011.023>, ISSN (online) 2228-5652.
296. MOLDOVAN, B. et al. In vitro and in vivo anti-inflammatory properties of green synthesized silver nanoparticles using *Viburnum opulus* L. fruits extract. In: *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*. 2017, vol. 79, pp. 720-727. doi:10.1016/j.msec.2017.05.122, ISSN 1873-0191.
297. MOREAU, M., et al. NO synthesis and signaling in plants – where do we stand? In: *Physiologia Plantarum*. 2010, vol. 138(4) pp. 372-383. doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01308.x, ISSN 0031-9317, 1399-3054.
298. MORGAN-KISS, R.M. et al. Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2006, vol. 70(1), pp. 222-252. <https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.222-252.2006>, ISSN 1092-2172, 1098-5557.
299. MORI, S., CASTORENO, A., LAMMERS, P.J. Transcript levels of *RbcR1*, *NtcA*, and *RbcL/S* genes in cyanobacterium *Anabaena* Sp. PCC 7120 are downregulated in response to cold and osmotic stress. In: *FEMS Microbiology Letters*. 2002, vol. 213, pp. 167-173. doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11301.x, ISSN (online) 1574-6968.
300. MORSY, F.M., et al. Green synthesis of silver nanoparticles by water soluble fraction of the extracellular polysaccharides/matrix of the cyanobacterium *Nostoc commune* and its application as a potent fungal surface sterilizing agent of seed crops. In: *Universal Journal of Microbiology Research*. 2014, vol. 2, pp. 36-43. doi: 10.13189/ujmr.2014.020303, ISSN (online) 2331-673X.
301. MUBARAKALI, D., et al. Synthesis and characterisation of CdS nanoparticles using C-phycoerythrin from the marine cyanobacteria. In: *Materials Letters*, 2012, vol. 74, pp. 8-11. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2012.01.026>, ISSN 0167-577X.
302. MUELLER, S. et al. Sensitive and real-time determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from intact peroxisomes. In: *Biochemical Journal*. 2002, vol. 363, pp. 483-491. doi: 10.1042/0264-6021:3630483, ISSN 1470-8728, 0264-6021.
303. MULLER, F.L., LIU, Y., VAN REMMEN, H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. In: *Journal of Biological Chemistry*. 2004, vol. 279(47), pp. 49064-49073. doi: 10.1074/jbc.M407715200, ISSN 0021-9258.
304. MULLINEAUX, C.W. Co-existence of photosynthetic and respiratory activities in cyanobacterial thylakoid membranes. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 2014, vol. 1837(4), pp. 503-511. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.11.017, ISSN 0005-2728, 1879-2650.
305. MULLINEAUX, C.W., EMLYN-JONES, D. State transitions: An example of acclimation to low-light stress. In: *Journal of Experimental Botany*. 2005, vol. 56(411), pp. 389-393, <https://doi.org/10.1093/jxb/eri064>, ISSN 1460-2431, 0022-0957.
306. MUNIER, M. et al. Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium cruentum*. In: *Food Chemistry*. 2014, vol. 150, pp. 400-407. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.113>, ISSN 03088146.
307. MURPHY, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species. In: *Biochemical Journal*. 2009, vol. 417(1), pp. 1-13. doi: 10.1042/BJ20081386, ISSN 1470-8728, 0264-6021.

308. MUTALE-JOAN, C., SBABOU, L., HICHAM, E.A. Microalgae and cyanobacteria: how exploiting these microbial resources can address the underlying challenges related to food sources and sustainable agriculture: a review. In: *Journal of Plant Growth Regulation*. 2023, vol. 42(1), pp. 1-20. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10534-9>, ISSN (online) 0721-7595.
309. NAKAMOTO, H., SUZUKI, N., ROY, S.K. Constitutive expression of a small heat-shock protein confers cellular thermotolerance and thermal protection to the photosynthetic apparatus in cyanobacteria. In: *FEBS Letters*. 2000, vol. 483, pp. 169-174. doi:10.1016/S0014-5793(00)02097-4, ISSN (online) 1873-3468.
310. NARAINSAMY, K. et al. Genomics of the pleiotropic glutathione system in cyanobacteria. In: Franck CHAUVAT, Corinne CASSIER-CHAUVAT, eds. *Genomics of Cyanobacteria*. Academic Press, Elsevier, 2013, vol. 65, pp. 157-188. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394313-2.00005-6>, ISBN 978-0-12-394313-2.
311. NAYAK, V., et al. Potentialities of selenium nanoparticles in biomedical science. In: *New Journal of Chemistry*. 2021, vol. 45, pp. 2849-2878. doi: 10.1039/DONJ05884J, ISSN (online) 1369-9261.
312. NAZ, H., et al. Thermodynamic characterization of kidney superoxide dismutase from *Labeo rohita* exposed to the mixture of lead and chromium. In: *Pakistan Journal of Zoology*. 2019, vol. 51(3), pp. 1105-1112. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2019.51.3.1105.1112>, ISBN 0030-9923.
313. NEWBY, R.J. et al. Characterization of zinc stress response in *Cyanobacterium Synechococcus sp.* IU 625. In: *Aquatic Toxicology*. 2017, vol. 186, pp.159-170, doi: 10.1016/j.aquatox.2017.03.005, ISSN (online) 1879-1514.
314. NG, I., KESKIN, B.B., TAN, S.A. Critical review of genome editing and synthetic biology applications in metabolic engineering of microalgae and cyanobacteria. *Biotechnology Journal*. 2020, vol. 15(8): 1900228. <https://doi.org/10.1002/biot.201900228>, ISSN (online) 1873-4863.
315. NIAZI, J.H., GU, M.B. Toxicity of metallic nanoparticles in microorganisms - A review. In: KIM, Y.J., PLATT, U., GU, M.B., IWAHASHI, H. eds. *Atmospheric and biological environmental monitoring*. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2009, pp. 193-206. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9674-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9674-7_12).
316. NIHAL TURKMEN, N., SARI, F., VELIOGLU, Y.S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. In: *Food Chemistry*. 2006, vol. 99(4), pp. 835-841. doi:10.1016/j.foodchem.2005.08.034, ISSN 0308-8146.
317. NIKKANEN, L., et al. Regulatory electron transport pathways of photosynthesis in cyanobacteria and microalgae: Recent advances and biotechnological prospects. In: *Physiologia Plantarum*. 2021, vol. 173(2), pp. 514-525. <https://doi.org/10.1111/ppl.13404>, ISSN 0031-9317, 1399-3054.
318. NISHIYAMA, Y., ALLAKHVERDIEV, S.I., MURATA, N. Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. In: *Physiologia Plantarum*. 2011, vol. 142(1), pp. 35-46. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.2011.01457.x>, ISSN 0031-9317, 1399-3054
319. NOHL, H., GILLE, L., STANIEK, K. Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. In: *Biochemical Pharmacology*. 2005, vol. 69(5) pp. 719-723. doi: 10.1016/j.bcp.2004.12.002, ISSN (online) 1873-2968.
320. OBANA, S. et al. Effect of *Nostoc sp.* on soil characteristics, plant growth, and nutrient uptake. In: *Journal of Applied Phycology*. 2007, vol. 19, pp. 641-646. doi:10.1007/s10811-007-9193-4, ISSN (online) 1573-5176.
321. OGAR, A., TYLKO, G., TURNAU, K. Antifungal properties of silver nanoparticles against indoor mould growth. In: *Science of the Total Environment*. 2025, vol. 521-522, pp. 305-314. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.101>, ISSN (online) 1879-1026.

322. OREN, A., et al. Microalgae and cyanobacteria of the Dead Sea and its surrounding springs. In: *Israel Journal of Plant Sciences*, 2008, vol. 56(1), pp. 1-13. <https://doi.org/10.1560/IJPS.56.1-2.1>, ISSN (online) 2223-8980.
323. ORLOWSKI, P. et al. Tannic acid modified silver nanoparticles show antiviral activity in herpes simplex virus type 2 infection. In: *PLoS ONE*. 2014, vol. 9:e104113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104113>, ISSN (online) 1932-6203.
324. OTERO, A., VINCENZINI, M. Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. In: *Journal of Biotechnology*. 2003, vol. 102(2), pp. 143-52. doi: 10.1016/s0168-1656(03)00022-1, ISSN (online) 1873-4863.
325. OUKARROUM, A., et al Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2012, vol. 78, pp. 80-85. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.012>, ISSN (online) 0146-6513.
326. OYAIZU, M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of product of browning reaction prepared from glucosamine. In: *Japan Journal of Nutrition*. 1986, vol. 44, pp. 307-315. doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307, ISSN (online) 1883-7921.
327. PADE, N., HAGEMANN, M. Salt acclimation of cyanobacteria and their application in biotechnology. In: *Life*. 2014, vol. 5(1), pp. 25-49. <https://doi.org/10.3390/life5010025>, ISSN 2075-1729.
328. PÁDROVÁ, K. et al. Trace concentrations of iron nanoparticles cause overproduction of biomass and lipids during cultivation of cyanobacteria and microalgae. In: *Journal of Applied Phycology*. 2015, vol. 27(4), pp. 1443-1451. doi.org/10.1007/s10811-014-0477-1, ISSN (online) 0921-8971.
329. PAERL, H. Mitigating harmful cyanobacterial blooms in a human- and climatically-impacted world. In: *Life (Basel)*. 2014, vol. 4(4), pp. 988-1012. doi: 10.3390/life4040988, ISSN (online) 2075-1729.
330. PAGELS, F. et al. Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. In: *Biotechnology Advances*. 2019, vol. 37(3), pp. 422-443. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.010>, ISSN 0734-9750.
331. PALANIVEL, T.M., et al. Bioremediation of copper by active cells of *Pseudomonas Stutzeri* LA3 isolated from an abandoned copper mine soil. In: *Journal of Environmental Management*. 2020, vol. 253. 109706. doi:10.1016/j.jenvman.2019.109706, ISSN (online) 1095-8630.
332. PALMER, J.S., et al. Rapid analytical methods for the microalgal and cyanobacterial biorefinery: Application on strains of industrial importance. In: *MicrobiologyOpen*. 2021, vol. 10(1), Article ID e1156. doi: 10.1002/mbo3.1156, ISSN (online) 2045-8827.
333. PANYAKAMPOL, J. et al. Physiological and transcriptional responses to high temperature in *Arthrospira (Spirulina) platensis* C1. In: *Plant and Cell Physiology*. 2015, vol. 56, pp. 481-496. doi:10.1093/pcp/pcu192, ISSN (online) 1471-9053.
334. PAREEK, A., SRIVASTAVA, P. Optimum photoperiod for the growth of *Spirulina platensis*. In: *Journal of Phytological Research*. 2001, vol. 14(2), pp. 219-220. ISSN 0970-5767.
335. PARK, J., et al. Easy and rapid quantification of lipid contents of marine dinoflagellates using the sulpho-phospho-vanillin method. In: *Algae*. 2016, vol. 31(4), pp 391-401. doi: doi.org/10.4490/algae.2016.31.12.7, ISSN (online) 2093-0860.
336. PATHAK, J. et al. Recent developments in green synthesis of metal nanoparticles utilizing cyanobacterial cell factories. In: TRIPATHI, D.K., et al. eds. *Nanomaterials in plants, algae and microorganisms*. Academic Press, 2019, pp. 237-265. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811488-9.00012-3>, ISBN 9780128114889.
337. PINTO, E. et al. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. In: *Journal of Phycology*. 2003, vol. 39(6), pp. 1008-1018. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x>, ISSN 0022-3646, 1529-8817.

338. PLANCHET, E., et al. Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. In: *Plant Journal*. 2005, vol. 41(5), pp. 732-743. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02335.x, ISSN 0960-7412, 1365-313X.
339. PLANCHON, M. et al. Exopolysaccharides protect *Synechocystis* against the deleterious effects of titanium dioxide nanoparticles in natural and artificial waters. In: *Journal of Colloid and Interface Science*. 2013, vol. 405, pp. 35-43. doi: 10.1016/j.jcis.2013.05.061, ISSN (online) 1095-7103.
340. POKORNY, J. Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? In: *European Journal of Lipid Science & Technology*. 2007, vol. 109(6), pp. 629-642. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700064I>, ISSN 1438-9312.
341. PRABHU, S., POULOSE, E.K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. In: *International Nano Letters*. 2012, vol. 2:32. <https://doi.org/10.1186/2228-5326-2-32>, ISSN (online) 2228-5326.
342. PRASAD, B. et al. How the space environment influences organisms: An astrobiological perspective and review. In: *International Journal of Astrobiology*. 2021, vol. 20(2), pp. 159-177. <https://doi.org/10.1017/S1473550421000057>, ISSN 1473-5504, 1475-3006.
343. PRESENTATO, A. et al. Biosynthesis of selenium-nanoparticles and -nanorods as a product of selenite bioconversion by the aerobic bacterium *Rhodococcus aetherivorans* BCP1. In: *Nature Biotechnology*. 2018, vol. 41, pp. 1-8. doi:10.1016/j.nbt.2017.11.002, ISSN (online) 1876-4347.
344. PRIETO, P., PINEDA, M., AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. In: *Analytical Biochemistry*. 1999, vol. 269(2), pp. 337-341. doi.org/10.1006/abio.1999.4019, ISSN (online) 1096-0309.
345. PROCHAZKOVA, D., WILHELMOVA, N. Nitric oxide, reactive nitrogen species and associated enzymes during plant senescence. In: *Nitric Oxide*. 2011, vol. 24(2), pp. 61-65. doi: 10.1016/j.niox.2011.01.005, ISSN 1089-8603, 1089-8611.
346. PULIT-PROCIAK, J., BANACH, M. Silver nanoparticles - a material of the future...? In: *Open Chemistry*. 2016, vol. 14(1), pp. 76-91. <https://doi.org/10.1515/chem-2016-0005>, ISSN 2391-5420.
347. PYRZYNSKA, K., SENTKOWSKA, A. Biosynthesis of selenium nanoparticles using plant extracts. In: *Journal of Nanostructure in Chemistry*. 2022, vol. 12, pp. 467-480. <https://doi.org/10.1007/s40097-021-00435-4>, ISSN (online) 2008-9244.
348. QIAN, H. et al. Effects of copper sulfate, hydrogen peroxide and n-phenyl-2-naphthylamine on oxidative stress and the expression of genes involved photosynthesis and microcystin disposition in *Microcystis aeruginosa*. In: *Aquatic Toxicology*. 2010, vol. 99(3), pp. 405-12. doi: 10.1016/j.aquatox.2010.05.018, ISSN (online) 0166-455X.
349. RACHEDI, R., FOGLINO, M., LATIFI, A. Stress signaling in cyanobacteria: a mechanistic overview. In: *Life*. 2020, vol. 10(12): 312. <https://doi.org/10.3390/life10120312>, ISSN 2075-1729.
350. RADYUKINA, N.L., MIKHEEVA, L.E., KARBYSHEVA, E.A. Low molecular weight antioxidants in cyanobacteria and plant cells. In: *Biology Bulletin Reviews*. 2019, vol. 9(6), pp. 520-531. <https://doi.org/10.1134/S2079086419060045>, ISSN 2079-0864, 2079-0872.
351. RAI, R. et al. Regulation of antioxidant defense and glyoxalase systems in cyanobacteria. In: *Plant Physiology and Biochemistry*. 2021, vol. 168, pp. 353-372. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.09.037>, ISSN 0981-9428.
352. RAJA, R. et al. Recent developments in therapeutic applications of Cyanobacteria. In: *Critical Reviews in Microbiology*. 2016, vol. 42(3), pp. 394-405. doi: 10.3109/1040841X.2014.957640, ISSN 1040-841X.
353. RAMASUBBURAYAN, R. et al. Synthesis of nanosilver by a marine epibiotic bacterium *Bacillus vallismortis* and its potent eco-friendly antifouling properties. In: *Environmental*

- Nanotechnology, Monitoring & Management*. 2017, vol. 8, pp. 112-120. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2017.06.005>, ISSN 2215-1532.
354. RAMEL, F. et al. Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. In: *Plant Physiology*. 2012, vol. 158(3), pp. 1267-1278. doi: 10.1104/pp.111.182394, ISSN 0032-0889, 1532-2548.
355. RANTAMAKI, S. et al. Oxygen produced by cyanobacteria in simulated Archaean conditions partly oxidizes ferrous iron but mostly escapes - conclusions about early evolution. In: *Photosynthesis Research*, 2016, vol. 130(1-3), pp. 103-111. doi: 10.1007/s11120-016-0231-4, ISSN 1573-5079, 0166-8595.
356. RAVELONANDRO, P.H. et al. Influence of light quality and intensity in the cultivation of *Spirulina platensis* from Toliara (Madagascar) in a closed system. In: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2008, vol. 83(6), pp. 842-848. <https://doi.org/10.1002/jctb.1878>, ISSN 0268-2575, 1097-4660.
357. RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. In: *Free Radical Biology and Medicine*. 1999, vol. 26(9-10), pp. 1231-1237. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3, ISSN 0891-5849.
358. REBOLLOSO FUENTES, M. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. In: *Food Chemistry*. 2000, vol. 70(3), pp. 345-353. doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00101-1, ISSN 1873-7072.
359. REHMAN, M. et al. Copper environmental toxicology, recent advances, and future outlook: A review. In: *Environmental Science and Pollution Research*. 2019, vol. 26, pp. 18003-18016. doi:10.1007/s11356-019-05073-6, ISSN (online)1614-7499.
360. ROCHA, F. et al. Cyanobacteria as a nature-based biotechnological tool for restoring salt-affected soils. In: *Agronomy*. 2020, vol. 10:1321. doi:10.3390/agronomy10091321, ISSN (online) 2073-4395.
361. RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. *A Guide to carotenoid analysis in foods*. Washington: International Life Sciences Institute. One Thomas Circle, NW, 2001, 64 p. ISBN 1-57881-072-8.
362. RODRIGUEZ-GARCIA, I., GUIL-GUERRERO, J.L. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. In: *Food Chemistry*. 2008, vol. 108(3), pp. 1023-26. doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.059, ISSN 1873-7072.
363. ROMERO, D.M., RÍOS DE MOLINA, M.C., JUÁREZ, Á.B. Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2011, vol. 74(4), pp. 741-747. doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.10.034, ISSN 1090-2414, 0147-6513.
364. ROSSA, M.M. et al. Effect of visible light on superoxide dismutase (SOD) activity in the red alga *Gracilaria tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). In: *Journal of Applied Phycology*. 2002, vol. 14(3), pp. 151-157. <https://doi.org/10.1023/A:1019985722808>, ISSN (online) 1939-1854.
365. ROUHIER, N. et al. Poplar peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense. In: *Plant Physiology*. 2004, vol. 134(3), pp. 1027-1038. <https://doi.org/10.1104/pp.103.035865>, ISSN (online) 1532-2548.
366. ROY, A.S. et al. Heavy metal removal from multicomponent system by the Cyanobacterium *Nostoc muscorum*: kinetics and interaction study. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2015, vol. 175, pp. 3863-3874. doi:10.1007/s12010-015-1553-y, ISSN (online) 0273-2289.
367. ROY, U.K., NIELSEN, B.V., MILLEDGE, J.J. Tuning *Dunaliella tertiolecta* for enhanced antioxidant production by modification of culture conditions. In: *Marine Biotechnology*. 2021, vol. 23, pp. 482-500. doi.org/10.1007/s10126-021-10041-8, ISSN (online) 1436-2236.
368. RUDI, L., CEPOI, L., CHIRIAC, T., MISCU, V., VALUTA, A., DJUR, S. Effects of citrate-stabilized gold and silver nanoparticles on some safety parameters of *Porphyridium*



- cruentum* biomass. In: *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023, vol.11, Article ID 1224945. doi: 10.3389/fbioe.2023.1224945, ISSN (online) 2296-4185.
369. RUDI, L., **CEPOI, L.**, CHIRIAC, T., ROTARI, I., PLÂNGĂU, E., VALUȚĂ, A., CARAUȘ, V., RUDIC, V. Antioxidant activity of spirulina biomass at the action of some pegilated nanoparticles. In: *Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community: nat. conf. with intern. particip., 21-22 oct. 2019*. Chisinau: „Biotehdesign”, 2019, pp. 71-72. ISBN 978-9975-108-83-6.
370. RUDI, L., **CEPOI, L.**, MISCU, V., VALUTA, A., GHELBET, V., BĂȚ, C., RUDIC, V. The role of constitutive lipids in the cell antioxidant defence. In: *Proceedings of the International Scientific Conference on Microbial Biotechnology: second ed., 9-10 oct. 2014*. Chișinău: „Elena-V.I.”, 2014, p. 151. ISBN 978-9975-4432-8-9.
371. RUDI, L., CHIRIAC, T., **CEPOI, L.**, MISCU, V., ZINICOVSCAIA, I., VALUTA, A., RUDIC V. Biomass production and pigment content in *Arthrospira platensis* by adding AuNP (PEG) and AgNP (PEG) at different growth phases of cultivation cycle. In: *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*. 2021, Tom. XXVIII, Issue 2, pp. 143-151. ISSN 1224-5119, 1844-7589.
372. RUDIC, V., **CEPOI, L.**, GUTSUL, T., RUDI, L., CHIRIAC, T., MISCU, V., SADOVNIC, D., NICORICI, A. Red algae *Porphyridium cruentum* growth stimulate CdSe quantum dots covered with thioglycerol. In: *Journal of Nanoelectronics and Optoelectronics*. 2012, vol. 7, pp. 681-687. <https://doi.org/10.1166/jno.2012.1416>, ISSN 1555 1318.
373. RUDIC, V., RUDI, L., CHIRIAC, T., **CEPOI, L.**, MISCU, V., CODREANU, S., DJUR, S., VALUȚĂ, A., IATSCO, Iu., CHELMENCIUC, V., DONI, V., ROTARU, M.  $\beta$ -carotene involving in free radicals annihilation in spirulina biomass cultivated under the oxidative stress conditions. In: *Proceedings of the International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, dedicated to the 70th anniversary of foundation of first research institutions and 55th anniversary of the inauguration of the Academy of Sciences of Moldova: third ed., 12-13 oct. 2016*. Chișinău: „Artpoligraf”, 2016, p. 184. ISBN 978-9975-3129-3-6.
374. RUDIC, V., RUDI, L., CHIRIAC, T., **CEPOI, L.**, MISCU, V., CODREANU, S., DJUR, S., VALUȚĂ, A., SADOVNIC, D., GHELBET, V., CHELMENCIUC, V., DONI, V., BĂȚ, C.  $\beta$ -carotene synthesis in *Spirulina platensis* cultivated under the induced thermal stress conditions. In: *Proceedings of the International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, dedicated to the 70th anniversary of foundation of first research institutions and 55th anniversary of the inauguration of the Academy of Sciences of Moldova: third ed., 12-13 oct. 2016*. Chișinău: „Artpoligraf”, 2016, p. 185. ISBN 978-9975-3129-3-6.
375. RUDIC, V., RUDI, L., CHIRIAC, T., **CEPOI, L.**, MISCU, V., CODREANU, S., DJUR, S., VALUȚĂ, A., SADOVNIC, D., GHELBET, V., CHELMENCIUC, V., DONI, V., BĂȚ, C. Sulfated polysaccharides as agent for free radicals annihilation in spirulina biomass cultivated under the induced illumination stress conditions. In: *Proceedings of the International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, dedicated to the 70th anniversary of foundation of first research institutions and 55th anniversary of the inauguration of the Academy of Sciences of Moldova: third ed., 12-13 oct. 2016*. Chișinău: „Artpoligraf”, 2016, p. 186. ISBN 978-9975-3129-3-6.
376. SABATINI, S.E. et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2009, vol. 72(4), pp. 1200-1206. doi: 10.1016/j.ecoenv.2009.01.003, ISSN 1090-2414, 0147-6513.
377. SAEED, M.U. et al. Bioprospecting microalgae and cyanobacteria for biopharmaceutical applications. In: *Journal of Basic Microbiology*. 2022, vol. 62(9), pp. 1110-1124. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100445>, ISSN 0233-111X, 1521-4028.
378. SAINI, D.K., et al. Enhancing production of microalgal biopigments through metabolic and genetic engineering. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2020, vol. 60(3), pp. 391-405. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1533518>, ISSN 1040-8398, 1549-7852.

379. SAJEDA, A. et al. Copper removal from industrial wastewater: A comprehensive review. In: *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2017, vol. 56(25), pp. 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.07.026>, ISSN (online) 1876-794X.
380. SAMANOVIC, M.I. et al. Copper in microbial pathogenesis: meddling with the metal. In: *Cell Host Microbe*. 2012, vol. 11(2), pp. 106-115. doi: 10.1016/j.chom.2012.01.009, ISSN (online) 1934-6069.
381. SANDALIO, L.M., ROMERO-PUERTAS, M.C. Peroxisomes sense and respond to environmental cues by regulating ROS and RNS signalling networks. In: *Annals of Botany*. 2015, vol. 116(4), pp. 475-485. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv074>, ISSN 0305-7364, 1095-8290.
382. SANNASIMUTHU, A. et al. Peroxiredoxin of *Arthrospira platensis* derived short molecule YT12 influences antioxidant and anticancer activity. In: *Cell Biology International*. 2020, vol. 44(11), pp. 2231-2242. <https://doi.org/10.1002/cbin.11431>, ISSN 1095-8355.
383. SARAIVA, R.M. et al. Reduced neuronal nitric oxide synthase expression contributes to cardiac oxidative stress and nitroso-redox imbalance in ob/ob mice. In: *Nitric Oxide*. 2007, vol. 16, Issue 3, pp. 331-338. doi: 10.1016/j.niox.2006.12.001, ISSN 1089-8603.
384. SATORA, P. et al. Strain-dependent production of selected bioactive compounds by Cyanobacteria belonging to the *Arthrospira* genus. In: *Journal of Applied Microbiology*. 2015, vol. 119(3), pp. 736-743. doi: 10.1111/jam.12897, ISSN 0021-8847, 1365-2672.
385. SCANDALIOS, J.G. The rise of ROS. In: *Trends in Biochemical Sciences*. 2002, vol. 27(9), pp.483-486. doi: 10.1016/s0968-0004(02)02170-9. ISSN 1362-4326, 0376-5067.
386. SCHRADER, M., FAHIMI, H.D. Peroxisomes and oxidative stress. In: *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006, vol. 1763(12), pp. 1755-1766. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.09.006, ISSN 0304-4165, 1872-8006.
387. SEKAR, S., CHANDRAMOHAN, M. Phycobiliproteins as a commodity: Trends in applied research, patents and commercialization. In: *Journal of Applied Phycology*. 2008, vol. 20(2), pp. 113-136. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9188-1>, ISSN 1573-5176, 0921-8971.
388. SELYE, H.A Syndrome produced by diverse nocuous agents. In: *Nature*. 1936, vol. 138(3479), pp. 32-32. <https://doi.org/10.1038/138032a0>, ISSN 1045-6767.
389. SENGANI, M., GRUMEZESCU, A.M., RAJESWARIA, V.D. Recent trends and methodologies in gold nanoparticle synthesis – A prospective review on drug delivery aspect. In: *OpenNano*. 2017, vol. 2, pp. 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2017.07.001>, ISSN 2352-9520.
390. SHABANA, E.F. et al. Biochemical composition and antioxidant activities of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in response to gamma irradiation. In: *Food Chemistry*. 2017, vol. 214, pp. 550-555. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.07.109, ISSN 0308-8146.
391. SHAKIBAIE, M. et al. Biosynthesis and recovery of selenium nanoparticles and the effects on matrix metalloproteinase-2 expression. In: *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2010, vol. 56, pp. 7-15. doi: 10.1042/BA20100042, ISSN (online) 1470-8744.
392. SHARMA, N. et al. Exploitation of marine bacteria for production of gold nanoparticles. In: *Microbial Cell Factories*. 2012, vol. 11:86. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-86>, ISSN 1475-2859.
393. SHARMA, R.K. et al. Immunomodulatory activities of curcuminstabilized silver nanoparticles: efficacy as an antiretroviral therapeutic. In: *Immunological Investigations*. 2017, vol. 46, p. 833-846. <https://doi.org/10.1080/08820139.13719>, ISSN 0882-0139.
394. SHEBIS, Y. et al. Natural antioxidants: function and sources. In: *Food and Nutrition Sciences*. 2013, vol.4, nr.6, pp. 643-649. doi: 10.4236/fns.2013.46083, ISSN (online) 2157-9458.
395. SHIH, P.M. Photosynthesis and early Earth. In: *Current Biology*. 2015, vol. 25(19), pp. R855-R859. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.046>, ISSN 09609822.
396. SHOEIBI, S., MASHREGHI, M. Biosynthesis of selenium nanoparticles using *Enterococcus faecalis* and evaluation of their antibacterial activities. In: *Journal of Trace*

- Elements in Medicine and Biology*. 2017, vol. 39, pp. 135-139. doi: 10.1016/j.jtemb.2016.09.003, ISSN 0946-672X.
397. SHUGUANG, W., et al. Toxic effects of gold nanoparticles on *Salmonella typhimurium* bacteria. In: *Toxicology and Industrial Health*. 2011, vol. 27, pp. 547-554. <https://doi.org/10.1177/0748233710393395>, ISSN (online) 0748-2332.
398. SHUKLA, M. et al. Influence of light intensity, temperature and CO<sub>2</sub> concentration on growth and lipids in green algae and cyanobacteria. In: *Indian Journal of Experimental Biology*, 2016, vol. 54(7), pp. 482-487. ISSN (online) 0975-1009.
399. SIEGELMAN, H., KYCIA, J.H. Alga biliproteins. In: HELLEBUST, J.A., CRAIGIE, J.S., eds. *Handbook of phycological methods: physiological and biochemical methods*. Cambridge: Cambridge University Press, 1978, pp. 72-78. ISBN 9780521218559.
400. SIES, H. et al. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2022, vol. 23(7), pp. 499-515. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00456-z>, ISSN 1471-0072, 1471-0080.
401. SIES, H. Introductory remarks. In: SIES, H., ed. *Oxidative Stress*. London: Academic Press, 1985, pp. 1-8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-642760-8.50005-3>, ISBN 978-0-12-642760-8.
402. SIES, H. Oxidative eustress and oxidative distress: Introductory remarks. In: Helmut SIES, ed. *Oxidative stress*. Academic Press, Elsevier, 2020, pp 3-12. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818606-0.00001-8>, ISBN 978-0-12-818606-0.
403. SIES, H. Oxidative stress: eustress and distress in redox homeostasis. In George FINK, ed. *Stress: physiology, biochemistry, and pathology*. Elsevier, 2019, pp. 153-163. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00013-8>, ISBN 978-0-12-813146-6.
404. SIES, H. What is oxidative stress? In: KEANEY, J.F. ed. *Oxidative stress and vascular disease*. Boston: Springer US, 2000, vol. 224, pp. 1-8. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4649-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4649-8_1), ISBN 978-1-4613-7103-8, 978-1-4615-4649-8.
405. SIES, H., BERNDT, C., JONES, D.P. Oxidative stress. In: *Annual Review of Biochemistry*. 2017, vol. 86(1), pp. 715-748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>, ISSN (online) 1545-4509.
406. SIES, H., JONES, D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020, vol. 21(7), pp. 363-383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>, ISSN 1471-0072, 1471-0080.
407. SILVA, M. et al. Assessment of the potential of *Dunaliella* microalgae for different biotechnological applications: A systematic review. In: *Algal Research*. 2021, vol. 58, 102396. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102396>, ISSN 2211-9264.
408. SINGH, A.K. et al. Photo-induced biosynthesis of silver nanoparticles from aqueous extract of *Dunaliella salina* and their anticancer potential. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2017, vol. 166, pp. 202-211. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.11.020>, ISSN (online) 1873-2682.
409. SINGH, J.S., KUMAR, A., SINGH, M. Cyanobacteria: A sustainable and commercial bioresource in production of bio-fertilizer and bio-fuel from waste waters. In: *Environmental and Sustainability Indicators*. 2019, vol. 3, 100008. doi:10.1016/j.indic.2019.100008, ISSN (online) 2665-9727.
410. SINGH, S. K. et al. Spirulina: From ancient food to innovative super nutrition of the future and its market scenario as a source of nutraceutical. In NEILAN, B., PASSARINI, M.R.Z., SINGH, P.K., KUMAR, A. eds. *Cyanobacterial biotechnology in the 21st century*. Singapore: Springer Nature, 2023, pp. 51-61. [https://doi.org/10.1007/978-981-99-0181-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-99-0181-4_4), ISBN 978-981-9901-80-7, 978-981-9901-81-4.
411. SINGH, S.C., SINHA, R.P, HADER, D.P. Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. In: *Acta Protozoologica*. 2002, vol. 41(4), pp. 297-308. ISSN (online) 1689-0027.

412. SINGH, S.K. et al. Biotechnological exploitation of cyanobacteria and microalgae for bioactive compounds. In MADAN L. VERMA, ANUJ K. CHANDEL eds. *Biotechnological Production of Bioactive Compounds*. Elsevier, 2020, pp. 221-259. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64323-0.00008-4>, ISBN 978-0-444-64323-0.
413. SINGH, V., PANDEY, K.D., MESAPOGU, S., SINGH, D. V. Influence of NaCl on photosynthesis and nitrogen metabolism of cyanobacterium *Nostoc calcicola*. In: *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2015 vol. 51 (6). pp. 720-25. doi:10.1134/S0003683815060149, ISSN 0003-6838, 1608-3024.
414. SINGLETON, V.L., ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. In: *American Journal of Enology and Viticulture*. 1965, vol. 16, pp. 144-158. ISSN 0002-9254.
415. SKIBSTED, L.H. Nitric oxide and quality and safety of muscle based foods. In: *Nitric Oxide*. 2011, vol. 24, Issue 4, pp. 176-183. doi: 10.1016/j.niox.2011.03.307, ISSN 1089-8603.
416. SLOCOMBE, S.P. et al. A rapid and general method for measurement of protein in microalgal biomass. In: *Bioresource Technology*. 2013, vol. 129, pp. 51-57. doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.163, ISSN (online) 1873-2976.
417. SNEZHKINA, A.V. et al. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. In: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019, 2019:6175804. <https://doi.org/10.1155/2019/6175804>, ISSN 1942-0900, 1942-0994.
418. SOLETTI, D. et al. Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. In: *Biochemical Engineering Journal*. 2008, vol. 39(2), pp. 369-375. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.10.007>, ISSN 1369-703X.
419. SONG, X., ZHANG, J., PENG, C., LI, D. Replacing nitrogen fertilizer with nitrogen-fixing cyanobacteria reduced nitrogen leaching in red soil paddy fields. In: *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 2021, 312, 107320. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107320>, ISSN 0167-8809.
420. SRIVASTAVA, A.K. Assessment of salinity-induced antioxidative defense system of diazotrophic cyanobacterium *Nostoc muscorum*. In: *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010, vol. 20(11), pp. 1506-1512. doi: 10.4014/jmb.1005.05037, ISSN 1738-8872.
421. SRIVASTAVA, N., MUKHOPADHYAY, M. Biosynthesis and structural characterization of selenium nanoparticles using *Gliocladium roseum*. In: *Journal of Cluster Science*. 2015, vol. 26, pp. 1473-1482. doi:10.1007/s10876-014-0833-y, ISSN (online) 1572-8862.
422. STAL, L.J. Nitrogen Fixation in Cyanobacteria. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2008, pp. 1-8. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021159>,
423. STARKOV, A.A. et al. Mitochondrial  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. In: *Journal of Neuroscience*. 2004, vol. 24, pp. 7779-7788. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1899-04.2004, ISSN 1529-2401.
424. STARKOV, A.A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008, vol. 1147, pp. 37-52. doi: 10.1196/annals.1427.015, ISSN 0077-8923.
425. STOLZ, D.B. et al. Peroxisomal localization of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. In: *Hepatology*. 2002, vol. 36, pp. 81-93. doi: 10.1053/jhep.2002.33716, ISSN 0270-9139, 1527-3350.
426. SUJATHA KANDASAMY, NAGARAJAN, P. Optimization of growth conditions for carotenoid production from *Spirulina platensis* (Geitler). In: *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*. 2013, vol. 2(10), pp. 325-328. ISSN 2319-7692, 2319-7706.

427. SUKENIK, A., CARMELI, Y., BERNER, T. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. In: *Journal of Phycology*. 1989, vol. 25(4), pp. 686-692. ISSN 0022-3646.
428. SUN, T.Y., BORNHÖFT, N.A., HUNGERBÜHLER, K., NOWACK, B. Dynamic probabilistic modeling of environmental emissions of engineered nanomaterials. In: *Environmental Science & Technology*. 2016, vol. 50(9), pp. 4701-4711. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05828>, ISSN 0013-936X, 1520-5851.
429. TAKAICHI, S. Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. In: *Marine Drugs*. 2011, vol. 9(6), pp. 1101-1118. doi: 10.3390/md9061101, ISSN 1660-3397.
430. TAMARY, E. et al. Structural and functional alterations of cyanobacterial phycobilisomes induced by high-light stress. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 2012, vol. 1817(2), pp. 319-327. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.11.008>, ISSN (online) 1879-2650.
431. TAVERNE, Y.J. et al. Oxidative stress and the early coevolution of life and biospheric oxygen. In: *Oxidative Stress*. Academic Press, Elsevier, 2020, pp. 67-85. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818606-0.00005-5>, ISBN 978-0-12-818606-0
432. TAVERNE, Y.J. et al. Reactive oxygen species: radical factors in the evolution of animal life: A molecular timescale from Earth's earliest history to the rise of complex life. In: *BioEssays*. 2018, vol. 40(3): 1700158. <https://doi.org/10.1002/bies.201700158>, ISSN (online) 1521-1878.
433. TIAN, J., YU, J. Changes in ultrastructure and responses of antioxidant systems of algae (*Dunaliella salina*) during acclimation to enhanced ultraviolet-B radiation. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology*, 2009. vol. 97(3), pp. 152-160. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2009.09.003, ISSN 1873-2682, 1011-1344.
434. TRETTER, L., ADAM-VIZI, V. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase. In: *Journal of Neuroscience*. 2004, vol. 24, pp. 7771-7778. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1842-04.2004, ISSN 1529-2401.
435. TRIPATHI, B.N. et al. Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short- and long-term exposure to  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ . In: *Chemosphere*. 2006, vol. 62, pp. 538-544. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.06.031, ISSN 0045-6535.
436. TROXELL, B., HASSAN, H. M. Transcriptional regulation by ferric uptake regulator (Fur) in pathogenic bacteria. In: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2013, vol. 3:59. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00059>, ISSN (online) 2235-2988.
437. TSIBAKHASHVILI, N.Y. et al. Microbial synthesis of silver nanoparticles by *Streptomyces glaucus* and *Spirulina platensis*. In: *Advanced Science Letters*. 2011, vol. 4, pp. 3408-3417. doi:10.1166/asl.2011.1915, ISSN (online) 1936-6612.
438. TURAN, N.B., ERKAN, H.S., ENGIN, G.O., BILGILI, M. S. Nanoparticles in the aquatic environment: Usage, properties, transformation and toxicity - A review. In: *Process Safety and Environmental Protection*. 2019, vol. 130, pp. 238-249. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.08.014>, ISSN (online) 1744-3598.
439. TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. In: *Journal of Physiology*. 2003, vol. 552, pp. 335-344. doi: 10.1113/jphysiol.2003.049478, ISSN 1469-7793.
440. UGYA, A.Y. et al. Antioxidant response mechanism of freshwater microalgae species to reactive oxygen species production: A mini review. In: *Chemistry and Ecology*. 2020, vol. 36(2), pp. 174-193. <https://doi.org/10.1080/02757540.2019.1688308>, ISSN 0275-7540, 1029-0370.
441. ULLAH, A. et al. Biosynthesis of selenium nanoparticles (via *Bacillus subtilis* BSN313), and their isolation, characterization, and bioactivities. In: *Molecules*. 2021, vol. 26:5559. <https://doi.org/10.3390/molecules26185559>, ISSN 1420-3049.
442. UMMALYMA, et al. Bioremediation by microalgae: current and emerging trends for effluents treatments for value addition of waste streams. In: VARJANI, S.,

- PARAMESWARAN, B., KUMAR, S., KHARE, S. eds. *Biosynthetic technology and environmental challenges. energy, environment, and sustainability*. Singapore: Springer, 2018, pp. 355-375. ISBN 978-98111074332.
443. VALUTA, A., CEPOI, L., RUDI, L., BULHAC, I., BOUROS, P., BOLOGA, O. Phycobiliprotein accumulation in cyanobacterium *Nostoc linckia* and modification of antioxidant activity. In: *The Annals of Oradea University, Biology Fascicle*. 2015, Tom XXII, Issue 1, pp. 13-19. ISSN (online) 1844-7589.
444. VAN THOR, J.J. et al. Light harvesting and state transitions in cyanobacteria. In: *Botanica Acta*. 1998, vol. 111(6), pp. 430-443. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1438-8677.1998.tb00731.x>, ISSN 0932-8629.
445. VANITHA, A., et al. Comparative study of lipid composition of two halotolerant alga, *Dunaliella bardawil* and *Dunaliella salina*. In: *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2007, vol. 58(5), pp. 373-382. <https://doi.org/10.1080/09637480701252252>, ISSN 2455-4898.
446. VÁRKONYI, Z. et al. Low-temperature-induced accumulation of xanthophylls and its structural consequences in the photosynthetic membranes of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*: An FTIR spectroscopic study. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002, vol. 99(4), pp. 2410-2415. <https://doi.org/10.1073/pnas.042698799>, ISSN (online) 1091-6490.
447. VAROL, M. ROS and oxidative stress in cancer: recent advances. In: TULI, H.S. ed. *Drug targets in cellular processes of cancer: From nonclinical to preclinical models*. Singapore: Springer, 2020, pp. 109-138. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-7586-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-15-7586-0_6), ISBN 9789811575853 9789811575860.
448. VÁZQUEZ-ROMERO, B. et al. Techno-economic assessment of microalgae production, harvesting and drying for food, feed, cosmetics, and agriculture. In: *Science of The Total Environment*. 2022, vol. 837: 155742. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155742>, ISSN (online) 1879-1026.
449. VINKOVIC VRCEK, I. Selenium nanoparticles: biomedical applications. In: MICHALKE, B. ed. *Selenium Molecular and Integrative Toxicology*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2018, pp. 393-412. ISBN 978-3-319-95389-2.
450. VINOTH, M. et al. Biological soil crust (BSC) is an effective biofertilizer on *Vigna mungo* (L.). In: *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020, vol. 27, pp. 2325-2332. doi:10.1016/j.sjbs.2020.04.022, ISSN (online) 1319-562X.
451. VÍTOVÁ, M. et al. Glutathione peroxidase activity in the selenium-treated alga *Scenedesmus quadricauda*. In: *Aquatic Toxicology*, 2011, vol. 102, pp. 87-94. doi: 10.1016/j.aquatox.2011.01.003, ISSN 0166-445X,
452. VOLKMANN, H., IMIANOVSKY, U., OLIVEIRA, J.L., SANT'ANNA, E.S. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino-acid profile. In: *Brazilian Journal of Microbiology*. 2008 vol. 39(1), pp. 98-101. doi: 10.1590/S1517-838220080001000022, ISSN 1678-4405.
453. WANG, P., WONG, M.H., TAM, N.F.Y. Antioxidant responses of two microalgae, *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella sp.*, to estradiol and ethinylestradiol. In: *Journal of Applied Phycology*. 2013, vol. 25(3), pp. 891-903. doi:10.1007/s10811-012-9959-1, ISSN 1573-5176, 0921-8971.
454. WANG, F. et al. Development of a strategy for enhancing the biomass growth and lipid accumulation of *Chlorella* Sp. UJ-3 using magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. In: *Nanomaterials*. 2021, vol. 11(11): 2802. doi.org/10.3390/nano11112802, ISSN 2079-4991.
455. WANG, H. et al. Identification of differentially expressed proteins of *Arthrospira (Spirulina) plantensis*-YZ under salt-stress conditions by proteomics and qRT-PCR analysis. In: *Proteome Science*. 2013, vol. 11(1), p. 6. doi: 10.1186/1477-5956-11-6, ISSN 1477-5956.

456. WANG, N. et al. Rapid screening of microalgae as potential sources of natural antioxidants. In: *Foods*. 2023, vol. 12, Article ID 2652. doi.org/10.3390/foods12142652, ISSN (online) 2304-8158.
457. WANG, W. et al. Physiological responses of soil crust-forming cyanobacteria to diurnal temperature variation. In: *Journal of Basic Microbiology*. 2013, vol. 53(1), pp.72-80. doi: 10.1002/jobm.201100510, ISSN 0233-111X, 1521-4028.
458. WARD, L.M., KIRSCHVINK, J.L., FISCHER, W.W. Timescales of oxygenation following the evolution of oxygenic photosynthesis. In: *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. 2016, vol. 46(1), pp. 51-65. https://doi.org/10.1007/s11084-015-9460-3, ISSN 0169-6149, 1573-0875.
459. WARD, L.M., et al. Follow the Oxygen: Comparative Histories of Planetary Oxygenation and Opportunities for Aerobic Life. In: *Astrobiology*. 2019, vol. 19(6), pp. 811-824. https://doi.org/ 10.1089/ast.2017.1779, ISSN 1531-1074, 1557-8070.
460. WILTBANK, L.B., KEHOE, D.M. Diverse light responses of cyanobacteria mediated by phytochrome superfamily photoreceptors. In: *Nature Reviews Microbiology*. 2019, vol. 17(1), pp. 37-50. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0110-4, ISSN (online) 1740-1534.
461. WWAP (*United Nations World Water Report*) 2018: *Nature-Based Solutions for Water*. UNESCO, Paris., ISBN 978-92-3-100264-9 (print/pdf). https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000261424
462. XIA, Z.K. et al. The antifungal effect of silver nanoparticles on *Trichosporon asahii*. In: *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2016, vol. 49, pp. 182-188. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.04.013, ISSN 1684-1182.
463. XIE, J., et al. Silver nanoplates: from biological to biomimetic synthesis. In: *ACS Nano*. 2007, vol. 1, pp. 429-439. doi:10.1021/nn7000883, ISSN (online) 1936-086X.
464. YADAV, P. et al. Mechanisms of stress tolerance in cyanobacteria under extreme conditions. In: *Stresses*. 2022, vol. 2(4), pp. 531-549. https://doi.org/10.3390/stresses2040036, ISSN (online) 2673-7140.
465. YADAV, P. et al. Role of cyanobacteria in green remediation. In: *Sustainable environmental clean-up*. Elsevier, 2021, pp. 187-210. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823828-8.00009-8, ISBN 978-0-12-823828-8.
466. YAN, J., TSUICHIHARA, N., ETOH, T., IWAI, S. Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in ABA inhibition of stomatal opening. In: *Plant, Cell and Environment*. 2007, vol. 30, nr. 10, pp. 1320-1325. doi: 10.1111/j.1365-3040.2007.01711.x, ISSN 0140-7791.
467. YANG, W., WANG, F., LIU, L.N., SUI, N. Responses of membranes and the photosynthetic apparatus to salt stress in Cyanobacteria. In: *Frontiers in Plant Science*. 2020, 11, 713. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00713, ISSN 1664-462X.
468. YARKENT, Ç., ÖNCEL, S. Ş. Biotechnological applications of haematococcus: Future perspectives. In: RAJA, R. et al. eds. *Haematococcus*. Singapore: Springer Nature, 2023, pp. 293-320. https://doi.org/10.1007/978-981-99-2901-6\_17, ISBN 978-981-9929-00-9 978-981-9929-01-6.
469. ZAKI, F.T.A, FATHI, A.A.B. Impact of copper on some physiological aspects of *Nostoc muscorllm* with special references to the detoxifying role of calcium. In: *Acta Botanica Hungarica*. 2004, vol. 46(3-4). pp. 423-433. doi:10.1556/ABot.46.2004.3-4.14, ISSN 0236-6495.
470. ZANGAR, R.C., DAVYDOV, D.R., VERMA, S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. In: *Technology and applied Pharmacology*. 2004, vol. 199(3), pp. 316-331. doi: 10.1016/j.taap.2004.01.018, ISSN 0041-008X.
471. ZEB, A. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry*. 2020 vol. 44(9):e13394. doi: 10.1111/jfbc.13394, ISSN 0145-8884.

472. ZEESHAN, H., et al. Endoplasmic reticulum stress and associated ROS. In: *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, vol. 17(3), 327. <https://doi.org/10.3390/ijms17030327>, ISSN 1422-0067.
473. ZEIDA, A. et al. Catalysis of peroxide reduction by fast reacting protein thiols: Focus review. In: *Chemical Reviews*. 2019, vol. 119(19), pp. 10829-10855. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00371>, ISSN 0009-2665, 1520-6890.
474. ZHANG, C. et al. Adsorption behavior of engineered carbons and carbon nanomaterials for metal endocrine disruptors: Experiments and theoretical calculation. In: *Chemosphere*. 2019, vol. 222, pp.184-194. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.01.128, ISSN 0045-6535.
475. ZHANG, H. et al. Biosynthesis of selenium nanoparticles mediated by fungus *Mariannaea* sp. HJ and their characterization. In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2019, vol. 571, pp. 9-16. doi:10.1016/j.colsurfa.2019.02.070, ISSN (online) 1873-4359.
476. ZHANG, L. et al. Lipid accumulation and biodiesel quality of *Chlorella pyrenoidosa* under oxidative stress induced by nutrient regimes. In: *Renewable Energy*. 2019, vol. 143, pp. 1782-1790. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.05.081>, ISSN 09601481.
477. ZHANG, S. et al. Unlocking the potentials of cyanobacterial photosynthesis for directly converting carbon dioxide into glucose. In: *Nature Communications*. 2023, vol. 14(1): 3425. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39222-w>, ISSN (online) 2041-1723.
478. ZHANG, X.F., et al. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. In: *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, vol. 17:1534. <https://doi.org/10.3390/ijms17091534>, ISSN (online) 1422-0067.
479. ZHAO, R., et al. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). In: *International Journal of Molecular Medicine*. 2019, vol. 44(1), pp. 3-15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>, ISSN 1107-3756, 1791-244X.
480. ZHOU, C. et al. Selenium uptake, volatilization, and transformation by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and post-treatment of Se-laden biomass. In: *Chemosphere*. 2021, vol. 280: 130593. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130593>, ISSN 0045-6535.
481. ZHU, H. et al. Effects of low light on photosynthetic properties, antioxidant enzyme activity, and anthocyanin accumulation in purple Pak Choi (*Brassica campestris* ssp. *Chinensis* Makino) In: *PLoS ONE*. 2017, vol. 12(6), Article ID e0179305. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179305>, ISSN (online) 1932-6203.
482. ZINICOVSCAIA, I. et al. Accumulation of silver nanoparticles in mice tissues studied by neutron activation analysis. In: *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2018, vol. 318, pp. 985-989. <https://doi.org/10.1007/s10967-018-6193-6>, ISSN (online) 1588-2780.
483. ZINICOVSCAIA, I. et al. Metal ions removal from different types of industrial effluents using *Spirulina platensis* biomass. In: *International Journal of Phytoremediation*. 2019, vol. 21(14), pp. 1442-1448. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1633264>, ISSN 1549-7879.
484. ZINICOVSCAIA, I., CEPOI, L., et al. *Spirulina platensis* as biosorbent of chromium and nickel from industrial effluents. In: *Desalination and Water Treatment*. 2016(a), vol. 57(24), pp. 11103-11110. <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1042061>, ISSN 1944-3994.
485. ZINICOVSCAIA, I., CEPOI, L., et al. *Nostoc Linckia* as biosorbent of chromium and nickel from electroplating industry wastewaters. In: *JMSE-B*. 2014, vol. 4(8), pp. 242-247. doi:10.17265/2161-6221/2014.08.007, ISSN (online) 2161-6221.
486. ZINICOVSCAIA, I., CEPOI, L., et al. Effect of zinc-containing systems on *Spirulina platensis* bioaccumulation capacity and biochemical composition. In: *Environmental Science and Pollution Research*. 2021(a), vol. 28, pp. 52216-52224. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14457-6>, ISSN 0944-1344, 1614-7499.
487. ZINICOVSCAIA, I., CEPOI, L., et al. Accumulation of dysprosium, samarium, terbium, lanthanum, neodymium and ytterbium by *Arthrospira platensis* and their effects on biomass biochemical composition. In: *Journal of Rare Earths*. 2021(b), vol. 39, nr. 9, pp. 1133-1143. <https://doi.org/10.1016/j.jre.2020.07.019>, ISSN 1002-0721.



488. ZINICOVSCAIA, I., CHIRIAC, T., **CEPOI, L.**, et al. Selenium uptake and assessment of the biochemical changes in *Arthrospira (Spirulina) platensis* biomass during the synthesis of selenium nanoparticles. In: *Canadian Journal of Microbiology*. 2017, vol. 63, nr.1, pp. 27-34. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0339>, ISSN (online) 1480-3275.
489. ZINICOVSCAIA, I., RUDI L., VALUTA A., **CEPOI L.**, et al. Biochemical changes in *Nostoc linckia* associated with selenium nanoparticles biosynthesis. In: *Ecological Chemistry and Engineering S*. 2016(b), vol. 23, nr. 4, pp. 559-569. <https://doi.org/10.1515/eces-2016-0039>, ISSN 1898-6196.
490. ZINICOVSCAIA, I., SAFONOV, A., TREGUBOVA, V., ILIN, V., **CEPOI, L.**, et al. Uptake of metals from single and multi-component systems by *Spirulina platensis* biomass. In: *Ecological Chemistry and Engineering S*. 2016(c), vol. 3, pp. 401-412. <https://doi.org/10.1515/eces-2016-0028>, ISSN (online) 2084-4549.
491. ZINICOVSCAIA, Inga, **CEPOI, Liliana**. Nanoparticle biosynthesis based on the protective mechanism of cyanobacteria. In: ZINICOVSCAIA, I., CEPOI, L. eds. *Cyanobacteria for Bioremediation of Wastewaters*. Springer Cham: Springer International Publishing, 2016, pp. 113-121. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-26751-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-26751-7_7), ISBN: 978-3-319-26749-4, 978-3-319-26751-7.
492. ZOROV, D.B., JUHASZOVA, M., SOLLOTT, S.J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. In: *Physiological Reviews*. 2014, vol. 94(3), pp. 909-950. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>, ISSN 0031-9333, 1522-1210.

*în limba rusă:*

493. БОРИСОВА, Г.Г., МАЛЕВА, М.Г., ЧУКИНА, Н.В. *Растение и стресс*. Курс лекций. Екатеринбург: Урал. гос. ун-т им. А. М. Горького, 2008. 267 с.
494. ГАРИФЗЯНОВ, А.Р., ЖУКОВ, Н.Н., ИВАНИЦЕВ, В.В. Образование и физиологические реакции активных форм кислорода в клетках растений. В: *Современные проблемы науки и образования*. 2011, №2. ISSN 2070-7428.
495. ДОНЦОВ, В.И., и др.. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении. В: *Труды Института системного анализа Российской академии наук*. 2006, Т. 19, с. 50-69. ISSN 2079-0279.
496. КОЛУПАЕВ, Ю.Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции. В: *Вестник Харьковского национального аграрного университета*. 2007, вып. 3(12), с. 6-26. ISSN 1992-4917.
497. МАКСИМОВ, И.В., ЧЕРЕПАНОВА, Е.А. Про/антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам. В: *Успехи современной биологии*. 2006, Т. 126, №3, с. 250-261. ISSN 0042-1324.
498. МИНИБАЕВА, Ф.В., ГОРДОН, Л.Х. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе. В: *Физиология растений*. 2003, Т. 50, №3, с. 459-464. ISSN 0015-3303.
499. ПОЛЕССКАЯ, О.Г. *Растительная клетка и активные формы кислорода*. Москва: КДУ, 2007, 144 с. ISBN 978-5-98227-252-2.
500. СКУЛАЧЕВ, В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода. В: *Соросовский образовательный журнал*. 2001, Т. 7, №6, с. 4-10.
501. ЧЕСНОКОВА, Н.П., ПОНУКАЛИНА, Е.В., БИЗЕНКОВА, М.Н. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах. В: *Успехи современного естествознания*. 2006, № 7, с. 29-36. ISSN 1681-7494.
502. ЧЕСНОКОВА, Н.П., ПОНУКАЛИНА, Е.В., БИЗЕНКОВА, М.Н. Общая характеристика источников образования свободных радикалов и антиоксидантных систем. В: *Успехи современного естествознания*. 2006, № 7. с. 37-41. ISSN 1681-7494.

**ANEXE**

## ANEXA 1. Acte de implementare



**Ficotehfarm S. R. L.**

MD 2028, str. Miorița 3/5, Chișinău, R. Moldova, tel/fax. 373(22) 73 50 07  
e-mail: [ficotehfarm@gmail.com](mailto:ficotehfarm@gmail.com), c/f 1004600074352, c/d 2224710SV89923657100, BC  
„Mobiasbanca-Groupe Societe Generale” SA, MOBBMD22, cod TVA 0205964

Act de implementare: Nr. **03/11**

din **23 noiembrie 2018**

Prin prezenta, se confirmă faptul că pe parcursul anului 2018 la „FICOTEHFARM” SRL au fost efectuate lucrări de testare experimentală în condiții de fabricare în serie a *procedului de cultivare a cianobacteriei Spirulina platensis în scopul obținerii biomasei cu conținut înalt de lipide*.

*Autorii elaborării:* dr. Cepoi Liliana, dr. Chiriac T., dr. Rudi L., cerc.șt. Djur Svetlana, cerc. Iushin Nichita, dr. Zinicovscaia Inga, acad. Rudic Valeriu (laboratorul Ficobiotehnologie, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie).

*Locul și perioada desfășurării lucrărilor de testare experimentală:* Ficotehfarm, Secția Producere Biomasă de spirulină; Secția fabricare Materii prime biologic active; laboratorul Control calitate, perioada de implementare 08.10.2018 – 18.10.2018).

*Subiectul, conținutul și concluziile lucrărilor de testare experimentală:* Conform etapelor descrise în prescripția de referință au fost reproduse în condiții de fabricare în serie: procesul de cultivare a cianobacteriei *Arthrospira/Spirulina platensis*, cu respectarea parametrilor – cheie de proces (nanoparticule de argint cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 0.0035...0.0038 g/l) și condițiile specifice de cultivare pentru a obține biomasa de spirulină cu conținut sporit de lipide: suplimentarea nanoparticulelor de argint la începutul ciclului de cultivare, pH-ul 8-8,5; temperatura 28-30°C; iluminarea de 37-55 μM fotoni/m<sup>2</sup>/s, durata cultivării 144 ore. A fost fabricată partida experimentală de biomasă de spirulină – 003 E(FTF-AgNP-B\_Sp) cu conținut înalt de lipide – 6.3% din biomasa absolut uscată.

*Concluzii:* Executarea tehnologiei în condițiile fluxului tehnologic elaborat s-a încadrat în limitele prescripției de referință, atât după parametri fizico-chimici (aspectul extern, starea de agregare, miros, culoare) cât și după cei calitativi (compoziție și cantitatea de lipide). Compoziția materiilor prime biologic active nu s-a modificat peste limitele prescripției. Astfel, fabricarea acestor produse în serie este justificată din punct de vedere tehnologic, fizico-chimic și calitativ.

Director:  
Dr. șt. biol., BOGDAN Valeriu

Farmacist diriginte, COMAN Svetlana








**Ficotehfarm S. R. L.**

MD 2028, str. Miorița 3/5, Chișinău, R. Moldova, tel/fax. 373(22) 73 50 07  
e-mail: [ficotehfarm@gmail.com](mailto:ficotehfarm@gmail.com), c/f 1004600074352, c/d 2224710SV89923657100, BC  
„Mobiasbanca-Groupe Societe Generale” SA, MOBBMD22, cod TVA 0205964

Act de implementare: Nr. **04/11**

din **23 noiembrie 2018**

Prin prezenta, se confirmă faptul că pe parcursul anului 2018 la „FICOTEHFARM” SRL au fost efectuate lucrări de testare experimentală în condiții de fabricare în serie a *procedului de cultivare a cianobacteriei Spirulina platensis în scopul obținerii biomasei cu conținut înalt de lipide*.

*Autorii elaborării:* dr. Cepoi Liliana, dr. Chiriac T., dr. Rudi L., cerc.șt. Djur Svetlana, cerc. Iushin Nichita, dr. Zinicovscaia Inga, acad. Rudic Valeriu (laboratorul Ficobiotehnologie, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie).

*Locul și perioada desfășurării lucrărilor de testare experimentală:* Ficotehfarm, Secția Producere Biomasă de spirulină; Secția fabricare Materii prime biologice active; laboratorul Control calitate, perioada de implementare 17.09.2018 – 24.09.2018).

*Subiectul, conținutul și concluziile lucrărilor de testare experimentală:* Conform etapelor descrise în prescripția de referință au fost reproduse în condiții de fabricare în serie: procesul de cultivare a cianobacteriei *Arthrospira/Spirulina platensis*, cu respectarea parametrilor – cheie de proces (nanoparticule de aur cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 0.0088...0.0091 g/l) și condițiile specifice de cultivare pentru a obține biomasa de spirulină cu conținut sporit de lipide: suplimentarea nanoparticulelor de aur la începutul ciclului de cultivare, pH-ul 8-8,5; temperatura 28-30°C; iluminarea de 37-55 μM fotoni/m<sup>2</sup>/s, durata cultivării 144 ore. A fost fabricată partida experimentală de biomasă de spirulină – 002E(FTF-AuNP-B\_Sp) cu conținut înalt de lipide – 6.6% din biomasa absolut uscată.

*Concluzii:* Executarea tehnologiei în condițiile fluxului tehnologic elaborat s-a încadrat în limitele prescripției de referință, atât după parametri fizico-chimici (aspectul extern, starea de agregare, miros, culoare) cât și după cei calitativi (compoziție și cantitatea de lipide). Compoziția materiilor prime biologice active nu s-a modificat peste limitele prescripției. Astfel, fabricarea acestor produse în serie este justificată din punct de vedere tehnologic, fizico-chimic și calitativ.

Director:  
Dr. șt. biol., BOGDAN Valeriu

Farmacist diriginte, COMAN Svetlana

*S. Coman*







**Ficotehfarm S. R. L.**

MD 2028, str. Miorița 3/5, Chișinău, R. Moldova, tel/fax. 373(22) 73 50 07  
e-mail: [ficotehfarm@gmail.com](mailto:ficotehfarm@gmail.com), c/f 1004600074352, c/d 2224710SV89923657100, BC  
„Mobiasbanca-Groupe Societe Generale” SA, MOBBMD22, cod TVA 0205964

Act de implementare: Nr. **05/11**

din **23 noiembrie 2018**

Prin prezenta, se confirmă faptul că pe parcursul anului 2018 la „FICOTEHFARM” SRL au fost efectuate lucrări de testare experimentală în condiții de fabricare în serie a *procedului de cultivare a microalgei Dunaliella salina în scopul obținerii biomasei cu conținut înalt de lipide*.

*Autorii elaborării:* dr. Cepoi Liliana, dr. Chiriac T., dr. Rudi L., dr. Miscu Vera, dr. Codreanu Svetlana, dr. Zinicovscaia Inga, acad. Rudic Valeriu, cerc. Dumbrăveanu Veronica (laboratorul Ficobiotehnologie, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie).

*Locul și perioada desfășurării lucrărilor de testare experimentală:* Ficotehfarm, Secția Producere Biomasă de dunaliella; Secția fabricare Materii prime biologic active; laboratorul Control calitate, perioada de implementare 18.06.2018 – 26.06.2018).

*Subiectul, conținutul și concluziile lucrărilor de testare experimentală:* Conform etapelor descrise în prescripția de referință au fost reproduse în condiții de fabricare în serie: procesul de cultivare a microalgei *Dunaliella salina*, cu respectarea parametrilor – cheie de proces (nanoparticule de aur cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 0.0088...0.0091 g/l) și condițiile specifice de cultivare pentru a obține biomasa de dunaliella cu conținut înalt de lipide: suplimentarea nanoparticulelor de aur la începutul cultivării, pH-ul 8; temperatura 25-28°C; iluminarea de 37-55 μM fotoni/m<sup>2</sup>/s, durata cultivării 192 ore. A fost fabricată partida experimentală de biomasă de spirulină – 001E(FTF-AuNP-B\_Ds) cu conținut înalt de lipide – 180 mg/l.

*Concluzii:* Executarea tehnologiei în condițiile fluxului tehnologic elaborat s-a încadrat în limitele prescripției de referință, atât după parametri fizico-chimici (aspectul extern, starea de agregare, miros, culoare) cât și după cei calitativi (compoziție și cantitatea de lipide). Compoziția materiilor prime biologic active nu s-a modificat peste limitele prescripției. Astfel, fabricarea acestor produse în serie este justificată din punct de vedere tehnologic, fizico-chimic și calitativ.

Director:

Dr. șt. biol., BOGDAN Valeriu

Farmacist diriginte, COMAN Svetlana



## ANEXA 2. Brevete de invenție



MD 4849 B1 2023.03.31

## REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4849** (13) **B1**  
(51) Int.Cl: *C12N 1/12* (2006.01)  
*C12N 1/38* (2006.01)  
*C12R 1/89* (2006.01)  
*C12P 7/64* (2006.01)  
*C01G 7/00* (2006.01)  
*B82Y 5/00* (2011.01)

## (12) BREVET DE INVENȚIE

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2022 0010 (22) Data depozit: 2022.02.16	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2023.03.31, BOP1 nr. 3/2023
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD (72) Inventatori: RUDI Ludmila, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; CEPOI Liliiana, MD; RUDIC Valeriu, MD; VALUȚA Ana, MD; DJUR Svetlana, MD; DONI Veronica, MD; CODREANU Liviu, MD; MISCU Vera, MD; ROTARI Ion, MD; TAȘCA Valentina, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD	

(54) Procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum*

## (57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* în scopul obținerii de biomasă cu conținut sporit de lipide.

Procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01 include cultivarea pe un mediu nutritiv ce conține, g/L: KCl 16,04; NaCl 12,52; KNO<sub>3</sub> 1,24; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2,5; CaCl<sub>2</sub> 0,118; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 0,5; KI 0,05; KBr 0,05; 1 mL/L soluție de microelemente ce conține, mg/L:

2  
H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2,86; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1,81; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,08; MoO<sub>3</sub> 0,015; FeEDTA 0,5 mL; nanoparticule de Au de 5 nm stabilizate în citrat 4,8-5,1 nM și apă distilată restul, la temperatura de 25-28°C, pH 6,8-7,2, iluminarea continuă de 50-57 μM fotoni/m<sup>2</sup>·s, timp de 14 zile.

Rezultatul invenției constă în sporirea biosintezei lipidelor și acumulării lor în biomasă microalgei *Porphyridium cruentum*.

Revendicări: 1

MD 4849 B1 2023.03.31





MD 4796 C1 2022.09.30

## REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4796** (13) **C1**  
(51) Int.Cl.: *C12N 1/20* (2006.01)  
*C12N 1/38* (2006.01)  
*C01G 5/00* (2006.01)  
*B82Y 5/00* (2011.01)

## (12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2021 0009 (22) Data depozit: 2021.02.26	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2022.02.28, BOPI nr. 2/2022
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD (72) Inventatori: RUDI Liudmila, MD; CEPOI Liliana, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; RUDIC Valeriu, MD; DJUR Svetlana, MD; ZINICOVSCAIA Inga, MD; VALUȚA Ana, MD; DUMBRĂVEANU Veronica, MD; MISCU Vera, MD; CEPOI Anastasia, MD; ROTARI Ion, MD; TAȘCĂ Ion, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD	

(54) Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*

## (57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* și poate fi aplicată în scopul obținerii de materie primă pentru elaborarea și fabricarea remediilor cu acțiune antimalignă și imunomodulatoare.

Conform invenției, procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* include cultivarea cianobacteriei pe mediul nutritiv ce conține, în g/L: NaNO<sub>3</sub>-2,5, NaHCO<sub>3</sub>-8,0, NaCl-1,0, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-1,0, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-0,2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O-0,2, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-0,00286, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O-0,00181, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O-0,00008;

2  
MoO<sub>3</sub>-0,000015, FeEDTA 1,0 ml/L și apă distilată restul, la temperatura de 30-32°C, pH 8,0-10,0 și iluminarea de 37-55 μM fotoni/m<sup>2</sup>·s în regim continuu, timp de 6 zile, totodată în a cincea zi de cultivare în mediul nutritiv se adaugă nanoparticule de Ag în înveliș de polietilenglicol cu dimensiunea de până la 5 nm în concentrația de 0,10-0,12 μM/L.

Rezultatul invenției constă în reducerea conținutului dialdehidei malonice în biomasa de spirulină.

Revendicări: 1

MD 4796 C1 2022.09.30



MD 4714 C1 2021.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4714** (13) **C1**  
(51) Int.Cl: *C12N 1/20* (2006.01)  
*C12N 1/38* (2006.01)  
*C01G 3/00* (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: a 2019 0041 (22) Data depozit: 2019.05.22</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.09.30, BOPi nr. 9/2020</p>
<p>(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD (72) Inventatori: RUDI Liudmila, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; CEPOI Liliana, MD; RUDIC Valeriu, MD; DJUR Svetlana, MD; ROTARI Ion, MD; MISCU Vera, MD; VALUȚA Ana, MD; IAȚCO Iulia, MD; CODREANU Liviu, MD; ZINICOVSCAIA Inga, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD</p>	

(54) Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la biotehnologie, bionanotehnologie, biofarmaceutică, și anume la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* în scopul obținerii materiei prime pentru elaborarea și fabricarea preparatelor cu aplicare în medicină, farmaceutică și cosmetologie.

2  
Procedeu, conform invenției, prevede cultivarea culturii pe un mediu nutritiv mineral cu adaos de nanoparticule hidrosolubile de cupru cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 3,15-3,18 μg/L.  
Revendicări: 1

MD 4714 C1 2021.04.30



MD 4598 C1 2019.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4598** (13) **C1**  
(51) Int.Cl: *C12N 1/12* (2006.01)  
*A01G 33/00* (2006.01)  
*C12R 1/89* (2006.01)  
*C01G 5/00* (2006.01)  
*B82Y 5/00* (2011.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: a 2018 0039 (22) Data depozit: 2018.05.15</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2018.10.31, BOPI nr. 10/2018</p>
<p>(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD (72) Inventatori: RUDIC Valeriu, MD; RUDI Liudmila, MD; MAFTEI Elena, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; CEPOI Liliana, MD; MISCU Vera, MD; CODREANU Svetlana, MD; DUMBRĂVEANU Veronica, MD; ZINICOVSCAIA Inga, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD</p>	

(54) Procedeu de cultivare a microalgei *Dunaliella salina* CNMN-AV-01

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de cultivare a microalgei *Dunaliella salina* CNMN-AV-01.

Procedeul de cultivare a microalgei *Dunaliella salina* CNMN-AV-01 prevede cultivarea acesteia pe un mediu nutritiv mineral ce conține, g/L: NaCl - 120,0, NaHCO<sub>3</sub> - 4,2, MgSO<sub>4</sub> - 0,6, KNO<sub>3</sub> - 0,5, FeCl<sub>3</sub> - 0,0002, CaCl<sub>2</sub> - 0,033, KHPO<sub>4</sub> - 0,0272, EDTA - 0,0087, nanoparticule de argint cu dimensiunea de 5 nm -

2  
0,0005...0,00055, la temperatura de 25...28°C, pH-ul 8,0 și iluminarea de 3000...4000 lx în regim continuu, în decurs de 8 zile.

Rezultatul invenției constă în majorarea producerii de biomasă de *Dunaliella salina* CNMN-AV-01 și a conținutului de lipide în biomasă cu scopul obținerii materiei prime pentru elaborarea și fabricarea remediilor liposolubile.

Revendicări: 1

MD 4598 C1 2019.05.31



MD 4543 C1 2018.07.31

## REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4543** (13) **C1**  
(51) Int.Cl: *C12N 1/12* (2006.01)  
*C12N 1/38* (2006.01)  
*C12R 1/89* (2006.01)  
*C01G 7/00* (2006.01)  
*B82Y 5/00* (2011.01)

## (12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2017 0018 (22) Data depozit: 2017.02.15	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2017.12.31, BOPI nr. 12/2017
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	
(72) Inventatori: RUDIC Valeriu, MD; RUDI Liudmila, MD; ZINICOVSCAIA Inga, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; CEPOI Liliana, MD; DJUR Svetlana, MD; IUSHIN Nikita, RU	
(73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*

## (57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*.

Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* prevede cultivarea culturii pe un mediu nutritiv mineral ce conține, g/L: NaNO<sub>3</sub> – 2,25, NaHCO<sub>3</sub> – 8,0, NaCl – 1,0, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,3, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,2, CaCl<sub>2</sub> – 0,024, FeSO<sub>4</sub> – 0,01, EDTA – 0,08, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0,00286, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O – 0,00181, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,00022, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O – 0,00008, MoO<sub>3</sub> – 0,000015, nanoparticule hidrosolubile de aur cu

2  
dimensiunea de 5 nm în concentrație de 0,0088...0,0091 g/L și apă distilată până la 1L, la temperatura de 25...28°C, pH 8,0...10,0, iluminarea de 3000...4000 lx în regim continuu în decurs de 5 zile.

Rezultatul invenției constă în stimularea producerii de biomasă de spirulină și a conținutului de lipide în biomasă cu scopul obținerii materiei prime pentru elaborarea și fabricarea remediilor cu acțiune anticanceră, imunostimulatoare și antioxidantă.

Revendicări: 1

MD 4543 C1 2018.07.31



MD 4542 C1 2018.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4542** (13) **C1**  
(51) Int.Cl: *C12N 1/12* (2006.01)  
*C12N 1/38* (2006.01)  
*C12R 1/89* (2006.01)  
*C01G 5/00* (2006.01)  
*B82Y 5/00* (2011.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: a 2017 0017 (22) Data depozit: 2017.02.15</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2017.12.31, BOPI nr. 12/2017</p>
<p>(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: RUDIC Valeriu, MD; RUDI Liudmila, MD; ZINICOVSCAIA Inga, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; CEPOI Liliana, MD; DJUR Svetlana, MD; IUSHIN Nikita, RU (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p>	

(54) Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*.

Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* prevede cultivarea culturii pe un mediu nutritiv mineral ce conține, g/L: NaNO<sub>3</sub> – 2,25, NaHCO<sub>3</sub> – 8,0, NaCl – 1,0, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,3, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,2, CaCl<sub>2</sub> – 0,024, FeSO<sub>4</sub> – 0,01, EDTA – 0,08, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0,00286, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O – 0,00181, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,00022, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O – 0,00008, MoO<sub>3</sub> – 0,000015, nanoparticule hidrosolubile de argint cu

2  
dimensiunea de 5 nm în concentrație de 0,0035...0,0038 g/L și apă distilată până la 1L, la temperatura de 25...28°C, pH 8,0...10,0, iluminarea de 3000...4000 lx în regim continuu în decurs de 5 zile.

Rezultatul invenției constă în stimularea producerii de biomasă de spirulină și a conținutului de lipide în biomasă cu scopul obținerii materiei prime pentru elaborarea și fabricarea remediilor cu acțiune anticanceroasă, imunostimulatoare și antioxidantă.

Revendicări: 1

MD 4542 C1 2018.07.31



MD 4200 C1 2013.09.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4200** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) Int.Cl: *B82Y 5/00* (2011.01)  
*B82Y 35/00* (2011.01)  
*C12N 1/12* (2011.01)  
*C12Q 1/02* (2011.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

<p>(21) Nr. depozit: a 2012 0058 (22) Data depozit: 2012.07.05</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2013.02.28, BOPI nr. 2/2013</p>
<p>(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: RUDIC Valeriu, MD; CEPOI Liliiana, MD; RUDI Liudmila, MD; MISCU Vera, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; SADOVNIC Daniela, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p>	

(54) **Procedeu de apreciere a toxicității nanoparticulelor cu ajutorul microalgei roșii *Porphyridium cruentum***

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la nanobiotehnologie, în  
special la un procedeu de apreciere a toxicității  
nanoparticulelor pentru microalge și poate fi  
utilizată în calitate de parte componentă a  
sistemelor de monitorizare a calității mediului  
și a inofensivității proceselor tehnologice de  
sinteză și utilizare a nanoparticulelor.

Procedeul, conform invenției, include culti-  
varea microalgei roșii *Porphyridium cruentum*

2  
timp de 6 ore pe mediu nutritiv, cu adăugarea  
5 peste o oră după inocularea microalgei a  
nanoparticulelor în diferite concentrații, după  
care în biomasa algală se determină conținutul  
10 de dialdehidă malonică, totodată sunt consi-  
derate toxice concentrațiile de nanoparticule  
care provoacă creșterea conținutului de  
15 dialdehidă malonică în biomasă.

Revenicări: 1

MD 4200 C1 2013.09.30

## ANEXA 3. Distincții la Saloane de invenție



# EUROINVENT

EUROPEAN EXHIBITION OF CREATIVITY AND INNOVATION

## 15 EDITION

# DIPL



# MA

# GOLD MEDAL

## 2023

is awarded to:

**Process for obtaining the biomass of the red microalga *Porphyridium cruentum* - source of omega 3 lipids with polyvalent properties**

RUDI Ludmila, CHIRIAC Tatiana, CEPOI Liliana, RUDIC Valeriu, VALUȚA Ana,  
DJUR Svetlana, MISCU Vera, IAȚCO Iulia

President of International Jury  
Prof.Dr.Eng. Mohd Mustafa Al Bakri ABDULLAH

President of Scientific Committee  
Prof.Dr. Ion SANDU



under the patronage of



MINISTERUL CERCETĂRII,  
INOVARII ȘI DIGITALIZĂRII



# DIPLOMA



**International Exhibition INVENTCOR**  
3<sup>rd</sup> edition, 15-17.12.2022, Deva, Romania

**AWARDED FOR**

**PROCESSES FOR SPIRULINA BIOMASS  
PRODUCTION - RAW MATERIAL FOR THE  
DEVELOPMENT OF ANTIOXIDANT ANTIBACTERIAL  
AND IMMUNOMODULATING AGENTS**

*no. 4796 MD/2022.02.28 and no. 4542MD/2018.07.31*

**TO**

**Rudi Ludmila, Chiriac Tatiana, Cepoi Liliana,  
Rudic Valeriu, Djur Svetlana, Zinicovscaia Inga,  
Valuța Ana, Miscu Vera, Rotari Ion, Cepoi Anastasia,  
Tașcă Ion, Iushin Nichita**

***Public Institution Institute of Microbiology and Biotechnology,  
Republic of Moldova***

Salon president,  
Associate Professor Corneliu BIRTOK BĂNEASĂ

Jury president,  
Professor Aurel Mihail ȚÎȚU





SALONUL INTERNAȚIONAL DE  
**INVENȚII  
INOVAȚII**  
„TRAIAN VUIA” TIMIȘOARA



# Diplomă

SE ACORDĂ



MEDALIA  
DE AUR

*pentru invenția*

**Procedee de obținere a biomasei de spirulina – materie primă pentru dezvoltarea noilor remedii cu efecte antioxidante, antibacteriene, imunomodulatoare.”**

*autori*

**RUDI Ludmila, CHIRIAC Tatiana, CEPOI Liliana, RUDIC Valeriu, DJUR Svetlana, ZINICOVSCAIA Inga, VALUȚA Ana, MISCU Vera, ROTARI Ion, CEPOI Anastasia, TAȘCĂ Ion, IUSHIN Nichita.**

*instituția*

**Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, Chișinău, Republica Moldova.**

*Președinte juriu*

**Prof.dr.habil.Narcisa MEDERLE**

*Președinte salon*

**Remi RĂDULESCU**

Data 10 octombrie 2022



# Diploma of Honor

## GOLD MEDAL

Offered to

**RUDI LUDMILA, CEPOI LILIANA, CHIRIAC TATIANA, RUDIC VALERIU,  
DJUR SVETLANA, ZINICOVSCAIA INGA, VALUȚA ANA, MISCU VERA,  
ROTARI ION, CEPOI ANASTASIA, TAȘCĂ ION, IUSHIN NICHITA**

Institute of Microbiology and Biotechnology, Ministry of Education and Research  
of the Republic of Moldova

**PROCESS FOR THE PRODUCTION OF SPIRULINA PLATENSIS  
BIOMASS - A SAFE RAW MATERIAL FOR THE DEVELOPMENT  
AND MANUFACTURE OF ANTI-CANCER AND  
IMMUNOMODULATORY REMEDIES**

in recognition of high scientific contribution and loyalty to  
the XXVI-th INTERNATIONAL EXHIBITION OF INVENTICS

## INVENTICA 2022

Iasi, Romania

22-24 June 2022

GENERAL MANAGER  
NATIONAL INSTITUTE OF INVENTICS  
Prof. Neculai-Eugen SEGHEIDIN PhD







MINISTERUL  
CERCETĂRII,  
INOVĂRII ȘI  
DIGITALIZĂRII

# DIPLOMA OF GOLD MEDAL 2022

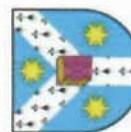
is awarded to:

**Processes for spirulina biomass production – raw material for the development of anticancer, immunostimulating and antioxidant agents**

RUDI Ludmila, CEPOI Liliana, CHIRIAC Tatiana, RUDIC Valeriu, DJUR Svetlana,  
ZINICOVSCAIA Inga, VALUȚA Ana, DUMBRĂVEANU Veronica, MISCU Vera,  
CEPOI Anastasia, ROTARI Ion, TAȘCĂ Ion, IUSHIN Nichita

President of International Jury  
Prof.Dr.Eng. Mohd Mustafa Al Bakri ABDULLAH

President of Exhibition  
Prof.Dr. Ion SANDU



May 28, 2022



# DIPLOMA

International Exhibition INVENTCOR  
II<sup>nd</sup> edition, 16-18.12.2021, Deva, Romania



AWARDED FOR

**PROCEEDING FOR OBTAINING SPIRULINA BIOMASS - RAW  
MATERIAL FOR NEW IMMUNOMODULATORY, ANTIVIRAL,  
ANTIMICROBIAL AND ANTICANCER REMEDIES**

***MD 4714 / 2020.09.30***

**TO**

**Rudi Ludmila, Chiriac Tatiana, Cepoi Liliana, Rudic Valeriu,  
Djur Svetlana, Rotari Ion, Miscu Vera, Valuța Ana, Iațco Iulia,  
Codreanu Liviu, Zinicovscaia Inga**

***Public Institution Institute of Microbiology and Biotechnology  
Republic of Moldova***

Salon president,

Associate Professor Corneliu BIRTOK BĂNEASĂ

Jury president,

Professor Aurel Mihail ȚÎȚU

Expoziția Internațională Specializată

# „INFOINVENT”

Ediția a XVII-a

## DIPLOMĂ

### MEDALIA DE AUR

se acordă


Ludmila Rudi, Tatiana Chiriac, Liliana Cepoi, Valeriu Rudic,  
Svetlana Djur, Ion Rotari, Vera Miscu, Ana Valuța, Iulia Iațco,  
Liviu Codreanu, Inga Zinicovscaia

pentru

Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*



Eugeniu RUSU,  
Președintele  
Comitetului organizatoric



Svetlana COJOCARU,  
Președintele Juriului

17-20 noiembrie 2021,  
Chișinău, Republica Moldova



# Diploma of Honor

## GOLD MEDAL

Offered to

**RUDI L., CHIRIAC T., CEPOI L., RUDIC V., DJUR S., ROTARI I.,  
MISCU V., VALUȚA A., IATCO I., CODREANU L., ZINICOVSCAIA I.**

Institute of Microbiology and Biotechnology, Chisinau, Republic of  
Moldova

**PROCEEDING FOR OBTAINING SPIRULINA BIOMASS - RAW  
MATERIAL FOR NEW IMMUNOMODULATOR, ANTIVIRAL,  
ANTIMICROBIAL AND ANTICANCER REMEDIES**

in recognition of high scientific contribution and loyalty to  
the XXV-th INTERNATIONAL EXHIBITION OF INVENTICS

### INVENTICA 2021

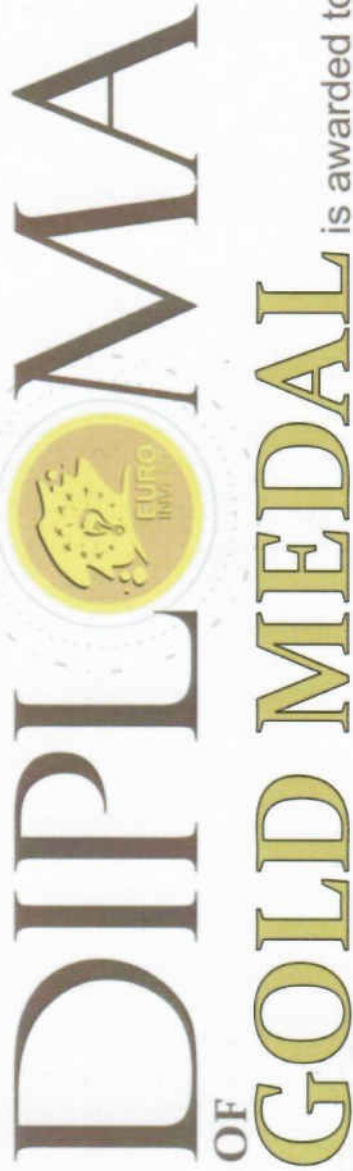
Iasi, Romania

23-25 June 2021

GENERAL MANAGER  
NATIONAL INSTITUTE OF INVENTICS  
Prof. Neculai-Eugen SEGHEDEIN PhD





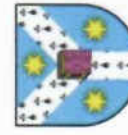


**DIPLOMA**  
OF  
**GOLD MEDAL** is awarded to:

**Procedures for obtaining *Spirulina* biomass – source of multifunctional remedies**

RUDI Ludmila, CHIRIAC Tatiana, CEPOI Liliana, ZINICOVSCAIA Inga, RUDIC Valeriu,  
DJUR Svetlana, ROTARI Ion, MISCU Vera, VALUȚA Ana, TAȘCA Ion, PLÂNGĂU  
Ecaterina, CODREANU Liviu, IUSHIN Nichita

President of International Jury  
Prof. Dr. Eng. Mohd Mustafa NI Bakri ABDULLAH

President of Exhibition  
Prof. Dr. Ion SANDU








SALONUL INTERNAȚIONAL AL CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE, INOVĂRII ȘI INVENTICII

# PRO INVENT

EDIȚIA XVIII, 18-20 NOIEMBRIE 2020  
CLUJ-NAPOCA



# DIPLOMA

DE EXCELENȚĂ  
ȘI MEDALIA DE AUR

RUDI Liudmila, CHIRIAC Tatiana, CEPOI Liliana, RUDIC Valeriu,  
DJUR Svetlana, ROTARI Ion, MISCU Vera, VALUȚA Ana, IAȚCO Iulia,  
CODREANU Liviu, ZINICOVSCAIA Inga

Se acordă

De la

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie Republica Moldova

Pentru

PROCEDEU DE CULTIVARE A CIANOBACTERIEI SPIRULINA PLATENSIS

PREȘEDINTELE SALONULUI,  
Prof. dr. ing. VASILE ȚOPA  
Rector al Universității Tehnice din Cluj-Napoca



PREȘEDINTELE JURIULUI,  
Prof. dr. ing. RADU MUNTEANU

*Radu Munteanu*



*The International Student Innovation and Scientific Research Exhibition*

*- "Cadet INOVA'20" -*

*The "Nicolae Bălcescu" Land Forces Academy of Sibiu, Romania*

*26-28 March 2020*

**THE GOLD MEDAL  
OF THE "Cadet INOVA'20" EXHIBITION**

*Is bestowed on the researchers*

**Rotari I. D., Tasca I., Carp E., Zinicovscaia I., Iushin N., Rudi L., Cepoi L., Chiriac T.,  
Djur S., Miscu V., Dumbraveanu V., Valuta A., Rudic V.**

*for the innovation:*

*Procedures for obtaining cyanobacterial and microalgal biomass - source of multifunctional remedies*

*President of the Jury,*

*Dipl. – Eng.*

**Andrei Victor SANDU PhD**



*President of the Exhibition,*

*Dipl. – Eng.*

**Siviu Mihai PETRIȘOR PhD**

MA-CI-2020





**EURO  
INVENT**  
13 EDITION  
EUROPEAN EXHIBITION OF  
CREATIVITY AND INNOVATION  
**2021**  
ONLINE  
IAȘI - ROMÂNIA



MINISTERUL  
CERCETĂRII,  
INOVĂRII ȘI  
DIGITALIZĂRII

# DIPLOMA OF GOLD MEDAL

is awarded to:

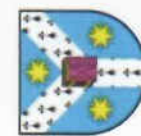
## Procedures for obtaining *Spirulina* biomass – source of multifunctional remedies

RUDI Ludmila, CHIRIAC Tatiana, CEPOI Liliana, ZINICOVSCAIA Inga, RUDIC Valeriu,  
DJUR Svetlana, ROTARI Ion, MISCU Vera, VALUȚA Ana, TAȘCA Ion, PLÂNGĂU  
Ecaterina, CODREANU Liviu, IUSHIN Nichita

EURO  
INVENT

EURO  
INVENT

President of International Jury  
Prof. Dr. Eng. Mohd Mustafa Al Bakri ABDULLAH



President of Exhibition  
Prof. Dr. Ion SANDU



May 22, 2021



**SOCIETATEA INVENTATORILOR  
DIN ROMANIA**



**CHIȘINĂU - REPUBLICA MOLDOVA  
Târgul Internațional  
de Invenții  
și Idei Practice**



Se acordă

**Medalia de aur cu diplomă de excelență**

**Autorilor:** Rudic V., Rudi L., Maftai E., Chiriac T., Cepoi L.,  
Miscu V., Plângău E., Codreanu S., Dumbraveanu V.,  
Zinicovscaia I.

pentru

**Invenția/Lucrarea:** Technology for Dunaliella salina cultivation

*Laureat al Premiului Juriului*  
**Târgului Internațional de Invenții și Idei Practice - 2018**  
**Chișinău - Republica Moldova INVENT - INVEST 2018**

Președinte Juriu,

Președinte SIR,

Prof. univ. dr. fiz. **Constantin Marin ANTOHI**



**INVENT - INVEST 2018**





**SOCIETATEA INVENTATORILOR  
DIN ROMANIA**

**INVENT  
INVEST  
2018**

**CHIȘINĂU - REPUBLICA MOLDOVA  
Târgul Internațional  
de Invenții  
și Idei Practice**



Award from  
**Romanian Society of Inventors**

**Authors:** Rudic V., Rudi L., Zinicovscaia I., Chiriac T., Cepoi L.,  
Djur S., Miscu V., Rotari I., Tașca I., Codreanu S.

**Paper:** Technologies for Spirulina cultivation

*Laureat al Premiului Juriului*  
Târgului Internațional de Invenții și Idei Practice - 2018  
Chișinău - Republica Moldova INVENT - INVEST 2018

Președinte Juriu,  
Acad. dr. hab. **Ion TIGHINEANU**

Președinte SIR,  
Prof. univ. dr. fiz. **Constantin Marin ANTOHI**



**INVENT - INVEST 2018**



**EURO  
INVENT**

EUROPEAN EXHIBITION OF  
CREATIVITY AND INNOVATION

EXPOZIȚIA EUROPEANĂ A  
CREATIVITĂȚII ȘI INOVĂRII

IAȘI - ROMÂNIA



# DIPLOMA



PROCEEDING FOR ASSESSING THE TOXICITY OF NANOPARTICLES BY MEANS OF  
RED MICROALGA PORPHYRIDIUM CRUENTUM

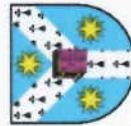
RUDIC V., CEPOI L., RUDI L., MISCU V., CHIRIAC T., SADOVNIC D., GHELBET V.

## GOLD MEDAL

MEMBER OF



President of International Jury  
Prof. Adrian GRAUR



President of Exhibition  
Prof. Ion SANDU



EUROINVENT  
2013

11 May 2013





NATIONAL INSTITUTE OF  
INVENTICS, JASSY, ROMANIA

# Diploma

## GOLD MEDAL

### The Hamangia Thinker

Offered Mr / Ms

Rudic Valery, Cepoi Liliana, Rudi Ludmila,  
Miscu Vera, Chiriac Tatiana,  
Sadovnic Daniela, Ghelbet Viorica

PROCEEDING FOR ASSESSING THE TOXICITY  
OF NANOPARTICLES BY MEANS OF RED  
MICROALGA PORPHYRIDIUM CRUENTUM  
Institute of Microbiology and  
Biotechnology of Academy of Sciences of Moldova

**THE XVII-TH INTERNATIONAL EXHIBITION  
OF RESEARCH, INNOVATION AND  
TECHNOLOGICAL TRANSFER**

**“INVENTICA 2013”**

IASI, ROMANIA  
19- 21 JUNE 2013

General Manager  
Prof. Boris Plahteanu Ph.D



# URKUNDE/CERTIFICATE



Internationale Fachmesse

»Ideen-Erfindungen-Neuheiten« Nürnberg

International Trade Fair

»Ideas-Inventions-New Products« Nuremberg

Rudic Valeriu, Duca Gheorghe, Gulea Aurelian, Cepoi Liliana, Rudi L.,  
Chiriac Tatiana, Miscu V., Djur S., Sadovnic D.

AGEPI

State Agency on Intellectual  
Property of the Republic of Moldova  
MOLDAU

wurde für hervorragende Leistungen eine /  
*was awarded with*

**Goldmedaille**

verliehen. /  
*for outstanding performances.*

**Erfindung / Neuheit – invention / new product**

Vorgehensweise zur Feststellung der Toxizität von Nanopartikeln mittels der  
Purpur-Rotalge (*Porphyridium cruentum*)

*Proceeding for assessing the toxicity of nanoparticles by means of red  
microalga porphyridium cruentum*

31. Oktober 2015

International Jury of iENA 2015

Kom. Rat Volkwin Hoffelner  
Vorsitzender der Jury/Chairman of the jury

International Jury of iENA 2015

Prof. Dr. Ing. Elmar Wagner  
2. Vorsitzender/Vice Chairperson



Anexa 4. Parametrii productivi și biochimici  
ai cianobacteriilor și microalgelor în condiții  
de stres tehnologic

Tabelul A4.1 Influența stresului termic asupra biomasei și parametrilor biochimici ai biomasei de *Arthrospira platensis* CNMN-CB-în condiții industriale și de laborator

	Temperatura 30 <sup>0</sup> C						Temperatura 40 <sup>0</sup> C					
	Ziua	Biomasa uscată (b.u), g/l	Proteine, % (b.u.)	Lipide, % (b.u.)	Carbohidrați % (b.u.)	Ficobiliproteine % (b.u.)	Biomasa uscată (b.u), g/l	Proteine, % (b.u.)	Lipide, % (b.u.)	Carbohidrați % (b.u.)	Ficobiliproteine % (b.u.)	
Condiții de laborator	1	0,46±0,06	62,00±1,12	4,69±0,22	12,90±0,08	14,38±0,11	0,40±0,08	61,60±1,23	4,50±0,12	11,30±0,23	12,00±0,23	
	2	0,42±0,04	62,00±1,14	3,15±0,41	12,20±0,11	12,44±0,12	0,42±0,06	64,00±1,22	3,92±0,11	15,60±0,32	14,24±0,22	
	3	0,44±0,04	63,33±1,07	3,70±0,11	12,00±0,12	12,04±0,13	0,45±0,05	64,00±1,02	4,56±0,21	16,50±0,33	13,26±0,17	
	4	0,50±0,07	63,00±0,85	3,47±0,32	12,60±0,21	18,38±0,25*	0,49±0,05	64,00±1,14	4,05±0,30	17,00±0,42	13,59±0,22*	
	5	0,55±0,05	65,00±1,06	4,69±0,20	11,90±0,10	16,75±0,22	0,63±0,10	65,30±1,51	4,33±0,11	13,00±0,25	14,93±0,17	
	6	0,58±0,04	64,50±1,11	5,01±0,11	12,00±0,22	16,82±0,12	0,65±0,11	62,00±1,40	4,69±0,21	12,50±0,22	15,49±0,22	
	7	0,60±0,08*	65,33±0,82*	4,66±0,20	10,90±0,12	15,45±0,24	0,72±0,12	58,00±2,25*	4,95±0,20	13,50±0,24	15,65±0,12	
	8	0,64±0,06*	65,67±1,04	4,42±0,14	12,70±0,21	14,68±0,13	0,74±0,21*	64,00±1,32	4,95±0,11	12,90±0,18	10,66±0,32	
	9	0,69±0,11	65,00±1,10	4,66±0,11*	12,30±0,25	16,89±0,11	0,74±0,22*	66,00±1,51	3,79±0,13*	12,70±0,22	11,18±0,41	
	10	0,76±0,12	65,00 ±1,21	5,68±0,12*	13,50±0,23	14,47±0,20	0,75±0,18	67,00±2,22	2,86±0,21*	13,00±0,20	10,22±0,11	
Condiții de producere	Ziua	Biomasa uscată (b.u), g/l	Proteine, % (b.u.)	Lipide, % (b.u.)	Carbohidrați % (b.u.)	Ficobiliproteine % (b.u.)	Biomasa uscată (b.u), g/l	Proteine, % (b.u.)	Lipide, % (b.u.)	Carbohidrați % (b.u.)	Ficobiliproteine % (b.u.)	
	1	0,44±0,07	62,90±1,20	3,73±0,11	10,30±0,21	17,40±0,17*	0,46±0,11	64,00±1,32	3,54±0,21	7,00±0,35	11,85±0,20*	
	2	0,50±0,05	62,80±2,01	3,09±0,12	11,50±0,11	13,70±0,22	0,51±0,12	67,00±1,14	3,28±0,32	9,60±0,22	15,50±0,23	
	3	0,55±0,04	62,7±1,22*	3,54±0,21	12,00±0,18	16,79±0,13	0,53±0,11	69,00±1,21*	3,99±0,12	9,70±0,23	16,27±0,31	
	4	0,58±0,04	60,15±1,32	4,63±0,22	12,40±0,21	14,55±0,22*	0,58±0,08	64,00±1,08	3,99±0,11	9,70±0,22	17,89±0,22*	
	5	0,60±0,08	62,10±1,28	4,27±0,17	11,00±0,10	15,50±0,18	0,64±0,21	63,00±1,02	3,79±0,24	8,00±0,14	15,50±0,41	
	6	0,76±0,11	64,25±0,86	4,50±0,11	11,20±0,08	16,32±0,11	0,67±0,20	64,00±1,04	4,18±0,20	8,50±0,24	16,42±0,52	
	7	0,81±0,10	63,50±1,11	4,31±0,10	9,90±0,11	15,22±0,16*	0,74±0,24	65,00±1,12	5,01±0,11	8,00±0,52	13,00±0,24*	
	8	0,85±0,10	63,95±1,30	4,24±0,08	10,80±0,24	17,88±0,22*	0,82±0,22	65,00±1,15	4,63±0,32	8,89±0,33	11,91±0,11*	
	9	0,89±0,06	64,95±1,18	4,11±0,11	11,90±0,26	17,87±0,20	0,92±0,12	66,00±1,07	4,05±0,33	10,90±0,38	17,00±0,61	
10	0,89±0,08	63,30±1,12	4,44±0,11	13,00±0,22	15,50±0,16*	0,98±0,11	65,00±1,16	3,92±0,11	11,80±0,41	17,88±0,20*		

Tabelul A4.2 Influența stresului de lumină asupra biomasei și parametrilor biochimici ai biomasei de *Arthrospira platensis* CNMN-CB-în condiții industriale și de laborator

	Iluminare continua						Iluminare periodica					
	Zi ua	Biomasa uscată (b.u), g/l	Proteine, % (b.u.)	Lipide ,% (b.u.)	Carbohidrați % (b.u.)	Ficobiliproteine %(b.u.)	Biomasa uscată (b.u), g/l	Proteine, % (b.u.)	Lipide ,% (b.u.)	Carbohidrați % (b.u.)	Ficobiliproteine %(b.u.)	
Condiții de laborator	1	0,45 ± 0,08	62,00± 1,28	4,69±0,37	12,9±0,08	14,38±0,66	0,40±0,06	54,50±1,11	5,40±0,42	17,00±0,06	17,85±0,38	
	2	0,42 ± 0,06	62,00± 1,33	3,15±0,35	12,2±0,22	12,44±0,41	0,45±0,04	50,07±1,06	4,11±0,23	27,60±0,16	14,56±0,27	
	3	0,44 ± 0,10	63,33± 1,08	3,70±0,32	12,0±0,21	12,04±0,52	0,48±0,06	51,30±1,03	3,89±0,52	26,50±0,11	16,77±0,33	
	4	0,50 ± 0,07	63,00± 1,08	3,47±0,43	12,6±0,15	18,38±0,22	0,57±0,04	51,70±1,12	4,05±0,34	23,40±0,15	14,20±0,24	
	5	0,55 ± 0,08	65,00± 0,88	4,69±0,38	11,9±0,11	16,75±0,21	0,67±0,07	48,22±1,12	3,99±0,33	25,00±0,14	17,18±0,42	
	6	0,58 ± 0,11	64,50± 0,96	5,01±0,44	12,0±0,22	16,82±0,16	0,67±0,12	50,60±1,02	4,37±0,24	25,00±0,08	17,68±0,21	
	7	0,60 ± 0,11	65,33± 1,02	4,66±0,32	10,9±0,23	15,45±0,32	0,75±0,11	51,10±1,04	4,66±0,25	23,00±0,22	18,25±0,22	
	8	0,65 ± 0,10	65,67± 1,01	3,92±0,27	12,7±0,21	14,68±0,33	0,90±0,08	52,15±1,03	4,50±0,32	22,50±0,21	15,52±0,17	
	9	0,69±0,08	65,00± 0,68	4,66±0,42	12,3±0,17	16,89±0,21	0,86±1,02	50,48±1,01	4,73±0,27	25,70±0,18	15,19±0,21	
	10	0,76±0,08	65,00± 0,76	5,69±0,36	13,5±0,16	14,47±0,20	1,04±0,06	50,40±1,01	4,28±0,36	26,80±0,21	14,11±0,33	
Condiții industriale	Zi ua	Biomasa uscată (b.u), g/l	Proteine, % (b.u.)	Lipide ,% (b.u.)	Carbohidrați % (b.u.)	Ficobiliproteine %(b.u.)	Biomasa uscată (b.u), g/l	Proteine, % (b.u.)	Lipide ,% (b.u.)	Carbohidrați % (b.u.)	Ficobiliproteine %(b.u.)	
	1	0,44± 0,09	62,90±0,66	3,73±0,27	10,3±0,42	19,00±0,33	0,46±0,07	53,40±1,08	3,92±0,33	18,50±0,55	17,03±0,54	
	2	0,50± 0,11	62,80±0,84	3,09±0,42	11,5±0,34	13,70±0,24	0,56±0,08	54,00±1,08	2,70±0,25	17,40±0,32	19,88±0,20	
	3	0,55± 0,12	62,70±1,01	3,54±0,44	12,0±0,44	16,79±0,17	0,61±0,06	55,60±1,12	3,54±0,24	18,89±0,22	19,32±0,16	
	4	0,58± 0,08	60,15±1,11	4,63±0,25	12,4±0,26	14,55±0,23	0,64±0,06	56,00±1,11	3,73±0,36	18,60±0,24	16,55±0,18	
	5	0,60± 0,11	62,10±1,12	5,27±0,41	11,0±0,22	15,50±0,22	0,98±0,04	56,00 ±1,05	4,11±0,42	18,00±0,23	18,08±0,21	
	6	0,76± 0,12	64,25±0,77	4,50±0,31	11,2±0,21	16,32±0,22	1,17±0,08	55,00±1,02	4,37±0,37	17,90±0,22	17,07±0,22	
	7	0,81± 0,09	63,50±0,82	4,31±0,24	9,90±0,18	15,22±0,43	1,22±0,11	54,00±1,11	5,21±0,41	17,70±0,21	19,05±0,31	
	8	0,85± 0,13	63,95±0,64	4,24±0,37	10,8±0,20	17,88±0,16	1,22±0,12	53,70±1,21	5,46±0,33	16,00±0,18	20,46±0,21	
	9	0,89± 0,08	64,95±0,57	4,11±0,42	11,9±0,16	17,87±0,14	1,16±0,12	54,60±1,06	4,50±0,34	14,00±0,21	21,57±0,14	
10	0,89± 0,11	63,30±0,85	4,44±0,22	13,0±0,18	15,50±0,33	1,21±0,09	55,12±1,05	4,82±0,45	14,80±0,16	20,50±0,13		

Tabelul A4.3 Influența stresului salin asupra biomasei și parametrilor biochimici ai biomasei de *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 și a tulpinii *Nostoc linckia* CNMN-CB-03 în condiții de laborator

<i>Arthrospira platensis</i> CNMN-CB-11							<i>Nostoc linckia</i> CNM-CB-03						
Ziua		Biomasa uscată (b.u.), g/l	Proteine, % (b.u.)	Lipide, % (b.u.)	Carbohidrați % (b.u.)	Ficobiliproteine % (b.u.)	Ziua	Biomasa uscată (b.u.), g/l	Proteine, % (b.u.)	Lipide, % (b.u.)	Carbohidrați % (b.u.)	Ficobiliproteine % (b.u.)	Biomasa uscată (b.u.), g/l
3	C	0,44±0,10	63,33±1,08	3,70±0,32	12,00±0,21	12,04±0,52	3	C	0,32±0,15	25,40±1,01	2,40±0,18	55,00±0,52	4,30±0,12
	10	0,43±0,11	59,15±0,06	4,37±0,17	12,61±0,32	12,09±0,33		10	0,36±0,15	26,32±1,02	2,38±0,33	61,30±0,63	4,65±0,11
	20	0,41±0,08	60,50±1,11	4,17±0,22	11,91±0,11	13,62±0,23		20	0,30±0,16	25,14±0,88	2,49±0,24	63,80±0,24	4,68±0,10
	30	0,44±0,06	55,40±1,01	4,54±0,12	15,69±0,24	12,10±0,16		30	0,30±0,08	27,23±1,04	2,33±0,26	64,27±0,22	3,55±0,20
	40	0,45±0,06	54,20±1,02	4,46±0,08	16,06±0,26	11,44±0,18		40	0,28±0,11	24,44±1,06	2,53±0,18	64,94±0,11	3,12±0,22
	50	0,42±0,10	55,80±1,21	4,04±0,11	13,99±0,11	11,33±0,21		50	0,29±0,11	20,68±1,44	2,82±0,12	68,30±0,21	2,54±0,14
6	C	0,58±0,11	64,50±0,96	5,01±0,44	12,00±0,22	16,82±0,16	6	C	0,42±0,08	24,10±1,00	2,20±0,17	58,00±0,34	4,90±0,06
	10	0,56±0,10	58,50±1,10	7,38±0,12	13,61±0,14	14,63±0,13		10	0,38±0,08	26,22±1,02	2,64±0,20	63,10±0,53	4,44±0,12
	20	0,60±0,12	55,30±1,22	6,40±0,11	14,08±0,14	15,15±0,15		20	0,34±0,06	24,18±1,10	2,89±0,11	64,80±0,24	3,02±0,10
	30	0,54±0,12	57,90±0,07	8,23±0,21	17,43±0,21	11,69±0,11		30	0,32±0,06	22,87±1,10	3,12±0,22	67,15±0,28	2,84±0,06
	40	0,52±0,11	57,40±0,08	7,93±0,10	17,51±0,22	10,04±0,22		40	0,32±0,07	21,88±0,86	3,15±0,24	69,03±0,66	2,38±0,08
	50	0,53±0,13	56,20±1,00	8,60±0,22	15,59±0,12	9,22±0,27		50	0,31±0,08	19,71±1,01	3,40±0,13	71,10±0,20	1,96±0,08
10	C	0,76±0,08	65,00±0,76	5,68±0,36*	13,50±0,16	14,47±0,20	10	C	0,53±0,10	22,70±0,07	2,60±0,13	54,00±0,36	4,10±0,11
	10	0,65±0,14	52,81±1,11	8,50±0,17	19,60±0,15	10,50±0,22		10	0,43±0,08	22,60±1,00	3,55±0,11	65,40±0,25	3,68±0,11
	20	0,63±0,15	51,15±1,02	7,67±0,13	23,10±0,22	9,60±0,21		20	0,36±0,06	20,17±1,10	3,68±0,10	67,90±0,11	2,53±0,12
	30	0,55±0,11	50,03±1,03	8,72±0,11	22,66±0,11	9,55±0,12		30	0,36±0,08	19,15±1,00	3,90±0,08	70,16±0,23	2,31±0,08
	40	0,54±0,08	51,33±1,00	8,33±0,21	24,52±0,11	8,12±0,17		40	0,32±0,10	19,20±0,07	4,07±0,10	69,85±0,20	1,92±0,08
	50	0,56±0,10	48,16±1,11	9,26±0,20	24,15±0,21	7,33±0,25		50	0,32±0,11	17,65±1,11	4,12±0,11	72,33±0,20	1,67±0,10

Tabelul A4.4. Influența stresului provocat de ioni metalici asupra biomasei și parametrilor biochimici ai biomasei de *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 și a tulpinii *Nostoc linckia* CNMN-CB-03 în condiții de laborator

<i>Arthrospira platensis</i> CNMN-CB-11						<i>Nostoc linckia</i> CNMN-CB-03							
Ziua	Biomasa uscată (b.u), g/l	Proteine, % (b.u.)	Lipide, % (b.u.)	Carbohidrați % (b.u.)	Ficobiliproteine % (b.u.)	Ziua	Biomasa uscată (b.u), g/l	Proteine, % (b.u.)	Lipide, % (b.u.)	Carbohidrați % (b.u.)	Ficobiliproteine % (b.u.)		
Control	3	0,42±0,04	60,85±1,04	12,24±0,22	4,52±0,32	13,80±0,21	Control	3	0,32±0,15	25,60±1,01	54,00±0,52	2,40±0,18	4,30±0,12
	4	0,48±0,11	62,80±0,84	12,13±0,12	5,03±0,47	12,20±0,18		4	0,34±0,08	24,40±1,02	52,00±0,66	2,47±0,14	4,30±0,10
	5	0,56±0,14	64,10±1,01	11,65±0,23	5,26±0,22	12,60±0,14		5	0,38±0,10	25,50±0,48	57,00±0,42	2,51±0,20	4,60±0,08
	6	0,64±0,24	64,20±0,66	11,45±0,15	4,87±0,18	12,50±0,11		6	0,40±0,08	24,00±1,00	57,20±0,34	2,40±0,17	4,80±0,06
	7	0,66±0,17	65,75±1,01	11,17±0,24	4,52±0,21	13,50±0,16		7	0,42±0,06	23,80±1,01	52,00±0,53	2,46±0,14	5,10±0,11
CuSO4 5 mg/l	3	0,27±0,16	43,20±1,11	32,37±0,23	4,81±0,16	6,99±0,09	CuSO4 5 mg/l	3	0,28±0,15	12,42±1,21	64,12±0,62	3,75±0,13	2,01±0,12
	4	0,34±0,15	47,45±1,21	32,20±0,18	4,58±0,13	8,95±0,06		4	0,25±0,10	11,92±1,11	66,58±0,21	3,44±0,11	1,84±0,07
	5	0,33±0,15	50,65±1,44	29,16±0,16	5,16±0,21	8,40±0,08		5	0,22±0,10	10,14±0,55	65,46±0,18	3,98±0,11	1,72±0,06
	6	0,19±0,11	49,85±1,01	26,79±0,22	6,76±0,12	2,44±0,21		6	0,20±0,07	8,35±1,21	67,35±0,16	4,01±0,21	1,77±0,10
	7	0,18±0,11	49,55±1,11	26,45±0,22	6,31±0,22	1,25±0,22		7	0,20±0,06	8,41±1,01	68,02±0,20	3,74±0,22	1,53±0,11
CuSO4 +	3	0,42±0,08	60,80±1,14	12,24±0,18	4,52±0,25	13,80±0,17	CuSO4 +	3	0,33±0,10	25,12±1,21	54,99±0,25	2,61±0,17	4,36±0,12
	4	0,39±0,13	62,40±1,01	14,39±0,16	6,12±0,18	8,12±0,12		4	0,35±0,06	14,22±0,71	60,44±0,33	3,11±0,12	2,66±0,07
	5	0,47±0,17	62,55±0,64	18,24±0,12	5,87±0,15	7,50±0,16		5	0,35±0,08	11,17±0,56	66,92±0,41	3,86±0,11	1,48±0,10
	6	0,55±0,15	61,20±0,78	21,42±0,22	6,47±0,12	7,80±0,11		6	0,39±0,10	7,38±1,00	68,14±0,58	3,95±0,10	1,50±0,06
	7	0,50±0,24	61,40±1,21	22,32±0,22	6,47±0,16	5,78±0,10		7	0,40±0,06	7,92±0,85	68,54±0,32	4,04±0,22	1,52±0,11

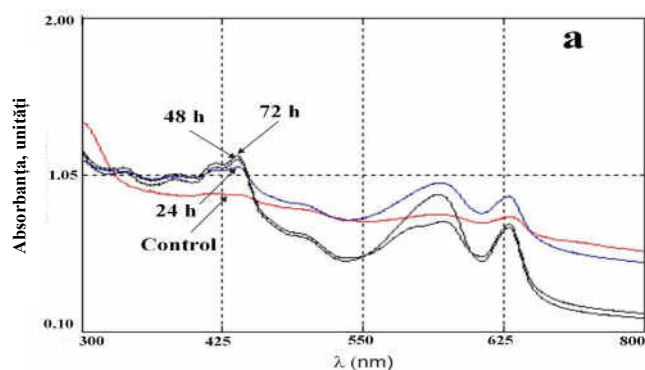
Zn acet 5 mg/l	3	0,54±0,26	61,70±1,22	13,32±0,1 1	5,20±0,22	12,20±0,20	Zn acet 5 mg/l	3	0,41±0,08	26,44±1,11	50,14±0,2 2	2,52±0,21	6,12±0,12
	4	0,56±0,25	64,80±1,14	13,06±0,0 8	4,30±0,20	11,91±0,08		4	0,44±0,10	25,72±1,21	48,13±0,1 8	2,84±0,17	6,44±0,07
	5	0,62±0,16	66,20±1,11	13,58±0,1 1	4,10±0,25	10,30±0,06		5	0,46±0,10	25,16±1,22	50,26±0,2 0	2,76±0,15	6,98±0,06
	6	0,66±0,25	66,70±0,88	14,80±0,1 2	4,20±0,23	10,74±0,06		6	0,49±0,08	25,48±1,11	50,33±0,2 1	2,73±0,15	7,50±0,10
	7	0,66±0,13	66,80±0,65	14,31±0,2 3	4,20±0,22	10,50±0,10		7	0,51±0,06	25,12±1,32	49,21±0,1 7	2,55±0,11	7,42±0,11

Tabelul A4.5. Influența stresului provocat de ioni metalici asupra biomasei și parametrilor biochimici ai biomasei de *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01 în condiții de laborator

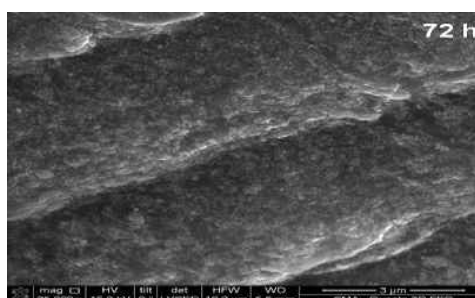
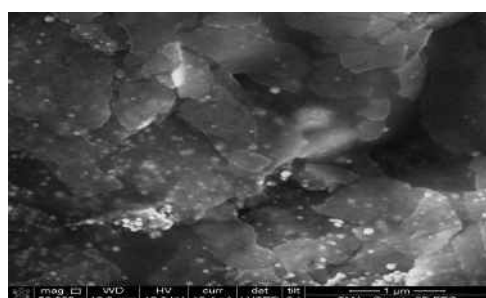
<i>Porphyridium Cruentum</i>						
Ziua	Biomasa uscată (b.u), g/l	Proteine, % (b.u.)	Lipide, % (b.u.)	Carbohidrați % (b.u.)	Ficobiliproteine % (b.u.)	
Control	4	1,24±0,09	22,06±0,78	9,14±0,11	21,18±1,32	6,35±0,09
	5	1,46±0,11	22,66±1,02	9,85±0,32	21,23±1,26	7,61±0,22
	6	1,68±0,13	24,17±1,32	10,11±0,37	22,16±0,98	7,82±0,74
	7	1,86±0,08	24,82±1,21	10,23±0,54	22,47±1,43	8,53±0,15
	8	2,04±0,13	25,07±0,96	10,35±0,12	22,86±2,09	8,91±0,62
	9	2,12±0,31	26,12±1,06	10,36±0,42	23,17±0,95	9,22±0,54
	10	2,12±0,17	26,66±2,11	10,54±1,05	23,66±1,56	9,37±1,02
CuSO4 5 mg/l	4	1,37±0,08	18,14±0,92	11,21±0,81	16,55±0,78	5,14±0,47
	5	1,49±0,14	18,52±1,04	12,54±0,68	17,21±1,08	5,11±0,51
	6	1,36±0,07	19,11±0,72	13,66±1,22	17,56±0,59	4,63±0,07
	7	1,59±0,08	19,38±1,11	14,82±0,95	18,06±0,46	5,07±0,12
	8	1,79±0,06	20,74±0,92	14,89±1,62	18,22±1,00	5,21±0,24
	9	1,68±0,12	21,11±1,06	16,12±0,84	18,12±0,49	6,17±0,22
	10	1,58±0,09	22,01±1,12	16,37±1,04	17,55±1,12	6,46±0,51
CuSO4 +	4	1,24±0,11	22,04±1,08	9,14±0,88	21,18±2,07	6,35±0,07
	5	1,45±0,12	22,11±1,22	10,24±0,62	20,71±0,83	6,33±0,68
	6	1,59±0,10	22,67±0,58	14,52±1,21	20,63±1,25	5,82±0,37
	7	1,68±0,13	23,01±2,06	14,66±1,36	19,56±0,96	6,12±0,48
	8	1,82±0,13	23,44±0,96	16,32±1,12	18,73±1,34	6,54±0,24
	9	1,79±0,21	23,67±1,14	16,22±1,23	18,25±1,41	7,14±0,51
	10	1,88±0,06	24,11±2,01	16,21±0,90	18,21±0,74	7,64±0,16

ANEXA 5. Dovezi ale procesului de nanobiosisteză cu utilizarea microalgelor și cianobacteriilor

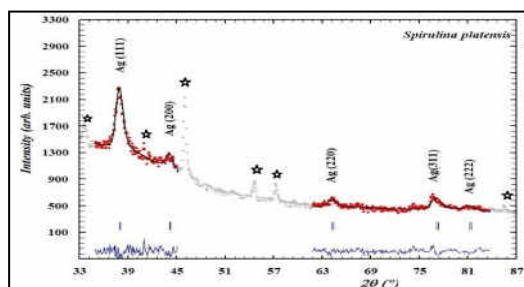




Spectrul de absorbție UV-VIS al culturii de *Arthrospira platensis*, pe durata biosintezei nanoparticulelor de argint

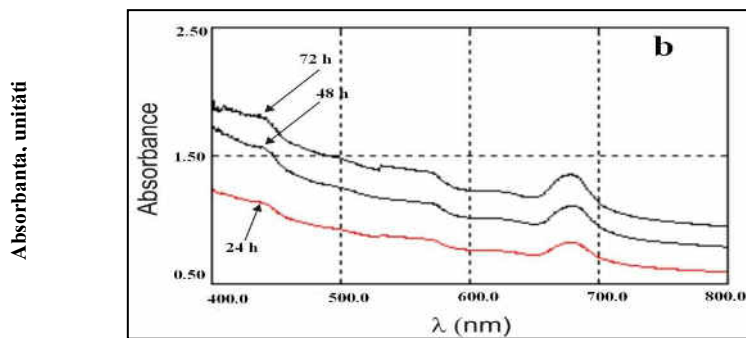


Imagini SEM ale celulelor de *Arthrospira platensis* cu nanoparticule de argint după un timp de incubare de 48 și 72 ore

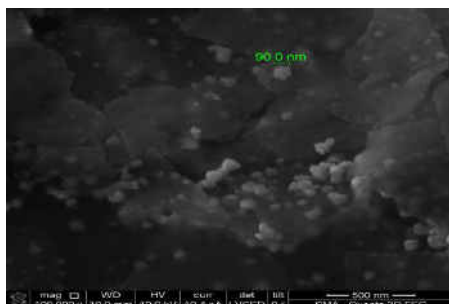


Spectrul EDAX al biomasei cu nanoparticule de argint și difractograma paternului de nanoparticule de argint în biomasa de *Arthrospira platensis* (24 ore de interacțiune)

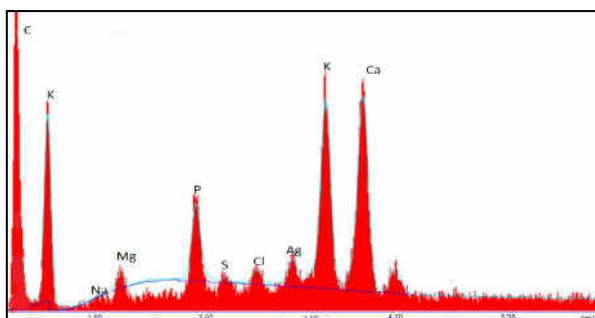
**Figura A5.1. Doveziile procesului de biosinteză a nanoparticulelor de argint de către cultura de *Arthrospira platensis*.**



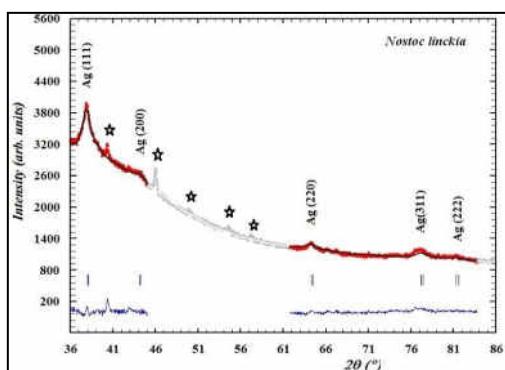
Spectrele de absorbție a probelor de biomasă prelevate la 24, 48 și 72 ore de la începutul experienței



Conglomerate de nanoparticule de argint situate extracelular pe suprafața capsulei polizaharidice la *Nostoc linckia*

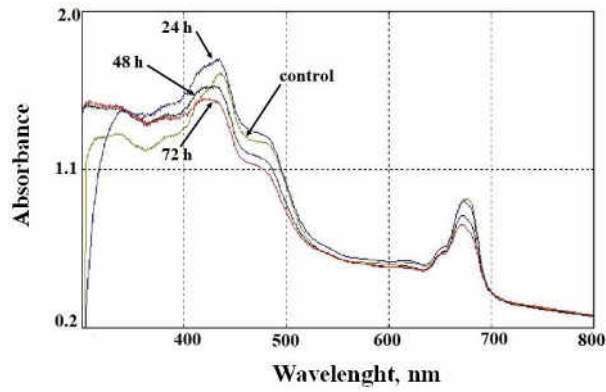


Spectrul EDAX al biomasei de nostoc cu nanoparticule de argint (24 ore de interacțiune).

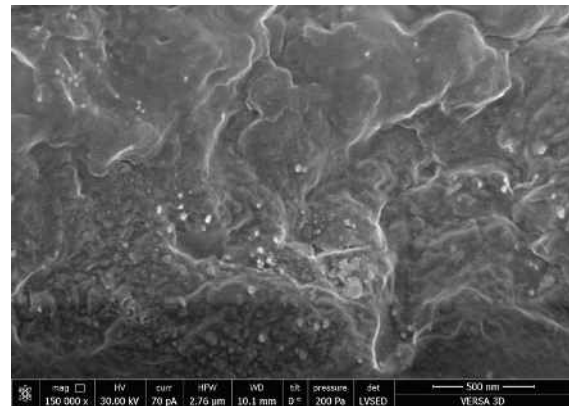
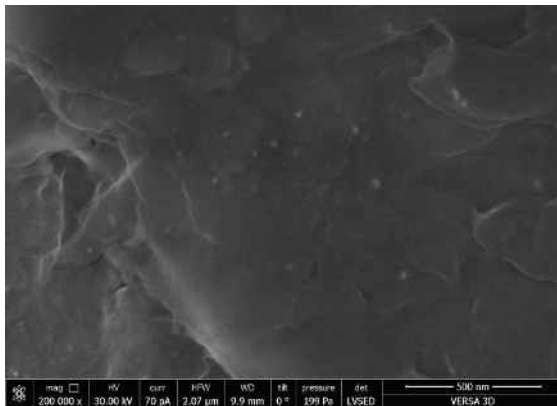


Difractograma paternului de nanoparticule de argint în biomasa de nostoc

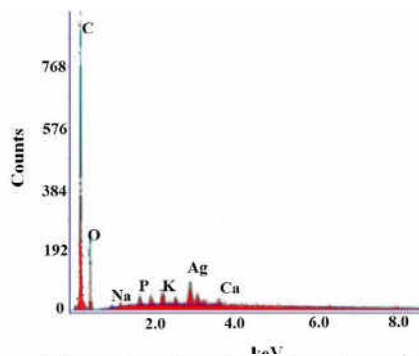
**Figura A 5.2. Dovezie ale procesului de biosinteză a nanoparticulelor de argint de către cultura de *Nostoc linckia*.**



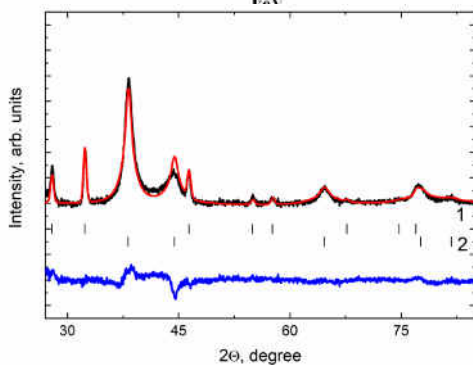
Spectrul UV-Vis al *Dunaliella salina* la diferite intervale de timp de incubare cu ionii de argint



SEM, biomasa de *Dunaliella salina* după 24 și 48 de interacțiune cu ionii de argint

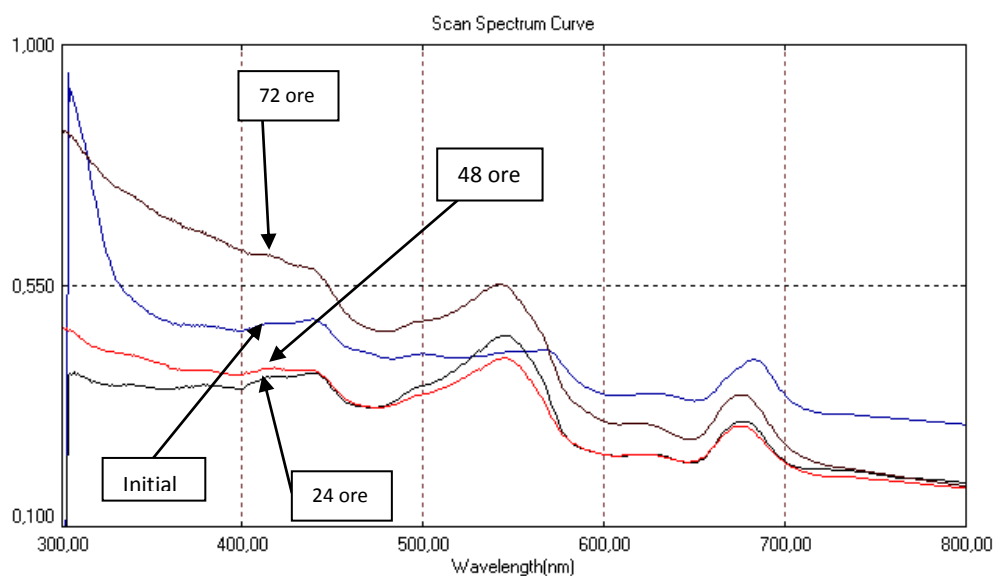


Spectrul EDX pentru *Dunaliella salina* tratată cu nitrat de argint 24 ore

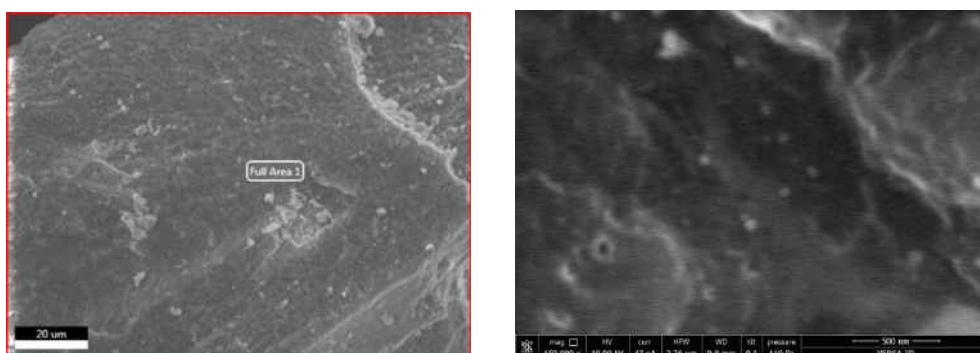


Patern de difracție a razelor X pentru biomasa de *Dunaliella salina* cu AgNP

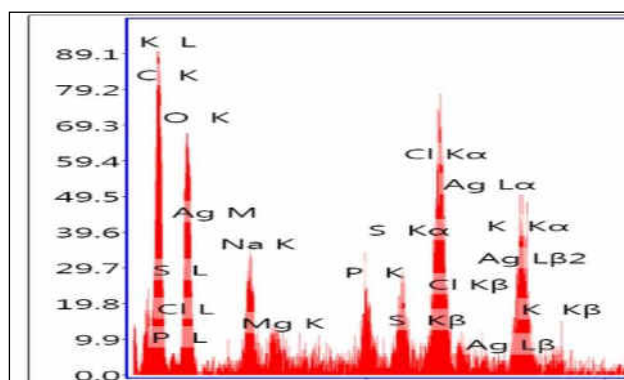
**Figura A 5.3. Dovezi ale procesului de biosinteză a nanoparticulelor de argint de către cultura de *Dunaliella salina*.**



*Spectrul de absorbție al biomasei de Porphyridium cruentum în soluție de azotat de argint*

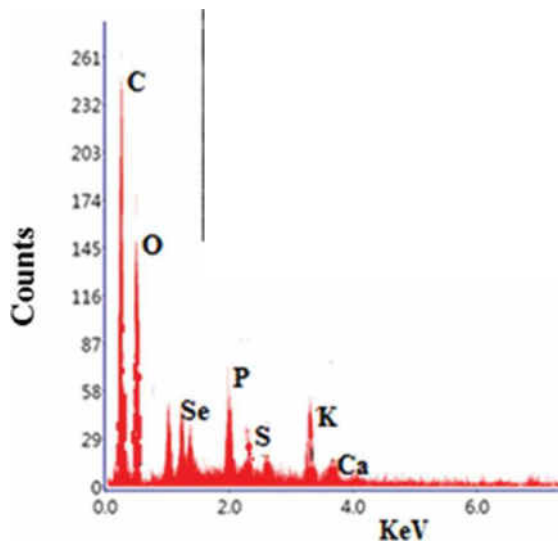


*Imagini SEM ale biomasei de Porphyridium cruentum după 24 ore de contact cu soluția de azotat de argint*



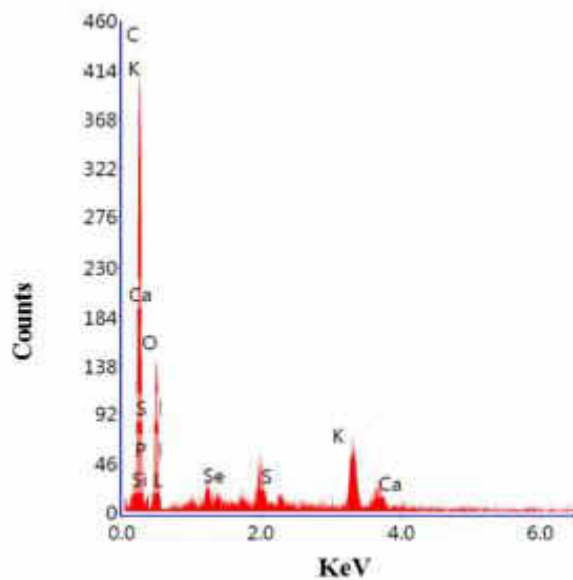
Spectrul EDAX ale biomasei de *Porphyridium cruentum* după 24 ore de contact cu soluția de azotat de argint.

**Figura A 5.4. Evidențe ale procesului de biosinteză a nanoparticulelor de argint de către cultura de *Porphyridium cruentum*.**



Spectrul de raze X (EDAX) obținut pentru biomasa *Arthrospira platensis* tratată cu soluție de selenit de cobalt timp de 72 de ore.

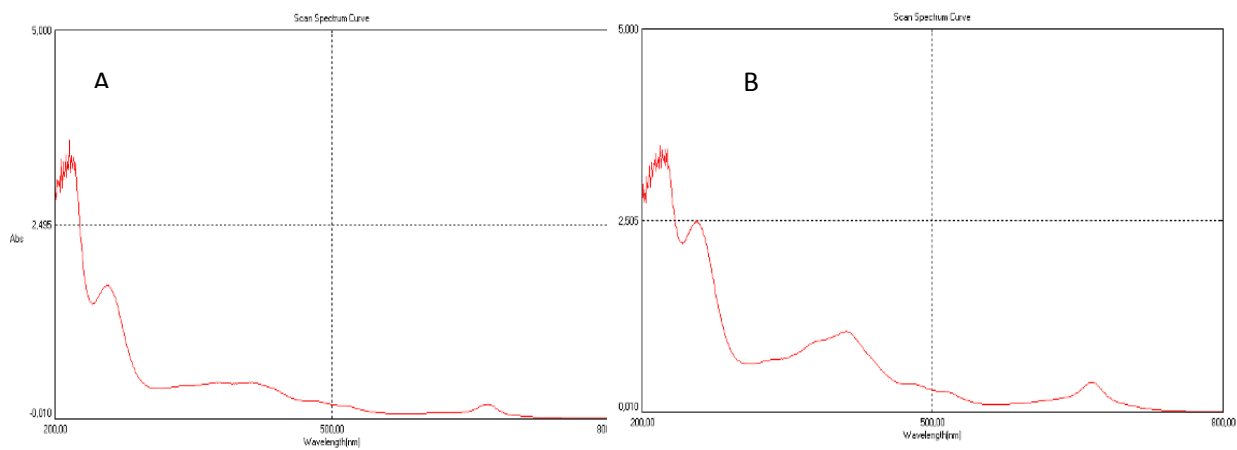
**Figura A5.5. Dovezi ale procesului de biosinteză a nanoparticulelor de selenium de către cultura de *Arthrospira platensis*.**



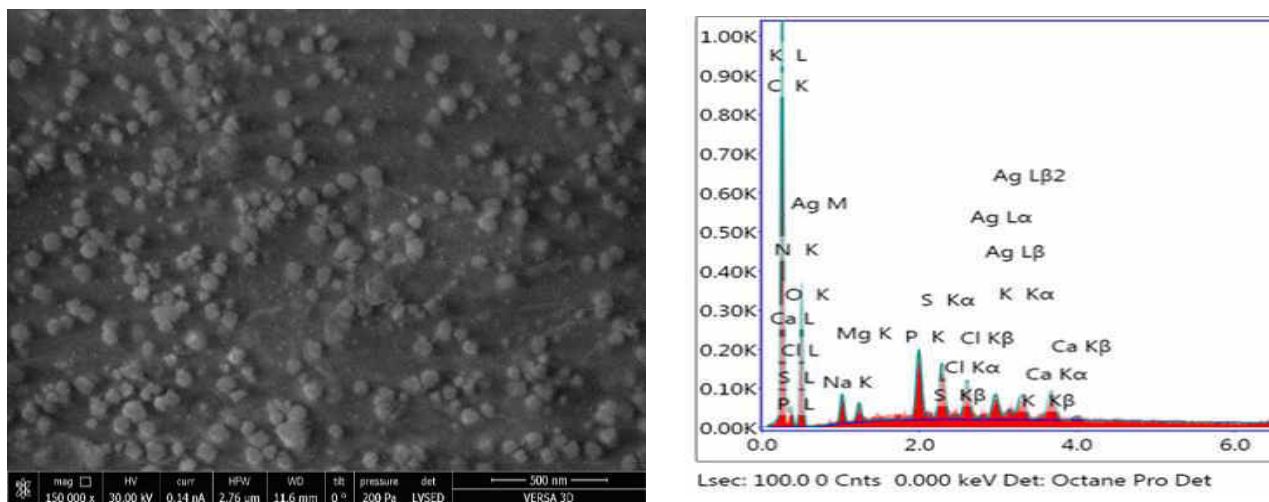
e

Spectrul EDAX pentru biomasa de *Nostoc linckia* cu nanoparticule de seleniu

**Figura A 5.6. Dovezi ale procesului de biosinteză a nanoparticulelor de selenium de către cultura de *Nostoc linckia*.**



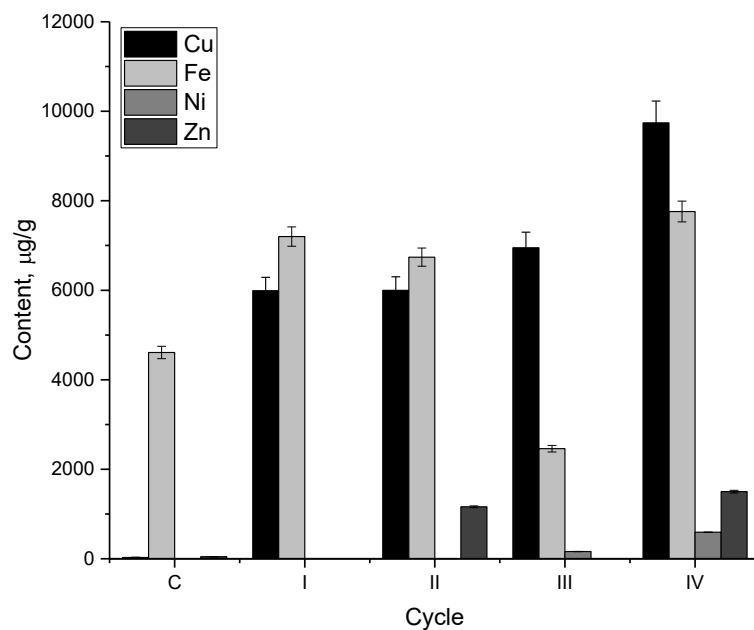
**Spectrul de absorbție al extractului hidro-etanolic din biomasa de spirulină, cultivată în condiții optime, proba martor (A) și obținută în prezența AgNP suplimentate la mediu de cultivare în concentrația de 10,0  $\mu$ M în a 5-a zi de cultivare (B)**



**Imagine SEM și spectrul EDAX al fracției proteice cu conținut de nanoparticule de argint biofuncționalizate**

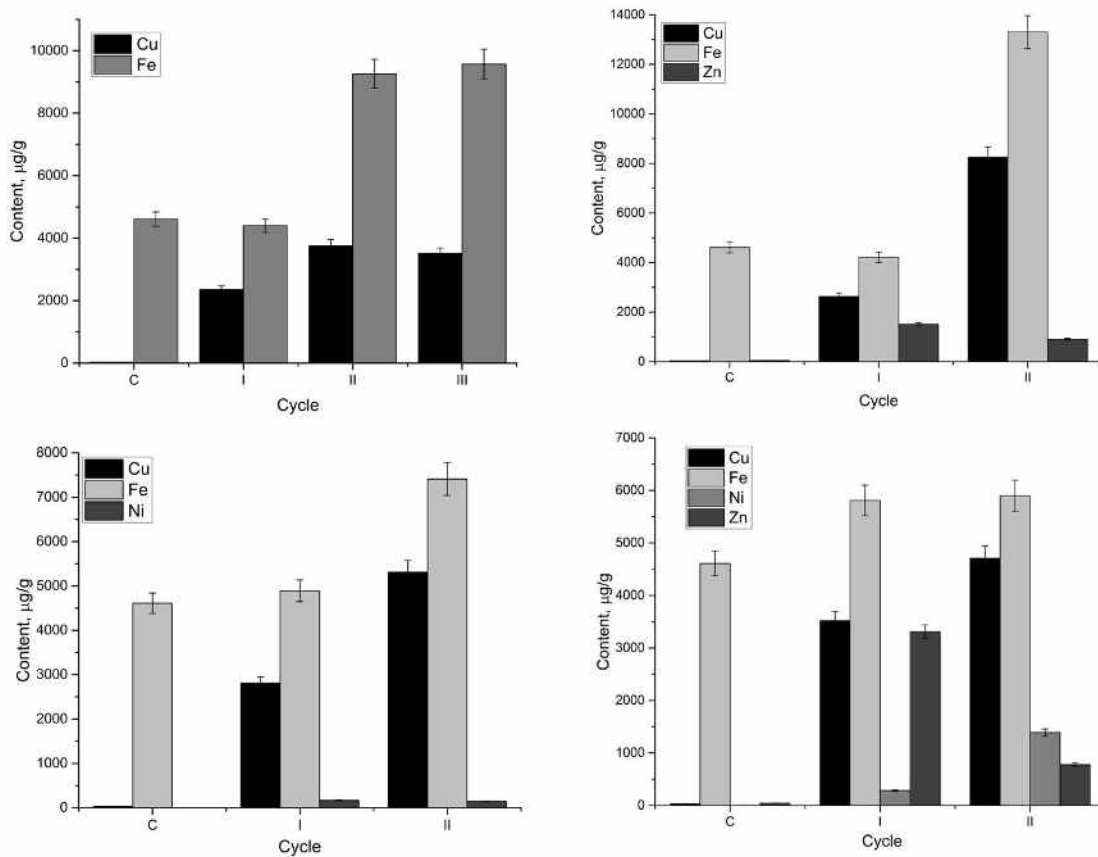
**Figura A5.7. Dovezi ale biofuncționalizării nanoparticulelor de Ag în biomasa spirulinei**

ANEXA 6. Acumularea metalelor în  
biomasa cianobacteriilor pe durata  
ciclurilor iterative de cultivare



**Fig. A.6.1. Bioacumularea metalelor de către *Arthrospira platensis* în 4 sisteme polimetalice: I) Cu/Fe, II) Cu/Fe/Zn, III) Cu/Fe/Ni and IV) Cu/Fe/Zn/Ni ( $C_{iCu}$  10 mg/L,  $C_{iFe}$  5 mg/L,  $C_{iNi}$  2 mg/L și  $C_{iZn}$  2 mg/L). Faza creșterii exponențiale**





**Fig. A. 6.2. Bioacumularea metalelor de către *Arthrospira platensis* în 4 sisteme polimetalice: I) Cu/Fe, II) Cu/Fe/Zn, III) Cu/Fe/Ni and IV) Cu/Fe/Zn/Ni ( $C_{iCu}$  10 mg/L,  $C_{iFe}$  5 mg/L,  $C_{iNi}$  2 mg/L și  $C_{iZn}$  2 mg/L). Faza staționată**

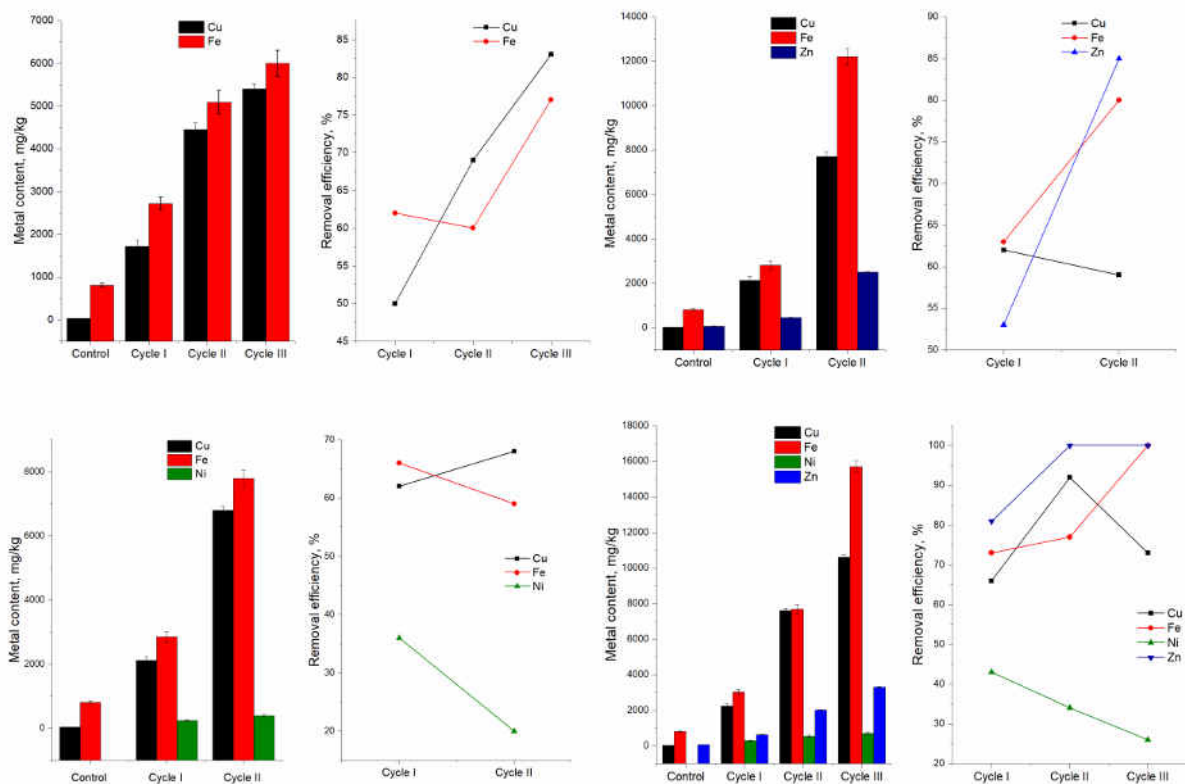
**Tabelul A.6.1. Acumularea metalelor de către biomasa *A. platensis* în patru sisteme analizate la adăugarea ionilor metalici în mediul de cultură în faza de creștere a biomasei, ( $C_{iCu}$  10 mg/L,  $C_{iFe}$  5 mg/L,  $C_{iNi}$  2 mg/L and  $C_{iZn}$  2 mg/L)**

Sistemul	Elementul	Conținutul de metale în biomasă, $\mu\text{g/g}$			
		Control	Ciclul I	Ciclul II	Ciclul III
Cr/Fe	Cr	9 $\pm$ 0.3	62 $\pm$ 4.5	104 $\pm$ 8.3	82 $\pm$ 6.5
	Fe	4610 $\pm$ 27	6190 $\pm$ 38	9530 $\pm$ 570	11300 $\pm$ 680
Cr/Fe/Ni	Cr	9 $\pm$ 0.3	76 $\pm$ 2.3	111 $\pm$ 3.3	105 $\pm$ 3.1
	Fe	4610 $\pm$ 27	6620 $\pm$ 26	8900 $\pm$ 360	13700 $\pm$ 550
	Ni	4 $\pm$ 0.08	53 $\pm$ 1.1	66 $\pm$ 1.3	115 $\pm$ 2.3
Cr/Fe/Ni/Zn	Cr	9 $\pm$ 0.3	96 $\pm$ 2.8	182 $\pm$ 5.4	129 $\pm$ 3.8
	Fe	4610 $\pm$ 27	7620 $\pm$ 46	12200 $\pm$ 73	15300 $\pm$ 920
	Ni	4 $\pm$ 0.08	87 $\pm$ 1.7	98 $\pm$ 1.9	149 $\pm$ 2.9
	Zn	45 $\pm$ 2.2	40.4 $\pm$ 2	51 $\pm$ 2.5	46 $\pm$ 2.3
Cr/Fe/Ni/Zn/C u	Cr	9 $\pm$ 0.3	94 $\pm$ 7.5	148 $\pm$ 9	139 $\pm$ 11
	Fe	4610 $\pm$ 27	7230 $\pm$ 50	10400 $\pm$ 63	19300 $\pm$ 135
	Ni	4 $\pm$ 0.08	61 $\pm$ 4.3	68 $\pm$ 6.8	109 $\pm$ 9.8
	Zn	45 $\pm$ 2.2	38 $\pm$ 0.3	72 $\pm$ 7	97 $\pm$ 9
	Cu	30 $\pm$ 2.3	n.d.	n.d.	n.d.

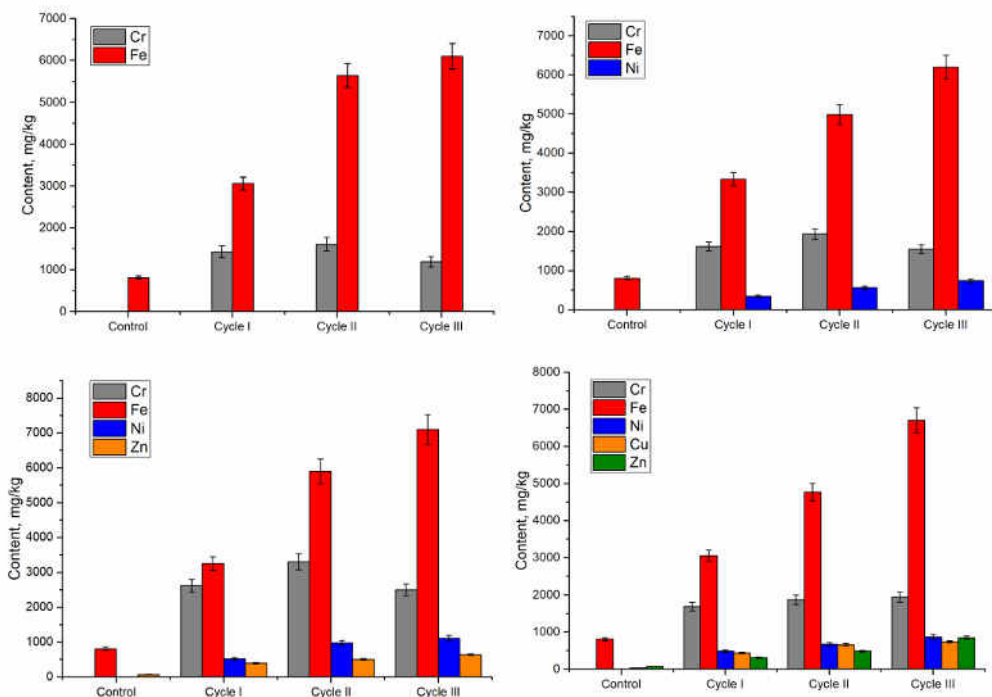
**Table A.6.2. Acumularea metalelor de către biomasa *A. platensis* în patru sisteme analizate la adăugarea ionilor metalici în mediul de cultură în faza staționară a**

System	Element	Metal content, $\mu\text{g/g}$			
		Control	Cycle I	Cycle II	Cycle III
Cr/Fe	Cr	9 $\pm$ 0.3	40 $\pm$ 2.4	36.5 $\pm$ 2.9	32 $\pm$ 2.2
	Fe	4610 $\pm$ 270	3860 $\pm$ 230	5190 $\pm$ 300	9100 $\pm$ 450
Cr/Fe/Ni	Cr	9 $\pm$ 0.3	61 $\pm$ 3.6	55 $\pm$ 3.3	45 $\pm$ 4
	Fe	4610 $\pm$ 270	4580 $\pm$ 230	7910 $\pm$ 390	17400 $\pm$ 870
	Ni	4 $\pm$ 0.08	240 $\pm$ 10	220 $\pm$ 8.8	206 $\pm$ 10.3
Cr/Fe/Ni/Zn	Cr	9 $\pm$ 0.3	80 $\pm$ 4.8	24 $\pm$ 1.6	56 $\pm$ 3.3
	Fe	4610 $\pm$ 270	4590 $\pm$ 270	2480 $\pm$ 124	18900 $\pm$ 900
	Ni	4 $\pm$ 0.08	222 $\pm$ 11	146 $\pm$ 7	274 $\pm$ 10
	Zn	45 $\pm$ 2.2	80 $\pm$ 4.8	24 $\pm$ 1.4	106 $\pm$ 5.3
Cr/Fe/Ni/Zn/Cu	Cr	9 $\pm$ 0.3	64 $\pm$ 7	74 $\pm$ 8	50 $\pm$ 5
	Fe	4610 $\pm$ 270	5710 $\pm$ 400	15200 $\pm$ 900	24100 $\pm$ 1870
	Ni	4 $\pm$ 0.08	131 $\pm$ 7.8	164 $\pm$ 9.8	170 $\pm$ 8.5
	Zn	45 $\pm$ 2.2	102 $\pm$ 6.1	125 $\pm$ 7.5	127 $\pm$ 6.3
	Cu	30 $\pm$ 2.3	117 $\pm$ 7	95 $\pm$ 5.7	117 $\pm$ 5.8

**biomasei**, mg/L:  $C_{iCr}$  2.5,  $C_{iFe}$  1.25,  $C_{iNi}$  0.5,  $C_{iZn}$  0.5 and  $C_{iCu}$  0.5

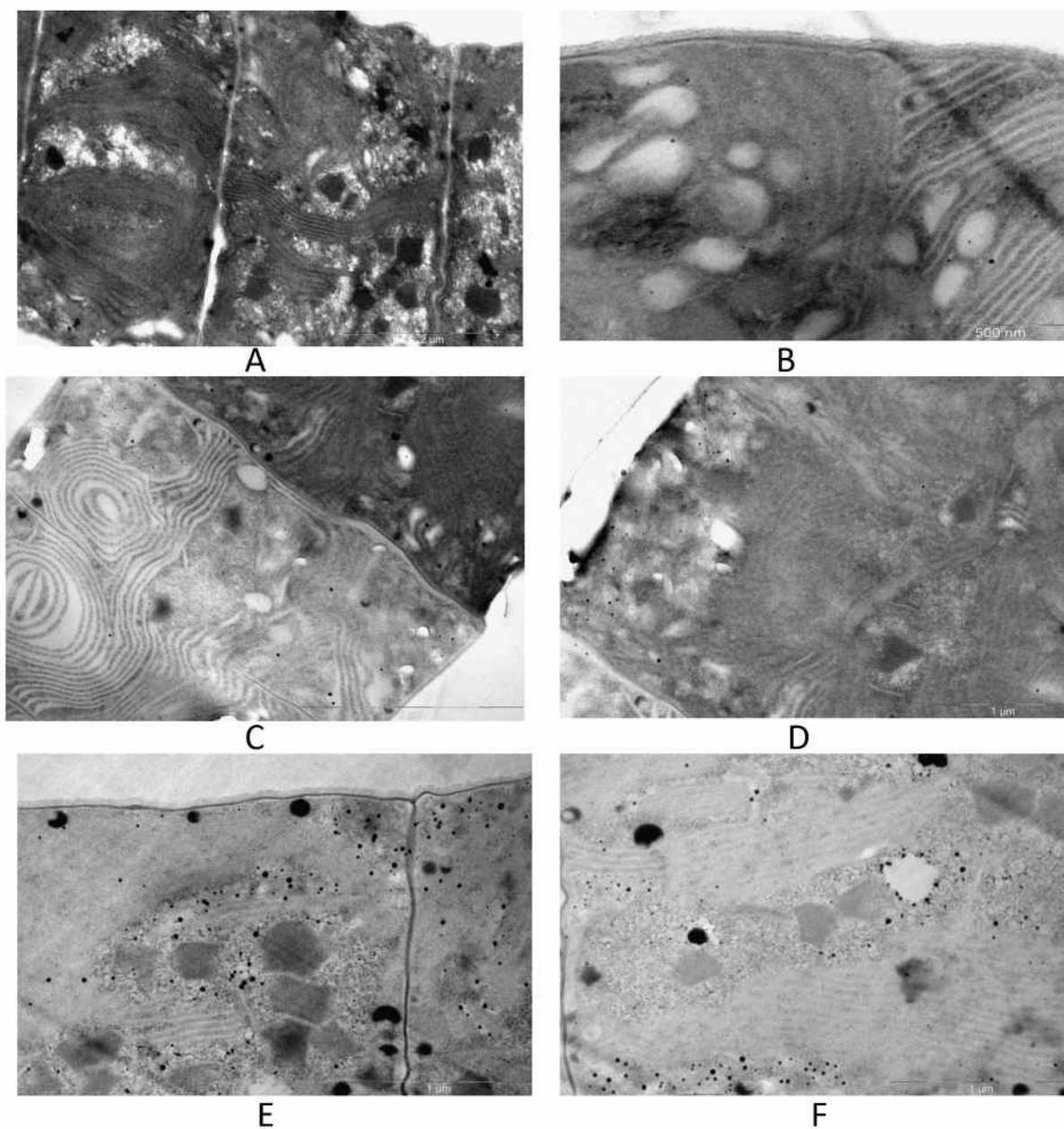


**Fig. A 6.3. Bioacumularea cuprului și a altor metale de către biomasa de *Nostoc linckia* pe durata a trei cicluri în medii ce conțin sisteme multimetalice (\*\* $p < 0.001$  pentru diferențele dintre probe și martor).**



**Fig.A.6.4. . Bioacumularea cromului și a altor metale de către biomasa de *Nostoc linckia* pe durata a trei cicluri în medii ce conțin sisteme multimetalice**

## Anexa 7. Ultrastructura spirulinei în condiții de stres



**Fig.A7.1. Ultrastructura celulelor de spirulină în condiții de stres : A – stres provocat de metale grele (Co(III), 30 mg/l) ; B – stres provocat de metale grele (Fe(II), 30 mg/l) ; C,D – stres provocat de metale grele (Ni (II), 30 mg/l) ; E,F – stres provocat de etanol, 4 ml/l.**

## Anexa 8. Procedee biotehnologice noi



## **Procedeu de sinteză dirijată a compușilor biologic activi (ficobiliproteine și polizaharide) la cultivarea în condiții industriale a spirulinei**

### **Etapa I:** Prepararea mediului nutritiv pentru spirulina

1. *Succeșiunea operațională – Cântărirea macro- și microelementelor, componentelor de cultivare a spirulinei:* Se calculează cantitatea de nutrienți conform rețetei compoziției optime a mediului nutritiv necesară pentru un volum de serie tehnologică preconizată pentru producere: macroelementele (g/l):  $\text{NaNO}_3$ -2,5;  $\text{NaHCO}_3$ -8,0g;  $\text{NaCl}$ -1,0;  $\text{K}_2\text{SO}_4$ -1,0;  $\text{NaHPO}_4$ -0,20;  $\text{MgSO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2g;  $\text{CaCl}_2$ -0,024; sol. de microelemente (mg/l):  $\text{H}_3\text{BO}_3$ -2,86;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -1,81;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,22;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,08;  $\text{MoO}_3$ -0,015; Fe-EDTA-1,0ml/l.
2. *Succeșiunea operațională – Dizolvarea macro- și micronutrienților, componente ale mediului de cultivare a spirulinei:* Macro- și microcomponentele mediului nutritiv cântărite în cantitatea calculată pentru volumul seriei de produs și conform succesiunii din prescripție, se adaugă consecutiv și se dizolvă prin amestecare, într-un vas din material plastic atoxic cu capacitatea corespunzătoare volumului calculat pentru seria de produs.

### **Etapa II:** Transferarea mediului nutritiv în instalația (fotoreactorul) de cultivare

1. *Succeșiunea operațională – Transferarea mediului nutritiv:* Mediul nutritiv din vasul cu mediul nutritiv preparat, se pompează cu ajutorul unei pompe prin conductă în instalația (fotoreactorul) de cultivare. Supapele fiind deschise. Cuvă se umple cu mediu până la volumul prevăzut, după care, supapele se închid.

### **Etapa III:** Inocularea suspensiei de spirulină

1. *Succeșiunea operațională – Inocularea suspensiei de spirulina:* După ce mediul nutritiv a fost transferat în cuvă fotoreactorului, se introduce inoculul de spirulină, reieșind din proporția 0,4-0,45 g/l biomasă uscată (Concentrația culturii „start” de spirulină se determină spectrofotometric, cu recalculul în g/l biomasă uscată).

**Etapa III:** Cultivarea spirulinei în scopul producerii de biomasă, ficobiliproteine și polizaharide – materie primă pentru diverse tipuri de produse cu proprietăți antioxidante, antivirale și imunomodulatoare

1. *Succeșiunea operațională: Cultivarea spirulinei în scopul producerii de biomasă, ficobiliproteine și polizaharide – materie primă pentru diverse tipuri de produse cu proprietăți antioxidante, antivirale și imunomodulatoare:* După inocularea culturii, se conectează mecanismul de agitare - malaxor cu palete care asigură viteza necesară de

agitare și dispozitivele de iluminare (lămpi cu lumină de zi: LB-20; LDT-80; DRL-125 și DRL-250) ale instalației (fotoreactorului) de cultivare. Pe durata cultivării se respectă următorii parametri de proces:

- Temperatura la cultivare: 28<sup>0</sup>C – 30<sup>0</sup>C;
- Regimul de iluminare:
  - ✓ Cultivarea la intensitatea luminii de 55 μM fotoni/m<sup>2</sup>/s cu durata de 12 ore;
  - ✓ Cultivarea în lipsă de iluminare cu durata de 12 ore;
- pHul mediului : 9,0-10,0 un. de pH;
- Durata cultivării: 144 ore (6 zile).

2. *Succesiunea operațională – Controlul interfazic și finit al procesului de cultivare a spirulinei*: Producerea biomasei de spirulină – materie primă pentru diverse produse cu proprietăți antioxidante, antivirale și imunomodulatoare este monitorizată pe durata întregului flux tehnologic. Acest proces este supus controlului interfazic și finit (calitatea și siguranța biomasei de spirulină), pentru care sunt stabilite 3 puncte de control și cu determinarea următorilor indici:

1) Sfârșitul primei zile de cultivare, după 24 ore

Indicii de control – (1) Nivelul de creștere al culturii pentru a stabili pornirea procesului de creștere al spirulinei și (2) Nivelul DAM;

2) Sfârșitul zilei a patra de cultivare, după 96 ore

Indicii de control - (1) Nivelul de creștere al culturii, (2) Nivelul DAM, (3) Conținutul de ficobiliproteine, (4) Cantitatea de polizaharide.

3) Sfârșitul zilei a 6-a de cultivare, după 144 ore, final de proces de cultivare

Indicii de control - (1) Nivelul de creștere al culturii, (2) Nivelul DAM, (3) Conținutul de ficobiliproteine, (4) Cantitatea de polizaharide.

#### **Etapa V: Colectarea biomasei de spirulină**

1. *Succesiunea operațională – Separarea biomasei de spirulină*: La a 6-a zi de cultivare (după 144 ore), cultura de spirulină din cava inferioară a instalației (fotoreactorului) de cultivare se trece prin pompă pe filtrul-ramă din pânză de bumbac cu diametrul de 0,70m<sup>2</sup> sau 0,90m<sup>2</sup> pentru separarea biomasei de lichidul cultural.

2. *Succesiunea operațională – Înlăturarea sărurilor de pe suprafața masei celulare de spirulină*: După filtrare, biomasa de spirulină se supune procedurii de înlăturare a sărurilor de pe suprafața masei celulare prin spălare cu o soluție de acetat de amoniu de 1,5%.

3. *Procedura operațională – Colectarea biomasei de spirulină:* După, biomasa se colectează într-un vas curat, corespunzător volumului obținut și se determină cantitatea de biomasă, ficobiliproteine, polizaharide și conținutul DAM în biomasa produsă. La corespunderea parametrilor de control prescripției de calitate pentru tipul de produs solicitat, biomasa produsă ca materie primă, poate fi supusă tehnicilor de prelucrare și procesare specifice fiecărui tip de substanță activă/produs fabricat.

## DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctor habilitat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Cepoi Liliana



Data

12.01.2024

## CV al Autorului

**Nume, prenume** CEPOI Liliana  
**Data și locul nașterii:** 30 august 1967, or. Râșcani,  
**Cetățenie:** R. Moldova



### **Studii și calificări:**

Octombrie 2003 Conferențiar cercetător (Certificat nr.4 din 23.10.2003 eliberat de Comisia Supremă de Atestare a R. Moldova)  
Decembrie 1995 Teza de doctor în științe biologice „Particularități fiziologo-biochimice de cultivare a algei roșii *Porphyridium cruentum* CNM - AR-01 – sursă de substanțe biologice active”  
Diplomă de doctor în științe biologie D nr.000289 din 29.02.1996, eliberată de Comisia Supremă de Atestare a R. Moldova  
1 noiembrie 1989 - Universitatea de Stat din Moldova, Doctorandă la specialitatea 03.00.07 - Microbiologie  
1 noiembrie 1993.  
1 septembrie 1984 - Universitatea de Stat din Moldova, Facultatea de Biologie și Pedologie - Studentă  
20 iunie 1989. Diplomă de studii superioare nr. 962836 din 30.06.1989, Biolog, profesor de biologie și chimie

### **Activitatea profesională:**

20.11.2020 – prezent Institutul de Microbiologie și Biotehnologie (2019-2022) al Universității Tehnice a Moldovei (din 01.01.2023), Director  
01.02.2019 – prezent Institutul de Microbiologie și Biotehnologie (2019-2022) al Universității Tehnice a Moldovei (din 01.01. 2023), laboratorul Ficobiotehnologie, Cercetător științific coordonator  
17 septembrie 2007 – 31.01.2019 Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM, Director adjunct pentru probleme științifice  
01 ianuarie 2009 - 31 august 2020 Universitatea de Stat Dimitrie Cantemir, Conferențiar universitar  
17 Iulie 2006 - 17 septembrie 2007 Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM, Laboratorul Ficobiotehnologie, Șef laborator  
01 iulie 2001 - 17 iulie 2006 Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM, Laboratorul Ficobiotehnologie, Cercetător științific coordonator

### **Domenii de interes științific:**

Biotehnologie, bionanotehnologie; Microbiologie; Ecologie - Compuși biologici activi derivați din cianobacterii și microalge și noi preparate multifuncționale pe baza acestora: modele de sinteză orientată, procedee și tehnici de prelucrare, formule și compoziții, tehnologii de

obținere, studii experimentale. Modele de sinteză a nanoparticulelor, biofuncționalizare și evaluarea toxicității lor cu ajutorul cianobacteriilor și microalgelor. Formarea de noi idei și concepte despre stresul oxidativ și rolul lui în biotehnologiile cianobacteriilor și microalgelor; Studiul și elaborarea de noi modele de bioremediere a efluenților contaminați cu diferite tipuri de poluanți.

***Participări la proiecte științifice naționale, bilaterale, și internaționale:***

1. 20.80009.5007.05 (2020-2023) Nanoparticule biofuncționalizate – obținerea cu ajutorul cianobacteriilor și microalgelor (MetBFN). *Executant.*
2. 16.00.1353.50.07A (2016- 2018) Tehnologii de biosinteză a nanoparticulelor de selen cu utilizarea spirulinei. *Executant.*
3. 16.80013.16.05.18/Ro (2016-2018) Modificarea statutului redox și a expresiei genelor legate de stres la Spirulina (Arthrospira) în condiții de stres oxidativ indus (ReGeSpi). *Executant.*
4. 15.817.05.01F (2015-2019) Stresul oxidativ indus de condițiile tehnologice și influența lui asupra calității biomasei de spirulină. *Executant.*
5. 15.820.18.05.14/B (2015-2016) Tehnologie de utilizare a cianobacteriei *Spirulina platensis* pentru purificarea apelor reziduale cu perspectiva utilizării ulterioare a biomasei. *Executant.*
6. 14.518.02.02A (2014-2015) Tehnologii cost eficiente de obținerea nanoparticulelor de argint cu utilizarea cianobacteriilor și microalgelor ca suport. *Executant*
7. Proiect PC 7 (2013 – 2015) NUTritional Labeling Study in Black Sea Region Countries (NUTRILAB). *Executant.*
8. 13.820.18.01/BA (2013-2014) Elaborarea și implementarea tehnologiei de obținere a premixelor selencomponente în baza biomasei de spirulină. *Executant.*
9. 1.817.08.18F (2011-2014) Stabilirea mecanismelor de modificare a statutului oxidativ și a componentei biochimice a biomasei unor microalge sub acțiunea metalocomplexelor în scopul obținerii preparatelor antioxidante. *Executant.*
10. 11.836.05.06F (2011–2012) Aprecierea efectelor nanoparticulelor CdSe, ZnSe, ZnS asupra proceselor de protecție antioxidantă la microalge și cianobacterii la pătrunderea lor în celulă și imobilizarea pe suprafața lor. *Executan.t*
11. 10.820.04.17 RoA (2010-2012) Bioacumularea și recuperarea microcomponentelor metalice din șlamul rezultat la solubilizarea alcalină a uraniului din minereu cu ajutorul cianobacteriilor și microalgelor. *Executant.*
12. 10.824.09.114T (2010-2011) Implementarea producerii industriale și utilizării clinice a preparatului inovativ – Ferribior (național). *Executant* 06.411.051F (2006 -2010) Fundamentarea științifică a sintezei orientate a substanțelor bioactive de către microorganisme. Compartimentul: Valorificarea potențialului fiziologo-biochimic al microalgelor și cianobacteriilor în calitate de surse de produse nutraceutice și farmaceutice noi (național). *Executant.*
13. 10.820.08.08/BA (2019-2010) Monitoringul și ameliorarea surselor de materie primă cu conținut valoros de elemente esențiale în baza plantelor acvatice superioare. *Executant.*
14. 09.816.09.03A (2009-2010) Preparate antiaterogene de origine algală. *Executant.*
15. 07.420.54T (2007-2008) Implementarea tehnologiilor de producere a preparatelor

- BioR-crom și BioR-zinc și a utilizării lor pentru reabilitarea pacienților cu afecțiuni de diversă etiologie, participanți la conflicte militare locale și internaționale. *Executant.*
16. 407.471T (2007-2008) Implementarea tehnologiilor de producere și utilizare a preparatelor de origine algală la sporirea spermatogenezei la tauri și vieri. *Director proiect.*
17. 06.411.016A (2006-2010) Elaborarea biotehnologiilor de producere și folosire a preparatelor microbiene pentru agricultură, industria alimentară și medicină, compartimentul: Preparate nutraceutice și farmaceutice noi de origine algală-biosinteza, obținerea și stabilizarea lor. *Executant.*

***Participări la manifestări științifice, unde au fost comunicate și puse în discuție rezultatele la tema tezei de doctor habilitat :***

1. National Conference with International Participation „Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community”, 29-30 Sept., 2022, Chisinau, R. Moldova.
2. National Scientific Symposium with International Participation „Modern biotechnologies – Solutions to the challenges of the contemporary world”, 20-21 May, 2021, Chisinau, R. Moldova.
3. International Congress of Geneticists and Breeders from the Republic of Moldova, eleventh ed., 15-16 June, 2021, Chișinău, R. Moldova.
4. International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering ICNMBE, fifth ed., 3-5 Nov 2021, Chișinău, R. Moldova
5. International Conference „Advances in Modern Phycology”, sixth ed., 15-17 May, 2019, Kyiv, Ukraine.
6. National Conference with International Participation Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community, 21-22 Oct., 2019, Chisinau, R. Moldova
7. International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, fourth ed., 11-12 Oct., 2018, Chișinău, R. Moldova
8. Actes du Colloque Francophone interdisciplinaire, 19-20 Oct., 2018, Chișinău, R. Moldova.
9. European Workshop on the molecular biology of cyanobacteria, tenth ed., 20-24 Aug. 2017, Cluj-Napoca, România.
10. International Simposium EuroAliment, eight ed., 07-08 Sept., 2017, Galați, România
11. International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, dedicated to the 70th anniversary of foundation of first research institutions and 55th anniversary of the inauguration of the Academy of Sciences of Moldova, third ed., 12-13 Oct., 2016, Chișinău, R. Moldova.
12. International Congress of Geneticists and Breeders from the Republic of Moldova, tenth ed., 28 June - 1 July 2015, Chișinău, R. Moldova.
13. International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, second ed., 9-10 oct., 2014. Chișinău, R. Moldova.
14. International Conference „Actual Problems in Modern Phycology”, fifth ed., 3-5 Nov., 2014, Chișinău, R. Moldova.
15. International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering ICNBME-

2013, second ed., 18-20 April, 2013, Chisinau, R. Moldova.

16. International Conference of zoologists „Actual problems of protection and sustainable use of the animal world diversity”, eighteen ed., 10-12 Oct., 2013, Chisinau, R. Moldova.

***Lucrări științifice publicate la tema tezei de doctor habilitat:***

Monografii monoautor - **1**;

Monografii coautor – **1**;

Capitole în monografii -**3**;

Ghid metodic – **1**;

Articole n reviste din bazele de date Web of Science și SCOPUS - **17**;

Articole în reviste din străinătate recunoscute - **2**;

Articole în reviste din Registrul Național al revistelor de profil (categoria B) - **14**;

Articole în lucrările conferințelor științifice internaționale - **4**;

Teze în lucrările conferințelor științifice internaționale, cu participare națională - **24**;

Brevete de invenții - **7**.

***Distincții și aprecieri ale rezultatelor științifice la tema tezei de doctor habilitat :***

1. European Exhibition of Creativity and Innovation EUROINVENT. Iași, România (2023, 2022, 2021, 2013) - *4 Medalii de Aur.*
2. 26<sup>th</sup> International Exhibition of Inventions INVENTICA. Iași, România (2022, 2021, 2013) – *3 Medalii de Aur.*
3. International Exhibition INVENTCOR 2021. Deva, România (2022, 2021) - *2 Medalii de Aur.*
4. Salonul Internațional al Cercetării științifice, Inovării și Inventicii ProInvent. Cluj Napoca, România (2020) - *1 Medalie de aur.*
5. Salonul internațional de invenții, inovații Traian Vuia. Timișoara, România (2021) - *1 Medalie de Aur.*
6. Expoziția Internațională Specializată INFOINVENT. Chișinău, R. Moldova (2021) - *1 Medalie de Aur.*
7. The International Student Innovation and Scientific Research Exhibition Cadet INOVA. Sibiu, România (2020) - *1 Medalie de aur.*
8. Târgul internațional de Invenții și Idei Practice. Chișinău, R. Moldova (2018) - *1 Medalie de aur și Premiul Forumului inventatorilor români.*
9. International Trade Fair, Ideas-Inventions- New Products – IENA. Nuremberg, Germany (2015) – *1 Medalie de Aur.*

***Date de contact :***

CEPOI Liliana,

WoS Researcher ID: J-9640-2019

ORCID ID 0000-0002-7516-948X

Scopus ID: 55246094000

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Universității Tehnice a Moldovei

MD 2028, Chișinău, str. Academiei 1,

Tel.: +373 69250071, e-mail: [liliana.cepoi@imb.utm.md](mailto:liliana.cepoi@imb.utm.md); [lilinacepoi@yahoo.com](mailto:lilinacepoi@yahoo.com); [cepoililiana67@gmail.com](mailto:cepoililiana67@gmail.com)