

**INFLUENȚA UNOR COMPUȘI AI Ge(IV) ASUPRA PRODUCTIVITĂȚII ȘI  
CONȚINUTULUI DE GLICEROL LA MICROALGA  
DUNALIELLA SALINA CNM-AV-02**

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

*Universitatea de Stat din Moldova*

*\*Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM*

*\*\*Universitatea Academiei de Științe a Moldovei*

A fost studiată influența compușilor coordinați ai Ge(IV) și a intensității luminii asupra productivității și conținutului de glicerol în biomasa de dunalielă. A fost stabilit că intensitatea luminii reprezintă un factor decisiv în acumularea biomasei și sinteza glicerolului de către *D. salina* cultivată pe mediul organo-mineral, în prezența compușilor Ge(IV). Dintre compușii Ge(IV) a fost evidențiat GeO<sub>2</sub>, care în concentrația de 20 mg/l a asigurat un spor al productivității de 11,2% și al glicerolului de 33,2% față de martor.

**Cuvinte-cheie:** *Dunaliella salina, mediu organo-mineral, biomasă, productivitate, glicerol, compuși ai Ge(IV), intensitate de iluminare.*

**THE INFLUENCE OF SOME COMPOUNDS OF Ge (IV) ON PRODUCTIVITY AND  
GLYCEROLCONTENT IN MICROALGA DUNALIELLA SALINA CNM-AV-02**

The dunaliella productivity, content of glycerol in the dunaliella biomass at cultivation in the presence of some Ge(IV) compounds at the different light intensity was determined. The light intensity is a decisive factor in the accumulation of biomass and glycerol synthesis by *D. salina* grown on organic-mineral medium in the presence of Ge(IV) compounds. From all Ge(IV) compounds, GeO<sub>2</sub> in the concentration of 20mg/L ensured the increase of productivity and glycerol with 11.2% and 33.2%, respectively, compared to the control samples.

**Keywords:** *Dunaliella salina, organic-mineral medium, biomass, productivity, glycerol, compounds of Ge(IV), light intensity.*

**Introducere**

Beneficiile incontestabile ale microalgei verzi *Dunaliella salina* se datorează atât capacității ei unice de rezistență la acțiunea diversilor factori abiotici, cât și capacității de sinteză și acumulare în biomasă a unui conținut major de glicerol și carotenoizi. Grație acestui fapt, *Dunaliella salina* a devenit una dintre cele mai solicitate obiecte ale cercetărilor biotehnologice. Speciile de *Dunaliella sp* sunt examinate ca potențiali producători de glicerol, care în unele cazuri pot depăși 30% din substanța uscată a celulei, proprietate valoroasă pentru sursele alternative de carburanți în industria energetică [1,3,11,12,17]. Din punct de vedere metodologic, *Dunaliella salina* reprezintă un obiect excepțional de convenabil pentru cercetări fiziologo-biochimice în legătură cu facilitatea distrugerii celulelor lor, obținerea fără dificultate a omogenatelor și extractelor.

Actualmente cercetările sunt orientate spre investigarea de noi stimulatori care ar majora atât productivitatea dunalielii, cât și conținutul de alte substanțe bioactive în biomasă, inclusiv conținutul de glicerol.

Scopul lucrării constă în evaluarea productivității și conținutului de glicerol în biomasa microalgei *D. salina* cultivate în prezența unor compuși ai Ge(IV) la varierea intensității iluminării.

**Material și metode**

Obiect de studiu a servit tulpina microalgei *Dunaliella salina* CNM-AV-02, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM. Cultivarea s-a realizat în retorte Erlenmeyer a câte 250 ml cu 100 ml suspensie de dunalielă, pe mediul nutritiv MD, elaborat anterior în baza lichidului cultural al spirulinei [10]. Temperatura de cultivare testată a fost 27-29°C, în prezența iluminării normale (3500 lx) și intense (5000 lx).

Durata optimă de cultivare a microalgei ce asigură acumularea unei cantități sporite de biomasă a fost stabilită prin cultivarea tulpinii timp de 8-10 zile, cu prelevarea zilnică a probelor și determinarea productivității microagale.

Compușii coordinațivi ai Ge(IV) cifrați FM-35, FM-28 și FM-30, oferiți cu amabilitate de acad. A.Gulea, șeful catedrei Chimie Anorganică și Fizică a USM, au fost introduși în mediul nutritiv în a 2-a zi de cultivare, în concentrație de 5, 10 și 20 mg/l. Probele crescute în lipsa compușilor coordinațivi, cu respectarea celorlalți parametri de cultivare, au fost considerate drept martor. Biomasa algală a fost separată de mediul nutritiv prin centrifugare timp de 5 minute la 5000 rpm.

Productivitatea dunaliei a fost determinată fotocolorimetric cu recalculul masei celulare la biomasa absolut uscată (BAU) [14].

Dozarea cantității de glicerol a fost efectuată prin metoda colorimetrică bazată pe oxidarea acestuia cu  $\text{HIO}_4$  până la formaldehidă, care formează cu acetalcetona un complex, intensitatea culorii căruia este direct proporțională cu cantitatea de glicerol din probe [13].

Cercetările au fost realizate în trei serii de repetări, datele prezentate constituind media aritmetică a determinărilor, veridicitatea conform criteriului Student  $p \leq 0,05$  [15,16].

### Rezultate și discuții

Intensitatea iluminării reprezintă un factor important în acumularea biomasei de dunaliela, cultivată atât în lipsa compușilor Ge(IV) suplimentați, cât și în prezența lor. Astfel, productivitatea probei martor cultivate la iluminare intensă (5000 lx) a fost cu 54,2% mai înaltă decât a martorului cultivat la o iluminare normală (Fig.1). Dintre compușii Ge(IV) testați, compusul anorganic  $\text{GeO}_2$  a sporit cel mai semnificativ productivitatea dunaliei, fiind cu 12,4% mai înaltă la concentrația de 10 mg/l compus la iluminarea normală (3500 lx) și de 11,2% mai înaltă la concentrația de 20 mg/l, dar la iluminare intensă (5000 lx), în comparație cu martorii corespunzători.

Compușii coordinațivi au manifestat acțiune nesemnificativă sau evident inhibitoare asupra productivității dunaliei. Complecșii FM-35 și FM-28, în concentrație de 10 mg/l, au asigurat un spor de doar 5,6% și 6,4% la iluminarea normală de 3500 lx, celelalte concentrații studiate diminuând cantitatea de biomasă în medie cu 9%. În cazul administrării compusului FM-30 productivitatea se menține la nivelul martorului (Fig.1).

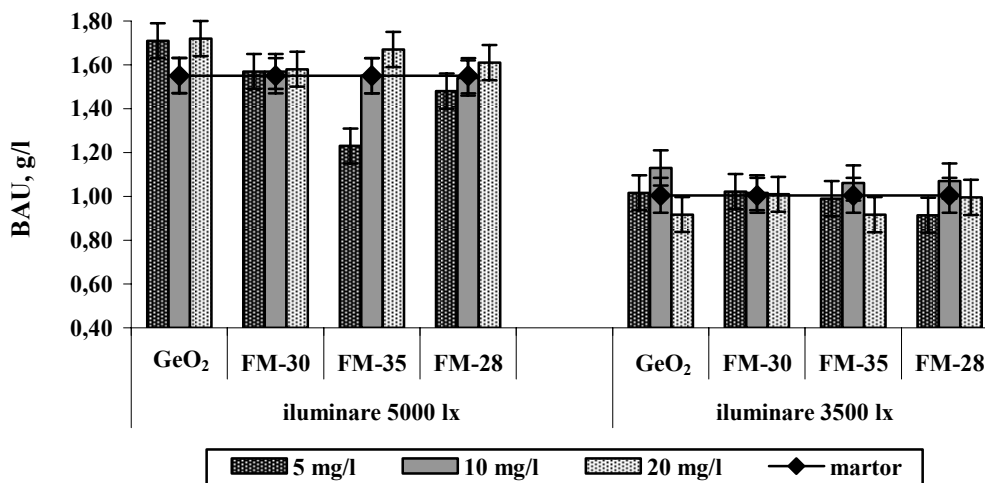


Fig.1. Productivitatea dunaliei cultivate în prezența unor compuși coordinațivi ai Ge(IV) în regim de iluminare 3500 lx și 5000 lx.

Fenomene identice s-au înregistrat și în cazul iluminării intense (5000 lx), la administrarea compusului coordinațiv FM-30 productivitatea având aceleași valori asemeni martorului. Compusul FM-35 în concentrație de 20 mg/l a stimulat productivitatea dunaliei cu 7,7%, concentrațiile mai mici având efect inhibitor. Complexul FM-28 stimulează nesemnificativ productivitatea algală odată cu mărirea concentrației de compus.

Dinamica productivității dunaliei cultivate în condiții de temperatură maximă (27-29°C) și inocul adaptat mediului MD va fi prezentată pe exemplul probei suplimentate cu 10 mg/l FM-28 (Fig.2). Rezultatele obținute au prezentat dispariția completă a Lag-fazei de dezvoltare a culturii. O rată mai înaltă de creștere s-a evidențiat la trecerea din ziua a 5-a la a 6-a de cultivare în regim de iluminare intensă (5000 lx), astfel încât în decurs de 24 ore productivitatea a crescut de la 0,75 g/l la 0,93 g/l (Fig.2). La fel s-a evidențiat și faptul că rata de acumulare a biomasei în cultura iluminată intens (5000 lx) este mai mare decât la cultura iluminată

normal (3500 lx). Astfel, productivitatea dunaliei cultivate timp de 9 zile la iluminarea intensă a crescut de la 0,20 g/l la 1,54 g/l, iar la iluminarea normală (3500 lx) – de la 0,20 g/l la doar 1,07 g/l.

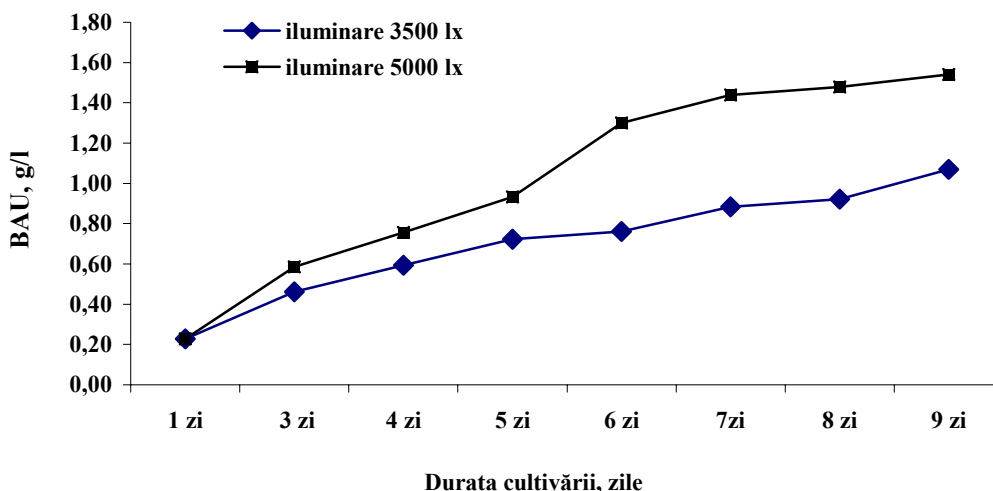


Fig.2. Dinamica productivității dunaliei cultivate pe mediul organo-mineral suplimentat cu FM-28 în concentrație de 10 mg/l.

Iluminarea puternică, alături de concentrațiile sporite de NaCl din mediul ambiant, reprezintă unul dintre factorii esențiali pentru sinteza glicerolului [2,4-9]. Acest fapt a fost demonstrat și de valorile obținute în cazul martorilor, unde conținutul de glicerol a fost cu 10,3% mai înalt la iradierea 5000 lx, comparativ cu iluminarea normală 3500 lx.

Fenomen oarecum identic a fost observat și în cazul compușilor coordinați ai Ge(IV) (Fig.3). Probele-martor supuse iluminării intense 5000 lx au prezentat un conținut mai ridicat de glicerol (cu 5,1%) decât variantele-martor iluminate 3500 lx.

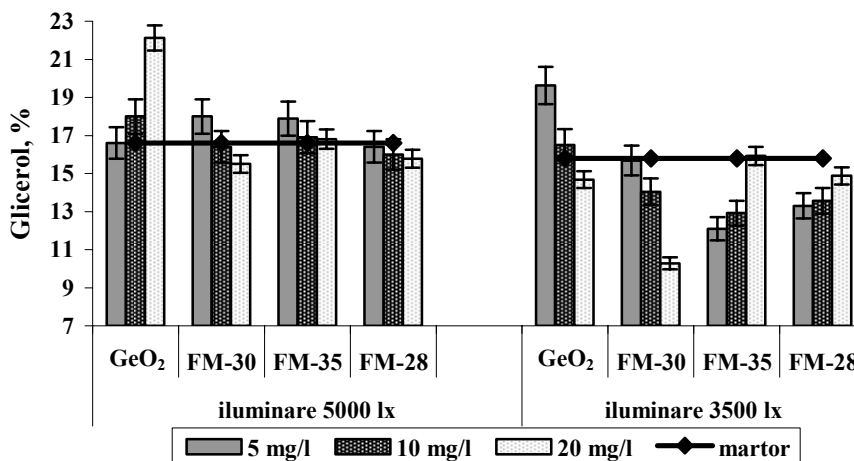


Fig.3. Conținutul de glicerol în biomasa dunaliei cultivate în prezența compușilor coordinați ai Ge(IV).

Cât privește influența compușilor coordinați ai germaniului asupra sintezei glicerolului, a fost evidențiat efectul neutru sau slab stimulator, în prezența unor concentrații de compus, la iluminarea intensă 5000 lx și, cu unele excepții, efectul evident inhibitor al metalocomplexelor germaniului la iluminarea normală 3500 lx.

Astfel, în cazul iluminării intense (5000 lx), odată cu mărirea concentrației de compuși de la 5 mg/l la 20 mg/l conținutul de glicerol în biomasa dunaliei a scăzut treptat. Rezultate diferite au fost evidențiate, însă, în prezența compusului GeO<sub>2</sub>, unde cantitatea de glicerol a sporit odată cu mărirea concentrației administrate în mediul de cultivare și a înregistrat la concentrația maximală de 20 mg/l cele mai sporite valori experimentale: cu

33,2% mai mult decât martorul. Conținut majorat de glicerol – cu 8,4% față de martor – a fost obținut și pentru 10 mg/l GeO<sub>2</sub>. Și compușii FM-30, FM-35 în concentrație de 5 mg/l au stimulat sinteza glicerolului, care a înregistrat valori mai înalte cu 8,4% și 7,7%, respectiv. Celelalte variante experimentale au demonstrat efect neutru sau slab inhibitor. Cel mai înalt grad de inhibiție – cu 6,6% mai puțin decât martorul – a fost observat pentru 20 mg/l compus coordinativ FM-30. Intensitatea mai joasă a iluminării (3500 lx) a prezentat un efect evident inhibitor în prezența compușilor germaniului. Excepție au constituit compusul GeO<sub>2</sub>, care în concentrație de 5 mg/l a stimulat cu 24,2% comparativ cu martorul acumularea glicerolului în biomasa dunaliei, iar în concentrație de 10 mg/l GeO<sub>2</sub> această influență a fost nesemnificativă (de 4,4%), și compușii coordinațivi FM-30 și FM-35, care la 5 mg/l și 20 mg/l, respectiv, au manifestat efect neutru asupra conținutului de glicerol. Cea mai înaltă inhibiție la iluminarea normală a fost observată pentru 20 mg/l FM-30; același compus și aceeași concentrație cu efect inhibitor semnificativ au fost evidențiate la iluminarea intensă. În acest caz, însă, gradul de inhibiție la iluminarea 3500 lx a fost mult mai semnificativ decât la 5000 lx.

Generalizând rezultatele, confirmăm importanța iluminării în procesul de sinteză a glicerolului la microalga verde *D. salina*, cele mai semnificative date fiind obținute la iradierea culturii cu 5000 lx. Dintre compușii Ge(IV) cel mai semnificativ efect stimulator a fost evidențiat pentru compusul GeO<sub>2</sub> în concentrație de 20 mg/l.

### Concluzii

1. Dintre compușii Ge(IV) testați, compusul anorganic GeO<sub>2</sub> a sporit cel mai semnificativ productivitatea dunaliei, fiind cu 12,4% mai înaltă la concentrația de 10 mg/l compus la iluminarea 3500 lx și de 11,2% mai înaltă la concentrația de 20 mg/l, dar la iluminare intensă (5000 lx), în comparație cu martorii corespunzători.
2. Intensitatea luminii reprezintă un factor decisiv în sinteza glicerolului de către *D. salina* cultivată pe mediul organo-mineral, în prezența compușilor Ge(IV). Dintre compușii Ge(IV) a fost evidențiat GeO<sub>2</sub>, care în concentrația de 20 mg/l a asigurat un spor al glicerolului de 33,2% față de martor.

### Bibliografie:

1. AVRON, M., BEN-AMOTZ, A. *Dunaliella: physiology, biochemistry and biotechnology*. Boca Raton: CRC Press, 1992. 240 p. ISBN 978-0849366475
2. BEN-AMOTZ, A., SUSSMAN, I., AVRON, M. Glycerol production by *Dunaliella*. In: *Experientia*, 1982, vol.38, p.49-52.
3. BEN-AMOTZ, A. Industrial production of microalgae cell-mass and secondary products - major industrial species *Dunaliella*. In: A.RICHMOND, ed. *Handbook of microalgal culture*. Oxford: Blakwell, 2004, p.273-280.
4. BIVOL, C. Parametri morfologici și biochimici ai microalgei verzi *Dunaliella salina* la cultivare pe medii minerale și organo-minerale. În: *Studia Universitatis. Seria „Științe ale naturii”*, 2008, nr.2(12), p. 32-35.
5. BIVOL, C. *Particularitățile fiziologo-biochimice și de cultivare ale microalgei verzi Dunaliella salina – sursă valoroasă de substanțe bioactive* / Autoreferat al tezei de doctor în biologie. Chișinău, 2010. 29 p.
6. CHITLARU, E., PICK, U. Regulation of glycerol synthesis in response to osmotic changes in *Dunaliella*. In: *Plant Physiol.*, 1991, vol.96, p.50-60.
7. CRONWRIGHT, G., ROHWER, J., PRIOR, B. Metabolic control analysis of glycerol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Appl. Envir. Microbiol.*, 2002, vol.68, p.4448-4456.
8. FUGGI, A. et al. The role of glycerol in osmoregulation of the acidophilic alga *Dunaliella acidophyla* (*Volvocales, Chlorophyta*). Effect of solute stress on photosynthesis, respiration and glycerol synthesis. In: *Phycologia*, 1988, vol.27, no.4, p.439-446.
9. GOYAL, A. Osmoregulation in *Dunaliella*, Part II: Photosynthesis and starch contribute carbon for glycerol synthesis during a salt stress in *Dunaliella tertiolecta*. In: *Plant Physiol. Biochem.*, 2007, vol.45, Issue, 9, p.705-710.
10. *Procedeu de cultivare a microalgei verzi Dunaliella salina*: brevet MD nr. 3780, Inventatori RUDIC, V., BULIMAGA, V., BIVOL, C. CIB A01G33/00. Publ. 31.12.2008, BOPI nr.12/08.
11. RAJA, R. et al. Exploitation of *Dunaliella* for β-carotene production. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, no.74(3), p.517-523. ISSN 0175-7598
12. RICHMOND, A., HU, Q. *Handbook of microalgal culture. Applied phycology and biotechnology*. Oxford: Blakwell, 2013. 736 p. ISBN 978-0470673898
13. RUDIC, V. *Aspecte noi ale biotehnologiei moderne*. Chișinău: Știința, 1993. 139 p. ISBN 978-5376018293

14. RUDIC, V. ș.a. *Metode de investigație în ficobiotehnologie*. Chișinău: CE USM, 2002. 61 p. ISBN 9975-70-254-6
15. ДОСПЕХОВ, Б. *Методика полевого опыта*. Москва: Агропромиздат, 1985. 351 с.
16. МАКСИМОВ, В. *Многофакторный эксперимент в биологии*. Москва: МГУ, 1980. 278 с.
17. ТРЕНКЕНШУ, Р., ГЕВОРГИЗ, Р., БОРОВКОВ, А. *Основы промышленного культивирования дуналиеллы солоноводной (Dunaliella salina Teod.)*. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2005. 103 с.

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

Prezentat la 03.11.2014