

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

Rezumatul tezei de doctor habilitat în științe biologice

CHIȘINĂU, 2024

Teza a fost elaborată în cadrul laboratorului Ficobiotehnologie al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Universității Tehnice a Moldovei.

Consultant științific:

RUDIC Valeriu doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, academician

Referenți oficiali:

VOLOȘCIUC Leonid doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător, Universitatea de Stat din Moldova

SACARĂ Victoria doctor habilitat în științe biologice, conferențiar universitar, IMSP Institutul Mamei și Copilului

NASTAS Tudor doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător, Universitatea de Stat din Moldova

Componenta Consiliului științific specializat:

DUCA Maria **președinte**, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, academician al AȘM

CHISELIȚA Natalia **secretar științific**, doctor în științe biologice

BURȚEVA Svetlana **membru**, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător

UNGUREANU Laurenția **membru**, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător, membru corespondent al AȘM

ANDRONIC Larisa **membru**, doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător

DIUG Eugen **membru**, doctor habilitat în științe farmaceutice, profesor universitar

GUDUMAC Valentin **membru**, doctor habilitat în științe medicale, profesor universitar

Susținerea va avea loc la **23 februarie 2024**, ora **14.00** în ședința Consiliului științific specializat DH 167.01-23-10 din cadrul Universității Tehnice a Moldovei, adresa: **Chișinău, strada Academiei, 1, sala 352**.

Teza de doctor habilitat și rezumatul pot fi consultate la biblioteca Universității Tehnice a Moldovei și la pagina web a ANACEC (www.anacec.md).

Rezumatul a fost expediat la data de **22 ianuarie 2024**.

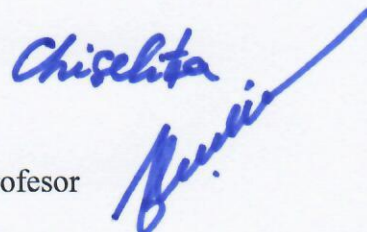
Secretar științific al Consiliului științific specializat:

CHISELIȚA Natalia doctor în științe biologice

Consultant științific:

Rudic Valeriu doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, academician

Autor
CEPOI Liliana



© Cepoi Liliana, 2024

CUPRINS

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII	4
1. STRESUL OXIDATIV LA MICROALGE ȘI CIANOBACTERII	8
2. DESIGNUL EXPERIMENTAL, OBIECTELE DE STUDIU ȘI METODELE DE CERCETARE	9
3. DINAMICA MODIFICĂRILOR ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A BIOMASEI CULTURILOR FICOLOGICE PE DURATA CICLULUI DE CREȘTERE ÎN CONDIȚII OPTIME	10
3.1. Ciclurile de creștere a culturilor ficologice în condiții optime ale sistemelor închise	11
3.2. - Activitatea antioxidantă a biomasei ficologice pe durata ciclului vital	12
3.5	
4. STRESUL TEHNOLOGIC LA CIANOBACTERIILE ȘI MICROALGELE DE INTERES INDUSTRIAL	13
4.1.- Influența stresului termic și de lumină asupra tulpinii tehnologice <i>Arthrospira</i>	
4.2 <i>platensis</i> CNMN-CB-11	14
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	17
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	18
5. STRESUL OXIDATIV ÎN NANOBIOTEHNOLOGIA CIANOBACTERIILOR ȘI MICROALGELOR	19
5.1 Stresul oxidativ la cianobacterii și microalge în procesul de bionanosinteză	19
5.2. Stresul oxidativ provocat de diferite nanoparticule la microalge și cianobacterii ..	21
5.3. Stresul oxidativ pe durata biofuncționalizării nanoparticulelor de aur și argint de către microalge și cianobacterii	24
6. STRESUL OXIDATIV ÎN PROCESELE DE BIOREMEDIERE A APELOR CONTAMINATE CU METALE	25
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 ...	26
6.2. Particularitățile răspunsului cianobacteriei <i>Nostoc linckia</i> și acumularea de metale grele din sistemele multimetalice, în cicluri iterative	29
6.3 Capacitatea de bioacumulare a metalelor grele și pământurilor rare de către <i>Arthrospira platensis</i>	30
7. MANAGEMENTUL STRESULUI OXIDATIV ÎN CADRUL TEHNOLOGIILOR DE CULTIVARE A OBIECTELOR FICOLOGICE DE INTERES INDUSTRIAL. GENERALITĂȚI, MECANISME, APLICAȚII	32
7.1. Mecanisme comune de instalare a stresului oxidativ de diferită etiologie	32
7.2. Identificarea și caracterizarea stării de stres în baza intensității proceselor oxidative	39
7.3. Aplicații ale stresului oxidativ în ficobiotehnologie	42
CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI	42
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	46
LISTA PUBLICAȚIILOR LA TEMA TEZEI	48
ADNOTĂRI	54
LISTA ABREVIERILOR	57

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța cercetărilor. Datorită diversității, capacității de adaptare, componenței prețioase a biomasei, microalgele și cianobacteriile sunt obiecte atractive pentru diverse aplicații [9, 18]. 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 [16]. 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 [4, 11, 17, 26, 28, 29]. Unele dintre acestea, de exemplu, *Arthrospira platensis*, cunoscută ca *spirulina*, sunt evaluate ca alimente complete din punct de vedere nutrițional.

Biomasa microalgelor și cianobacteriilor este o materie primă potrivită pentru obținerea diferitor produse alimentare și farmaceutice [15, 23, 27]. 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 mult mai înaltă ca cele tradiționale [3, 14, 24]. Aplicarea acestor instrumente, orientată 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) [5, 22]. 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, realizarea apoptozei ș.a [25]. Sistemele antioxidante ale celulelor sunt adaptate la un anumit nivel de concentrație al SRO, pe care le elimină eficient, iar în condiții fiziologice normale asigură echilibrul redox al sistemelor vii [20, 21]. În cazul stresului oxidativ se produce un dezechilibru dintre radicalii liberi și antioxidanții din 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 a compușilor organici [10, 12, 30]. Cunoașterea potențialelor pericole și managementul lor eficient este o condiție a siguranței biotehnologiilor aplicate și a produselor ficologice obținute.

Pe de altă parte, cianobacteriile și microalgele posedă o capacitate înaltă de a percepe SRO și de a iniția rapid apărarea antioxidantă, care în condițiile unui mediu labil este crucială pentru

supraviețuire. Mecanismele intrinseci 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 ficologice, astfel ca această biomasă să fie sigură pentru consumul uman și animal în termeni de prezență a produselor degradării oxidative a macromoleculelor.

Contactul cianobacteriilor și microalgelor cu xenobioticele este asociat cu instalarea unei stări de stres oxidativ de diferită intensitate. Reacțiile de răspuns la stres, inițiate de aceste organisme sunt orientate spre reducerea toxicității substanțelor străine prin diferite tactici cum ar fi transformarea ionilor agresivi în forme zerovalente (de exemplu prin biosinteza nanoparticulelor), 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 [1, 6, 19]. Cunoașterea mecanismelor de derulare a reacțiilor de răspuns la stresul oxidativ poate sta la baza utilizării obiectelor ficologice în scop de nanobiosinteză ori de bioremediere a mediilor poluate, la fel și pentru obținerea de biomasă ficologică valoroasă și sigură, precum și a diferitor preparate în baza acestei biomase.

Scopul lucrării a constat în 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 componență prognozată;
- Estimarea implicării stresului oxidativ în procesele de bioremediere de către culturile vii de 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 tehnologiilor, bazate pe aplicarea răspunsului obiectelor ficologice la stresul oxidativ indus.

Ipoteza de cercetare. Răspunsul culturilor ficologice la stresul oxidativ indus poate fi un instrument eficient pentru obținerea biomasei prețioase cu conținut dirijat, pentru biosinteza și

biofuncționalizarea nanoparticulelor de aur, argint și seleniu și pentru bioremedierea mediului poluat. Aplicarea acestui instrument este condiționată de intensitatea proceselor de protecție antioxidantă 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 reprezentanții celor două domene ale lumii vii. Tulpinile selectate posedă valoare biotehnologică; manifestă flexibilitate în cadrul fluxurilor tehnologice; sunt introduse în producere la nivel local/zonal, ceea ce asigură transferul rapid al elaborărilor 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 și 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 α/β -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, ceea ce a condus la elaborarea procedeelelor 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 reperele 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 (13 procedee) și biofuncționalizarea 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); 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); 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, ediția a 11-a, 2021 (Chișinău, Moldova); Conferința internațională în Biotehnologia Microbiană, 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 monografii 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, din ele în 11 - primul autor; 2 articole în reviste recunoscute de 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.

1. STRESUL OXIDATIV LA MICROALGE ȘI CIANOBACTERII

Tema stresului oxidativ și a răspunsului la acest fenomen este una din problemele de ordin general atât pentru științele biologice, cât 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 principalele surse de formare a speciilor reactive ale oxigenului la cianobacterii și microalge - două procese vitale de bază – respirația și fotosinteza, la care se adaugă influența factorilor fizici, chimici și biologici, care acționează asupra culturilor ficologice.

Accelerarea proceselor vitale prin aplicarea diferitor procedee de stimulare duce 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. Atât procesele de stimulare a proceselor biosintetice la microalge și cianobacterii, cât și condițiile de stres oxidativ generează modificări semnificative ale calității biomasei ficologice. 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.

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. Designul general a inclus 6 etape principale, structurate conform schemei din figura 1.

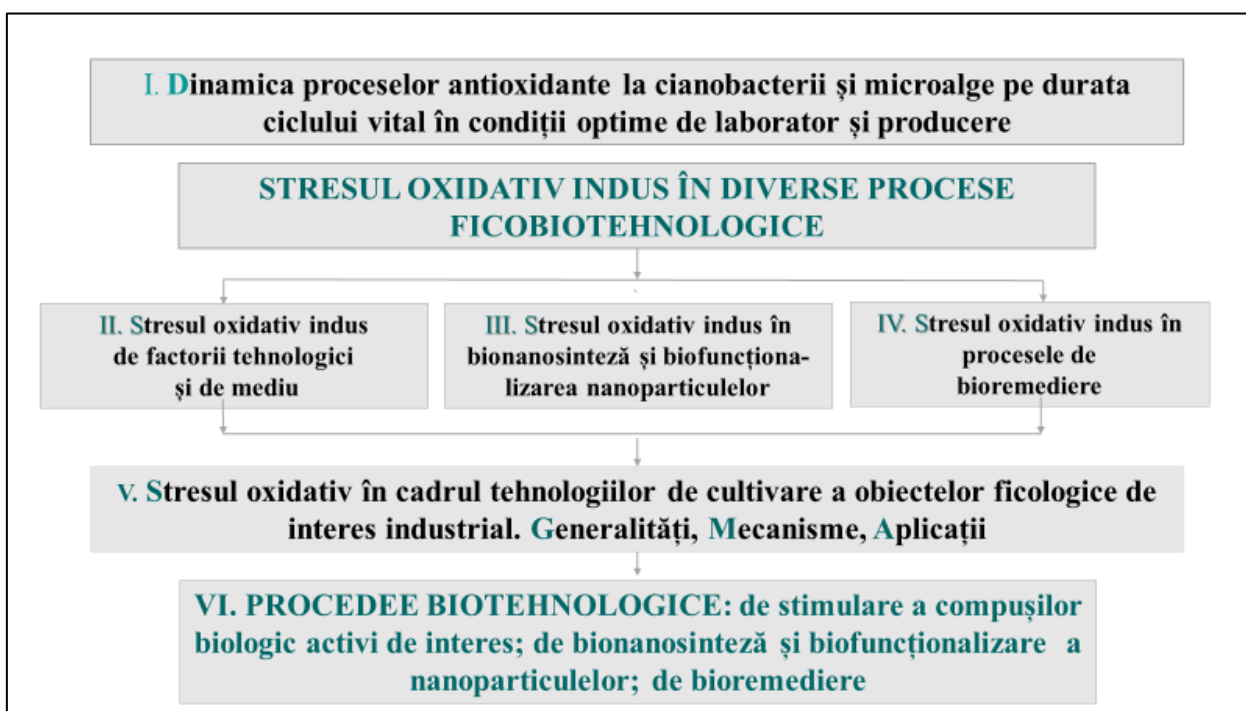


Fig. 1. Designul general al studiului realizat

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.

În calitate de obiecte 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). 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 a cercetărilor fundamentale: metoda de determinare a cantității de biomasă, metodele de determinare cantitativă a componentelor biomasei: proteine, ficobiliproteine, carbohidrați, lipide, pigmenți fotosintetici, fenoli; metode de determinare a activității antioxidante; metoda de determinare a dialdehidei malonice, metode de determinare a activității enzimelor antioxidante, microscopia electronică de scanare și de transmisie, analiza de activare cu neutroni, metoda de determinare a nivelului de expresie relativă a genelor asociate cu stresul, metode de analiză statistică a datelor experimentale.

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 microorganisme, fiind prezente toate fazele de creștere. Fiecare dintre fazele ciclului se caracterizează prin particularități distinse și prezintă diverse posibilități de a interveni în scopul obținerii efectelor dorite în cadrul tehnologiilor de cultivare. Pentru elaborarea 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. De obicei, parametrul studiat pe durata ciclurilor de creștere este cantitatea de biomasă [2, 13, 31]. În același timp, pe durata cultivării

culturilor ficologice se modifică și alți parametri biochimici. De exemplu, dacă cantitatea de proteine totale în biomasă este un parametru relativ constant, atunci cantitatea de lipide și glucide, precum și cantitatea dar și raportul pigmentilor variază semnificativ în dependență de faza de dezvoltare. De asemenea pe durata ciclului de creștere se modifică semnificativ și activitatea antioxidantă. La această etapă a studiului au fost identificate fluctuațiile 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. Unele dintre rezultatele monitorizării parametrilor de creștere și calitate pe durata ciclurilor de creștere a culturilor studiate sunt prezentate mai jos.

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

Pentru toate culturile ficologice studiate se observă un ciclu clasic de acumulare a biomasei, cu prezența vizibilă a fazelor specifice de creștere. În Figura 2. este prezentată acumularea de biomasă în cazul a patru culturi ficologice studiate.

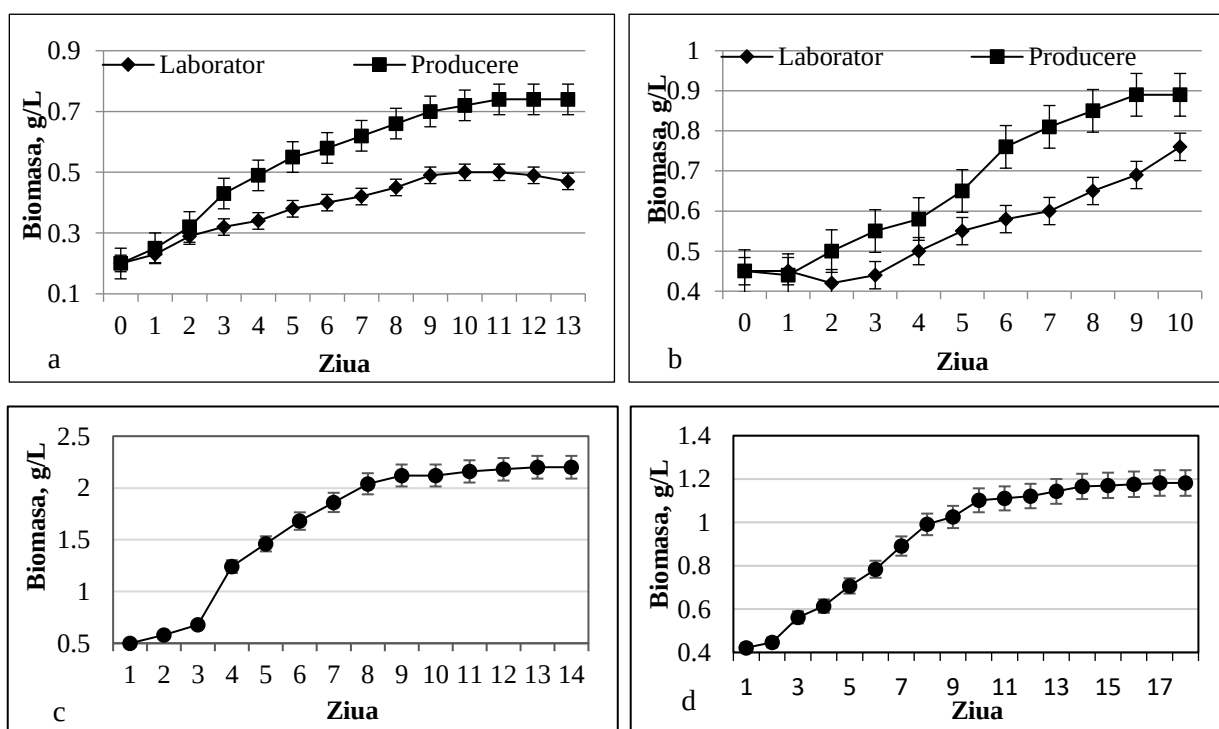


Fig. 2. Curbele de creștere a culturilor ficologice în sistem închis, în condiții optime: (a) – *Nostoc linckia* CNMN-CB-03; (b) – *Arthrospira platensis* CNMN-CB-02; (c) – *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01; (d) – *Haematococcus pluvialis* CNMN-AV-05

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. Pentru culturile ficologice care se caracterizează printr-o

rată de creștere mult mai redusă comparativ cu alte culturi microbiene, ciclul poate dura de la 10 la 30 de zile și chiar mai mult, în dependență de particularitățile culturii și condițiilor aplicate. Pentru culturile cianobacteriene au fost identificate diferențe în ciclurile specifice condițiilor de laborator și a celor de producere.

3.2-3.5. Activitatea antioxidantă a biomasei ficologice pe durata ciclului vital

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. În figura 3 sunt prezentate drept exemplu rezultatele obținute la determinarea activității antioxidante și cantității dialdehidei malonice în biomasa de nostoc crescut în laborator în condiții optime. Rezultatele obținute indică asupra unei activități antioxidante înalte, determinată de diferite componente ale biomasei, astfel, că diferite metode aplicate (care au la bază evidențierea diferitor grupuri de compuși) au livrat valori diferite ale activității.

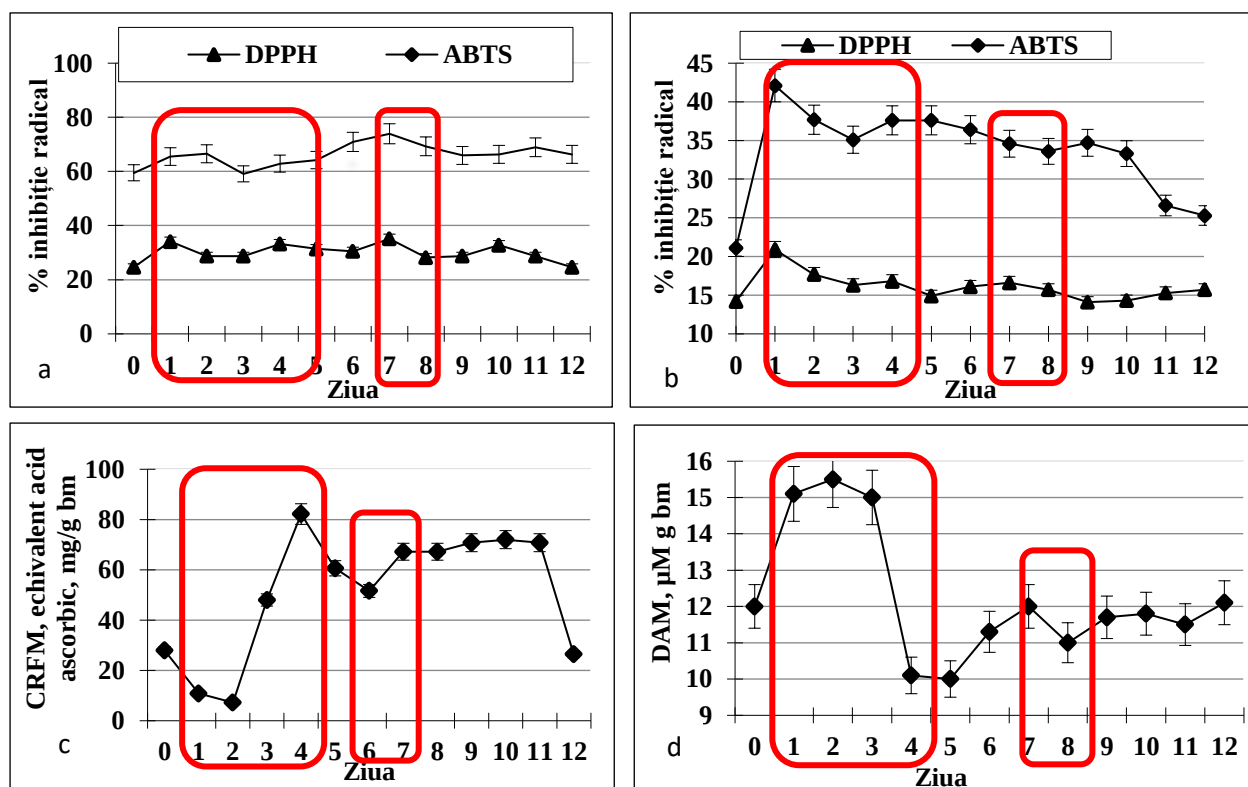


Fig. 3. Activitatea antioxidantă și cantitatea dialdehidei malonice în biomasa de nostoc pe durata unui ciclu de creștere în condiții de laborator: (a) – teste ABTS și DPPH componente hidrosolubile; (b) teste ABTS și DPPH componente liposolubile; (c) – test CRFM componente liposolubile; (d) – test TBARS biomasă

În același timp, în cazul tuturor metodelor aplicate se evidențiază salturi valorice în anumite faze ale ciclului de creștere a culturii. Cele mai evidente fluctuații se produc în faza de latență și la începutul fazei de creștere exponențială. De asemenea, se evidențiază și finalul fazei de creștere exponențială. Tot în aceste intervale de timp valorile testului TBARS sunt informative. În faza de latență și în prima zi a fazei de creștere exponențială valorile testului sunt cele mai înalte, indicând o stare de stres în cultura care se adaptează la condițiile unui nou ciclu. Aceleași faze sensibile – faza lag și a doua parte a fazei creșterii exponențiale – au fost evidențiate și la spirulină (figura 4).

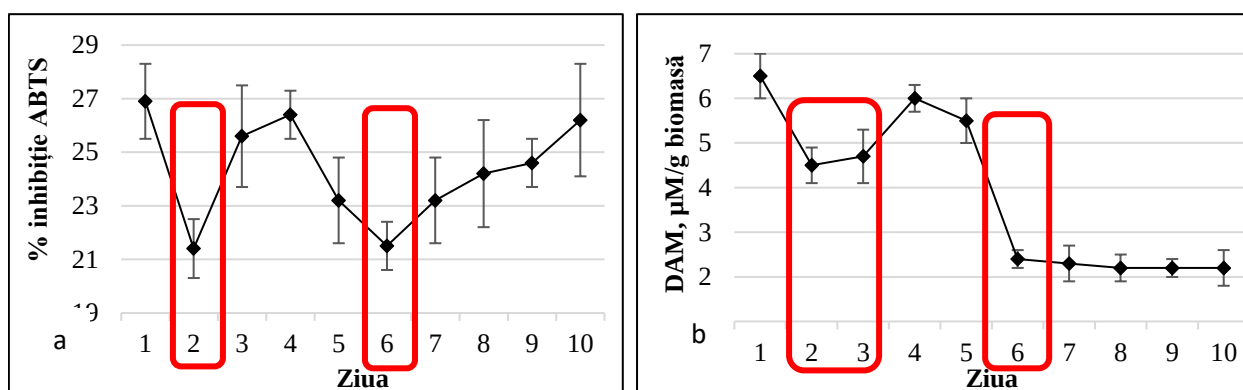


Fig.4. Activitatea antioxidantă și cantitatea dialdehidei malonice în biomasa de spirulină pe durata unui ciclu de creștere în condiții de laborator: (a) – ABTS componente hidrosolubile; (b) testul TBARS biomasă

Astfel, faza de latență la toate speciile studiate se evidențiază prin capacitate joasă de protecție antioxidantă. 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 manipularilor în scop de dirijare a proceselor biosintetice în culturile ficologice și de obținere a biomasei valoroase, și sigure pentru consum.

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. Cercetările au fost realizate conform schemei reprezentate în figura 5.

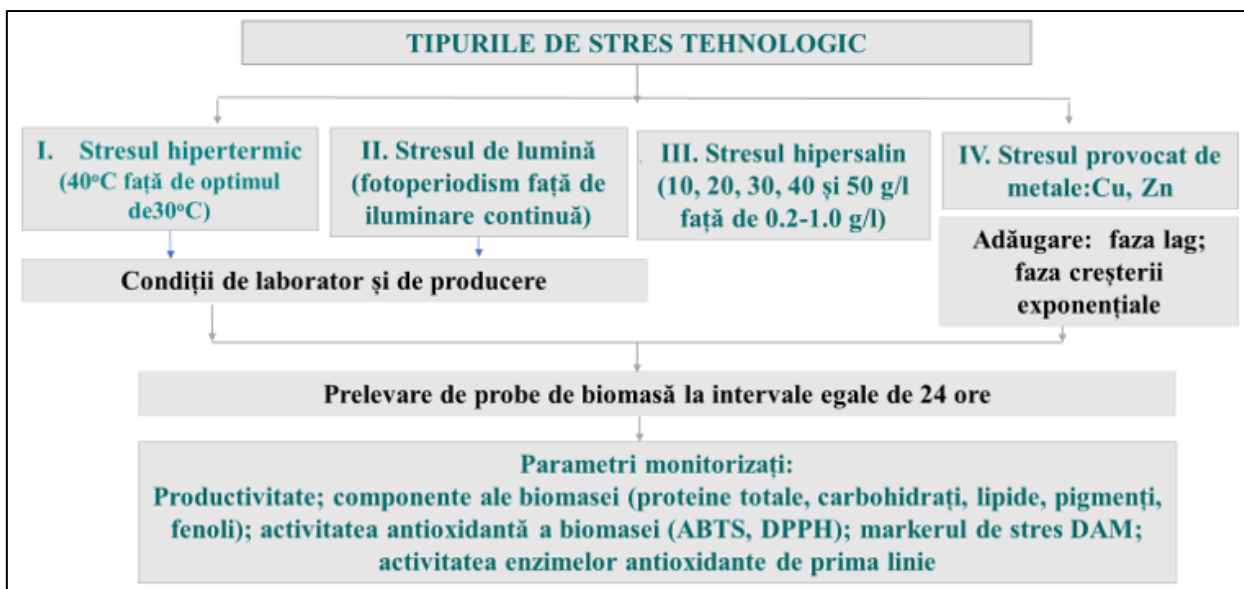


Fig. 5. Designul studiului efectelor stresului tehnologic asupra culturilor ficologice

Influența stresului hipertermic și de lumină asupra culturii de spirulină a fost studiată în condiții de laborator și de producere. Stresul salin a fost indus în condiții de laborator pentru culturile de spirulină și nostoc. Acest tip de stres a fost modelat în mai multe variante de intensitate, în dependență de concentrația de clorură de sodiu. Stresul metallic a fost indus prin prezența cuprului și zincului în componența sărurilor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ și $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, care au fost adăugate la mediile pentru cultivarea spirulinei, nostocului și porfiridiumului. În cazul stresului provocat de cupru, sarea a fost adăugată în două variante: în faza de latență și în faza creșterii exponențiale. Parametrii monitorizați sunt prezentați în figura 5.

4.1. - 4.2. Influența stresului termic și de lumină asupra tulpinii tehnologice *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11

În aceste subcapitole este prezentat efectul stresului termic și al fotoperiodismului asupra spirulinei în condiții de laborator și de producere industrială. Activitatea antioxidantă a biomasei de spirulină și cantitatea de dialdehidă malonică în condiții de stres de temperatură sunt prezentate în figura 6. Din rezultatele prezentate este evident, 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%.

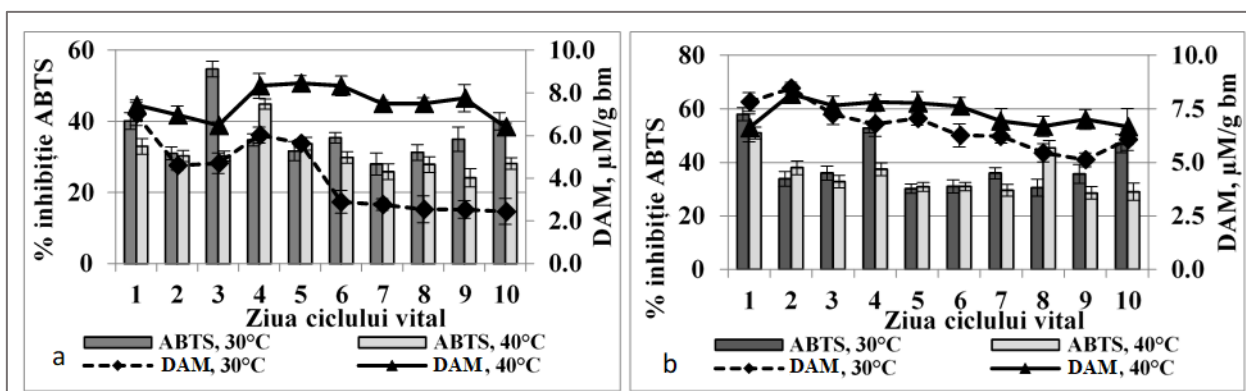


Fig. 6. Activitatea antioxidantă și cantitatea de dialdehidă malonică în biomasa de *Arthrospira platensis* în condiții de stres termic pe durata ciclului vital: (a) - condiții de laborator; (b) – condiții industriale

Valorile testului ABTS în extractele din biomasa crescută la temperatura optimă de 30°C în condiții de laborator variază pe durata ciclului vital în limitele de 28,0 și 54,7% inhibiție, iar în condiții de producere – între 31,0 și 58,0% (figura 6). Putem evidenția începutul fazei de creștere exponențială, când se înregistrează o scădere proporțională 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.

Figura 7 reflectă rezultatele obținute la aplicarea stresului de lumină în condiții de laborator și de producere. Aplicarea regimului de iluminare periodică a spirulinei în condiții de laborator s-a asociat cu o creștere foarte pronunțată a DAM.

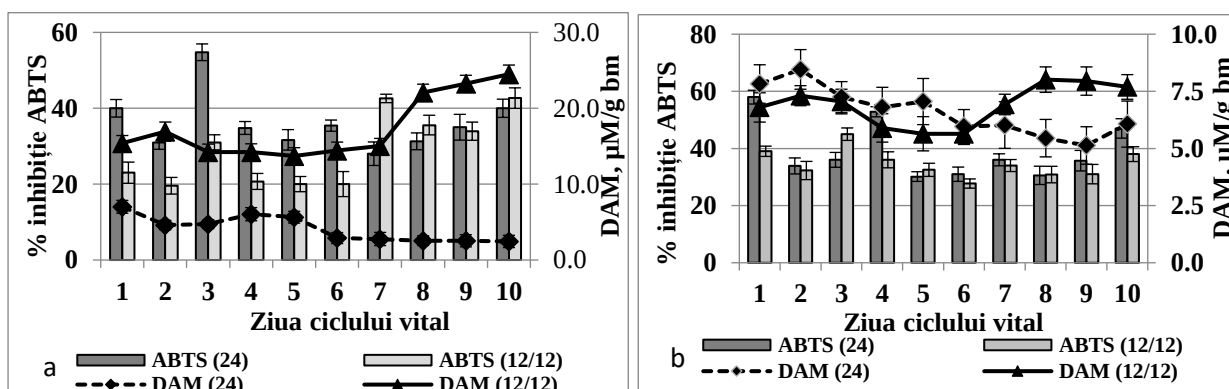
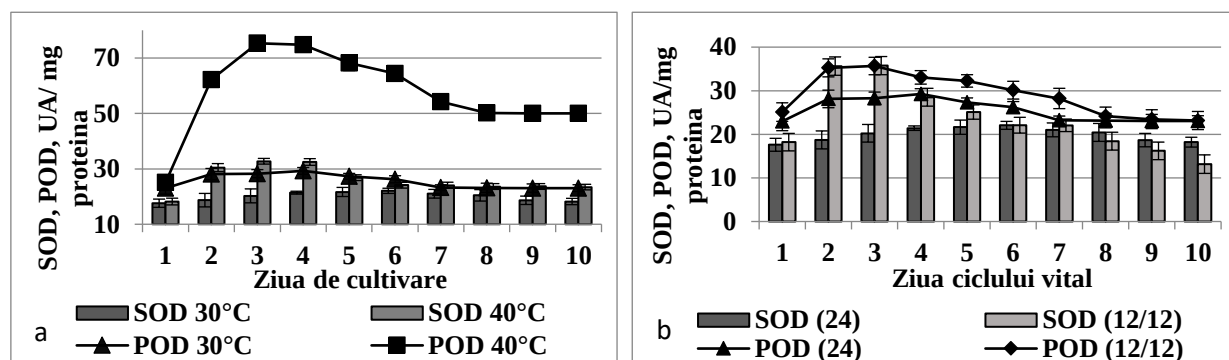


Fig. 7. Activitatea antioxidantă și cantitatea de dialdehidă malonică în biomasa de *Arthrospira platensis* în condiții de stres de iluminare pe durata ciclului vital: (a)- condiții de laborator; (b) - condiții de producere, ((24) - iluminare continuă; (12/12) - iluminare periodică 12 ore lumină:12 ore întuneric)

Astfel, pe durata ciclului vital în condiții de iluminare periodică nivelul DAM în spirulină crește progresiv comparativ cu condițiile de iluminare continuă, diferența fiind de 2,2 ori la începutul ciclului și de 10 ori la final. În condiții de producere fotoperiodicitatea provoacă creșterea cantității DAM cu cel mult 55,0% față de valorile respective obținute pentru condițiile de iluminare continuă ($p < 0.001$). 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 condițiile de iluminare continuă, iar în zilele următoare (cu excepția zilei a 7-a) valorile activității antioxidante în ambele variante de iluminare sunt foarte apropiate. 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.

Activitatea enzimelor antioxidante în condiții de stres termic și fotoperiodicitate la creșterea spirulinei în condiții de laborator sunt prezentate în figura 8.



În condiții de temperatură optimă 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 este 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, la începutul fazei de creștere exponențială activitatea POD fiind de 2,2 ori mai mare. 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).

Cu toate că în condiții de fotoperiodism unii parametri tehnologici se caracterizează prin valori atractive (crește cantitatea de biomasă acumulată, cantitatea de ficobiliproteine și de 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 *A. platensis* și *N. 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.

În studiul realizat au fost testate 5 concentrații de NaCl (10, 20, 30, 40 și 50 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. Rezultatele sunt prezentate în figura 9.

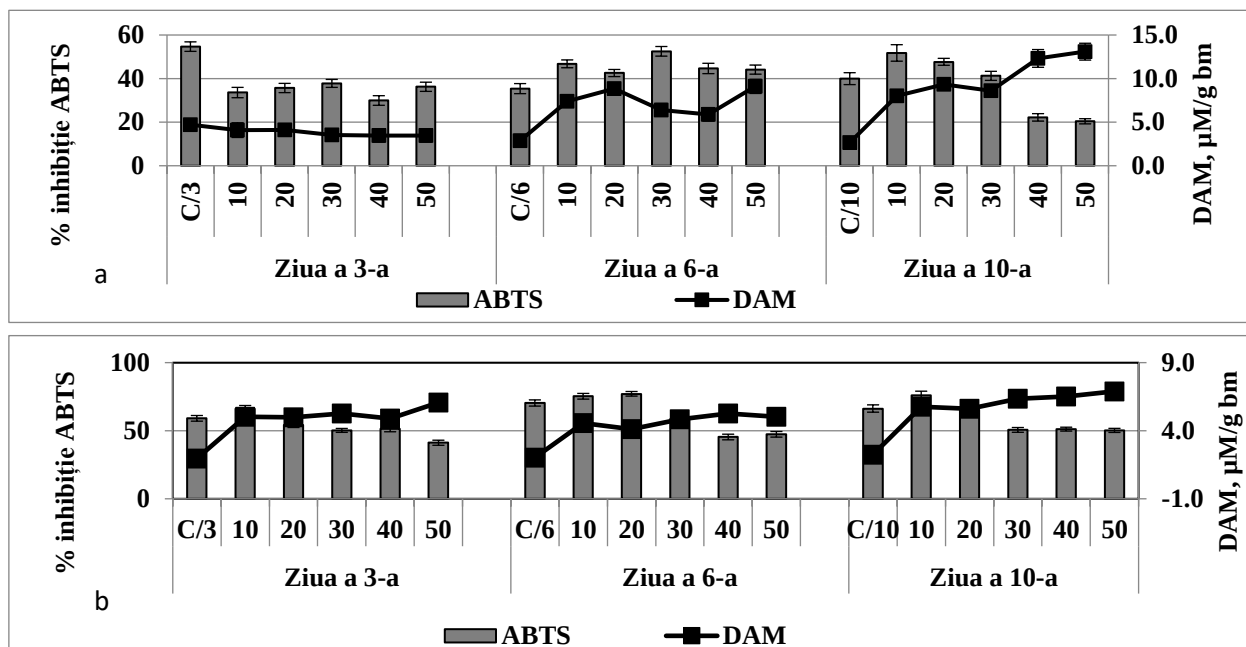


Fig. 9. Activitatea antioxidantă și cantitatea de dialdehidă malonică în biomasă cianobacteriilor la diferite concentrații de NaCl în mediu. (C/3, C/6, și C/10 - controlul la ziua a 3-a, a 6-a și a 10-a); 10, 20, 30, 40, 50 - concentrația de NaCl, g/l: (a) - *Arthrospira platensis*; (b) - *Nostoc linckia*

Rezultatele obținute 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. La *Nostoc* stresul provocat de nivelul

crescut al clorurii de sodiu este mai pronunțat, concluzie susținută de creșterea nivelului DAM și descreșterea activității antioxidante în biomasă.

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

Au fost analizate 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. Contactul culturilor ficologice cu cuprul s-a produs în două variante: în faza lag și în faza creșterii exponențiale. În figura 10 sunt prezentate unele dintre rezultatele obținute în cazul culturii de *Porphyridium cruentum*.

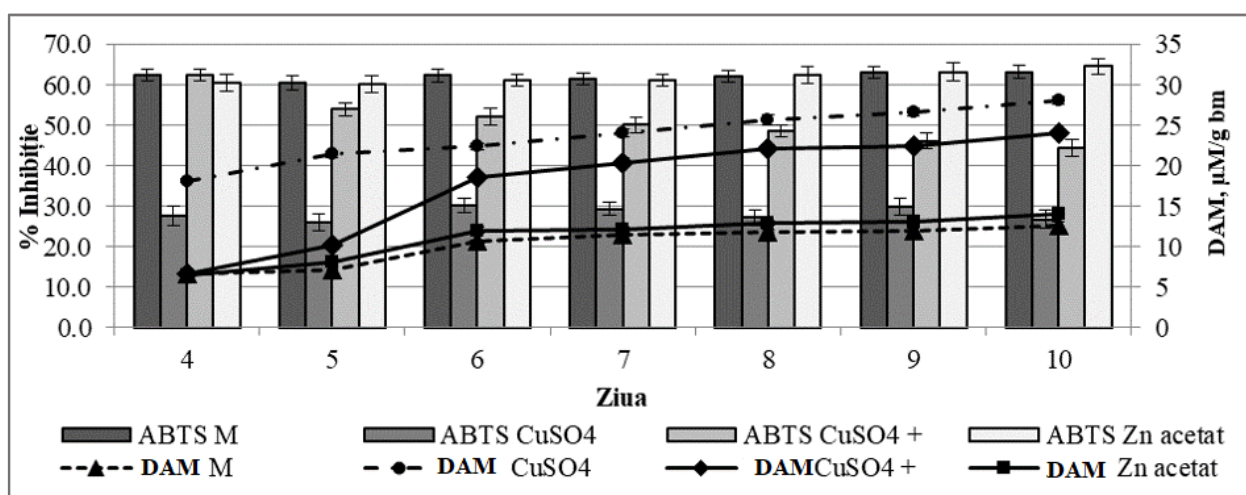


Fig. 10. Activitatea antioxidantă și conținutul de dialdehidă malonică în biomasă de *Porphyridium cruentum* în prezența cuprului și zincului: ((C) - control; (CuSO₄) - 5 mg/l CuSO₄ adăugat la prima zi; (CuSO₄+) - 5 mg/l CuSO₄ adăugat la ziua a 3-a; (Zn acetat) - 5 mg/l ZnC₄H₁₀O₆ adăugat la prima zi

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 biomasă 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 în cazul 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. Acetatul de zinc în concentrația de 5 mg/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.

Cele patru tipuri diferite de stres tehnologic au produs 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 DAM.

5. STRESUL OXIDATIV ÎN NANOBIOTEHNOLOGIA CIANOBACTERIILOR ȘI MICROALGELOR

Cercetările descrise în acest capitol 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). De asemenea, procesele de biosinteză și biofuncționalizare au fost monitorizate prin identificarea directă și indirectă a nanoparticulelor sintetizate/biofuncționalizate (figura 11).

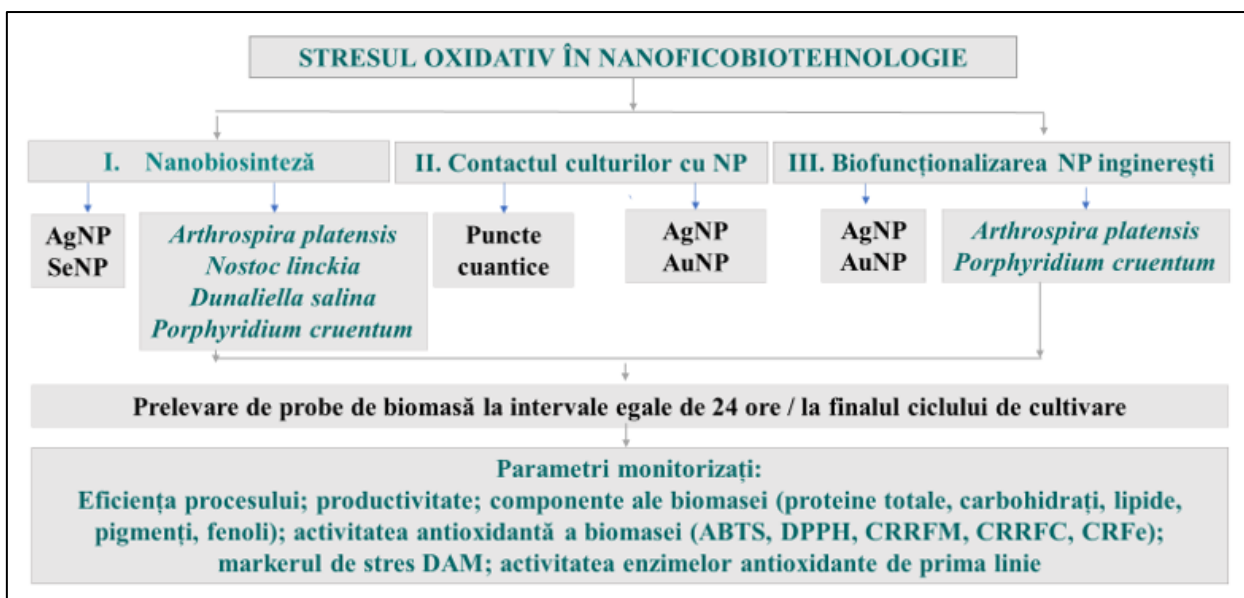


Fig. 11. Designul studiului efectelor stresului oxidativ în nanoficobiotehnologie

5.1. Stresul oxidativ la cianobacterii și microalge în procesul de bionanosinteză

Metoda biologică de sinteză a nanoparticulelor are multiple priorități, cea mai importantă fiind caracterul prietenos mediului. În scopuri de bionanosinteză sunt utilizate diverse organisme

vii, celule și derivate celulare, printre care și microorganismele fotosintetizatoare. 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. Scopul cercetărilor prezentate în acest subcapitol a fost de a evidenția posibilitatea de a realiza biosinteza nanoparticulelor de argint și seleniu în celulele vii de microalge și cianobacterii și în condițiile păstrării calității și valorii biologice a biomasei acestor culturi. O asemenea abordare este prețioasă atunci, când se aplică o viziune integrată de utilizare a nanomaterialelor. Aceasta se referă în special la domeniul de teranostică, când proprietățile nanoparticulelor obținute prin biosinteză și a matricei biologice în care acestea sunt incluse să fie valorificate pentru diagnosticare și tratament într-o singură procedură. Cercetările realizate au permis de a demonstra posibilitatea de obținere a nanoparticulelor pornind de la forme chimice diferite ale elementelor de interes. În același timp s-a urmărit păstrarea unui echilibru între nanobiosinteză și calitatea biomasei. În calitate de exemplu, în continuare sunt prezentate câteva dintre rezultatele obținute. Figura 12 reflectă modificările produse în biomasa de *Porphyridium* pe durata biosintezei nanoparticulelor de argint pornind de la soluția de nitrat de argint.

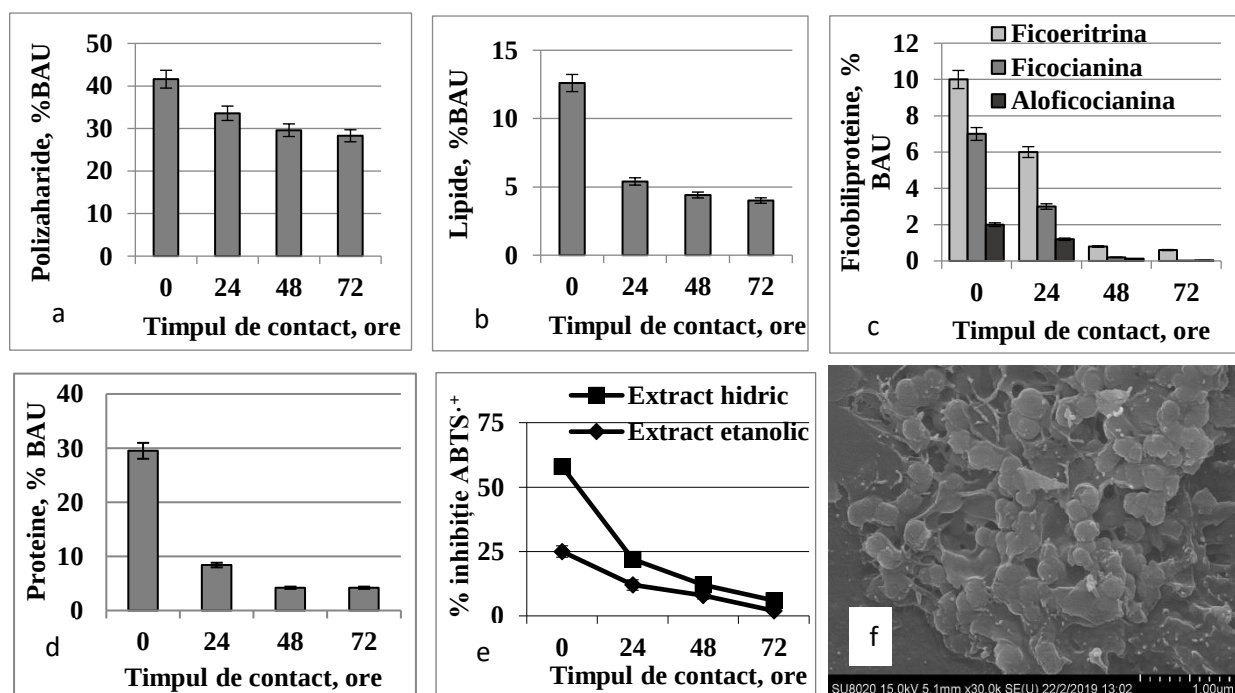


Fig. 12. Modificarea pe durata nanobiosintezei a conținutului unor componente în biomasa de *Porphyridium cruentum* (a-d); a activității antioxidante (e); imagine MES a biomasei (f)

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. În același timp, microalga *Porphyridium cruentum* poate fi 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 în special în condițiile unui contact cu ioni de argint cu durată de 24 ore.

Același principiu a fost identificat în cazul biosintezei nanoparticulelor de argint de către culturile vii de *Arthrospira platensis*, *Nostoc linckia* și *Dunaliella salina*, dar și a biosintezei nanoparticulelor de seleniu pornind de la soluția de selenit de cobalt de către culturile de *Arthrospira platensis* și *Nostoc linckia*. Fenomenul de biosinteză a nanoparticulelor de către culturile ficologice vii 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 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

În cadrul acestui compartiment al lucrării 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 obținute și în activitatea antioxidantă a acesteia. În studiu au fost luate nanoparticule cu o utilizare practică extinsă – nanoparticulele luminescente (puncte cuantice CdSe, ZnSe și ZnS) utilizate în multiple arii ingineresti și nanoparticulele metalelor nobile (Au și Ag), utilizate în diferite industrii și medicină.

Punctele cuantice CdSe cu dimensiunea de 3-5 nm au fost obținute prin metoda sintezei în solvent cu punct de fierbere ridicat; particulele de ZnSe cu dimensiunea de 40 nm și ZnS cu dimensiunea de 30-35 nm au fost obținute prin metoda hidrotermală de cercetătorii din cadrul Institutului de Inginerie și Nanotehnologii D. Ghițu. Nanoparticulele au fost suplimentate la mediile de cultură ale spirulinei și porfiridiumului în trei serii de experiențe cu aplicarea diferitor

concentrații de nanoparticule de la 0.01 la 10 mg/l. Această serie de experiențe au fost realizată pe *Arthrospira platensis* CNMN-CB-02 și *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01.

În cadrul cercetărilor efectuate a fost stabilit că toxicitatea celor 3 tipuri de particule pentru cultura de spirulină și porfiridium descrește în șirul ZnSe>CdSe>ZnS. Activitatea antioxidantă a componentelor hidrosolubile ale biomasei ficologice 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 ($r = -0,61 \dots -0,90$) între cantitatea de biomasă acumulată și produsele peroxidării (dialdehida malonică) în diapazonul de concentrații, în care nanoparticulele manifestă un efect toxic (tabelul 1). Aceste corelații puternice evidențiază 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, iar rezultatele prezentate susțin ideea posibilității utilizării ei pentru testele de toxicitate a xenobioticelor.

Tabelul 1. Coeficienții de corelație semnificativi între cantitatea de biomasă de spirulină și porfiridium și conținutul dialdehidei malonice în biomasă la acțiunea punctelor cuantice

Tipul de NP/Domeniul de concentrații	<i>Arthrospira platensis</i>		
	CdSe 0,1-4,0 mg/l	CdSe 0,01-0,1 mg/l	ZnSe 0,01-0,1 mg/l
Coeficienții de corelație între cantitățile de DAM și biomasă	-0,9054 ($p < 0,001$)	-0,8211 ($p < 0,01$)	-0,8980 ($p < 0,001$)
Tipul de NP/Domeniul de concentrații	<i>Porphyridium cruentum</i>		
	CdSe 1,0-12,0 mg/l	ZnS 1,0-8,0 mg/l	ZnSe 0,01-0,06 mg/l
Coeficienții de corelație între cantitățile de DAM și biomasă	-0,7837 ($p < 0,01$)	-0,8563 ($p < 0,01$)	-0,6087 ($p < 0,05$)

Un alt obiectiv al studiului realizat a constat în stabilirea capacității 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 lor în sistem închis. Nanoparticulele de argint și aur în polietilenglicol în intervalul de concentrație de 0,025–0,5 μM 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 μM , iar la concentrație de 0,5 μM a fost înregistrată o diminuare a acestui parametru. Au fost observate unele modificări legate de mecanismul fotosintetic. Valoarea raportului clorofilă α/β -caroten a servit drept indicator al stresului. Valorile obținute în această cercetare pentru raportul clorofilă/caroten sunt date în tabelul 2. Pentru AgNP la concentrații de 0,025–0,25 μM 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 μM 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.

Tabelul 2. Efectul nanoparticulelor asupra ratei clorofilă α/β -caroten la spirulină

Tipul de nanoparticule	Rata Clorofilă α/β -caroten					
	Concentrația nanoparticulelor, μM					
	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

Concentrația AgNP și AuNP de 0,5 μM 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 α/β -caroten. Menținerea nivelului ridicat de productivitate la această concentrație a fost asigurată de un nivel adecvat al activității antioxidante a biomasei.

Expunerea culturii de *Porphyridium cruentum* la acțiunea AgNP cu dimensiunea de 10 și 20 nm în limita de concentrații între 0,01 și 0,1 μM s-a soldat cu o diminuare a conținutului de lipide (cu 32-41%) în biomasă (figura 13), iar concentrațiile mai mari au dus la o creștere semnificativă (de 2,1-3,0 ori) a conținutului de lipide. În limita concentrațiilor aplicate de AgNP, dependența dintre concentrația AgNP și conținutul lipidelor în biomasă este puternică, coeficientul de corelație Pearson calculat pentru AgNP de 10 nm este de $r=0,856$ și pentru AgNP de 20 nm este de $r=0,819$. De asemenea, crește și cantitatea de DAM, care depășește valorile normale de până la 3,4 ori. Cantitatea dialdehidei malonice corelează cu concentrația de nanoparticule aplicate, coeficienții de corelație fiind $r=0,823$ (AgNP de 10 nm) și $r=0,899$ pentru AgNP de 20 nm.

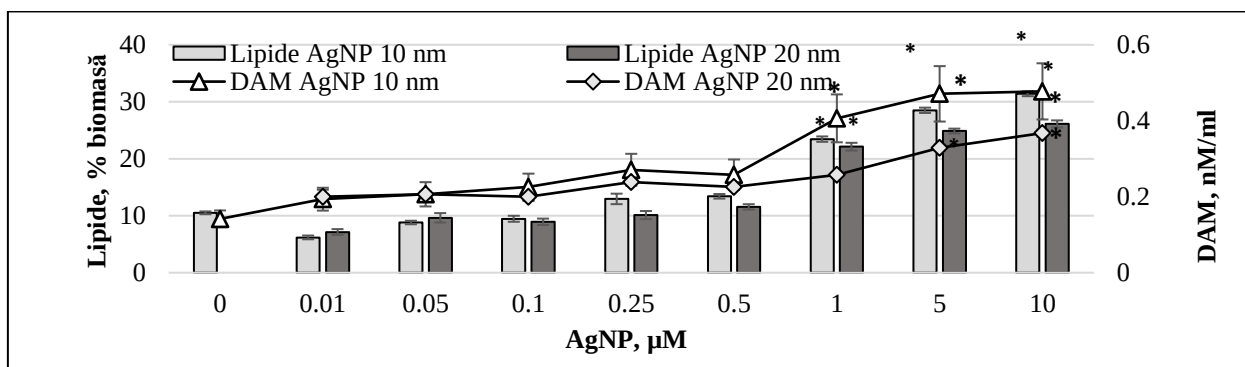


Fig. 13. Efectul diferitor concentrații ale nanoparticulelor de argint cu dimensiunea de 10 și 20 nm asupra conținutului de lipide și DAM în biomasa de *Porphyridium cruentum* (* $p < 0,001$ pentru diferența față de martor)

Același pattern de răspuns al culturii de porfiridium se atestă și în cazul nanoparticulelor de aur stabilizate în citrat. 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

În studiul dat au fost utilizate nanoparticule de argint și de aur de dimensiuni mici de 5 nm, stabilizate în polietilenglicol. Spirulina și porfiridiumul au fost cultivate în prezența nanoparticulelor, care au fost introduse în mediul de cultivare în perioade diferite ale ciclului vital în scopul evidențierii 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*; 2) începutul fazei de creștere exponențială și 3) sfârșitul fazei de creștere exponențială. Biofuncționalizarea nanoparticulelor a fost demonstrată prin metode indirecte (înregistrarea deplasării maximelor de absorbție) și directe – vizualizarea nanoparticulelor în fracțiile de biomasă ficologică. În procesul de biofuncționalizare a nanoparticulelor în biomasa ficologică se observă același tip de modificări, ca cele descrise anterior (subcapitolul 5.2). Ideea 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 ficologice. Astfel, a fost demonstrat că capacitatea de reducere a radicalului oxidului nitric, determinată pentru extractele obținute din biomasa ficologică, cultivată în prezența nanoparticulelor stabilizate în polietilenglicol, suplimentate la mediul de cultivare în faza de latență, a crescut semnificativ. În figura 14, drept exemplu, sunt prezentate rezultatele obținute în cazul extractelor din biomasa de porfiridium. Nanoparticulele de aur și argint au indus creșterea capacității de reducere a oxidului nitric în extractele din biomasa de *P. cruentum*, cu 36-89%, dependența fiind de tip doză-efect ($r = 0,989$ în cazul AgNP și $r = 0,893$ în cazul AuNP).

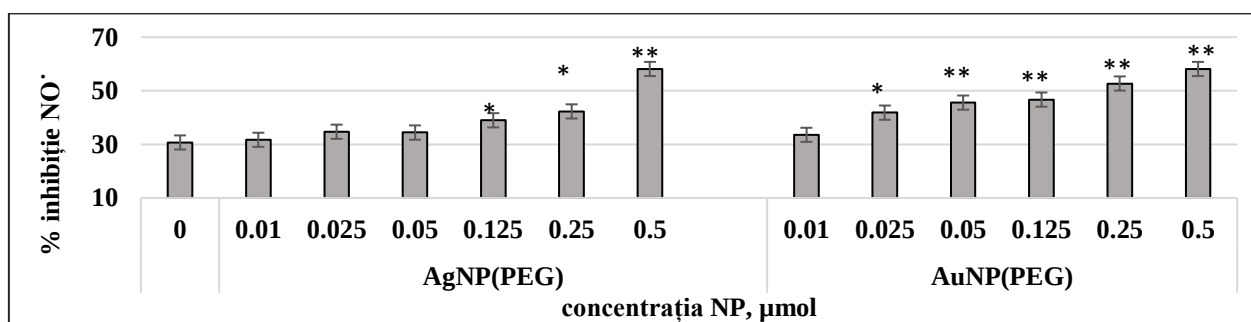


Fig. 14. Capacitatea de reducere a radicalului oxidul nitric de către extractele etanolice din biomasa de *P. cruentum* crescută în prezența nanoparticulelor de aur și argint adăugate în faza de latență (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$)

Vârsta culturilor de *P. cruentum* și *A. platensis* este un factor important în formarea reacției de răspuns a culturii la stresul oxidativ generat de prezența nanoparticulelor de aur și argint, dar și de modelare a procesului de biofuncționalizare a nanoparticulelor. Faza creșterii exponențiale, se evidențiază ca termen potrivit în scopul obținerii de nanoparticule biofuncționalizate, dar poate fi asociată cu o acumulare în exces a produselor degradării oxidative a lipidelor.

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 cercetările prezentate în acest capitol, 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. Schema experiențelor este prezentată în figura 15.

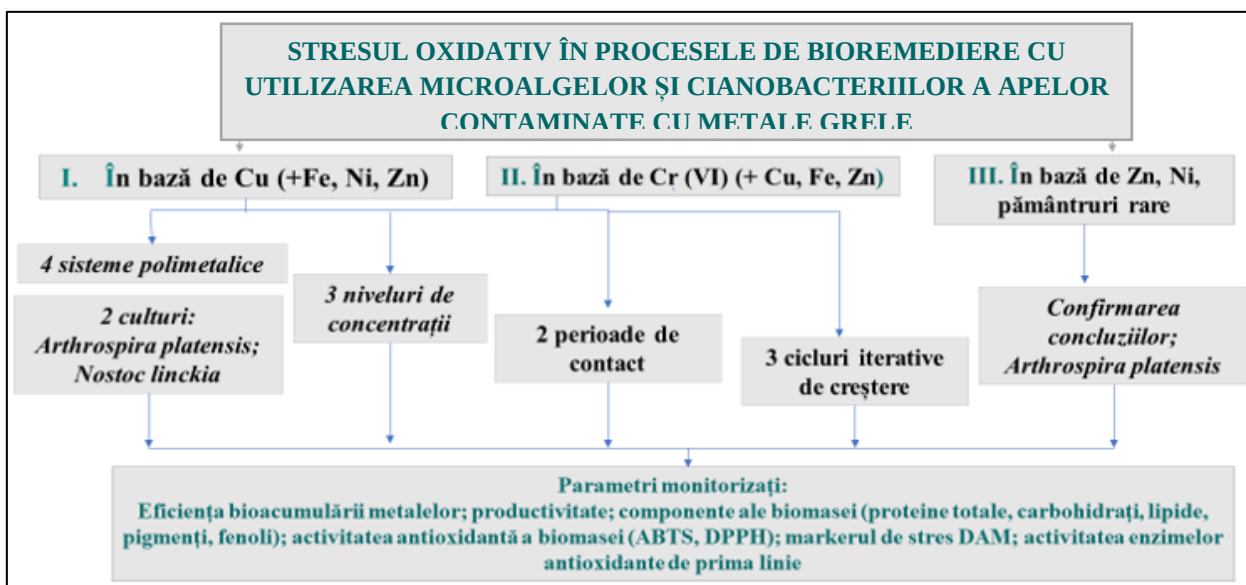


Fig. 15. Designul studiului efectelor stresului oxidativ în procesele de bioremediere

Principalul parametru monitorizat în cadrul acestor studii a fost eficiența bioacumulării metalelor din mediile contaminate, iar în paralel au fost cuantificați parametrii productivi și biochimici, care reflectă starea culturilor și nivelul de implicare a răspunsului la stres.

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 persistenți, dar și să acumuleze o cantitate mare de biomasă în aceste condiții. În acest subcapitol sunt generalizate 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. Suplimentar, sistemele au inclus: I – fier; II – fier și nichel; III – fier și zinc; IV – fier, zinc și nichel. Au fost modelate sisteme polimetalice cu diferite concentrații ale metalelor (Cu – de la 2,5 la 10 mg/l; Fe – 1,25 -5,0 mg/l; Ni și Zn – 0,5 – 2,0 mg/l). În sistemele care au conținut cantitatea maximală de metale spirulina a supraviețuit un singur ciclu de cultivare, iar toți parametrii de productivitate și calitate a biomasei au avut valori sub limita de acceptare. Astfel în dependență de componența sistemului, cantitatea de biomasă produsă a scăzut cu 32,8-52,6% față de martor (figura 16,b), cantitatea de proteine a scăzut cu până la 69%, iar a carbohidraților – cu până la 29,2% față de martori. Ficobilinele scad de la 14% din biomasă în martor la 0,32-0,88% în variantele experimentale. Rezultatele prezentate denotă o toxicitate extremă a sistemelor polimetalice cu cupru în concentrațiile de 10 mg/l pentru Cu, 5,0 mg/l pentru Fe și 2,0 mg/l pentru Ni și Zn.

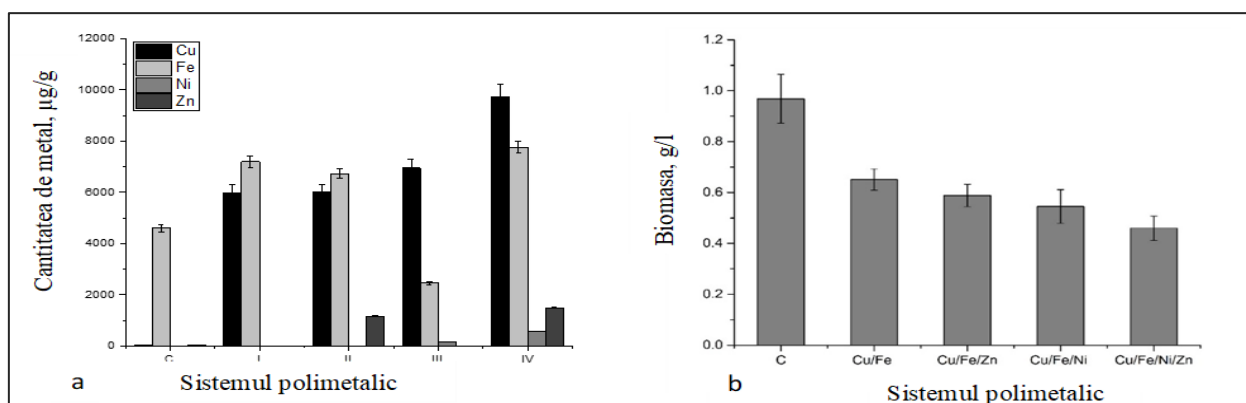


Fig. 16. Cantitatea de metale acumulate și producerea de biomasă de spirulină în sistemele I) Cu/Fe, II) Cu/Fe/Zn, III) Cu/Fe/Ni și IV) Cu/Fe/Zn/Ni (Concentrațiile, mg/l: Cu – 10,0; Fe – 5,0; Ni – 2,0; Zn – 2,0)

Conform datelor analizei de activare cu neutroni (fig.16,a), în sistemul Cu/Fe, biomasa spirulinei a acumulat $6,0 \pm 0,3$ mg/g de cupru, care este de 200 de ori mai mare decât în biomasa martor și $7,2 \pm 0,3$ 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 și fier rămâne la același nivel, în timp ce cantitatea de zinc a fost de $1,60 \pm 0,05$ mg/g (de 26 de ori mai mare decât la martor). 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. În sistemul Cu/Fe/Ni, cantitatea de cupru acumulată a crescut, în timp ce absorbția de fier a fost redusă semnificativ. În sistemul cuaternar Cu/Fe/Ni/Zn s-a observat cea mai mare acumulare pentru toate elementele. 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. În sistemele analizate spirulina a supraviețuit doar pe durata unui ciclu.

În sistemele polimetalice cu conținut dominant de cupru și concentrații mai mici de metale 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 componența biochimică a biomasei. Reducerea cantității de biomasă a fost de 28,1-42,6% față de martor, de asemenea, au fost înregistrate înrăutățiri semnificative a calității biomasei produse, exprimată în reducerea cantității de proteine și a pigmentilor, precum și în modificarea conținutului tuturor fracțiilor de biomasă studiate. Acumularea metalelor a fost diferită de la ciclu la ciclu, iar o legitate a fost comună pentru toate sistemele polimetalice. Astfel, cantitatea de cupru acumulat în biomasă este maximă în primul ciclu de cultivare, după care scade progresiv în ciclurile II și III. Cantitatea fierului din contra, se diminuează în primul ciclu, după care revine la normă sau chiar crește în următoarele două cicluri. Este evidentă adaptarea culturii de spirulină la efluenții cu conținut de cupru 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.

A fost investigată acumularea de metale de către spirulina din efluenți sintetici cu următoarea compoziție chimică: Cr/Fe; Cr/Fe/Ni; Cr/Fe/Ni/Zn și Cr/Fe/Ni/Zn/Cu pe durata a trei cicluri de cultivare. Metalele în diferite concentrații (în mg/l: Cr (VI) – 10,0 – 5,0; Fe – 5,0 – 1,25; Zn, Cu și Ni – 2,0 – 0,5), au fost adăugate în mediul de cultură în fazele exponențială și staționară ale creșterii și acumularea lor în biomasă a fost urmărită folosind analiza de activare a neutronilor. Efectul ionilor metalici asupra biomasei și principalii parametri biochimici (proteine, carbohidrați, lipide, ficobiline și β -caroten) au fost monitorizați. La adăugarea ionilor metalici în faza staționară de creștere, spirulina menține o capacitate ridicată de acumulare a metalului pe parcursul a 2-3 cicluri de cultivare. Prin adăugarea de metale în faza de creștere exponențială în următoarele concentrații: 10 mg/l crom(VI), 5 mg/l fier, 2 mg/l zinc, nichel și cupru, spirulina a acționat ca sorbent regenerabil numai în sistemul Cr/Fe. *Arthrospira platensis* și-a menținut capacitatea de acumulare pe parcursul a trei cicluri de cultivare atunci când a fost expusă la concentrații mai mici de ioni metalici. Capacitatea spirulinei de a acumula ioni metalici pe parcursul mai multor cicluri de cultivare a fost asigurată prin menținerea nivelului optim de proteine și conținut de lipide.

Conform datelor AAN (tabelul 3), biomasa spirulinei în timpul a trei cicluri de cultivare a acumulat de 7-20 de ori mai mult crom (VI) decât conținutul său în biomasa martor.

Tabelul 3. Acumularea metalelor de către biomasa *A. platensis* în sisteme polimetalice cu crom (VI) la adăugarea de ioni metalici în mediul de cultură în faza creșterii exponențiale*

Sistemul	Metalul	Conținutul de metal, $\mu\text{g/g}$			
		Martor	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 $\pm$ 270	6190 $\pm$ 380	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 $\pm$ 270	6620 $\pm$ 260	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 $\pm$ 270	7620 $\pm$ 460	12200 $\pm$ 730	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/Cu	Cr	9 $\pm$ 0.3	94 $\pm$ 7.5	148 $\pm$ 9	139 $\pm$ 11
	Fe	4610 $\pm$ 270	7230 $\pm$ 500	10400 $\pm$ 630	19300 $\pm$ 1350
	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.

*Concentrațiile metalelor, mg/l: Cr 2,5, Fe 1,25, Ni 0,5, Zn 0,5 și Cu 0,5

În toate sistemele studiate acumularea maximă a cromului (VI) a avut loc în al doilea ciclu de creștere. Cea mai mare cantitate de crom (VI) a fost acumulată în sistemul Cr/Fe/Ni/Zn/Cu. Spirulina a fost mai sensibilă la adăugarea metalelor în faza de creștere exponențială. În acest caz, spirulina a supraviețuit trei cicluri de cultivare la concentrațiile cromului de 2,5 și 5,0 mg/l în toate sistemele studiate și la concentrația cromului de 10 mg/l în sistemul Cr/Fe. Cromul și fierul se acumulează în cantități mai mari la adăugarea metalelor în faza de creștere exponențială, în timp ce nichelul, cuprul și zincul – la adăugarea în faza staționară. În toate variantele experimentale, acumularea metalului a fost asociată cu scăderea semnificativă a conținutului de ficobiline și β -caroten în biomasă, în timp ce creșterea conținutului de carbohidrați poate fi considerată ca activare a mecanismelor de protecție împotriva ionilor metalici toxici. Rezultatele obținute indică perspectiva utilizării spirulinei ca acumulator regenerabil pentru tratarea efluenților moderat poluați cu crom(VI) 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

Cercetări similare celor descrise în subcapitolul 6.1. au fost realizate având în calitate de obiect de studiu cianobacteria *Nostoc linckia*. Aplicând AAN a fost evaluată acumularea de Cu, Cr, Fe, Ni și Zn de către nostoc în cadrul sistemelor polimetalice cu conținut de cupru și de crom. În cazul sistemelor pe bază de cupru capacitatea de acumulare a ionilor metalici de Cu din sisteme multi-elementale de către *Nostoc linckia* a fost înaltă și a crescut pe parcursul a două cicluri de cultivare în sistemele Cu-Fe-Ni și Cu-Fe-Zn și pe parcursul a trei cicluri în sisteme Cu-Fe și Cu-Fe-Ni-Zn. Acumularea de Fe, Ni și Zn a crescut, de asemenea, de la un ciclu la altul. Procesul de acumulare a metalelor a fost asociat cu schimbarea semnificativă a compoziției biochimice a biomasei. La primul contact cu poluanții, toleranța ridicată la metalele grele din mediu a fost caracteristică tulpinii studiate. În aceste condiții s-a produs o reducere a conținutului de proteine, lipide și carbohidrați, degradarea pigmentilor și scăderea capacității antioxidante a biomasei. Sub acțiunea repetată a poluanților, toleranța culturii a scăzut, iar nostocul ar trebui explorat pentru bioremedierea de urgență.

În cazul sistemelor polimetalice în bază de Cr(VI), capacitatea de acumulare a Cr(VI) de către cianobacteria *Nostoc linckia* a rămas ridicată pe parcursul a trei generații, în timp ce absorbția de Fe, Ni, Cu și Zn în biomasă a crescut de la o generație la alta. Acțiunea repetată a metalelor a dus la o stare de stres moderat, exprimată prin scăderea cantității de biomasă și acumularea de dialdehidă malonică. În același timp, calitatea biomasei a rămas nealterată. Menținerea calității biomasei *Nostoc* în condiții de stres cauzate de prezența metalelor este asigurată de o creștere a

conținutului de compuși cu acțiune antioxidantă. Datorită capacității sale mari de bioacumulare 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 în combinație cu alte metale.

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 cercetări 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 4. 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 trei cicluri iterative de creștere. 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 de nichel în biomasa de nostoc 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 același sistem, biomasa a acumulat de 110 ori mai mult crom și de 4,7 ori mai mult fier decât martorull. Cea mai mare acumulare de cupru (2870 mg/kg) a fost realizată în sistemul Ni/Cu/Zn/Mo, iar de zinc (1860 mg/kg) — în sistemul Ni/Cu/Zn/Sr.

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, parametrii de productivitate și markerii stresului oxidativ, împreună cu capacitatea înaltă de bioacumulare a metalelor permit să afirmăm că *Arthrospira platensis* poate fi utilizată 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. 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, dominant fiind zincul, spirulina poate fi considerată un acumulator și bioremediator eficient.

Tabelul 4. 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	[32]
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	[7]
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	[8]
La	10-30	Crește	Nu se modifică semnificativ	88-95%	[33]
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%	

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 litu.

Au fost evaluate creșterea cianobacteriei *Arthrospira platensis* și modificările fiziologice ale biomasei sub efectele a șase elemente de pământ rare. 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. Pământurile rare provoacă o creștere a conținutului de DAM din biomasa spirulinei. Modificările activității antioxidante relevă un stres moderat la spirulina expusă contactului cu pământurile rare, astfel că cianobacteria *A. platensis* poate fi utilizată cu succes pentru bioremedierea apelor naturale contaminate cu aceste elemente, precum și pentru recuperarea lor din efluenții industriali slab poluați.

7. MANAGEMENTUL STRESULUI OXIDATIV ÎN CADRUL TEHNOLOGIILOR DE CULTIVARE A OBIECTELOR FICOLOGICE DE INTERES INDUSTRIAL.

GENERALITĂȚI, MECANISME, APLICAȚII

Cultivarea industrială a cianobacteriilor și microalgelor este asociată cu stresul oxidativ, ceea ce poate compromite calitatea biomasei. Stresul asociat cu acumularea de radicali liberi și produse ale degradării oxidative este considerat o provocare majoră, un factor de risc economic și de sănătate. În același timp, un stres moderat poate oferi beneficii prin 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.

7.1. Mecanisme comune de instalare a stresului oxidativ de diferită etiologie

În capitolele anterioare au fost prezentate date despre modificări ale nivelului de productivitate, componență biochimică și activitate antioxidantă în diferite tipuri de stres la culturile ficologice. În anumite condiții de acumulare masivă a produselor degradării oxidative a macromoleculelor apar și modificări morfologice la nivel macro și microstructural. Schimbarea culorii culturii generată de modificarea componenței pigmenților, modificarea dimensiunilor celulelor sau a filamentelor, formarea de conglomerate celulare atipice culturii – sunt fenomene

răspândite, ușor de observat și descrise suficient de detaliat. 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 și stresul oxidativ generat de xenobiotice (metale – Zn, Co, Cu, Mo, Ni, nanoparticule de aur și argint, etanol). În figura 17 pot fi urmărite modificările care au loc în ultrastructura celulelor *A. platensis* pe durata procesului de bionanosinteză a nanoparticulelor de seleniu.

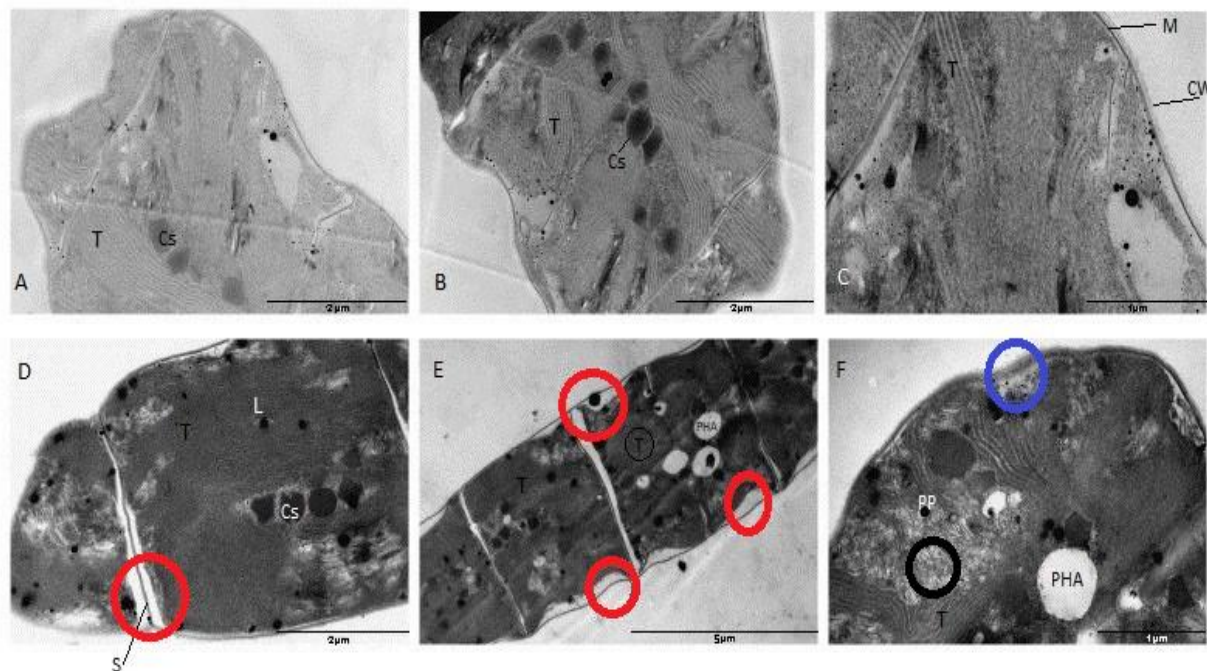


Fig. 17. Ultrastructura celulelor *A. platensis* în proces de nanobiosinteză. A, B, C – martor, D, E, F – celule în care are loc nanobiosinteza SeNP. Cs- carboxizomi; T – tilacoizi; M- membrană; CW – peretele celular; L- incluziuni de lipide; PHA – polihidroxialcanoati; PP- corpi polifosfat; S – sept; cercurile negre –dezorganizarea tilacoizilor, cercurile roșii – spațiul dintre membrana celulară și peretele celular/septul intercelular, cerc albastru – modificarea peretelui celular/densității exopolizaharidelor

În figura 17 (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 spirulină. 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 polihidroxi-alcanoății (care sunt o formă de stocare a rezervelor de carbon), decompactizarea peretelui celular. 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 5.

Tabelul 5. 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			Nanobiosinteză, 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)
Polihidroxi-alcanoăți	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 DAM 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 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*). 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 18).

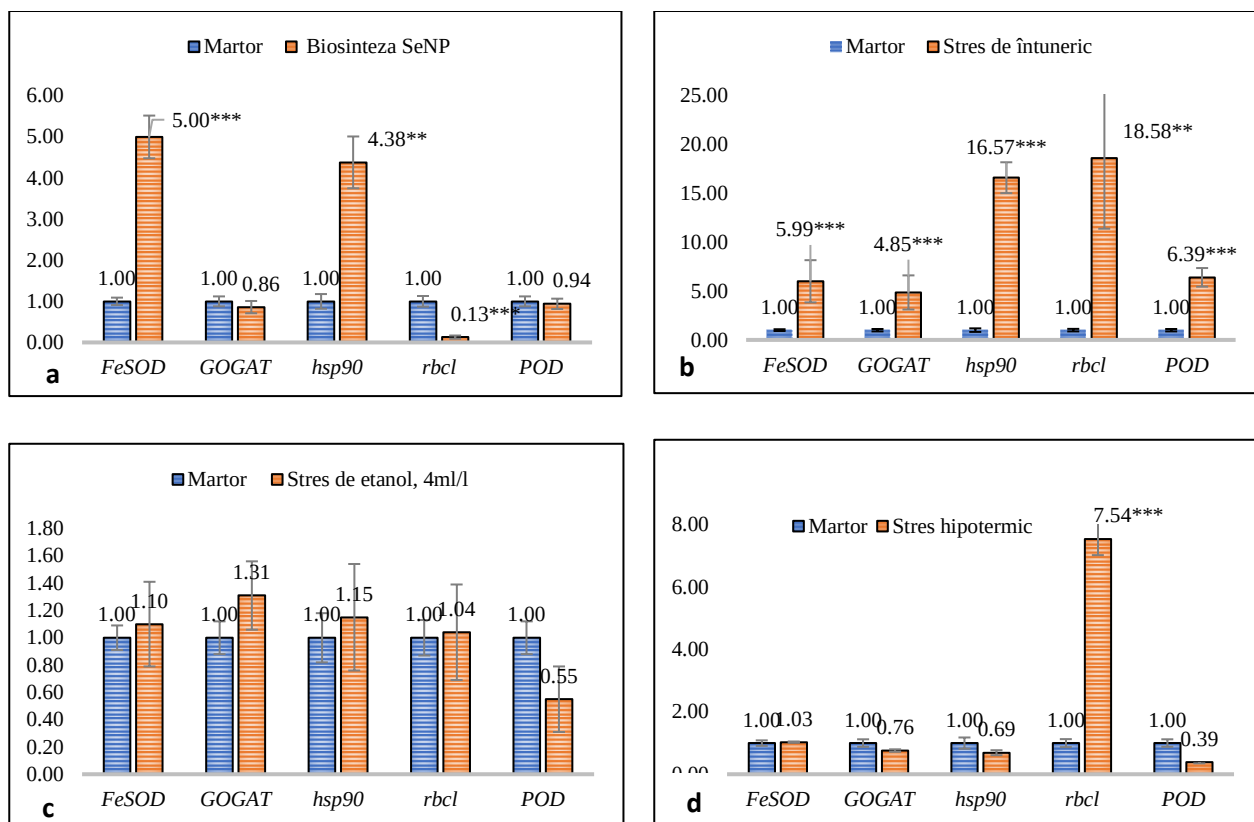


Fig. 18. Diferența de expresie relativă a genelor asociate răspunsului la stresul oxidativ, între martor și situația de stres la *Arthrospira platensis*: a – biosinteza nanoparticulelor de Se; b – stres de întuneric (24 ore); c- stres de etanol (4 ml/l); d -stres hipotermic 20°C (** - $p < 0.01$, * - $p < 0.001$)**

În cazul nanosintezei, conform datelor cu referire la productivitate și componența biochimică a biomasei, nu se atestă o stare de stres evidentă, în timp ce creșterea de 5 ori a expresiei FeSOD în comparație cu martorul poate fi considerată o dovadă a unui stres oxidativ nefavorabil în celulele *A. platensis* care realizează sinteza SeNP (figura 18, a). Situația se poate complica în timp, deoarece nivelul de expresie al peroxidazelor a rămas la nivelul martorului, aceste enzime fiind responsabile de îndepărtarea produsului de reacție (H_2O_2) format ca urmare a activității superoxid dismutazei. În condiții de sinteză a SeNP în celulele de *A. platensis* s-a observat o creștere de 4,4 ori față de martor a abundenței transcripționale a *hsp90*, 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 martor. 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 oxidativ, deși aparent cultura cianobacteriană s-a dezvoltat normal. În condiții de stres de întuneric cu durată de 24 ore (figura 18, b) se observă mărirea semnificativă a abundenței transcripționale pentru toate cele 5 gene analizate, stare asociată cu dereglarea fotosintezei, 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 18, c). 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 8, d).

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 6.

Tabel 6. 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

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 a fost de a identifica unele 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 19.

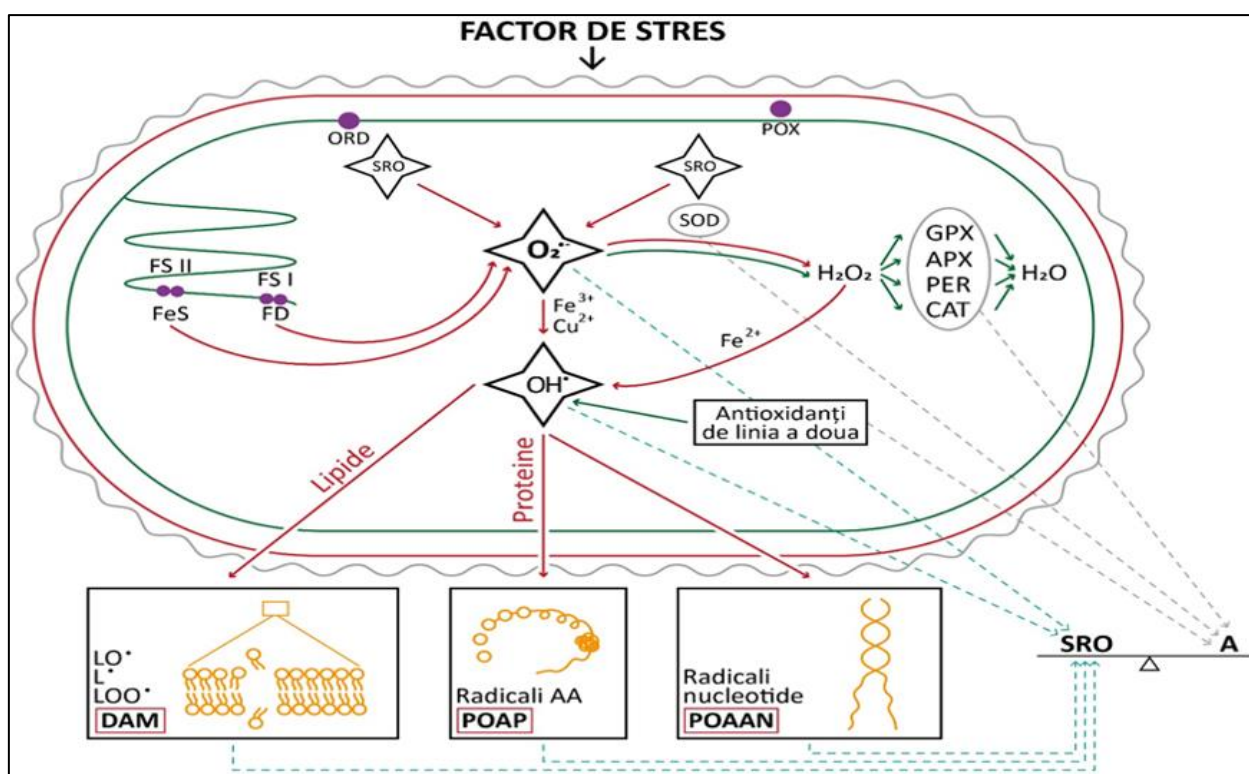


Fig. 19. Apariția și consecințele dezechilibrului activității enzimelor antioxidante primare la *Arthrospira platensis* (explicațiile sunt în text)

Superoxidradicalul este printre primele specii reactive care se formează 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 citoplasmatică, peroxidaza apoplasmică, 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 către 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, peroxiredoxina), implicate în neutralizarea inclusiv a

altor tipuri de peroxizi. În cazul unei activități înalte a superoxidismutazei fără o creștere coordonată a activității enzimelor implicate în degradarea H_2O_2 , acesta din urmă generează radicalul hidroxil prin intermediul reacțiilor de oxidoreducere cu implicarea metalelor cu grad de oxidare variabil. În condițiile prezentei în mediul celular a metalelor cu valență variabilă, în special a Fe și Cu, 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 19).

Modificarea expresiei genelor asociate răspunsului la stres amplifică efectele fiziologice ale stresului prin afectarea multiplelor procese vitale în celulele cianobacteriene (figura 20).

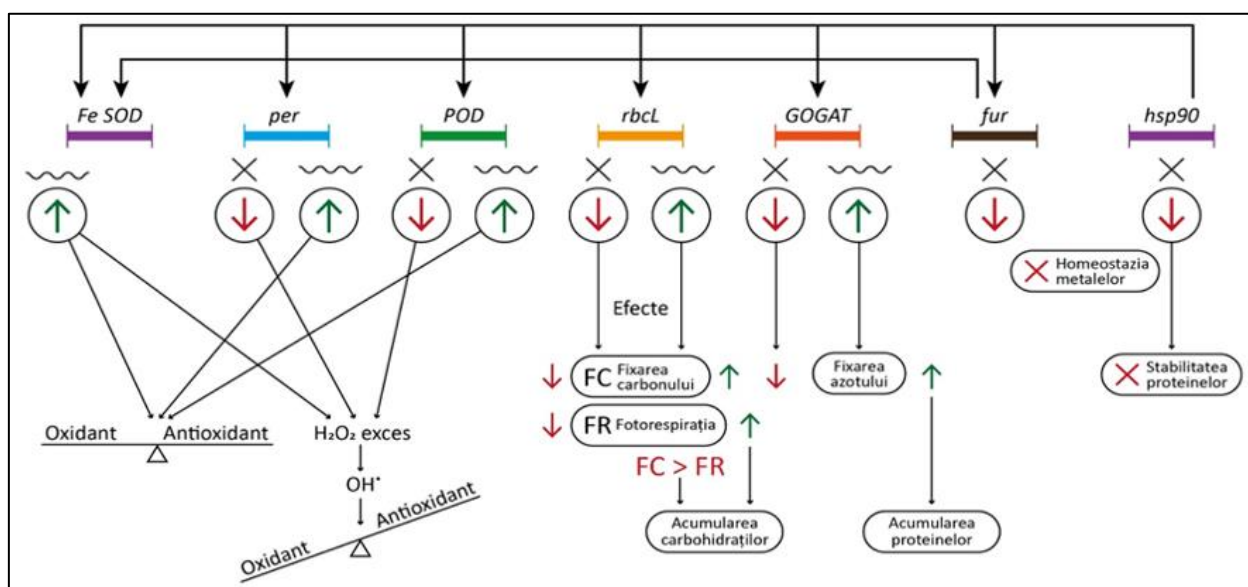


Fig. 20. Modificările expresiei unor gene asociate cu stresul și efectele lor fiziologice la cianobacteria *Arthrospira platensis* (explicațiile sunt în text)

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 întineric 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 fotosintetizante. 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

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. 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; de produsul molecular și de produsul fiziologic generat în condițiile de stres. 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 [22]. 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 procedeeleor biotehnologice. În figura 21 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 21 (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 procedeeleor de stimulare care sunt aplicate la etapa actuală în ficobiotehnologie. 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 (figura 21, a); creșterea valorii factorului până la un anumit nivel, după care urmează o scădere a acestuia până la nivelul inițial sau apropiat de acesta (figura 21, b) și creșterea valorii factorului productiv până la un anumit nivel, urmată de o cădere sub limita de acceptare (figura 21, 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 calitatea dorită. Intensitatea optimă a factorului aplicat în situațiile descrise poate fi identificată prin experiențe cu valori variabile ale acestuia. Figura 21 (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 21d. Creșterea intensității factorului în anumite limite nu produce modificarea parametrului de interes, după care efectul generat devine negativ, iar valoarea parametrului de interes scade. Situațiile

descrise în figura 21, 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 (figura 21, 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.

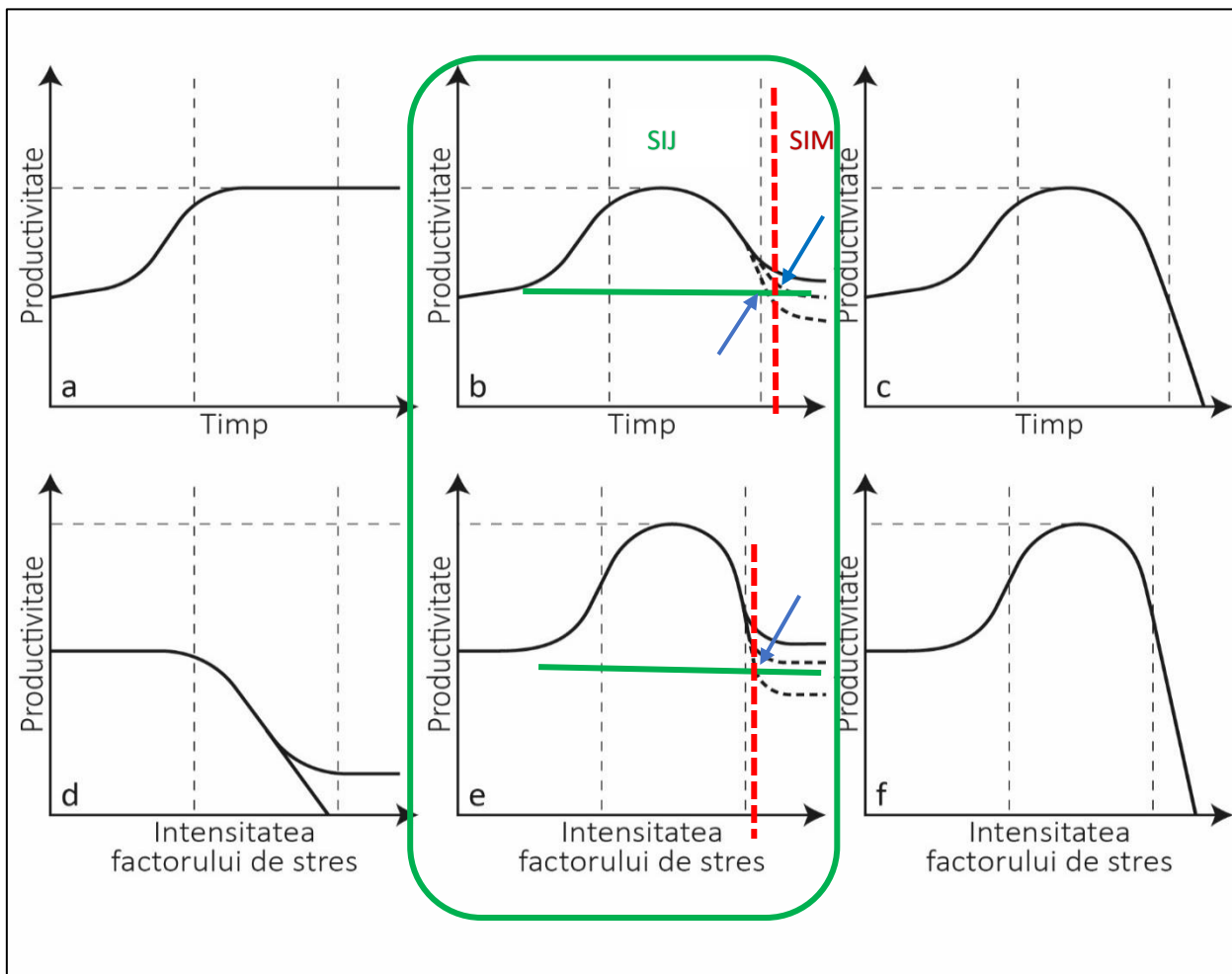


Figura 21. Patternuri de derulare a stresului oxidativ la cianobacterii și microalge: a, b, c – în timp, după acțiunea factorului de stres de intensitate cunoscută; d, e, f – la finalul ciclului vital în dependență de intensitatea factorului de stres;

În această situație este posibil de delimitat stresul de intensitate joasă de cel de intensitate intermediară, identificând punctul de revenire la valoarea inițială a parametrului. 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 (figura 21, f). Prezintă interes situațiile descrise în figura 21, e și 21, f, când pot fi identificate valori ale intensității factorului de stres care asigură o cantitate maximă de produs.

În figura 21, 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 de revenire la valorile inițiale ale parametrului, 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 prestabilită. 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: Procedeu de dirijare a conținutului de compuși biologic activi (ficobiliproteinele și polizaharidele) la cultivarea în condiții industriale a spirulinei; Procedee de biosinteză a nanoparticulelor de argint (AgNP) și seleniu (SeNP) cu ajutorul microalgelor și cianobacteriilor; Procedeu de biofuncționalizare a nanoparticulelor de argint (AgNP) cu ajutorul cianobacteriei *Arthrospira platensis*; Procedee de obținere a biomasei ficologice cu conținut înalt de lipide (Brevete 4542MD, 4543 MD, 4714 MD, 4796 MD); Procedee de bioremediere a efluenților moderat poluați cu metale cu ajutorul cianobacteriilor *Arthrospira platensis* și *Nostoc linckia*; Procedeu de determinare a toxicității nanoparticulelor cu ajutorul microalgei roșii *Porphyridium cruentum* (Brevet 4200 MD).

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 biotehlogic și farmaceutic Ficotehfarm SRL. Procedeele noi de obținere a produselor biotehnologice valoroase (biomasă cu conținut înalt de ficobiliproteine, carbohidrați, lipide; nanoparticule de biosinteză, nanoparticule biofuncționalizate), elaborate în baza aplicării reacțiilor de răspuns a culturilor ficologice la stresul oxidativ sunt eficiente și simplu de realizat în condiții de producere industrială.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

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, osmotice și chimice) asupra a mai multor obiecte ficologice (*A. platensis*, *N. linckia*, *H. pluvialis*, *D. salina*, *P. cruentum*) a condus la evidențierea elementelor comune ale răspunsului celular, care se exprimă în modificarea unor parametri cuantificabili: creșterea cantității de DAM în biomasă, 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 aceluiași 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 demonstrează capacitatea culturilor vii de microalge (*D. salina*, *P. cruentum*) și cianobacterii (*A. platensis*, *N. linckia*) de a realiza biosinteza de nanoparticule pornind de la ioni cu potențial toxic (de exemplu Ag^+ , 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, permit 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 (componența 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 peroxiredoxinei (*per*). De asemenea, se reduce expresia relativă a genei proteinei reglatoare 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, corelarea inversă 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.

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 multipleror gene asociate cu stresul și prin manifestări distructive 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.

Recomandări practice

1. Se recomandă spre implementare 8 procedee de biosinteză a nanoparticulelor de argint cu utilizarea culturilor vii, biomasei și fracțiilor biologic active de *Arthrospira platensis*, *Nostoc linckia*, *Dunaliella salina* și *Porphyridium cruentum* conform schemelor elaborate.
2. Se recomandă spre implementare 5 procedee de biosinteză a nanoparticulelor de seleniu cu utilizarea culturilor vii, biomasei și fracțiilor biologic active de *Arthrospira platensis*, *Nostoc linckia* conform schemelor elaborate.
3. 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.
4. Se recomandă spre implementare procedeul de testare a toxicității nanoparticulelor pentru organisme acvatice conform brevetului de invenție MD 4200.
5. 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 SELECTIVĂ

1. 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. ISSN 0944-1344, 1614-7499.
2. 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. ISSN (online) 1532-2548.
3. BHARADWAJ, S.V.V., RAM, S., PANCHAL, 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. ISBN 978-0-12-817536-1.
4. 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. ISSN 2666-5662.
5. 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. ISSN 2073-4425.
6. CAVALLETTI, E. et al. Copper effect on microalgae: Toxicity and bioremediation strategies. In: *Toxics*. 2022, vol. 10(9), 527. ISSN 2305-6304.
7. 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, ISSN (online) 2076-2607.
8. CEPOI, L., et al. Biomass of *Arthrospira platensis* enriched with lithium by bioaccumulation and biosorption process. In: *Food Bioscience*. 2021, vol. 41, 100950. ISSN 2212-4292.
9. 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. ISSN 0959-6526.
10. 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. ISSN 2405-8440.
11. FREEMAN, E.C., et al. 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. ISSN (online) 1365-2486.
12. GAUTHIER, M.R., et al. Microalgae under environmental stress as a source of antioxidants. In: *Algal Research*. 2020, vol. 52, 102104. ISSN 2211-9264.
13. GIANNUZZI, L. Cyanobacteria growth kinetics. In: Y., KEUNG WONG, ed. *Algae*. IntechOpen, 2019, 70 p. ISBN 978-1-83880-562-3 978-1-83880-563-0.
14. 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. ISSN 0961-9534.
15. 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. ISSN 0233-111X, 1521-4028.
16. 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. ISBN 978-0-12-819311-2.
17. LI, S. et al. Advances in the production of bioactive substances from marine unicellular microalgae *Porphyridium spp.* In: *Bioresource Technology*. 2019, 292, 122048., ISSN 0960-8524.

18. 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. ISSN 0958-1669.
19. LU, Q., et al. 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. ISSN (online) 2211-9264.
20. 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. ISSN 0031-9317, 1399-3054.
21. 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. ISSN 1473-5504, 1475-3006.
22. RACHEDI, R., FOGLINO, M., LATIFI, A. Stress signaling in cyanobacteria: a mechanistic overview. In: *Life*. 2020, vol. 10(12): 312. ISSN 2075-1729.
23. SAEED, M.U. et al. Bioprospecting microalgae and cyanobacteria for biopharmaceutical applications. In: *Journal of Basic Microbiology*. 2022, vol. 62(9), pp. 1110-1124. ISSN 0233-111X, 1521-4028.
24. 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. ISSN 1040-8398, 1549-7852.
25. 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. ISSN 1471-0072, 1471-0080.
26. 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.
27. 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. ISBN 978-0-444-64323-0.
28. 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. ISSN (online) 1740-1534.
29. 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. ISBN 978-981-9929-00-9 978-981-9929-01-6.
30. 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. ISSN 09601481.
31. 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. ISSN (online) 2041-1723.
32. ZINICOVSCAIA, I., 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, ISSN 0944-1344, 1614-7499.
33. ZINICOVSCAIA, I., 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. ISSN 1002-0721.

LISTA PUBLICAȚIILOR AUTOAREI LA TEMA TEZEI

1. Monografii

1.1. monografii monoautor

1. **CEPOI, Liliana.** *Stresul oxidativ și efectele lui asupra cianobacteriilor și microalgelor de interes biotehnologic.* Chișinău: „Artpoligraf”, 2021. 260 p. ISBN 978-9975-62-444-2.

1.2. monografii colective

2. RUDI, L., CHIRIAC, T., **CEPOI, L.**, ș.a. *Factorii tehnologici și calitatea biomasei de spirulină.* Chișinău : „Artpoligraf”, 2020. 242p. ISBN 978-9975-3462-8-3.

1.3. capitole în monografii

1. **CEPOI Liliana**, ZINICOVSCAIA Inga. *Spirulina platensis* as a model object for the environmental bioremediation studies. In: KONUR O (ed) *Handbook of Algal Sciences, technology and Medicine.* Elsevier, Academic Press, London, 2020, ISBN 978-0-12-818305-2. pp.629-640. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818305-2.00039-5>.
2. **CEPOI, Liliana.** 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; Amsterdam: Elsevier Inc., 2019. pp. 217-244. ISBN 978-012814668-2, 978-012814667-5. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00011-8>.
3. 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. ISBN: 978-3-319-26749-4, https://doi.org/10.1007/978-3-319-26751-7_7.

2. Articole în reviste științifice

2.1. în reviste din bazele de date Web of Science și SCOPUS

1. **CEPOI, L.**, ZINICOVSCAIA, I., CHIRIAC, T., 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. ISSN 1996-1944 <https://doi.org/10.3390/ma16020852>.
2. **CEPOI, L.**, ZINICOVSCAIA, I., RUDI, L., et al. Assessment of metal accumulation by *Arthrospira platensis* and its adaptation to iterative action of nickel mono- and polymetallic synthetic effluents. In: *Microorganisms.* 2022, vol. 10, 1041. ISSN 2076-2607. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051041>.
3. **CEPOI, L.**, ZINICOVSCAIA, I., VALUTA, A., 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. ISSN 2305-6304 <https://doi.org/10.3390/toxics10030113>.
4. **CEPOI, L.**, ZINICOVSCAIA, I., RUDI, L. et al. Changes in the *Dunaliella salina* biomass composition during silver nanoparticles formation. In: *Nanotechnol. Environ. Eng.* 2022, vol. 7, pp. 235-243. ISSN 2365-6387, 2365-6379. <https://doi.org/10.1007/s41204-022-00218-4>.
5. **CEPOI, L.**, ZINICOVSCAIA, I., VALUTA, A., 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. ISSN 2076-3298 <https://doi.org/10.3390/environments9010001>.
6. RUDI, L., CHIRIAC, T., **CEPOI, L.**, et al. 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. Print-ISSN: 1224-5119; e-ISSN: 1844-7589.
7. **CEPOI, L.**, ZINICOVSCAIA, I., RUDI, L., et al. Biomass of *Arthrospira platensis* enriched with lithium by bioaccumulation and biosorption process, In: *Food Bioscience.* 2021, vol. 41, 100950. ISSN: 2212-4306, 2212-4292. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100950>.

8. **CEPOI, L., RUDI, L., ZINICOVSCAIA, I., et al.** Biochemical changes in microalga *Porphyridium cruentum* associated with silver nanoparticles biosynthesis. In: *Archives of Microbiology*. 2021, vol. 203, pp. 1547–1554. ISSN: 0302-8933,1432-072X. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02143-z>.
9. ZINICOVSCAIA, I., **CEPOI, L., RUDI, L., et al.** Effect of zinc-containing systems on *Spirulina platensis* bioaccumulation capacity and biochemical composition. In: *Environ Sci Pollut Res*. 2021, vol. 28, pp. 52216–52224. ISSN: 1614-7499. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14457-6>.
10. ZINICOVSCAIA, I., **CEPOI, L., RUDI, 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, vol. 39, nr. 9, pp. 1133–1143. ISSN: 1002-0721, ISSN: 2509-4963 <https://doi.org/10.1016/j.jre.2020.07.019>.
11. **CEPOI, L., ZINICOVSCAIA, I., RUDI, 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. ISSN: 2079-6412. <https://doi.org/10.3390/coatings10080717>.
12. **CEPOI, L., ZINICOVSCAIA, I., RUDI, L., et al.** *Spirulina platensis* as renewable accumulator for heavy metals accumulation from multi-element synthetic effluents. In: *Environ Sci Pollut Res*. 2020, vol. 27, nr. 25, pp. 31793-31811. ISSN: 1614-7499 <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09447-z>.
13. **CEPOI, L., ZINICOVSCAIA, I., RUDI, 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. ISSN: 1872-6992, 0925-8574. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2019.105637>.
14. 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. ISSN: 0008-4166, 1480-3275. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0339>.
15. 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, vol. 23, nr. 4, pp.559-569. ISSN: 2084-4549. <https://doi.org/10.1515/eces-2016-0039>.
16. **CEPOI, L.; RUDI, L.; CHIRIAC, T.; et al.** Biochemical changes in cyanobacteria during the synthesis of silver nanoparticles. In: *Canadian Journal of Microbiology*. 2015, vol. 61, 13-2. 0008-4166, 1480-3275. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0450>.
17. RUDIC, V., **CEPOI, L., GUTSUL, T., et al.** Red Algae *Porphyridium cruentum* growth stimulate CdSe quantum dots covered with thioglycerol. In: *Journal of Nanoelectronics and Optoelectronics*. 2012, vol. 7, pp. 681-687. ISSN: 1555 1318. <https://doi.org/10.1166/jno.2012.1416>.

2.2. în reviste din străinătate recunoscute

1. BECZE, A., **CEPOI, L., SIMEDRU D., et al.** 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. ISSN: 1221-5317. <https://doi.org/10.15835/agrisp.v103i3-4.12836>.
2. VALUTA, A., **CEPOI, L., RUDI, L., et al.** 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: 12245119, 18447589.

2.3. în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, cu indicarea categoriei

Categoria B

1. **CEPOI, L., RUDI, L., CHIRIAC, T., ș.a.** Modificarea conținutului unor compuși biologic activi la *Spirulina platensis* în condiții de stres de iluminare indus. În : *Buletinul Academiei*

- de Științe a Moldovei. *Științele vieții*. 2018, nr. 2 (335), pp. 95-103, ISSN 1857-064X.
2. **CEPOI, Liliana**. Particularitățile manifestării stresului oxidativ indus de cupru (II) la *Spirulina platensis*. In: *Akados*. 2017, nr. 4, pp.39-44. ISSN 1857-0461.
 3. **CEPOI, L., RUDI, L., CHIRIAC, T., ș.a.** Conținutul pigmentilor și activitatea antioxidantă la *Arthrospira platensis* în condiții de stres termic. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2017, nr. 3 (333), pp. 136-144. ISSN 1857-064X.
 4. 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. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2016, nr. 3 (330), pp.143-149. ISSN 1857-064X.
 5. RUDIC, V., RUDI, L., CHIRIAC, T., CODREANU, S., DUMBRĂVEANU, V., DJUR, S., **CEPOI, L., ș.a.** Dinamica modificării componentei 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.
 6. 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. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2015, nr. 3 (327), pp. 156-162. ISSN 1857-064X.
 7. **CEPOI, L., GOLAN, Y., GRYGANSKYI, A.** Phylogenetical approach for the search of valuable metabolic products in cyanobacteria. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2015, Nr.2 (326), pp. 167-172. ISSN 1857-064X
 8. RUDIC, V.; RUDI, L.; **CEPOI, L.; ș.a.** Influența stresului oxidativ indus asupra componentei și activității antioxidante a biomasei de *Spirulina platensis*. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2015, nr. 1 (325), pp.146-153. 1857-064X.
 9. **CEPOI, Liliana**. Pigmenții fotosintetici la *Porphyridium cruentum* în condiții de stres oxidativ indus, În: *Akados*. 2014, vol. 4, nr. 35, pp.116-120. ISSN 1857-0461
 10. RUDI, L., **CEPOI, L., MISCU, V., 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.146-154. ISSN 1857-064X
 11. **CEPOI, L., RUDI, L., MISCU, V., ș.a.** Activitatea antioxidantă a *Haematococcus pluvialis* la diferite etape ale ciclului vital în prezența compușilor coordinați ai Co cu bazele Schiff. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2013, nr. 1 (319), pp.126-136. ISSN 1857-064X.

2.4. Alte reviste editate în Republica Moldova

12. RUDI, L., **CEPOI, L., CHIRIAC, T., ș.a.** Unele particularități ale răspunsului microalgei *Porphyridium cruentum* la acțiunea nanoparticulelor de argint și aur stabilizate în citrat. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2022, nr. 1 (345), pp. 79-86. ISSN 1857-064X.
13. RUDI, L., **CEPOI, L., CHIRIAC, T., ș.a.** Unele aspecte ale aplicării nanoparticulelor de aur în biotehnologia microalgei *Porphyridium cruentum*. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2021, nr. 2 (344), p. 126-132. ISSN 1857-064X.
14. **CEPOI, L.; RUDI, L.; CHIRIAC, T., 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. ISSN 2587-3458

3. Articole în culegeri științifice

3.2. în lucrările conferințelor științifice internaționale (Republica Moldova)

1. **CEPOI, L., RUDI, L., CHIRIAC, T; 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.

2. **CEPOI, Liliana.** 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*, Chişinău: „Elena-V.I.”, 2014, p. 25-29. ISBN 978-9975-4432-8-9.
3. **CEPOI, Liliana.** Statutul antioxidant în corelare cu componenţa biochimică a biomasei unor microalge în condiţii de tehnologii intensive. In: *Actual Problems in Modern Phycology, fifth ed. intern. conf., 3-5 nov., 2014*, Chişinău: CEP USM, 2014, pp. 30-37. ISBN 978-9975-71-577-5.
4. SADOVNIC, D., **CEPOI, L.**, RUDI, L., ş.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*, Chişinău, 2014, pp. 89-94. ISBN 978-9975-71-577-5.

4. Teze în culegeri ştiinţifice

3.1. în lucrările conferinţelor ştiinţifice internaţionale (peste hotare)

1. **CEPOI, Liliana.** 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.
2. BIVOL C., BECZE A., **CEPOI L.**, et al. Temperature-induced expression of fatty acids desaturase genes in *Arthrospira platensis*. In: *The European Workshop on the molecular biology of cyanobacteria, tenth ed., 20-24 aug. 2017*. Cluj-Napoca, România, p.123.
3. **CEPOI, L.**, RUDI, L., CECLU, L., et al. Antioxidants of algae for food industry. In: *Abstract Book of the International Simposium EuroAliment, eight ed., 07-08 sept., 2017*, Galaţi. Galaţi University Press, 2017, pp.104-105

3.2. în lucrările conferinţelor ştiinţifice internaţionale (Republica Moldova)

1. **CEPOI, L.**, RUDI, L., CHIRIAC, T., 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.
2. **CEPOI, Liliana.** 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*, Chişinău: CEP USM, 2021, p.148. ISBN 978-9975-152-13-6.
3. CHIRIAC, T., RUDI, L., **CEPOI, L.**, et al. 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.
4. MISCU, V., **CEPOI, L.**, CHIRIAC, T., et al. 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.
5. **CEPOI, L.**, RUDI, L., CHIRIAC, T. Les microalgues et les cyanobacteries pour une alimentation saine. In: *Securite alimentaire, 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.
6. **CEPOI, L.**, VALUŢĂ, A., DONI, V., 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.

7. **CEPOI, Liliana.** Induced oxidative stress – a biotechnological tool in phycobiotechnology. In: *Proceedings of the International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, fourth ed., 11-12 oct., 2018*, Chişinău: „Artpoligraf”, 2018, p. 88. ISBN 978-9975-3178-8-7.
 8. **CEPOI, L.,** CHIRIAC, T., ROTARI, I., 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., 11-12 oct., 2018*, Chişinău: „Artpoligraf”, 2018, p. 151. 978-9975-3178-8-7.
 9. **CEPOI, Liliana.** 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, 12-13 oct., 2016*, Chişinău: „Artpoligraf”, 2016, p. 28. ISBN 978-9975-3129-3-6
 10. **CEPOI, L.,** RUDI, L., CHIRIAC, T., et al Antioxidative activity and β -carotene synthesis in biomass of green algae *Dunaliella salina*. In: *Proceedings of the International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, 12-13 oct., 2016*, Chişinău: „Artpoligraf”, 2016, p. 179. ISBN 978—9975-3129-3-6
 11. RUDIC, V., RUDI, L., CHIRIAC, T., **CEPOI, L.,** et al. β -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, 12-13 oct., 2016*, Chişinău: „Artpoligraf”, 2016, p. 184. ISBN 978—9975-3129-3-6
 12. RUDIC, V., RUDI, L., CHIRIAC, T., **CEPOI, L.,** et al. β -carotene synthesis in *Spirulina platensis* cultivated under the induced thermal stress conditions. In: *Proceedings of the International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, 12-13 oct., 2016*, Chişinău: „Artpoligraf”, 2016, p. 185. ISBN 978—9975-3129-3-6
 13. RUDIC, V., RUDI, L., CHIRIAC, T., **CEPOI, L.,** et al. 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, 12-13 oct., 2016*. Chişinău: „Artpoligraf”, 2016, p. 186. ISBN 978—9975-3129-3-6.
 14. **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.
 15. RUDI, L., **CEPOI, L.,** MISCU, V., et al. 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*. Chişinău: „Elena-V.I.”, 2014, p. 151. ISBN 978-9975-4432-8-9.
 16. **CEPOI, L.,** RUDI, L., CHIRIAC, T, 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.
 17. **CEPOI, L.,** RUDI, L., CHIRIAC, T., 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.
- 3.3. în lucrările conferințelor științifice naționale cu participare internațională**
1. **CEPOI, Liliana.** 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.

2. **CEPOI, L.,** RUDI, L., CHIRIAC, T., 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.
3. **CEPOI, Liliana,** TAȘCA, Ion. 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.
4. RUDI, L., **CEPOI, L.,** CHIRIAC, T., et al. 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, 2019, pp. 71-72. ISBN 978-9975-108-83-6.

6. Brevete de invenții

1. 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.
2. RUDI, L., **CEPOI, .,** CHIRIAC, T., 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. RUDIC, V., **CEPOI, L.,** RUDI, L., ș.a. Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei. 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.

8. Lucrări științifico-metodice și didactice

8.3. alte lucrări științifico-metodice și didactice

1. RUDI, L., CHIRIAC, T., **CEPOI, L.,** ș.a. Metode de analiză în ficobiotehnologie. Ghid metodic. 2020. Chișinău: Artpoligraf. 101p. ISBN 978-9975-3462-9-0.

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, componența biochimică, ultrastructură, expresia genelor asociate stresului, intensitatea stresului.

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 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.

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 culturilor de microalge și cianobacterii la stres, au fost elaborate tehnologii de obținere a biomasei ficologice cu conținut valoros dirijat, procedee de biosinteză și biofuncționalizare a nanoparticulelor și de bioremediere a mediului ambiant. Au fost identificați indicatori noi ai stresului oxidativ de intensitate joasă și formulate principii de apreciere a intensității stresului.

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; 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*.

Semnificația teoretică: Au fost formulate reperele 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 ai stresului și regulile de apreciere a intensității stresului oxidativ. Au fost identificate elementele comune ale reacțiilor de răspuns a microalgelor și cianobacteriilor la starea de stres. Au fost stabiliți indicatori noi pentru controlul de siguranță în condițiile aplicării stresului oxidativ de intensitate joasă în ficobiotehnologie.

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 SRL (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 основного текста, 98 рисунков, 16 таблиц. Результаты изложены в 75 научных публикациях.

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

Цель работы: обоснование использования окислительного стресса как биотехнологического инструмента в фикобиотехнологии посредством выявления общих элементов ответа микроводорослей и цианобактерий на действие индуцированного стресса, вызванного различными факторами.

Задачи работы: Выявление особенностей проявления окислительного стресса, индуцированного физическими и химическими факторами, у цианобактерий и микроводорослей, представляющих биотехнологический интерес; Выяснение возможности применения ответных реакций на индуцированный окислительный стресс для получения фикологической биомассы прогнозируемого состава; Оценка роли окислительного стресса в процессах биоремедиации микроводорослями и цианобактериями вод, загрязненных металлами, в итеративных системах; Выявление принципов нанобиосинтеза и биофункционализации наночастиц с помощью микроводорослей и цианобактерий, основанных на механизмах защиты от окислительного стресса; Обоснование возможности и границ применения ответных реакций на окислительный стресс как инструмента в фикобиотехнологии; Разработка технологий, основанных на ответных реакциях микроводорослей и цианобактерий на индуцированный окислительный стресс.

Научная новизна и оригинальность: Оригинальность работы заключается в подходе к реакции микроводорослей и цианобактерий на окислительный стресс как к эффективному инструменту управления процессами в фикобиотехнологии. Основываясь на ответные реакции на стресс, были разработаны технологии получения биомассы с целевым ценным содержанием, способы биосинтеза и биофункционализации наночастиц и биоремедиации окружающей среды. Выявлены новые показатели низкоинтенсивного окислительного стресса и сформулированы принципы оценки интенсивности стресса.

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: *окислительный стресс как инструмент в фикобиотехнологии*.

Теоретическая значимость: Сформулированы принципы использования окислительного стресса различной интенсивности как механизма управления фикобиотехнологическими процессами. Аргументированы принципы применения новых показателей стресса и правил оценки интенсивности окислительного стресса. Выявлены общие элементы ответных реакций микроводорослей и цианобактерий. Установлены новые показатели для контроля безопасности в условиях применения низкоинтенсивного окислительного стресса в фикобиотехнологии.

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: To identify the common responses of microalgae and cyanobacteria to various types of induced oxidative stress and to ground the possibility of using the oxidative stress as a tool in phycobiotechnology.

Objectives of the work: To identify the peculiarities of the oxidative stress induced by physical and chemical factors in cyanobacteria and microalgae; To estimate possibility of using the response to the induced oxidative stress for obtaining phycological biomass with predicted composition; To estimate the possibility of using microalgae, cyanobacteria and oxidative stress in remediation of waters contaminated by heavy metals in the iterative systems; To ground the principles of nanobiosynthesis and biofunctionalization of nanoparticles based on the mechanisms of protection against of oxidative stress in microalgae and cyanobacteria; To assess the possibilities and limitations of applying the response to the induced oxidative stress; To elaborate phycological procedures based on the application of the induced oxidative stress.

Scientific novelty and originality: The originality of the work lies in the approach to the response of microalgae and cyanobacteria to oxidative stress as an efficient tool for directing processes in phycobiotechnology. By leveraging the response of microalgae and cyanobacteria cultures to stress, technologies have been developed for obtaining phycological biomass with directed valuable content, as well as methods for biosynthesis and biofunctionalization of nanoparticles and environmental bioremediation. New indicators of low-intensity oxidative stress have been identified, and principles for assessing stress intensity have been formulated.

The obtained results, which contribute to addressing the important scientific problem, consist in 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 controlled content of bioactive compounds; bioremediation of effluents contaminated with heavy metals, which outlined a new research direction: *oxidative stress as a tool in phycobiotechnology*.

Theoretical significance: Conceptual landmarks have been formulated for the use of oxidative stress of varying intensity as a mechanism for directing phycobiotechnological processes. The principles of applying new indicators of stress and rules for assessing the intensity of oxidative stress have been argued. Common elements of response reactions of microalgae and cyanobacteria to stress have been identified. New safety control indicators have been established for the application of low-intensity oxidative stress in phycobiotechnology.

Applied significance: on the basis of the new accumulated knowledge technologies were developed based on induced oxidative stress, focused on obtaining valuable biomass, removal/accumulation of heavy metals from the contaminated environment; and biosynthesis and biofunctionalization of nanomaterials.

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 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
AuNP	Nanoparticule de aur
BAU	Biomasa absolut uscată
CAT	Catalaza
DAM	Dialdehida malonică (alternativ MDA – Malondialdehida)
DPPH	1,1 difenil-2-picril hidrazil
<i>FeSOD</i>	Gena superoxiddismutazei fierice
FeSOD	Superoxiddismutaza fierică
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
MES	Microscopie electronică de scanare
PEG	Polietilenglicol
<i>per</i>	Gena peroxiredoxinei
PER	Peroxiredoxina
PHA	Polihidroxiacanoați
POAAN	Produsele oxidării avansate a acizilor nucleici
POAP	Produsele oxidării avansate a proteinelor
<i>pod</i>	Gena peroxidazei
POX	Peroxidaza
PP	Corpi polifosfați
CRRFM	Capacitatea de reducere a reactivului fosfo-molibdenic
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
<i>rbcl</i>	Gena subunității mari a ribulozo-1,5-bifosfat carboxilazei/oxigenazei
RuBisCo	Ribulozo-1,5-bifosfat carboxilaza/oxigenaza
SeNP	Nanoparticule de selenium
SOD	Superoxiddismutaza
SRO	Specii Reactive ale Oxigenului
TBARS	Substanțe de reacție a acidului tiobarbituric (thiobarbituric acid reactive substance)
XRD	Difracția razelor X

CEPOI LILIANA

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

167.01 – BIOTEHNOLOGIE, BIONANOTEHNOLOGIE

Rezumatul tezei de doctor habilitat în științe biologice

Aprobat spre tipar: DH 167.01-23-10
(15.01.2024)

Formatul hîrtiei: 60x84 1/16

Hîrtie ofset. Tipar digital

Tiraj 100

Coli de tipar: 4

Comanda nr. 240189

Tipografia Artpoligraf SRL

info@artpoligraf.md

str. Columna 160 B,

tel: 022 221 190