

MODEL DE DIMINUARE A CONSECINTELOR STRESULUI HIPERSALIN LA *DUNALIELLA SALINA*

Cercetător științific **Iulia IAȚCO**
Institutul de Microbiologie
și Biotehnologie, AȘM

MODEL REDUCTION OF THE CONSEQUENCES OF THE HIPERSALIN STRESS AT *DUNALIELLA SALINA*

Dunaliella salina is a well known object model of biotech research, and the latest publications allowed the following lines for the practical application of the obtained fundamental results: the carotene producing, complex preparations producing, biofuel producing. *Dunaliella* bioactive complex preparations include lipids containing valuable essential polyenic fatty acids: alpha-linolenic, gamma-linolenic and docosahexaenoic, phosphatidyl inositol and phosphatidyl choline - essential phospholipids with multiple uses in the pharmaceutical industry. Fundamental researches of *Dunaliella salina* refer in particular to two main areas: *Dunaliella* species' systematic and phylogeny and microalgae's adaptation mechanisms to environment salinity changes.

Salinity stress is one of the efficient factors for increase lipids quantity in biomass, but at the same time it decreases the microalgae's productivity. The negative effects of hypersalin stress could be reduced by adding in nutritive medium the biometals in different form and quantity.

1. Prefață

Dunaliella salina este un obiect-model cunoscut al cercetărilor biotehnologice, iar studiul publicațiilor de ultimă oră a permis punerea în evidență a următoarelor direcții de aplicare practică a rezultatelor unor investigații științifice fundamentale: producerea de caroten, producerea de preparate complexe, producerea de biocombustibil [1-8]. Preparatele complexe bioactive din dunalielă includ, de rând cu bioaditive, carotenul și lipide cu un conținut valoros de acizi grași polienici esențiali: alfa-linolenic, gama-linolenic și docosahexaenoic, precum și fosfatidil inozitol și fosfatidil colina – fosfolipide esențiale cu utilizări multiple în industria farmaceutică [5, 8-9].

Cercetările fundamentale, care au drept obiect de studiu *Dunaliella salina* se referă, în special, la două domenii principale: sistematica și filoge-

nia speciilor de *Dunaliella* [10] și mecanismele de adaptate a microalgei la modificarea salinității mediului [10-11].

Fiind o specie halofilă, *Dunaliella* prezintă un obiect ideal de studiu al mecanismelor de adaptare, iar realizările principale în acest domeniu țin de elucidarea rolului esențial al lipidelor constitutive și al proteinelor membranelor celulare, în special a plasmalemei, în asigurarea acestor mecanisme [12-15].

Obiectivele principale ale cercetărilor efectuate pe speciile de *Dunaliella* constau în evidențierea condițiilor și stimulatoarelor biosintezei carotenului și a lipidelor [6, 11-12, 15-16]; elaborarea tehnologiilor performante de extragere a complexelor bioactive din biomasa microalgă [7]; elaborarea tehnologiilor de cultivare a dunalielii pe medii ieftine, în special pe medii reziduale rezultate din alte procese biotehnologice [17]; elaborarea sistemelor tehnologice pentru utilizare în cadrul tehnologiilor intensive [1, 3, 18].

Fiind o specie halofilă, *Dunaliella salina* se adaptează ușor condițiilor de hiperosmoză prin sinteza glicerolului și a lipidelor, dar în aceste condiții are loc reducerea drastică a cantității de biomasă produsă [11, 15, 18-19]. Astfel, biomasa microalgă, obținută în condiții de stres hiperosmotiv este valoroasă din punct de vedere biochimic, dar din cauza productivității reduse, obținerea unei cantități suficiente de produs necesită investiții suplimentare.

Din cele expuse mai sus, cercetările orientate spre găsirea căilor de depășire a efectelor negative ale stresului salin rămân a fi actuale atât din punct de vedere fundamental, cât și din punct de vedere practic.

În cadrul cercetărilor efectuate anterior în Laboratorul Ficobiotehnologie a fost demonstrată capacitatea compușilor coordinativi ai fierului trivalent cu aminoacizi de a spori productivitatea culturii de *Dunaliella salina* cu 14-25% față de proba martor [19]. Este cunoscut, de asemenea, efectul antioxidant al Zn(II) în diminuarea efectelor negative ale stresului hipersalin [20], precum și capacitatea lui de a stimula sinteza fitochelatinelor, care facilitează acumularea fierului, acesta fiind un stimulator al productivității [21].

Scopul cercetărilor expuse în acest articol a constat în aprecierea eficienței unui compus coordinativ al Fe(III) – alaninatul de fier și al clorurii de zinc în diminuarea consecințelor stresului hiperosmotiv la *Dunaliella salina* în condiții de cultură periodică.

Inducerea stresului hiperosmotic cu adăugare de NaCl

Concentrația inițială NaCl în mediul de cultivare	Cantitatea �i timpul de introducere a NaCl la mediul de cultivare	Concentrația finală NaCl în mediu	Notarea variantelor experimentale
8% NaCl (Abd El-Baky, 2004)	+ 4% NaCl la mijlocul fazei logaritmice	12% NaCl	Varianta 1
	+ 4% NaCl la sf�r�itul fazei logaritmice		Varianta 2
	+ 8% NaCl la mijlocul fazei logaritmice	16% NaCl	Varianta 3
	+ 8% NaCl la sf�r�itul fazei logaritmice		Varianta 4
	+ 12% NaCl la sf�r�itul fazei logaritmice	20% NaCl	Varianta 5
12% NaCl (Ben-Amotz, 1990)	+ 4% NaCl la mijlocul fazei logaritmice	16% NaCl	Varianta 1
	+ 4% NaCl la sf�r�itul fazei logaritmice		Varianta 2
	+ 8% NaCl la mijlocul fazei logaritmice	20% NaCl	Varianta 3
	+ 8% NaCl la sf�r�itul fazei logaritmice		Varianta 4
		+ 12% NaCl la sf�r�itul fazei logaritmice	24% NaCl

2. Obiecte  i metode de studiu

 ocul salin a fost indus prin administrarea suplimentară a clorurii de sodiu la două medii cu salinitate diferită – cu 8% [5] de sare  i 12% [18]. Ambele medii sunt utilizate cu succes pentru cultivarea dunaliei  i asigură ob inerea unei cantit i optime de biomasă cu un con inut echilibrat de lipide. Suplimentarea mediilor cu NaCl s-a efectuat pe parcursul cultivării, la mijlocul  i sf r itul fazei cre terii exponen iale, în conformitate cu con inutul tabelului 1.

Determinarea productivit ii s-a efectuat prin cuantificarea absorbânței la lungimea de undă de 450 nm, cu utilizarea curbei de calibrare [19].

Extragerea lipidelor [23]. 3 gr biomasă au fost amestecate cu 5 ml apă  i m cerate cu ultrasunet. A fost adăugat amestecul de solven i cloroform:metanol în raport de 2:1 (v/v). Extragerea s-a efectuat repetat, prin agitare la temperatura camerei timp de 60 minute. Din extractul sumar ob inut s-a eliminat alcoolul prin spălare cu solu ie KCl 0,98% (1/5 din volumul extractului, 5 ori). Extractul cloroformic rezultat, care con ine lipidele totale, a fost dehidratat cu sulfat de sodiu anhidru  i cloroformul a fost  nl aturat prin distilare la temperatura de 40 C. Reziduu uscat a fost reluat într-un volum cunoscut de cloroform (1 ml). Extractul de lipide totale se păstrează la temperaturi de congelare. Lipidele extrase alcătuiesc 7,4% din biomasă  i reprezintă o masă v scoas  semidens  de culoare brun ro ietic .

Separarea  i identificarea lipidelor. Separarea lipidelor polare de lipidele neutre a fost efectuată prin cromatografia pe strat sub ire de silicagel folosind plăci Merck Silica Gel 60 de 10x20 cm. Pentru separarea lipidelor, ini ial a fost utilizată faza mobilă care a constat din eter petroleic : eter dietilic : acid

acetic glacial 80:20:1 (v/v/v), identific nd astfel preponderent lipidele neutre.  n urma cromatografiei, lipidele polare r m n în zona startului. Frațiile lipidice au fost dezvoltate cu vapori de iod. Au fost identificate  ase fra ii, determinate prin valoarea R_f . Fosfotidil inozitolul, fosfatidil colina  i fosfatidil glicerolul au fost identificate cu utilizarea amestecului standard de fosfolipide SIGMA. Conținutul cantitativ a fost determinat gravimetric.

3. Rezultate  i discu ii

Prima serie de experien e, efectuate în cadrul acestui studiu, a constat în crearea  ocului hiperosmotic pentru cultura de *Dunaliella salina*  i monitorizarea productivit ii  i a nivelului de lipide în biomasă. Pentru aceasta, la mediile Abd El-Baky  i Ben-Amotz a fost adăugat NaCl în conformitate cu tabelul 1. Rezultatele obținute pot fi observate în figura 1.

 n cazul mediului cu con inutul ini ial de NaCl de 8%, în  irul de experien e montate se observă cre terea semnificativă a cantit ii de lipide în biomasă (cu p n  la 63%) pe fonul unei scăderi a productivit ii cu p n  la 44%.

Inducerea  ocului hipersalin în cazul cultivării dunaliei pe mediul cu 12% NaCl ini ial, a fost urmată de reac ii asemănătoare de mic orare a productivit ii cu p n  la 50%  i sporul de lipide.

 n ambele cazuri observăm o tendin  de diminuare a productivit ii  i sporire a cantit ii de lipide în biomasă pe fon de  oc hiperosmotic, cre terea cantit ii de lipide în biomasă fiind mult mai importantă pe mediul cu salinitate mare.

Cu toate că cantitatea de lipide în biomasă se schimbă sim itor, raportul cantitativ al fra iilor fosfolipidelor, precum  i raportul lipidelor polare  i nepolare în biomasă ob inut  pe ambele medii în

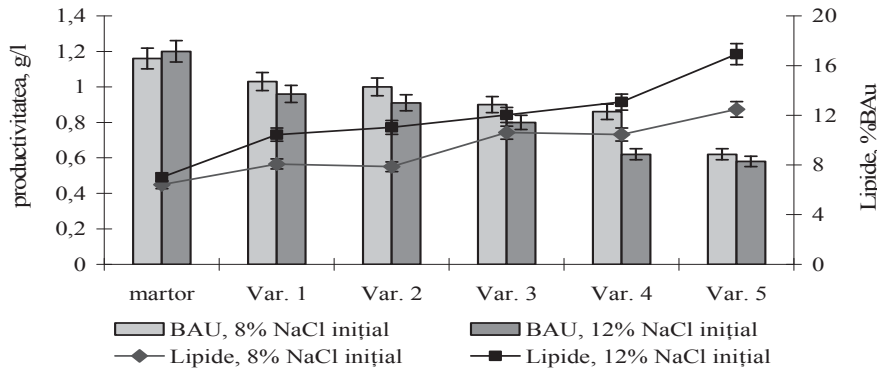


Figura 1. Influența inducerii stresului hiperosmotic pe parcursul cultivării la *Dunaliella salina* pe mediile cu salinitatea inițială de 8% și 12% NaCl, asupra productivității (g/l) și acumulării lipidelor (% BAU).

cadru experiențelor de inducere a stresului salin nu diferă semnificativ de la variantă la variantă, ceea ce indică asupra adaptării celulelor viabile la stresul salin (figura 2).

Din rezultatele prezentate devine evidentă stabilitatea fracțiilor fosfolipidelor. Prin urmare, cultivarea dunalierei pe mediile în care concentrația inițială a clorurii de sodiu este de 8%, iar cea finală de 12, 16 și 20%, nu modifică profilul lipidelor. Rezultatele obținute confirmă stabilitatea componenței lipidice membranare în celula algală și modificarea rapidă a diferitor fracții cu readucerea lor la normă [24]. Glicerolul, care este veriga principală a răspunsului osmotic și-i sintetizat din hidrații de carbon, face față hipersalinității mediului, iar stresul salin nu implică modificări în structura lipidelor ci doar mărirea cantității lor. Rezultatele fracționării cromatografice a lipidelor polare, obținute din biomasa de dunalielă cultivată pe mediile cu concentrația inițială a clorurii de sodiu de 12%, au determinat același tablou al repartizării fracțiilor de fosfolipide.

În concluzie, putem afirma că inducerea stresului salin la *Dunaliella salina* CNM-AV-02 nu mo-

difică spectrul lipidic al algei. Frațiile lipidice și, în special, fosfatidil inozitolul și fosfatidil colina, rămân neschimbate.

Compușii coordinativi ai metalelor constituie un capitol aparte în reglarea creșterii și dezvoltării microorganismelor, precum și în stimularea proceselor biosintetice. Aportul considerabil al compușilor coordinativi în modificarea conținutului de principii bioactive, acumulate în biomasă, este determinat de prezența metalelor în centrul de complexare. Metalele, pe de o parte, servesc ca activatori ai enzimelor, iar pe de altă parte, complexarea lor cu diverși liganzi de origine organică și anorganică le conferă noi proprietăți și-i înzestreză cu capacitatea de a interacționa și activa diverse molecule extra- și intracelulare. După cum au demonstrat multiplele cercetări științifice, efectuate de colaboratorii laboratoarelor de Ficobiotehnologie ale IMB și USM, compușii coordinativi ai metalelor pot fi utilizați cu succes în calitate de reglatori ai productivității și componenței biochimice a cianobacteriilor și microalgelor în scopul elaborării biotehnologiilor intensive [19].

Dunaliella salina și-a elaborat mecanisme spe-

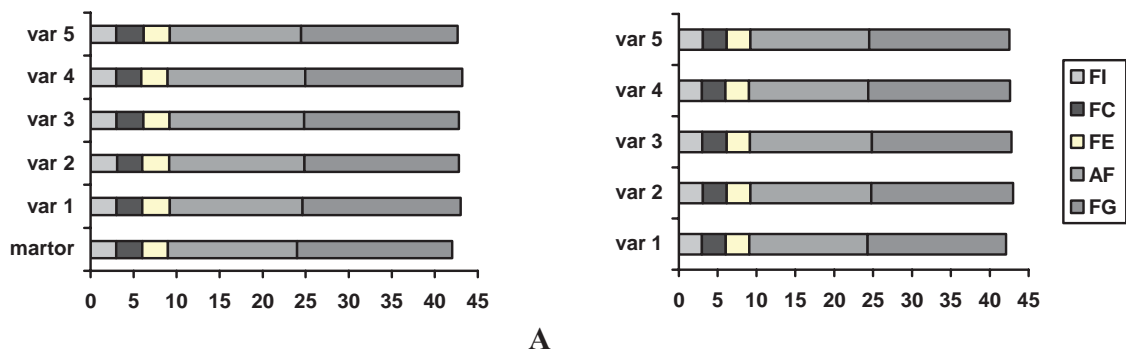


Figura 2. Conținutul fracțiilor fosfolipidelor în biomasa de *Dunaliella* în experiența inducerii șocului hiperosmotic pe mediile cu salinitatea inițială de 8% NaCl (A) și 12% NaCl (B)

FI – fosfatidil inozitol; FC – fosfatidil colina; FE – fosfatidil etanolamina; AF – acid fosfatidic; FG – fosfatidil glicerol

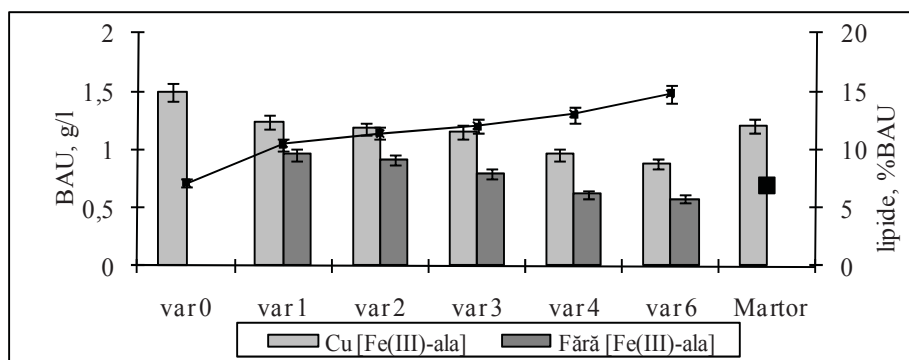


Figura 3. Influen a inducerii stresului osmotic asupra productivit tii (g/l)  i acumulării lipidelor (%BAU) la *Dunaliella*, cultivată pe mediul cu salinitatea inițială de 12%NaCl  i suplimentat cu [Fe(III)-ala] 1,0 mg/l

ciala de acumulare a Fe(III). Fiind algă halofilă, iar mediile saline sunt ferodeficitare, membranele microalgale con in proteine transportatoare, care mediază eficient transportul fierului prin membrane în condi ii de hipo-  i hipersalinitate (Fisher, 1998). Studiile de comparare a asimilării compu ilor Fe(III)-citrat, Fe(III)-EDTA  i Fe(III)-compus organic au demonstrat eficien a utilizării Fe(III)-compus organic [25].

Deoarece s-a stabilit deja efectul pozitiv al compu ilor fierului cu aminoacizi asupra acumulării de biomasă la dunaliela, a fost studiată posibilitatea dep  irii procesului de reducere a productivit tii culturii în condi ii de stres salin. Pentru cercetările din cadrul celei de-a doua etape de studiu fusese utilizat compusul coordinativ al Fe(III) cu alanina.

Experien ele au fost efectuate cu utilizarea concentra iei minime de 1 mg/l. Stresul salin s-a indus în conformitate cu tabelul 1, pornind de la salinitatea inițială de 12%. Suplimentar la variantele deja analizate, a fost  ntrodus  varianta 0 –  n care nu a fost indus stresul salin, dar a fost adăugat compusul coordinativ. Rezultatele obținute sunt prezentate în figura 3.

 n varianta 0 a fost înregistrată o cre tere a productivit tii cu 25% fa  de proba martor.  n variantele cu stres salin indus, scăderea cantit tii de biomasă este mai pu in pronun at  în variantele cu compus coordinativ fa  de cele unde compusul coordinativ lipse te. Astfel, în variantele cu adaos de compus coordinativ are loc o diminuare a efectului de inhibare a productivit tii care permite recuperarea a 23-35% din biomasa pierdută în urma ac iunii  ocului hiperosmotic. Conținutul lipidelor polare în biomasa ob inut  în condi ii de stres salin  i în prezen a alaninului de fier (III) este reflectat în figura 4.

Frac ionarea lipidelor extrase din biomasa dunaliellei cultivată pe mediul cu salinitatea inițială de 12% NaCl  i suplimentat cu compusul Fe(III)-ala în concentra ia de 0,1 mg/ml a demonstrat că cantitatea de fosfatidil inozitol  i fosfatidil colină nu s-a modificat.

Pentru a aprecia eficien a elaborărilor din punct de vedere economic s-a efectuat calculul cantit tii de lipide la litru de suspensie celulară. Pentru mediul standard cu con inut ini ial de clorură de sodiu

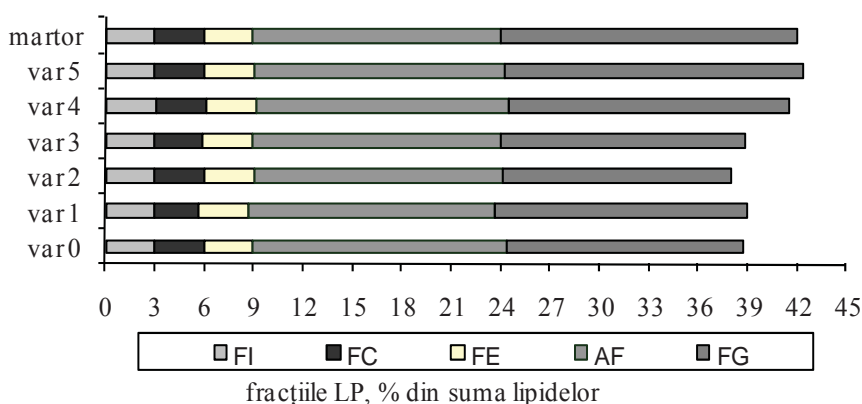


Figura 4. Conținutul frac ionar al lipidelor polare (% din suma lipidelor extrase) din biomasa *Dunaliella*, cultivată pe mediul suplimentat cu alaninul de Fe(III)  i inducerea stresului salin în varianta salinit ii ini iale de 12% NaCl

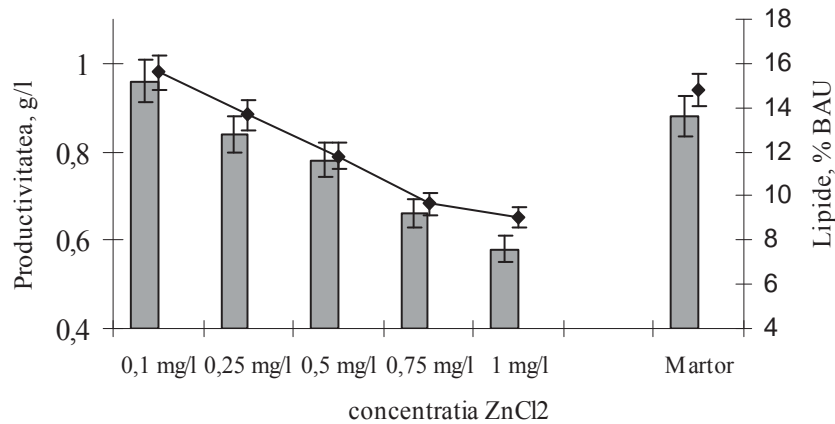


Figura 5. Ifluența ZnCl₂ asupra productivității (g/l) și acumulării lipidelor (%BAU) la *Dunaliella*, cultivată pe mediul cu salinitatea inițială de 12%NaCl și finală de 24% NaCl, suplimentat cu alaninat de Fe(III)

de 12% această cantitate este de 82 mg/l, în cazul variantelor cu inducerea stresului salin avem cantități mai mari, iar în variantele cu adăugarea compușilor coordinațivi pe fond de șoc osmotic ele ating valori de 110-135 mg/l (tabelul 2).

Prin urmare, au fost stabiliți trei factori care favorizează acumularea lipidelor: concentrația clorurii de sodiu inițială de 12%; inducerea stresului salin în perioada creșterii exponențiale și utilizarea compusului coordinațiv alaninatul de Fe(III).

Studii recente, efectuate în scopul elucidării posibilității diminuării efectelor stresului hiperosmotic la *dunaliella*, au scos în evidență importanța Zn(II) în acest sens. Efectul pozitiv al compușilor cu conținut de zinc se explică prin faptul, că aceștia acționează pe două căi – prin efectul antioxidant al lor și prin stimularea sintezei fitochelatinelor, care facilitează acumularea fierului.

Pornind de la aceste rezultate, au fost montate experiențe, în care pe fond de stres salin se adminis-

Tabelul 2

Valorile absolute ale lipidelor obținute din biomasa de *Dunaliella salina* CNM-AV-02 în rezultatul experiențelor efectuate

Condițiile de cultivare	Valoarea absolută a lipidelor, mg/l
Mediul cu 12% NaCl	82
Mediul cu 12% NaCl inițial + 8% NaCl la mijlocul log fazei	96
Mediul cu 12% NaCl inițial + 12%NaCl la sfârșitul log fazei	98
Mediul cu 12% NaCl inițial suplimentat cu 1,0 mg/l Fe(III)-ala + 4 - 8% NaCl	125-135

trează compuși de fier și zinc în ansamblu. Rezultatele obținute la administrarea clorurii de zinc arată, că la concentrații mici ale compusului se poate obține atât creșterea productivității, cât și creșterea cantității de lipide (figura 5).

Valorile absolute ale lipidelor obținute din biomasa de *Dunaliella salina* CNM-AV-02 în varianta cu adăugarea clorurii de zinc (1 mg/l) pe fond de șoc hiperosmotic și suplimentare cu compusul coordinațiv [Fe(III)-ala] atinge valoarea de 165 mg/l, ceea ce este cu 22% mai mult decât în varianta cu compus coordinațiv al fierului în lipsa clorurii de zinc.

În încheiere putem menționa, că inducerea stresului salin la *Dunaliella salina* este una din căile eficiente de sporire a cantității de lipide în biomasa, dar în mod obligatoriu, este și cauza scăderii esențiale a productivității acestei microalge. Diminuarea efectelor negative ale stresului hipersalin poate fi obținută prin modificarea mediului nutritiv în ceea ce ține de cantitatea și forma biometalelor administrate. Astfel, în baza exemplului alaninatului de Fe(III) și a clorurii de Zn(II) putem afirma, că aceste tipuri de substanțe pot fi o soluție pentru depășirea obstacolelor în biotehnologia *dunaliellei*.

În baza rezultatelor obținute și a analizei lor au fost formulate următoarele concluzii:

1. Concentrația inițială a clorurii de sodiu, optimă inducerii stresului hiperosmotic în mediul nutritiv pentru *Dunaliella salina* CNM-AV-02, este cea de 12%.

2. Stresul salin indus pe parcursul cultivării algei verzi *Dunaliella salina* CNM-AV-02 este un factor de stimulare a lipidogenezei pe fundalul diminuării productivității.

3. Inducerea șocului hiperosmotic la mijlocul

fazei cre terii exponen iale permite ob inerea unei cantit ti sporite de lipide din contul scăderii, mai pu in pronun ate, a productivit tii.

4. Stresul hiperosmotic nu duce la modificarea spectrului lipidic  i raportul frac ionar al fosfolipidelor la *Dunaliella salina* CNM-AV-02.

5. Alaninatul de Fe(III)  i clorura de Zn(II) diminuează nivelul de scădere a productivit tii la *Dunaliella salina* CNM-AV-02 pe fond de stres hiperosmotic.

Bibliografie

[1] Del Campo, JA., García-González, M., Guerrero MG. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 74,1163-74 .

[2] Jin, E., Melis, A. (2008). Microalgal biotechnology: carotenoid production by the green algae *Dunaliella salina*. *Biotechnol. Bioproc Eng* 8, 331-337.

[3] Garcia-Gonzalez, M., Moreno, J., Canavate, J.P., Anguis, V., Prieto, A., Manzano, C., Iorencio, F.J., Guerrero, M.G. (2003). Condition for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain, *J. Appl. Phycol* 15, 177-184.

[4] Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv* 25, 294-306.

[5] Abd El-Baky, HH., El Baz, FK., El-Baroty, GS. (2004). Production of lipid rich in omega 3 fatty acids from the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Biotechnology* 3, 102-108.

[6] Zhi-Wei Ye , Jian-Guo Jiang, Guang-Hong Wu. (2008). Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. *Biotechnology Advances*26, 352-360.

[7] Hejazi, M.A., Holwerda, E., Wijffels, R.H. (2003). Milking microalga *Dunaliella salina* for α -carotene production in two-phase bioreactors, *Biotechnol. Bioeng* 85, 475-481.

[8] Aharon Oren, A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. (2005). *Saline Systems* 1:2, 1-14.

[9] Mendoza, H., Martel, A., Jimenez del Rio, M., Garcia, Reina G. (1999). Oleic acid is the main fatty acid related with carotenogenesis in *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology* 11, 15-19.

[10] Katz, A., Waridel, P., Shevchenko, A., Pick U. (2007). Salt-induced Changes in the Plasma Membrane Proteome of the Halotolerant Alga *Dunaliella salina* as Revealed by Blue Native Gel Electrophoresis and Nano-LC-MS/MS. Analysis. *Molecular and Cellular proteomics* 6(9), 1459-72.

[11] Borowitzka MA, Borowitzka LJ, Kessly D. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *J. Appl Phycol* 2, 111-9.

[12] Azachi M., Sadka A., Fisher M., Goldshlag P., Gokhman I., and Zamir, A. Salt induction of fatty acid elongase and membrane lipid modifications in the ex-

treme halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 2002, 129, 1320-1329.

[13] Vanitha, A., Narayan, M. S., Murthy, K. N. C., Ravishankar, G. A. (2007). Comparative study of lipid composition of two halotolerant alga, *Dunaliella bardawil* and *Dunaliella salina*. *Internat. J. Food Sciences and Nutrition* 58(5), 373 - 382.

[14] Leland S. Jahnke, Andrea L. White. (2003). Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *J. Plant Physiol* 160, 1193 - 1202

[15] Kregg, J. Einspahr, Manabu Maeda, Guy, A., Thompson, Jr. (1988). Concurrent Changes in *Dunaliella salina* Ultrastructure and Membrane Phospholipid Metabolism after Hyperosmotic. *Journal of Cell Biology* 107, 529-538

[16] Mutsumi Takagi, Karseno, and Toshiomi Yoshida. (2006). Effect of Salt Concentration on Intracellular Accumulation of Lipids and Triacylglyceride in Marine Microalgae *Dunaliella* Cells. *J. biosc. and bioeng.* 101(3), 223-226.

[17] Bivol, C. Productivitatea  i componen a biochimic  a microalgei verzi *Dunaliella salina* la cultivare pe lichidul cultural al spirulinei suplimentat cu NaCl, ioni de NO³⁻  i SO⁴2-. (2009). *Studia Universitatis, seria „ tiin e ale naturii”* 1(21), 10-12.

[18] Ben Amotz, A., Avron, M. (1973). The role of glycerol in the osmotic regulation in the halophilic alga, *Dunaliella parva*. *Plant Physiol* 51:875 - 878.

[19] Rudic, V et al. Ficobiotehnologie - cercet ri fundamentale  i realiz ri practice. Chi in u, 2007, 362 p.

[20] Naoki Tsuji, Nayumi Hirayanagi, Megumi Okada, Hitoshi Miyasaka, Kazumasa Hirata, Meinhart H. Zenk, and Kazuhisa Miyamotoa. (2002). Enhancement of tolerance to heavy metals and oxidative stress in *Dunaliella tertiolecta* by Zn-induced phytochelatin synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Comm* 293, 653-659.

[21] Mojaat, M., Pruvost, J., Foucault, A., Legrand, J. (2008). Effect of organic carbon sources and Fe²⁺ ions on growth and α -carotene accumulation by *Dunaliella salina*. *Biochemical Engineering Journal* 39, 177-184.

[22] Ben-Amotz, A., Avron, M. (1990). The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*, *Trends Biotechnol* 8, 121-126.

[23] Folch, J., Lees, M., Stanley, GHS. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509.

[24] Karseno, M., Toshiomi, Yoshida. (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 11, 223-226.

[25] Pick, U. Adaptation of the halotolerant alga *Dunaliella* to high salinity, in *Salinity: Environment-Plants-Molecules* (La uchli, A., and Lu ettge, U., eds) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 2002. pp. 97-112.