

INSTITUTUL NATIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU STIINTE BIOLOGICE BUCURESTI

RAPORT STIINTIFIC SI TEHNIC

Proiect: PN-II-PT-PCCA-2013-4-0608

Sistem integrat de monitorizare si bioremediere a zonelor contaminate cu metale grele si radionuclizi

Acronim:IMONBIO

Contract nr. 72/2014

Etapa de raportare :

Etapa a IIa – Proiectarea si dezvoltarea unei retele de biosenzori - instrument analitic pentru monitorizarea si determinarea metalelor grele si radionuclizilor

Perioada de raportare : 05.12.2014-04.12.2015

Cuprins	Pag
Consortiu, obiective	1
Rezumatul etapei a IIa de implementare a proiectului	2
A 2.1. Dezvoltarea de biosenzori. Determinarea caracteristicilor de performanta ale biosenzorilor dezvoltati (partea a 2a).	3
A 2.2. Optimizarea biosenzorilor- partea 1a.	7
A 2.3. Studiul nivelului de contaminare a habitatelor cu metale grele si radionuclizi	10
A 2.4. Diseminare	
A 2.5. Alegerea tulpinilor microbiene pentru decontaminarea eficienta a metalelor grele si radionuclizilor-partea 1	14
Concluzii	18

Proiectul IMONBIO este realizat de un **consorciu** academic-industrial format din:

- Institutul National C-D pentru Stiinte Biologice Bucuresti -INCDSB, coordonatorul proiectului, (CO)
- CPMED Laboratory SRL (P1)
- Institutul National de Cercetare Dezvoltare pentru Fizica Laserilor, Plasmei si Radiatiei – INFLRP RA (P2)
- Institutul National de Cercetare Dezvoltare pentru Metale si Resurse Radioactive - ICPMRR - Bucuresti (P3)

Scopul acestui proiect este acela de a dezvolta un sistem complex, integrat, de monitorizare si bioremediere a metalelor grele si radionuclizilor din areale contaminate.

Realizarea acestui sistem integrat este conditionata de utilizarea cu succes a caracteristicilor versatile ale unor micro-organisme care pot functiona atat ca bio-catalizatori in transformarea/degradarea celor doua clase de contaminanti, radionuclizii si, respectiv, metalele grele, cat si ca elemente de bio-recunoastere moleculara a acestora, intrucat proiectul propune ca si instrument de monitorizare o retea de micro-electrozi modificati/retea de micro-senzori (enzimatici si microbieni), selectiva si sensibila pentru detectia metalelor grele si radionuclizilor. Metalele grele luate in studiu sunt: cupru, plumb, mercur, cadmiu, zinc iar radionuclizii de inters sunt uraniu, radon si toriu.

Obiectivele proiectului IMONBIO conform contract 72/01.07.2014:

O1. Dezvoltarea unei strategii de bioremediere a metalelor grele si radionuclizilor pe baza de micro-organisme la nivel de laborator.

O2. Dezvoltarea si validarea unui nou instrument analitic: retea de micro-biosenzori pe baza de micro-organisme si enzime imobilizate, pentru monitorizarea gradului de contaminare cu metale grele si radionuclizi.

O3. Realizarea unui model demonstrator care sa sustina fiabilitatea strategiei de bioremediere si a utilitatii retelei de senzori dezvoltate.

Rezumatul etapei a II a de implementare a proiectului

Activitatile specifice etapei a II -a de raportare pentru proiectul IMONBIO au fost:

A2.1. Dezvoltarea de biosenzori. Determinarea caracteristicilor de performanta ale biosenzorilor dezvoltati (partea a 2a); A2.2. Optimizarea biosenzorilor- partea I; A 2.3. Studiul nivelului de contaminare a habitatelor cu metale grele si radionuclizi ; A2.4. Diseminare ; A2.5. Alegerea tulpinilor microbiene pentru decontaminarea eficienta a metalelor grele si radionuclizilor-partea I

Realizarea proiectului IMONBIO porneste de la ideea utilizarii versatile a micro-organismelor si enzimelor atat ca si biocatalizatori cat si ca elemente de biorecunoastere. In termenii proiectului aceasta inseamna utilizarea micro-organismelor, respectiv enzimelor pe de o parte in proiectarea unor tehnologii de bioremediere si, pe de alta parte, in constructia de biosenzori pentru monitorizarea gradului de poluare pentru cele doua clase de contaminanti. Obiectivele proiectului IMONBIO de realizare a unui sistem integrat de monitorizare si remediere a arealelor contaminate implica si identificarea unora dintre zonele critice, contaminate cu metale grele si radionuclizi, din Romania, incercandu-se prin acest proiect introducerea unor noi instrumente analitice de monitorizare, dezvoltate in cadrul proiectului.

Ca urmare a activitatilor de CD realizeate in aceasta etapa a fost demonstrata eficienta in anumite cazuri de contaminare a micro-organismelor selectate (*Pseudomonas aeruginosa*) pentru elaborarea strategiei de bioremediere.

Au fost dezvoltati, caracterizati si optimizati partial noi biosenzori pentru determinarea metalelor grele si radionuclizilor: Au-SPE/ALP; C-SPE/ALP; AcP-RG-ITO care s-au dovedit aplicabili pentru monitorizarea nivelelor de Zn (II), Hg (II), Cr (III). Cele mai bune rezultate s-au obtinut pentru Hg(II).

Biosenzor	Poluant	% Inhibitie	K _i (mol L ⁻¹)
Au-SPE/ALP	Zn (II)	36,63	$6,85 \times 10^{-5}$
	Hg (II)	73,91	$2,76 \times 10^{-6}$
	Cr (III)	66,66	$4,70 \times 10^{-5}$
C-SPE/ALP	Hg (II)	34,46	$5,21 \times 10^{-5}$
	Cr (III)	30,22	$5,78 \times 10^{-4}$
AcP-RGO-ITO	Hg (II)	71,93	$1,43 \times 10^{-5}$

Rezultatele obtinute au fost validate parcial, inter-laborator, biosenzorii pe baza de ALP dovedindu-se sensibili si precisi in determinarea continutului de Hg(II). Pentru Hg (II) regasirea din proba cu biosenzorul Au-SPE/ALP a fost de 101,87%, dovedindu-se acuratetea raspunsului biosenzorului.

Au fost structurate primele modele de bioreactoare utilizabile in testarea strategiilor de bioremediere.

S-a demonstrat potentialul utilizarii spectroscopiei laser fotoacustice in evaluarea randamentului de metabolizare a metalelor grele, astfel incat sa se obtina informatii de mare acuratete cu privire la impactul contaminantilor metalici asupra habitatelor.

A2.1. Dezvoltarea de biosenzori. Determinarea caracteristicilor de performanta ale biosenzorilor dezvoltati (partea a 2a)

Dezvoltarea unei retelei de senzori si biosenzori pentru monitorizarea continutului in metale grele si radioactive (contaminanti) implica mai intai dezvoltarea de unitati independente de biosenzori/senzori, care sa raspunda specific si sensibil si sa furnizeze informatii privind nivelul de concentratie al contaminantului.

Dezvoltarea unui senzor/biosenzor are la baza o succesiune de etape de constructie si caracterizare care incepe cu asigurarea unei detectii adecvate pentru analitul de interes (contaminantul), ceea ce inseamna alegerea unui element de biorecunoastere moleculara (care poate fi: enzima, celula intreaga, ADN, etc.) care sa asigure specificitatea raspunsului. Aceasta inseamna ca trebuie ales un element de biorecunoastere moleculara care sa reactioneze specific cu analitul, astfel incat sa genereze un produs de reactie chimica/biochimica a carui acumulare (in cazul detectiei directe) sau scadere a concentratiei (in cazul detectiei prin inhibtie) sa poata fi usor masurata in urma transformarii semnalului chimic/biochimic in semnal masurabil de catre un traductor (care poate fi electrochimic, optic, de frecventa etc). La nivelul traductorului poate avea loc si amplificarea semnalului. Senzorul/biosenzorul astfel construit este apoi caracterizat din punct de vedere al performantelor analitice: domeniu dinamic de raspuns, sensibilitate, limita de detectie, reproductibilitate, stabilitate operationala si stabilitate la stocare etc.

Pornind de la rezultatele obtinute in etapa anterioara de realizare a proiectului si tinand seama de principiul de baza al proiectului IMONBIO- monitorizare si remediere-, micro-organismele selectate pentru elaborarea strategiei de bioremediere si pentru constructia unor senzori microbieni sunt: *Pseudomonas aeruginosa*; *Pseudomonas fluorescens*; *Clostridium spp.* iar enzimele selectate pentru constructia de bio- senzori electrochimici pentru monitorizarea gradului de contaminare cu metale grele - dintre care unele pot fi utilizate si in strategiile de bioremediere- apartin uratoarelor clase: polifenol oxidaze (lacaza si tirozinaza); fosfataze (fosfataza alcalina si alcalina) si colinesteraze (acetilcolinesteraza).

In tabelul de mai jos sunt prezentate principalele clase de contaminanti care pot fi adsorbite in filem de bioremediere pe care enzimele le formeaza in functie de conditiile de mediu.

Tabelul 1. Clase de contaminati care pot fi bio-remediate enzimatic

Material bioconcentrare & bioabsorptie	Contaminanti de mediu
Polifenol oxidaze (ex: Lacaza)	Fenoli, bisfenoli, metale
Cholinesteraze	Cd, Hg
Fosfataze	Cr, V, U, Pu, Cd, Zn, Hg

In etapa anterioara s-au elaborat protocolele de imobilizare si au fost caracterizati din punct de vedere al performantelor analitice polifenol-oxidazele, rezultand astfel primele modele de unitati de biosenzori pentru determinarea prin inhibitie a Cd (II), Zn (II) si Pb (II) care, la o concentratie de 5×10^{-6} molL⁻¹, induc o inhibitie medie de 87 % a semnalului inregistrat pentru substratul specific acid cafeic, la o concentratie de substrat de 10^{-5} molL⁻¹.

Trebuie mentionat ca, datorita rezultatelor obtinute in studiile de caracterizare a biosenzorilor pe baza de polifenol oxidaze, s-a ajuns la concluzia ca reteaua de biosenzori pentru monitorizarea contaminantilor din soluri si ape poate include alaturi de unitatile pentru determinarea metalelor

grele si radionuclizilor si unitati care sa detecteze compusii cu actiune perturbatoare a sistemului endocrin (EDC) de tipul nonilfenol, octilfenol.

In aceasta etapa de implementare a proiectului activitatea de dezvoltare a unitatilor de biosenzori care vor intra in alcatauirea retelei de biosenzori de monitorizare a contaminantilor din probe de ape si de soluri a continuat cu stabilirea protocalelor de imobilizare a fosfatazelor, alcalina si, respectiv acida, si apoi cu stabilirea caracteristicilor de performanta ale biosenzorilor astfel obtinuti.

2.1.1. Dezvoltarea de biosenzori pe baza de fosfataza alcalina.

Mecanismul de actiune al fosfatazelor asupra substraturilor specifice este prezentat in figura 1 in care se evidenta faptul ca reactia este o reactie insotita de formarea intermediara a unui complex enzima-substrat, aceasta etapa intermediara putand sa complice masurarile bazate pe procese de inhibitie.

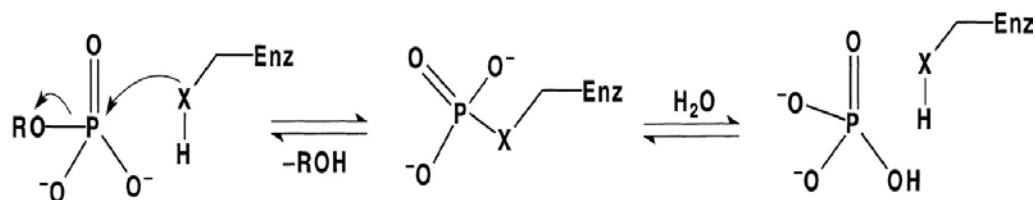
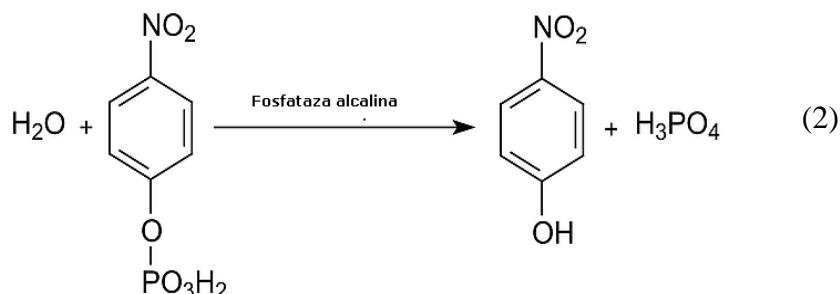
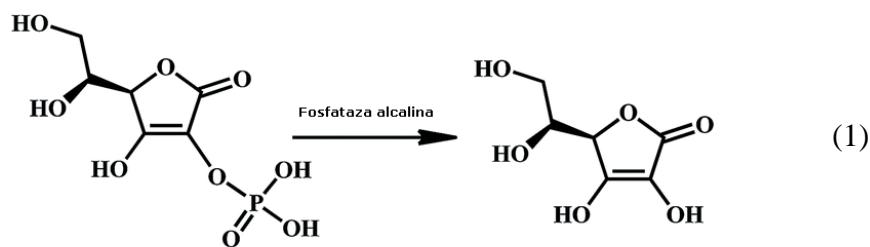


Figura 1. Mecanismul de actiune al fosfatazei alcaline

Principiul de functionare al unor biosenzori pe baza de fosfataze este acelasi ca pentru orice biosenzor de inhibitie, prezenta contaminantului reduce activitatea enzimei, si, ca urmare, si cantitatea de produs de reactie format.

In cazul fosfatazelor alcaline sunt frecvent utilizate doua substraturi specifici, fosfatul acidului ascorbic (AAP) si, respectiv, paranitrofenil fosfatul (pNPP), ambele generand in urma reactiei catalizate enzimatic produsi de reactie electrochimic activi, acidul ascorbic (reactia 1), respectiv para-nitro fenolul (reactia 2), si, in ambele cazuri, acidul fosforic (anionul fosfat).



Primele determinari efectuate prin voltametrie ciclica, cu enzima in solutie de tampon TRIS, pH=8,10, utilizand ca si celula de lucru celula screen-printata DRP 220 AT, care are un electrod de lucru de Au, un pseudo-electrod de referinta Ag/AgCl si contraelectrod de Au, au demonstrat ca potentialul redox specific oxidarii para-nitrofenolului este +1,15 V (\pm 0,050) vs Ag/AgCl, fiind definit si picul procesului de electrod al anionului PO_4^{3-} la un potential de +0,93 V (\pm 0,050)vs Ag/AgCl. Valorile de potential nu recomanda utilizarea in dezvoltarea si caracterizarea biosenzorilor pe baza de fosfataza alcalina a substratului pNPP, deoarece raspunsul va fi clar afectat de interferente electrochimice (compusi electrochimic activi care se oxideaza/reduc in fereastra de potential 0 V- + 1,15V).

Inregistrarea voltamogramei ciclice pentru rectia enzimatica in solutie utilizand AAP ca si substrat (vezi figura 2) a condus la concluzia ca acest substrat este mai potrivit pentru caracterizarea biosenzorilor aperometrici pe baza de fosfataza alcalina, potentialul de oxidare al produsului reactiei enzimatiche fiind +0,400 V (\pm 0,013) vs Ag/AgCl pe electrodul de lucru de Au, demonstrandu-se ca aplicarea in cronoamperometrie a unui potential care sa asigure oxidarea totala a produsului de reactie, adica un potential de + 0,430 V vs Ag/AgCl conduce la rezultate bune in termeni de mentinere a afinitatii pentru substrat (conform valorilor constantei Michaelis-Menten k_m^{app} , sensibilitate, limita de detectie si domeniu de liniaritate).

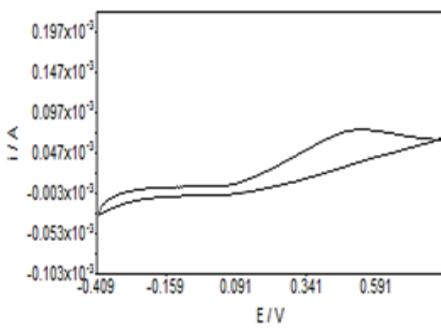


Figura 2. Voltamograma ciclica a AAP $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ in prezenta de ALP (100 mU), in tampon TRIS pH=8.10, electrod de lucru Au (DRP 220AT, $v=100 \text{ mV sec}^{-1}$)

2.1.1.1 Variante constructive ale biosenzorilor pe baza de fosfataza alcalina

S-au testat mai multe variante constructive pentru realizarea biosenzorilor pe baza de fosfataza alcalina, utilizandu-se mai multe suporturi conductive, electrozi screen-printati de Au, respectiv de carbune, modificati sau nu cu nanoparticule de grafit pirolitic.

Pe suprafata conductiva a unor celule electrochimice screen-printate, Au-SPE DRP 220AT, respectiv C-SPE DRP 110, a fost depus un volum de 5 μL solutie fosfataza alcalina pe electrozii de lucru astfel incat sa se asigure pe electrod 150 mU enzima, apoi au fost lasati la uscat timp de 6 ore la 20°C-24°C, dupa care au fost stocati la frigider pana la utilizare. Biosenzorii realizati prin acest protocol de imobilizare sunt Au-SPE/ALP, respectiv C-SPE/ALP.

In cazul modificarii cu nanoparticule de grafit intr-o prima etapa s-a realizat sonicarea timp de 60 de minute a 20 mg nanoparticule de grafit in 1 mL solutie tampon, apoi intr-un volum de 500 μL a fost dizolvata cantitatea necesara de enzima astfel incat, la pipetarea unui volum de suspenzie grafit-ALP de 5 μL , sa se asigure aceeasi activitate enzimatica pe electrodul de lucru. Biosenzorul astfel realizat este notat C-SPE_grafitNP/ALP.

Determinarea caracteristicilor de performanta analitica a biosenzorilor astfel construiti a fost realizata prin cronoamperometrie, potentialul aplicat fiind cel stabilit in urma experimentelor de voltametrie ciclica cu enzima in solutie.

Mentinerea afinitatii fata de substrat a ALP immobilizata este dovedita de valorile constantelor Michaelis-Menten aparente, care sustin fezabilitatea realizarii de biosenzori pe baza de fosfataza alcalina (vezi tabelul 2), indeosebi pentru variantele constructive care implica adsorbtia directa pe suportul conductiv a ALP, realizarea compozitului ALP-grafit determinand o impiedicare paritala a penetrarii substratului catre situsul centrilui activi ai enzimei.

Tabelul 2. Caracteristicile de afinitate fata de substrat ale ALP immobilizate pe diverse suporturi

Substrat	Biosenzor	$K_M^{app}(\text{mol L}^{-1})$
Acid Ascorbic Fosfat	Au-SPE/ALP	$5,32 \times 10^{-5}$
	C-SPE /ALP	$4,46 \times 10^{-4}$
	C-SPE/grafitNP/ALP	$14,8 \times 10^{-4}$

2.1.1.2 Variante constructive ale biosenzorilor pe baza de fosfataza acida

Biosenzorii pe baza de fosfataza alcalina au fost dezvoltati utilizand ca si suport conductiv un electrod de oxid de indiu si stibiu (ITO). Modificarea electrodului de ITO, curatat in prealabil cu alcool izopropilic si apa distilata, s-a realizat in 2 etape, prima constand in depunerea prin adsorbtie a $10\mu\text{L}$ de oxid de grafena (GO) si uscarea peste noapte la temperatura camerei urmata de a doua etapa, de reducere a oxidului de grafena prin aplicarea unui potential constant timp de 5 minute. Pe baza datelor experimentale obtinute din voltamograma ciclica inregistrata utilizand ca electrod de lucru GO-ITO prin baleierea potentialului pe domeniul $+0.25 \div -1,25\text{V}$ vs AgAgCl in tampon acetat pH 5 (figura 3) s-a ales ca si potential de lucru optim pentru reducerea oxidul de grafena, potentialul de -0.9 V vs. Ag/AgCl.

Imobilizarea fosfatazei acide (AcP) pe suprafata electrodului de lucru s-a realizat prin reticulare cu glutaraldehida (solutie apoasa de concentratie 1%), cantitatea de enzima pe electrod asigurand 40mU activitate enzimatica. Dupa imobilizare, electrodul modificat cu enzima, notat AcP-RG-ITO, a fost lasat sa se usuce timp de 36 h la o temperatura de 4°C inainte de a fi utilizat.

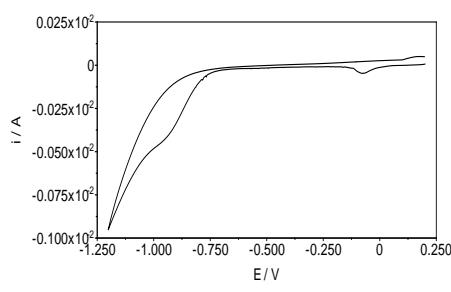
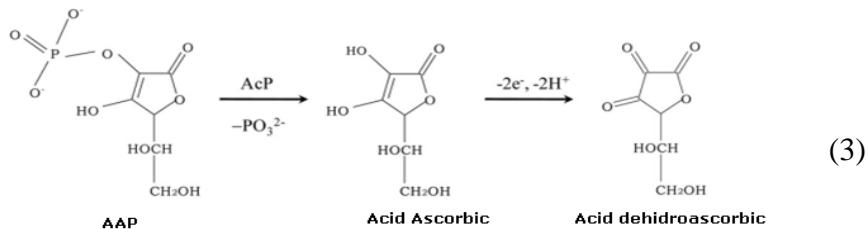


Figura 3. Voltamograma ciclica inregistrata pentru electrod de ITO modificat prin depunerea a $10\mu\text{L}$ GO (1mg/ml) in tampon acetat pH 5

Mecanismul de actiune al fosfatazei alcaline este dat in reacția 3, mecanismul de detectie care sta la baza functionarii biosenzorului constand in oxidarea electrochimica a acidului L-ascorbic obtinut in urma hidrolizei enzimatice.



Stabilirea potentialului de lucru pentru biosenzorul amperometric pe baza de fosfataza acida s-a realizat de asemenea, in urma experimentelor de voltametrie ciclica inregistrate pentru substratul AAP, utilizand ca electrod de lucru AcP-RGO-ITO, in tampon acetat pH 5 (figura 4).

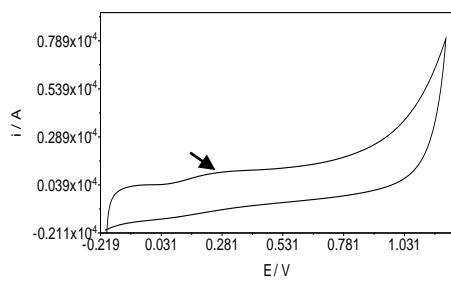


Figura 4. Voltamograma ciclica inregistrata pentru AAP, 10^{-4} molL $^{-1}$, utilizand electrodul AcP-RGO-ITO in tampon acetat pH = 5,00

La o valoare a potentialului de +0,25 V vs Ag/AgCl a fost obtinut intensitatea de pic maxima, aceasta valoare a potentialului fiind aleasa ca optima pentru a fi utilizata in experimentele cronoamperometrice, in vederea caracterizarii analitice a biosenzorului astfel construit precum si in realizarea studiilor de raspuns a acestui biosenzor la actiunea unor inhibitori nespecifici cum sunt metalele grele si radionuclizi.

Biosenzorii astfel construiți au fost caracterizați și optimizați parțial, rezultatele obținute în această etapă fiind prezentate în paragraful următor, A2.2. Optimizarea biosenzorilor.

A 2. 2. Optimizarea biosenzorilor

Pornind de la parametrii operaționali stabiliți în etapele de dezvoltare ale biosenzorilor pe baza de fosfataza alcalină, respectiv acidă, s-a trecut la o prima fază de optimizare a biosenzorilor astfel construiți.

In cazul fosfatazei alcaline conditiile de pH la care se fac determinările sunt determinante pentru asigurarea sensibilității maxime a răspunsului. In același timp, având în vedere că se urmărește aplicarea acestor biosenzori la determinarea de contaminanți de tip metale grele trebuie să se ia seama de faptul că, în condiții de pH extrem alcalin, mai toate metalele grele precipita sub forma hidroxizilor și complexilor corespunzători. Ca urmare stabilirea pH-ului optim de lucru se face prin realizarea unui compromis între cele două condiții menționate.

Variatia raspunsului biosenzorului Au-SPE/ALP in functie de pH-ul mediului de lucru este prezentata in figura 5.

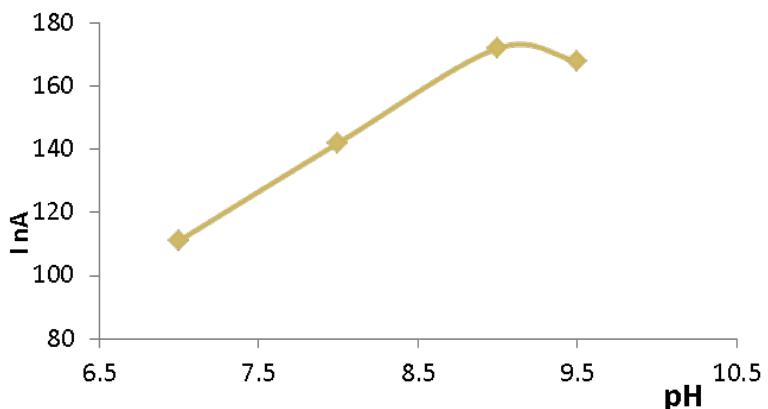


Figura 5. Variatia intensitatii curentului picului de oxidare al acidului ascorbic cu variatia pH-ului pentru un biosenzor pe baza de fosfataza alcalina (Au-SPE/ALP), potential aplicat +0.430 V

Caracteristicile de performanta ale biosenzorilor pe baza de fosfataze, alcalina respectiv acida, sunt date in tabelul 3.

Tabelul 3. Unele caracteristici de performanta ale biosenzorilor dezvoltati pe baza de fosfataze alcalina (ALP), respectiv acida (AcP)

Substrat	Biosenzor	Domeniu de liniaritate (molL^{-1})	R	Sensibilitate ($\mu\text{A}/\text{mmol}$)
Acid Ascorbic Fosfat	Au-SPE/ALP	$4,5 \times 10^{-6} - 2,1 \times 10^{-4}$	0,9922	4,78
	C-SPE /ALP	$18 \times 10^{-6} - 1,18 \times 10^{-4}$	0,9746	4,16
	AcP-RGO-ITO	$3,8 \times 10^{-5} - 5,2 \times 10^{-4}$	0,9962	15

Limitele de detectie, determinate ca $3 \times S/Z$ pentru biosenzorii Au-SPE/ALP, respectiv C-SPE /ALP au fost $4,55 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$ pentru Au-SPE/ALP, respectiv $6,03 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$.

Cronoamperograma obtinuta pentru aditii succesive de AAP pe un biosenzor Au-SPE/ALP este prezentata in figura 6.

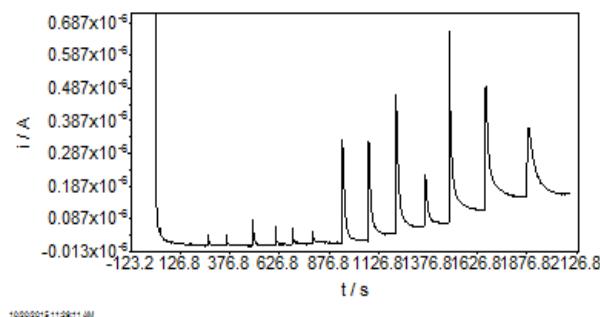


Figura 6. Cronoamperograma obtinuta pentru 14 aditii succesive de AAP pe un biosenzor Au-SPE/ALP, tampon TRIS, pH=8.10, potential aplicat +0.430 V

Avand in vedere ca toti aceste biosenzori dezvoltati si caracterizati din punct de vedere al parametrilor de performanta in raport cu substratul specific AAP vor fi utilizati pentru determinarea metalelor grele si radionuclizilor, s-au determinat constantele de inhibitie si, respectiv, procente de inhibitie pentru cele trei variante constructive in prezenta metalelor grele de tip Hg (II), Zn (II), Cd (II), Pb(II), Cr (III) si Cu(II).

Cele mai bune rezultate s-au obtinut pentru metalele grele Hg (II), Cr (III) si Zn (II) prezentate in tabelul 4.

Tabelul 4. Raspunsul de inhibitie al biosenzorilor pe baza de fosfataze alcalina (ALP), respectiv acida (AcP)

Biosenzor	Poluant	% Inhibitie	K _i (mol L ⁻¹)
Au-SPE/ALP	Zn (II)	36,63	$6,85 \times 10^{-5}$
	Hg (II)	73,91	$2,76 \times 10^{-6}$
	Cr (III)	66,66	$4,70 \times 10^{-5}$
C-SPE/ALP	Hg (II)	34,46	$5,21 \times 10^{-5}$
	Cr (III)	30,22	$5,78 \times 10^{-4}$
AcP-RGO-ITO	Hg (II)	71,93	$1,43 \times 10^{-5}$

Constantele de inhibitie au fost obtinute prin metoda grafica Lineweaver-Burk (graficul 1/i functie de 1/c) si metoda Dixon (1/i functie de c_i-concentratia de inhibitor), valorile obtinute pentru constantele de inhibitie demonstrand doar pentru Hg(II) si biosenzorul pe baza de fosfataza alcalina caracterul necompetitiv al inhibitiei, celelalte valori pledand mai mult pentru un caracter competitiv al inhibitiei ALP. De asemenea, inhibitia enzimei AcP cu Hg²⁺ are un caracter reversibil si competitiv.

Ca urmare se poate spune ca biosenzorii pe baza de fosfataza alcalina, ALP sunt fara indoiala aplicabili pentru determinarea Hg (II), pentru ceilalți contaminanți necesitând optimizări ulterioare.

Biosenzorul pe baza de fosfataza alcalina a fost caracterizat din punct de vedere al caracteristicilor de performanta in raport cu Hg(II) ca si contaminant, amperograma obtinuta la inhibitie fiind data in figura 7.

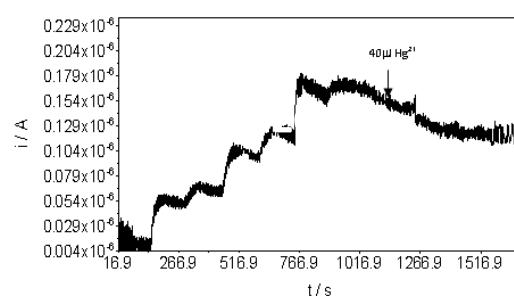


Figura 7. Amperograma inregistrata pentru electrodul AcP-RGO-ITO in tampon acetat pH= 5,00, potential aplicat + 0,25 V vs Ag/AgCl utilizand solutie standard de AAP de concentratie $2,08 \times 10^{-4}$ molL⁻¹

S-a obtinut o dependenta liniara a gradului de inhibitie in functie de concentratia de Hg^{2+} pe domeniul $1,40 \times 10^{-6}$ - $2,3 \times 10^{-5}$ molL⁻¹, cu o limita de detectie de 1×10^{-6} molL⁻¹. S-a determinat valoarea indicelui I_{50} corespunzator unei inhibitii enzimatiche de 50% obtinandu-se o valoare de $5,66 \times 10^{-4}$ molL⁻¹. Si acest biosenzor va suporta optimizari ulterioare.

Validarea raspunsului biosenzorilor. Raspunsul biosenzorilor astfel construiti a fost validat in raport cu alte metode de analiza, consacrate, utilizand probe furnizate de partenerul P3 INCDMRR, de concentratii cunoscute de catre acestia, determinate prin metode de absorbtie atomica in flacara.

Concentratiile probelor trimise catre toti partenerii pentru analiza au fost: Zn 0,13000 ppm; Cu 0,12710 ppm; Cd 0,22490 ppm; Pb 0,41400 ppm; Hg 0,40000 ppm. Pentru Hg (II) regasirea din proba cu biosenzorul Au-SPE/ALP a fost de 101.87%, dovedindu-se acuratetea raspunsului biosenzorului.

A 2. 3. Studiul nivelului de contaminare a habitatelor cu metale grele si radionuclizi

Pentru asigurarea continuitatii de monitorizare si pentru a reusi maparea habitatelor contaminate din Romania, habitatele de interes au fost si in acest an aceleasi cu cele din 2014, si anume cele circumschrisse habitatului minei Baita Plai.

Din analiza valorilor de concentratii ale metalelor in probele de vegetatie, asa cum sunt prezентate in cele doua tabele, se observa o tendinta de scadere a concentratiilor metalelor in probele de vegetatie recent prelevate.

Datele privind contaminarea cu metale grele a apelor din zona Baita plai si Nucet au fost comparate cu datele istorice existente in arhiva INCDMRR ICPMRR, avand confirmarea evolutiei poluarii in ultimii 2 ani in acest areal minier.

Analizand datele privind dinamica concentratiilor de metale grele si radionuclizi atat in probele de sol si de vegetatie prelevate recent, si, respectiv in anul 2012, se constata o tendinta generala de scadere in timp a concentratiei ale acestor indicatori in probele analizate, exceptie fiind indicatorul uraniu in proba Nucet sol si indicatorul cupru in proba Baita Plai Taluz sol care au concentratie superioara fata de anul 2012. In probele de vegetatie exceptia fata de tendinta generala de diminuare a nivelelor de concentratii de metale grele si radionuclizi o reprezinta indicatorul uraniu pentru probele Baita plai taluz si G11, care are valori mai ridicate in probele recent prelevate fata de 2012.

Pentru stabilirea impactului contaminarii cu metale grele si radionuclizi este necesara utilizarea de tehnici de inalta performanta, capabile sa aduca informatii asupra ratei de metabolizare a metalelor grele si radionuclizilor la nivelul vegetatiei.

Ca urmare, partenerul P2 INFLRP a incercat demonstrarea potentialului spectroscopiei laser fotoacustice in evaluarea randamentului de metabolizare a metalelor grele. Modelul elaborat de catre P2 se bazeaza pe monitorizarea etilenei din rosiile cherry mature (greutate 30 grame) ca raspuns la schimbarea conditiilor de stocare. Masuratorile au fost efectuate pe rosiile cherry intacte, (coapte, nepatacate, nelovite) cu o greutate de aproximativ 30 g. Acestea au fost injectate (dupa indepartarea coditei) cu 1 mL de metal greu si lasate la temperatura camerei. Concentratia de etilena in urma injectarii cu metal greu a fost evaluata mai intai dupa 4 ore si apoi dupa 24 de ore. Deoarece pentru biosintезa etilenei este absolut necesara prezenta O₂, fiecare proba a fost analizata in un flux de aer sintetic la presiune atmosferica.

Metalele grele au fost furnizate de P3 INCDMRR, fiind aceleasi probe utilizate pentru validarea raspunsului biosenzorilor (vezi 2.2)

In figura 8 este prezentat rezultatul inregistrat la masurarea emisiei de etilena la 4 ore dupa injectarea cu 1mL de metal greu (Zn, Cu, Pb si Hg), corelata cu emisia de etilena a fructului neinjectat.

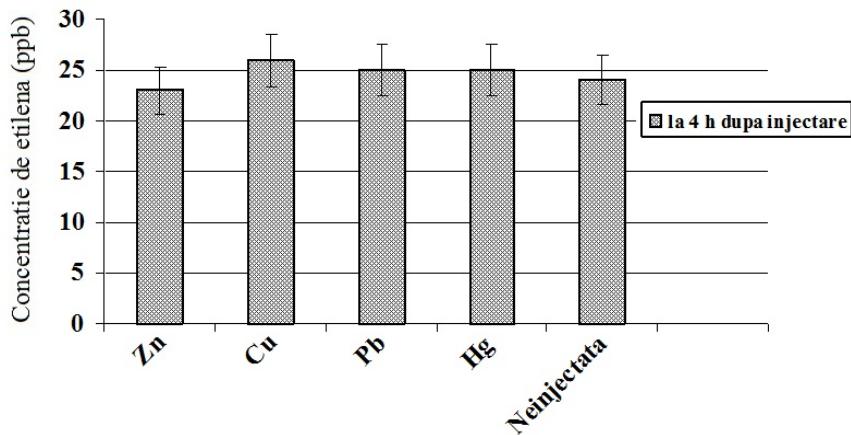


Figura 8. Emisia de etilena in flux de aer sintetic, la 4 ore dupa injectare cu metal greu in cazul a 4 probe de rosii cherry (greutate/proba \approx 30 g).

In figura 9 este prezentat rezultatul inregistrat la masurarea emisiei de etilena la 24 ore dupa injectarea cu 1mL de metal greu (Zn, Cu, Pb si Hg) corelata cu emisia de etilena a fructului neinjectat.

Dupa cum se poate observa din cele doua figuri (8,9), conditiile aerobe impreuna cu injectarea de Zn, Cu, Pb si Hg, nu cresc semnificativ productia de etilena la rosiiile cherry coapte comparativ cu fructele neinjectate.

O atentie deosebita a fost acordata Cd, in figura 10 observandu-se ca emisia de etilena la rosiiile cherry inregistreaza o crestere semnificaiva dupa 12 ore de la injectarea cu: 1mL de Cd si 2mL de Cd .

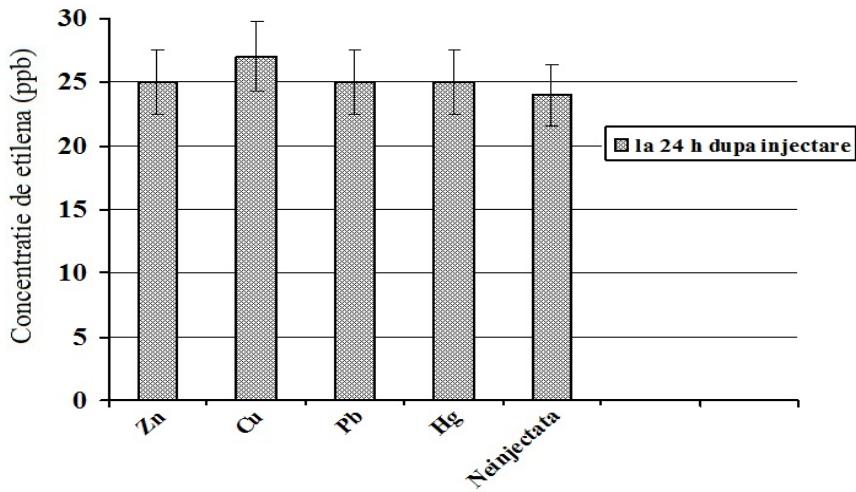


Figura 9. Emisia de etilena in flux de aer sintetic, la 24 de ore dupa injectare cu metal greu.

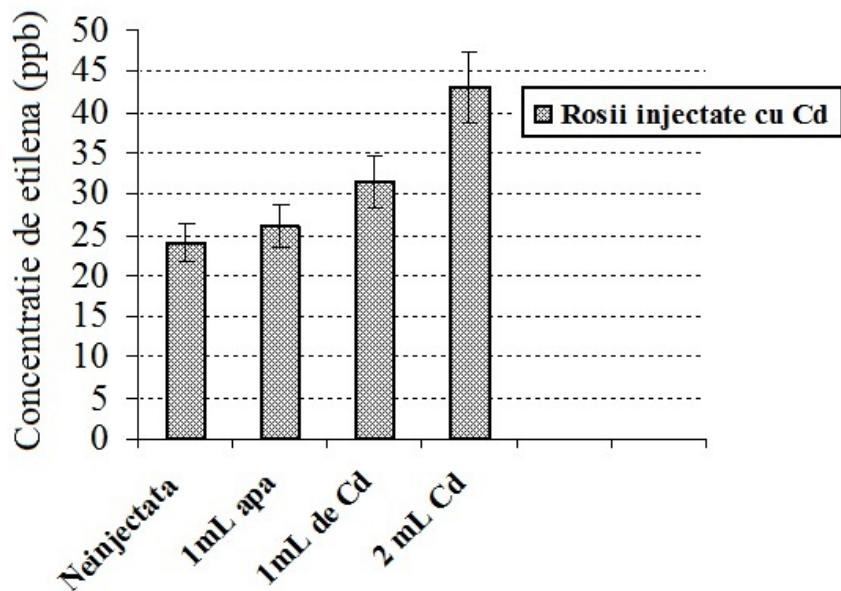


Figura 10. Emisia de etilena la rosiile cherry dupa 12 ore de la injectarea cu Cd.

Dupa cum se poate observa, in cazul celor 4 metale grele: Zn, Cu, Pb si Hg are loc producerea unui efect mai putin pronuntat comparativ cu efectul Cd asupra rosiilor cherry, odata cu marirea concentratiei de metal greu in fruct. Se poate concluziona ca efectul de injectare cu metal greu (respectiv Cd), conduce la cresterea productiei de etilena odata cu cresterea concentratiei de metal greu din fruct, acest tip de stres actionand in biosintезa etilenei in special la nivelul conversiei ASM in ACC, precursorul direct al etilenei.

In aceste "conditii de stres" are loc declansarea raspunsului complex impreuna cu sistemul de protectie, ducând la producerea si acumularea directa de specii reactive de oxigen (ROS) impreuna cu denaturarea proteinelor in fruct. Datele obtinute demostreaza potentialul utilizarii spectroscopiei laser fotoacustice in evaluarea randamentului de metabolizare a metalelor grele, astfel incat sa se obtina informatii de mare acuratete cu privire la impactul contaminantilor metalici asupra habitatelor.

A2.5. Alegerea tulpinilor microbiene pentru decontaminarea eficienta a metalelor grele si radionuclizilor-partea 1

Stabilirea unei strategii de bioremediere din punct de vedere al parametrilor operationali, precum si proiectarea diverselor modele de bioreactoare la nivelul carora sa fie testate strategiile de bioremediere implica optimizarea din punct de vedere al randamentului de bioaccumulare al metalului la nivelul microorganismului cei mai importanți parametrii fiind la sursa optima pentru microorganism si mediul de lucru (mediul de cultura, pH, temperatură, lumina, nivel de oxigen etc.). Celulele bacteriene sunt capabile sa concentreze o varietate de ioni metalici prin bioaccumulare. In cazul unor metale acumularea poate avea loc accidental deoarece acestea au structura similara elementelor necesare functionarii celulare si de aceea acestea sunt activ retinute in celula. Uraniul nu are un rol biologic cunoscut si, ca urmare, s-a sugerat ca uraniul poate fi acumulat in celule ca urmare a permeabilitatii membranare crescute cauzata de exemplu de toxicitatea sa. In aproape toate articolele s-a evidențiat ca uraniul a fost acumulat intracelular sub forma de fosfat de uranil de catre *Pseudomonas sp.* (Kazy et al., 2009; VanEngelen et al., 2010; Choudhary and Sar,

2011), desi intr-un studiu s-a identificat bioacumularea uraniului de catre un material organic izolat din mediu care este strans legat de *Arthrobacter ilicis* (Suzuki and Banfield, 2004). In ciuda interesului academic crescut exista dovezi slabe ca bioacumularea uraniului ar putea fi o solutie viabila de bioremediere a terenurilor si apelor contaminate.

Pe baza studiilor initiate in etapa anteroara de executie a proiectului s-au realizat experimente de testare a tulpinilor microbiene pentru decontaminarea eficienta a metalelor grele si radionuclizilor. In vederea testarii capacitatilor microbiene de a fixa ioni metalici, a fost utilizata tulpina de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (American Type Culture Collection) 27853. Tulpina este mentinuta in Colectia Centrului de Cercetare, Formare si Consulting in Genetica, Microbiologie si Biotehnologie (MICROGEN) in conditii standardizate internationale, in mediu LB cu 40% glicerol, la -70°C (freezer Revco), fiind furnizata pentru studii partenerului P3, INCDMRR.

Analizand rezultatele se observa o diminuare semnificativa a concentratiei de zinc in toate cele 3 probe analizate, concentratia maxima adsorbita fiind de 89% in 72 h si minima 83% in acelasi interval de timp, in timp concentratiile de cobalt si nichel din P2 si P3 sunt cvasi-stationare, iar cuprul se adsoarbe in proportie maxima de 28% in 72 h.

Rezultatele obtinute utilizand microorganismele de tip *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, ca si potentialul de bioabsorbtie si concentrare pe care unele dintre enzimele utilizate pentru constructia de biosenzori il au fata de contaminati de tip metale grele si radionuclizi au condus la urmatoarele ipoteze de proiectare a demonstratorului pentru bioreactor, pornind de la datele existente si in literatura :

- a. Model bioreactor discontinuu. Prima faza de proces din bioreactoarele discontinue este de obicei de sterilizare, dupa care mediul de cultura steril este inoculat cu microorganisme care au fost cultivate pentru a obtine un rezultat specific. In aceasta perioada de reactie dinamica, celulele, substraturile etc isi variaza concentratiile, produsiide reactie variind in timp. O buna amestecare pastreaza diferentele de compozitia si temperatura la niveluri acceptabile. Procesele sunt aerobe. Pentru a dezvolta cultivarea aeroba, mediul este aerat, prin furnizarea unui flux continuu de oxigen. Produse secundare gazoase formate, cum ar fi CO₂, sunt eliminate.
- b. Model bioreactor continuu. In reactoarele continue faza sterilă formata din microorganisme este alimentata continuu in bioreactor pentru a mentine starea de echilibru. Produsul obtinut este, de asemenea, eliminat continuu in afara reactorului. Variabilele de reactie si parametrii de control raman aceleasi cu deosebirea ca in reactor se genereaza o faza constanta in timp, care are ca rezultat cresterea productivitatii prin generarea continua de produs.
- c. Model bioreactor semi-continuu.

Primele abordari de proiectare implica un bio-reactor de bioremediere orizontal. Bioreactorul orizontal este definit de un container de siguranta si aparat folosit pentru crearea unor conditii de mixare pe baza de trei faze (solid, lichid si gaz) pentru cresterea ratei de bioremediere a solulului. In figura 11 este prezentata o schita a unui astfel de bio-reactor.

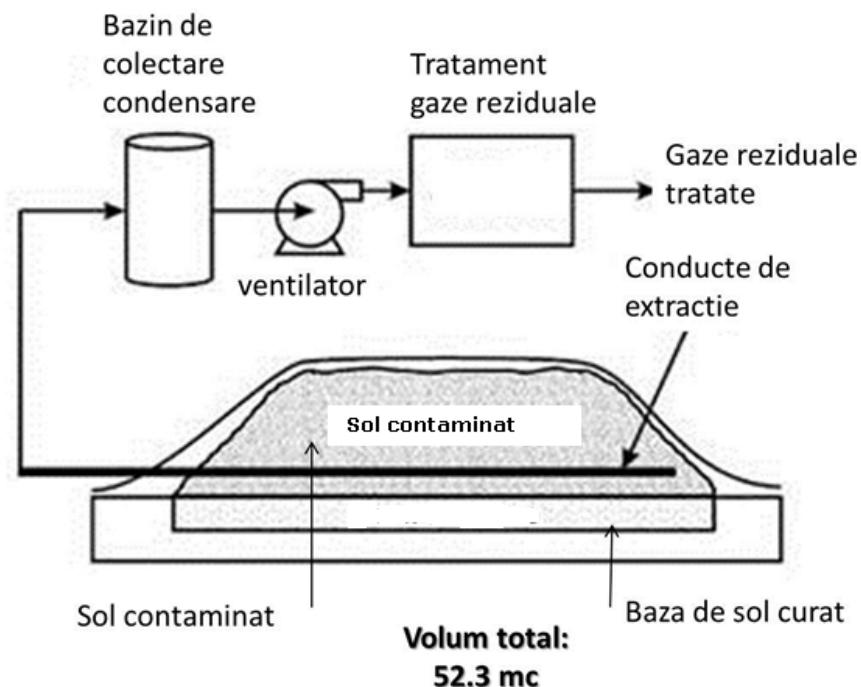


Figura 11. Schita bioreactor bioremediere orizontal

O serie de noi procese sunt in curs de elaborare, ca variante la tehnologiile de bioremediere care utilizeaza microorganisme. Unul dintre procedee implica utilizarea enzimelor izolate. Avantajul este ca acest proces nu are nevoie de hrana cu cerinte speciale cum este cazul microorganismelor vii. Cu toate acestea este necesara determinarea conditiilor optime de desfasurare a activitatilor catalitice enzimatiche

O problema suplimentara este faptul ca utilizarea enzimelor izolate este in general costisitoare la o singura de utilizare. In consecinta, timpi de reactie lungi pot fi acceptati in cazul in care factorii de cost prevad ca enzimele trebuie utilizate numai in concentratii scazute. Tehnologiile cu enzime imobilizate pot rezolva cu succes aceste dificultati. Cu enzima imobilizata intr-un pat sau tub, solutia de substrat pentru conversie este trecuta la produs de reactie. Produsul este colectat continuu ca efluent din bioreactor. Proiectarea si exploatarea unui reactor cu enzima imobilizata este similar cu cel al proceselor care utilizeaza cataliza eterogena. Sistemele eterogene permit recuperarea produselor la costuri mici de separare generand sisteme omogene corespunzatoare.

Enzima poate fi imobilizata pe o varietate de suporturi.

Variabilele care tin de functionalitatea bioreactorului sunt: conditiile de viabilitate celulara (mediul de cultura, temperatura, presiunea oxigenului, nutrienti) si transferul de masa; fluxul de fluid; dinamica de curgere, care trebuie asigurata de modelul constructiv.

Un model de bioreactor fezabil, utilizabil pentru elaborarea strategiilor de bioremediere atat pe baza de microorganisme cat si pe baza de enzime este prezentat in figura 12.

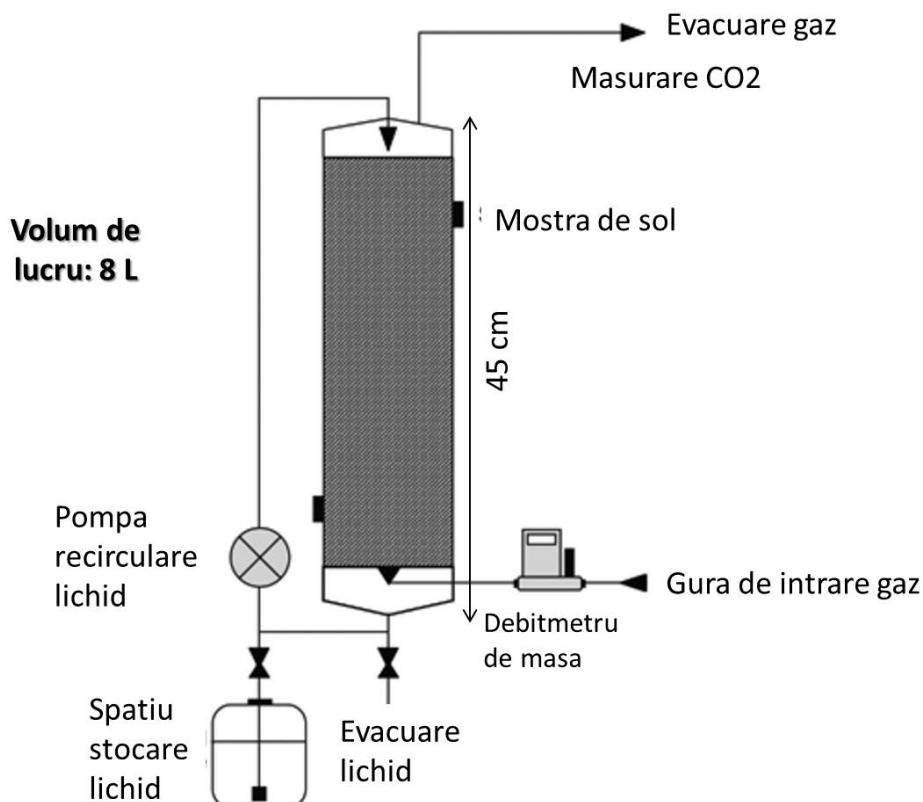


Figura 11. Schita bioreactor bioremediere vertical-prototip laborator

Concluzii

Ca urmare a activitatilor de CD realizate in aceasta etapa a fost demonstrata eficienta in anumite cazuri de contaminare a micro-organismelor selectate (*Pseudomonas aeruginosa*) pentru elaborarea strategiei de bioremediere.

Au fost dezvoltati, caracterizati si optimizati partial noi biosenzori pentru determinarea metalelor grele si radionucliziilor: Au-SPE/ALP; C-SPE/ALP; AcP-RG-ITO care si-au demonstrat aplicabilitatea pentru monitorizarea nivelelor de Zn (II), Hg (II), Cr (III).

Cele mai bune rezultate s-au obtinut pentru Hg(II) care determina o inhibtie a sunstratului de cca 73%.

Rezultatele obtinute au fost validate parțial, inter-laborator, biosenzorii pe baza de ALP dovedindu-se sensibili și precisi în determinarea continutului de Hg(II).

Au fost structurate primele modele de bioreactoare utilizabile în testarea strategiilor de bioremediere.

S-a demonstrat potentialul utilizării spectroscopiei laser fotoacustice în evaluarea randamentului de metabolizare a metalelor grele, astfel încât să se obțina informații de mare acuratețe cu privire la impactul contaminanților metalici asupra habitatelor.

Bibliografie

1. Choudhary S., Sar P., *Uranium biomineralization by a metal resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from contaminated mine waste.* J. Hazard. Mater. 2011, 186, 336–343.
2. Choudhary S., Sar P., *Identification and characterization of uranium accumulation potential of a uranium mine isolated *Pseudomonas* strain,* World J Microbiol Biotechnol. 2011, 27,1795–1801
3. Suzuki Y., Banfield J.F., *Geomicrobiology of uranium.* Rev. Mineral. Geochem. 1999, 38, 393–432.
4. Kazy S.K., D'Souza S.F., Sar P., *Uranium and thorium sequestration by a *Pseudomonas* sp.: mechanism and chemical characterization.* J. Hazard. Mater. 2009, 163, 65–72.
5. Suzuki Y., Banfield J.F., *Resistance to, and accumulation of uranium by bacteria from a uranium-contaminated site.* Geomicrobiol. J. 2004, 21, 113–121
6. VanEngelen M.R., Field E.K., et al. *UO_2^{2+} speciation determines uranium toxicity and bioaccumulation in an environmental *Pseudomonas* sp. isolate.* Environ. Toxicol. Chem. 2010, 29, 763–769.