

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

**Perioada de raportare :** 07.12.2016 - 29.09.2017

Cuprins	Pag
Consortiu, obiective	1
Rezumatul etapei a IV-a de implementare a proiectului	2
A 4.1. Proiectarea tehnologiei de bioremediere-partea a 2-a; A.4.4. Realizare demonstrator (transfer din 2016)	2
A 4.2. Integrarea biosenzorilor enzimatici si microbieni intr-o retea	12
A 4.3 Comparari inter-laborator (transfer din 2016).	14
A.4.5. Diseminare rezultate	15
Concluzii	16

**Proiectul IMONBIO** este realizat de un **consorțiu** 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 modificate/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 IV a de implementare a proiectului**

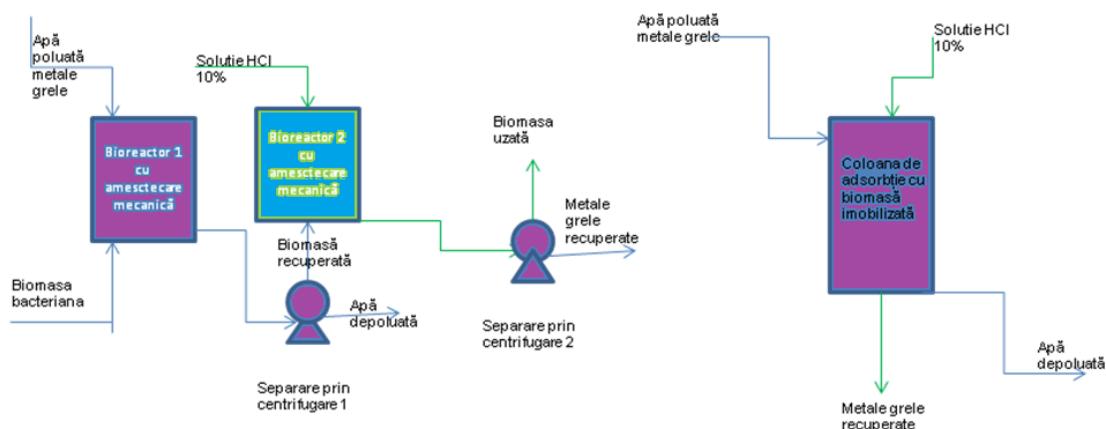
**Activitatile specifice etapei a IV-a de raportare pentru proiectul IMONBIO au fost:**

#### A 4.1. Proiectarea tehnologiei de bioremediere-partea a 2-a

#### A.4.4. Realizare demonstrator

Rezultatele obtinute in etapa anterioara de executie a proiectului au condus la urmatoarele concluzii privind tehnologia de bioremediere:

- se pot propune două variante de flux tehnologic pentru proiectarea instalației de bioremediere, astăzi sunt prezentate în figura de mai jos;



- tulipa microbiana care prezinta cel mai mare randament pentru decontaminarea eficienta a metalelor grele si radionuclizilor este *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
  - s-a demonstrat ca materialul ceramic potrivit pentru fixarea inoculului microbial este pulberea ceramica de tip frita-cordierit cu granulatie < 2mm, achizitionat de la Institutul National de Cercetare Dezvoltare pentru Inginerie Electrica ICPE-CA in anul 2016.
  - In etapele de optimizare a conditiilor de lucru s-a demonstrat ca raportul optim pentru randament maxim de adsorbire a metalelor grele este de 5g material ceramic la 200 mL suspensie inocul bacterian.

Pe baza acestor concluzii s-a definit tehnologia de bioremediere si s-a construit bioreactorul -scara pilot de laborator- a carui functionalitate a fost testata si validata in aceasta ultima etapa de implementare a proiectului.



### FISA TEHNICA TEHNOLOGIE

- A. Compoziția mediului King B la 1000mL: 20g peptonă din carne, 0.4g MgSO<sub>4</sub>, 1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8mL glicerol, pH 7.0.  
 B. Densitate celule inocul  $1 \times 10^6$  celule/ml. Volum insamantare 1% procente volum.  
 C. Cantitati material adsorbant utilizeate in experimentele batch anterioare

Cantitate g	Volum mediu King B ml	Cod Proba	Tip granule	Cantitate extrasă la fiecare proba ml	Volum soluție HCl 10% utilizat pentru resolubilizare de pe depozitul centrifugat ml
5	200	3	Granulație < 2mm Frita cordierit < 2mm	20	10

D. Cantitati recomandate pentru experiment bioreactor coloana de adsorbție Volum 2L

Cantitate Material adsorbant tip 3 g	Volum mediu King B ml	Cod Prob a	Tip granule	Concentrație metal Cu calculata mg/L	Volum solutie metal recomandaat pentru circulare/recirculare	Cantitate extrasă la fiecare proba ml	Volum soluție HCl 10% utilizat pentru resolubilizare de pe depozitul centrifugat ml	Observatii	Preleva ri
5*2000/200 = 50 g	2000	3	Granulație < 2mm Frita cordierit < 2mm	100	Minim 2 L maxim 4 L	20	10	Mediul king B insamantat cu inocul în concentrată recomandată se recircula la viteza scăzuta a debitului prin coloana de adsorbție de minim 4 pasaje prin coloana de adsorbție timp minim de 3 ore pentru a permite aderența bacteriei la materialul adsorbant. Abia după aceea se trece la introducerea soluției de metal Cu 100 mg/L pentru studiul adsorbției desorbției	Interval de prelevare minim 3 ore maxim 24 ore Puncte de prelevare înainte și după coloana de adsorbție Daca se poate, și în punct de prelevare din interiorul coloanei la mijloc

Prototipul bioreactorului a fost proiectat si realizat constructiv folosind varianta instalatiei de tip coloana, parametrii constructivi fiind urmatorii:

- volum: 1 L
- material: sticla termorezistenta
- capac cu orificii pentru introducerea instrumentelor de control ale pH-ului, vitezei de agitare si pentru barbotare O<sub>2</sub>.

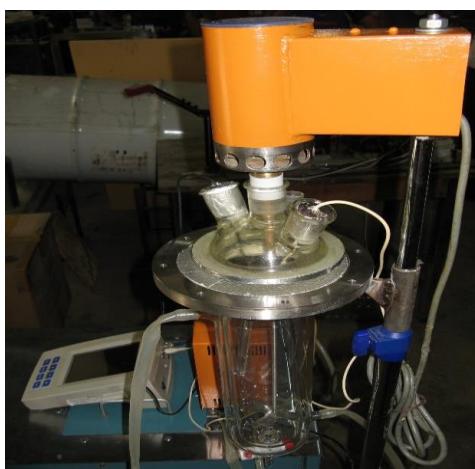


Fig.1. Bioreactor pentru bioremediera microbiana a metalelor grele – prototip de laborator

## Tehnologia de bioremediere

### Mod de lucru. Materiale

#### 1. Inocul bacterian

Materialul bacterian brut de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a fost procurat de la societatea Sanimed International Impex S.R.L., sub forma de tulipa de referinta liofilizata, impreuna cu lichidul de hidratare (mediu TSB).

S-a utilizat mediul de cultura King B lichid, stiut fiind faptul ca acest mediu stimuleaza sinteza de siderofori. Compozitia mediului King B la 1000mL: 20g peptona din carne, 0.4g MgSO<sub>4</sub>, 1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8mL glicerol, pH 7.0.

In vederea insamantarii tulpinii bacteriene de *P.aeruginosa* ATCC 27853, aceasta a fost cultivata in mediu Luria-Bertani lichid (10g peptona din carne, 5g extract de drojdie, 10g NaCl, pH 7.0, la 1000mL apa distilata) la 28°C cu 250 rpm agitare orbitala in shaker Certomat 3300. Pentru activarea tulpinii bacteriene au fost realizate 3 pasaje succesive, in aceleasi conditii, cate 24h.

Pentru prepararea inoculului bacterian, ultimul pasaj a fost centrifugat 10min la 10.000rpm in centrifuga Sigma cu racire 4oC. Dupa doua spalari in apa distilata sterilă, densitatea celulara a fost citita la spectrofotometru (600nm) si ajustata la 1 x 10<sup>6</sup> celule/ml.

Acest inocul a fost insamantat in proportie de 1% in flacoanele cu mediu King B si respectiv, cu mediu King B suplimentat cu ioni metalici de cupru. Solutia de cupru a fost preparata folosind Cu solid dizolvat in HNO<sub>3</sub> si apa ultrapura.

## **2. Pregatirea coloanei de adsorbtie - bioreactor**

S-a folosit o cantitate de material adsorbant (tip frita-cordierit cu granulatie < 2mm) de 25 de g pentru a fixa 1000 mL avand urmatoarea componitie: 20g peptona din carne, 0.4g MgSO<sub>4</sub>, 1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8mL glicerol, pH 7.00.

S-a folosit 1 L solutie de cupru de concentratie 100 mg/L pentru circulare/recirculare in coloana de adsorbtie.

Mediul king B insamantat cu inoculul in concentratia mentionata s-a recirculat la viteza scazuta a debitului prin coloana de adsorbtie de minim 4 pasaje prin coloana de adsorbtie timp minim de 3 ore pentru a permite aderenta bacteriei la materialul adsorbant.

S-a continuat prin introducerea solutiei de metal Cu 100 mg/L pentru studiul adsorbtiei desorbtie.

S-au prelevat probe timp de 24 ore, la intervale de 3 ore, in puncte de prelevare inainte, in interiorul si post - coloana de adsorbtie.

S-a utilizat un volum de 5 mL volum solutie HCl 10% pentru resolubilizare de pe depozitul centrifugat.

## **Rezultatele aplicarii tehnologiei de bioremediere**

Tinand seama de datele de literatura, care raporteaza un grad de biosorbtie a metalelor grele chiar si pe celule moarte de microorganism, demonstrarea functionalitatii modelului demonstrator de bioremediere s-a facut pe experimente paralele, luand ca „martor” procesul care are loc si cand in bioreactor se introduc celule moarte. Biosorbtia rapida a cuprului pe celulele moarte de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 este in acord cu biosorbtia acestui metal pe celule liofilizate de *P. aeruginosa*<sup>1</sup> si *P. cepacia*<sup>2</sup>, care s-a finalizat dupa 10 min timp de contact. Acest proces rapid de biosorbtie s-a corelat cu caracteristicile biomasei si interactiile fizico-chimice cu ionul metalic<sup>3</sup>. Retinerea de metal microbial de catre celulele moarte, care este un proces pasiv de legare de peretii celulei, independent de metabolism (adsorbtie) ca si de alte suprafete exterioare, este considerat in general un proces rapid, care are loc in cateva minute<sup>4</sup>. Sorbtia rapida de metal este, de asemenea, de dorit in actiunea biosorbentilor pentru aplicatii practice<sup>5</sup>.

**Efectul timpului de reactie asupra biosorbtiei** . In figura 2 este prezentat efectul timpului de reactie asupra biosorbtiei Cu(II) din solutii apoase.

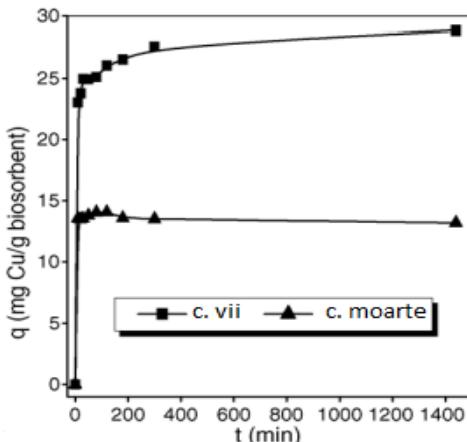
<sup>1</sup> P. Sar, S.K. Kazy, R.K. Asthana, S.P. Singh, Int. Biodeterior. Biodegrad. 44 (1999) 101

<sup>2</sup> G.M. Gadd, Fungal response towards heavy metals, in: R.A. Herbert, G.A. Codd (Eds.), Microbes in Extreme Environments, Academic Press, London, 1986, pp. 83–110

<sup>3</sup> I. Ingleton, P. Simmons, J. Chem. Technol. Biotechnol. 65 (1996) 21.

<sup>4</sup> G.M. Gadd, L. De Rome, Appl. Microbiol. Biotechnol. 29 (1988) 610.

<sup>5</sup> B. Volesky, in: B. Volesky (Ed.), Biosorption of Heavy Metals, CRC Press, Boca Raton, FL, 1990

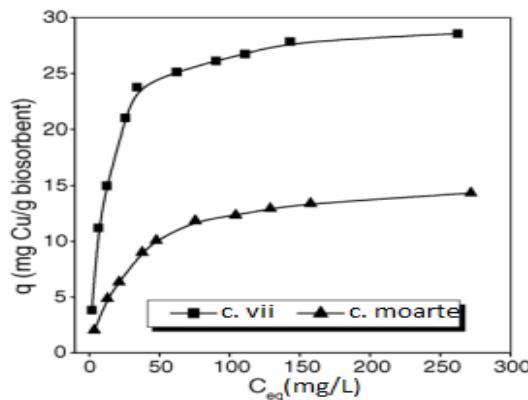


**Fig. 2.** Efectul timpului de reactie asupra biosorbtiei Cu (II) de catre celulele vii si moarte de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Pentru a evita atribuirea incorecta, de tip artefact, a efectului de biosorbtie a Cu (II) de catre *P.aeruginosa*, s-a demonstrat functionalitatea bioremedierii de catre celulele vii de *P.aeruginosa* in raport cu procesele care au loc atunci cand pe coloana sunt introduse celule moarte. Viteza de biosorbtie a cuprului de catre celulele moarte a fost foarte rapida, atingand aproape 96% din capacitatea maxima de adsorbtie dupa 10 min timp de contact. Se constata o usoara scadere a sorbtiei Cu(II) de catre celulele moarte la 120 min, dupa care ramane aproape constanta. Aceasta se poate explica printr-o usoara eliberare a Cu(II) in solutie si este in concordanta cu datele de literatura care raporteaza

Se mai poate vedea ca biosorbtia metalelor de catre celulele vii consta din doua faze: o prima faza rapida (10-30 min) si o a doua faza, mai lenta. Aceasta sugereaza ca are loc nu numai sorbtia la suprafata, ci si o preluare mai lenta de metal dependenta de metabolism. In toate cazurile apare ca celulele vii prezinta o capacitate mai mare de biosorbtie decat celulele moarte (Fig.2), ceea ce este in acord cu biosorbtia Cu(II) pe celule ramase si inactivate de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 . Acest rezultat poate fi atribuit acumularii intracelulare de ioni metalici care are loc in celulele vii, ceea ce conduce la amplificarea capacitati de retinere a metalului.

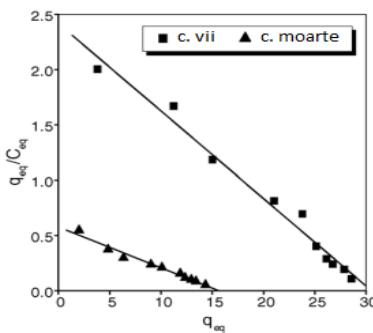
**Efectul concentratiei initiale de metal asupra capacitatii de biosorbtie.** A fost validat in conditiile de lucru specifice tehnologiei de bioremediere domeniul de concentratii de metal greu pana in care bioremedierea este eficienta. Capacitatea de biosorptie a Cu (II) de catre celulele vii a crescut rapid atunci cand concentratia initiala de metal a crescut pana la 50 mg/L, dupa care s-a observat o crestere usoara dupa cum se arata in figura 3.



**Fig. 3.** Efectul concentratiei initiale a Cu (II) asupra biosorbtiei de catre celulele vii si moarte de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

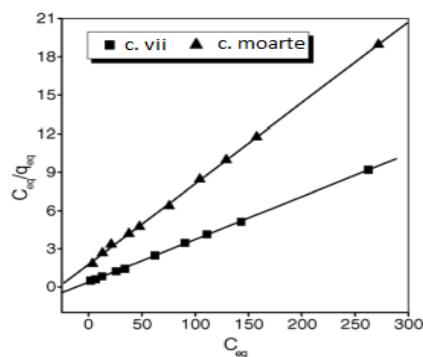
Celulele moarte au indicat o crestere progresiva a biosorbtiei Cu (II) pana la concentratia de 100 mg/L, urmata de o crestere usoara. Cand concentratia initiala de Cu (II) a crescut de la 5,7 la 286,2 mg/L, capacitatea de biosorbtie a celulelor vii a crescut de la 3,8 la 28,6 mg/g, dar numai de la 2,0 pana la 14,4 mg/g pentru celulele moarte. De asemenea, s-a constatat ca valoarea capacitatii de biosorbtie a Cu (II) de catre celulele vii a fost semnificativ mai mare decat cea a celulelor moarte pentru toate concentatiile de metal. Cresterea capacitatii de biosorbtie a biomasei cu cresterea concentratiei de metal ar putea fi atribuita interactiunii dintre ionii metalici si biosorbenti. Mai mult decat atat, concentratia initiala mai mare a metalului asigura o forta motrice sporita pentru depasirea rezistentei la transferul de masa a tuturor metalelor intre fazele apoase si cele solide si sa accelereze coliziunea probabila dintre ionul de metal si sorbenti, care duce la o adsorbtie mai mare a metalelor.

**Izotermele de adsorbtie Langmuir si Freundlich.** Izoterna reprezinta relatia de echilibru dintre retinerea metalelor de catre sorbent si concentratia finala a metalului in faza apoasa, aratand capacitatea de sorbtie a sorbentului. Valoarea pH-ului 7,00 a fost aleasa ca o conditie experimentală optima pentru stabilirea izotermelor de adsorbtie. Pentru a evalua capacitatea de adsorbtie a Cu (II) de catre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, izotermele de adsorbtie au fost analizate si reprezentate utilizand ecuatia Scatchard. Cand graficul Scatchard a aratat o abatere de la liniaritate, s-a acordat o atentie mai mare analizei datelor de adsorbtie utilizand modelul Freundlich pentru a construi izotermele de adsorbtie la o concentratie particulara in solutii. Figura 4 prezinta caracteristicile de adsorbtie evaluate din graficul Scatchard. In adsorbtii de metale, analiza Scatchard a datelor de legare la echilibru a Cu (II) pe celulele *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 au dat nastere la un grafic aproape liniar, indicand faptul ca modelul Langmuir ar putea fi aplicat.

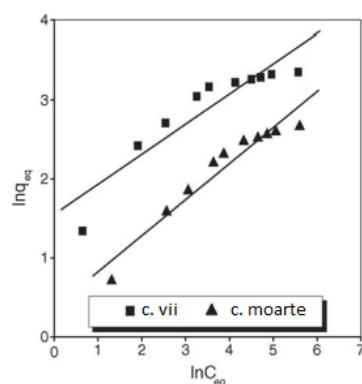


**Fig. 4.** Reprezentarea grafica Scatchard pentru adsorbția Cu (II) de catre celulele vii și moarte de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Liniarizarea izotermelor de adsorbție Langmuir și Freundlich pentru Cu (II) pentru celulele vii și moarte de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 este prezentată în figurile 5 și 6. Constantele de adsorbție, constanta de legare a metalului și coeficienți de corelare pentru Cu (II) obținute din izotermele Langmuir și Freundlich și analiza Scatchard sunt prezentate în Tabelul 1. Datele de adsorbție referitoare la Cu (II) oferă o corelare excelentă pentru izoterma Langmuir.



**Fig. 5.** Izoterma de adsorbție Langmuir a Cu (II) de catre celulele vii și moarte de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



**Fig. 6.** Izoterma de adsorbție Freundlich a Cu (II) de catre celulele vii și moarte de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

In experimentele de biosorbție a Cu (II), valoarea  $Q_{\max}$  a celulelor vii de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a fost de 29,9 mg/g, comparativ cu 15,8 mg/g a celulelor moarte. *P. cepacia*, valoarea

capacitatii de biosorbtie a cuprului de catre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a fost mai mica. Dar capacitatea sa de biosorbtie de catre celulele vii este comparativa cu *P. syringae* (25,4 mg/g). Mai mult decat atat, biosorbtia Cu (II) de catre celulele *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 este invariabil mai mare decat *P. putida* (6,6 si 6,9 mg/g). Se stie ca *b* este o constanta legata de afinitatea centrilor activi de legare, ceea ce ne permite sa facem o comparatie a afinitatii biomasei catre ionii metalici.

**Tabelul 1.** Parametrii izotermelor de adsorbtie pentru Cu (II) pe celulele vii si moarte de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Metal	Biosorbent	Izoterma Langmuir			Analiza Scatchard			Izoterma Freundlich		
		Q <sub>max</sub> (mg/g)	b (l/mg)	r <sup>2</sup>	K <sub>b</sub>	q <sub>m</sub> (mg/g)	r <sup>2</sup>	K <sub>f</sub> (mg/g)	n	r <sup>2</sup>
<b>Cu (II)</b>	celule vii	29,9	0,087	0,9997	12,62	30,05	0,9810	4,73	2,63	0,85
	celule moarte	15,8	0,036	0,9994	27,03	15,6	0,9762	1,45	2,19	0,9316

**Desorbtia Cu (II).** Rezultatele experimentului de biosorbtie si desorbtie a Cu (II) sunt raportate in tabelul 2. Acestea au demonstrat ca aproximativ 40-50% din metal a fost preluat in mod activ de catre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, restul fiind legat pasiv de bacterie. Aceasta indica faptul ca o solutie de 0,1 M HCl poate desorbi eficient legaturile de Cu (II) de pe celulele moarte, dar nu foarte eficient pentru celulele vii. De asemenea, se poate datora retinerii unei parti din Cu (II) de catre celulele vii prin acumularea intracelulara, deoarece este posibila indepartarea metalelor de pe suprafetele celulare dupa biosorbtie, dar nu si dupa bioacumulare.

**Tabelul 2.** Desorbtia Cu (II) din celulele vii si moarte de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 \*

Metal	Biosorbent	Sorbtie (mg/g)	Desorbtie (mg/g)	Desorbtie (%)
<b>Cu (II)</b>	celule vii	27,6 ± 0,51	20,0 ± 0,78	72,5 ± 1,8
	celule moarte	13,2 ± 0,68	12,5 ± 0,82	95,3 ± 2,6

\*Masuratorile au fost efectuate in triplicat, iar valorile afisate reprezinta media aritmetica a acestora, inclusiv deviatia standard.

**Concluzii.** A fost demonstrata functionalitatea modelului demonstrator si compatibilitatea utilizarii *P.aeruginosa* cu recuperarea metalelor, in bioreactoare simple asa cum a fost cel construit in cadrul IMONBIO.

#### **Varianta sistem de bioremediere, utilizand culturi de cereale**

In cadrul acestei a patra etape partenerul P2, a studiat potentialul spectroscopiei laser fotoacustice in evaluarea randamentului de metabolizare a patru metale grele prin monitorizarea etilenei si amoniacului din semintele de grau comun germinabile. Obiectivul general al acestei activitati a fost de a compara concentrațiile de etilenă si ammoniac din semintele germinate cu diferite dilutii de metal greu (prin amestecul acestora cu apa distilata) cu semintele germinate cu doar apa distilata, cu ajutorul spectroscopiei laser fotoacustice in infraroșu. Metalele grele studiate au fost Zn, Cu, Pb si Cd, randamentul de metabolizare fiind determinat prin masurarea optoacustica a emisiei de etilena si amoniac corespunzatoare.

Drept material biologic s-au utilizat 6 g de seminte germinabile de *Triticum aestivum*. S-au utilizat solutii de metal greu si apa distilata, in diferite proportii.

In principal s-a urmarit determinarea ratei de productie a etilenei ca raspuns la actiunea metalelor grele; cat de repede raspund plantele; gradul de distrugere a membranelor celulare pentru evaluarea tolerantei semintelor germinate la acumularea speciilor oxidante (" stres oxidativ") induse de metalele grele.

Semintele de grau comun, au fost germinate la temperatura camerei, in probe din policarbonat incolor, produse de Sabic, cu un volum specific de 0.83 cm<sup>3</sup>/g (figura 7).



Fig. 7. Capsula din policarbonat cu *Triticum aestivum* germinat in apa distilata la  $\approx 132$  h.

Pe parcusul experimentelor pentru detecția optoacustica a emisiei de amoniac si a etilena au fost utilizati următorii parametrii importanți: puterea fasciculului laser pe linia 10P(14) a laserului: 3.6 W iar pe linia 9R(30): 1.5 W; responsabilitatea celulei: 246 cmV/W ; linii laser de lucru: 10P(14), coeficient de absorbție maxim pentru etilenă:  $\lambda = 949.479 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\alpha = 30.4 \text{ cm}^{-1}\text{atm}^{-1}$ ; 9R(30), coeficient de absorbție maxim pentru amoniac:  $\alpha = 56 \text{ cm}^{-1}\text{atm}^{-1}$ ; presiunea cuvei: 1037 mbar; semnal in azot: 26  $\mu\text{V}$ ; aer sintetic: Linde Gaz România, 20% oxigen și 80% azot (impurități: hidrocarburi max 0,1 ppmV, oxizi de azot max 0,1 ppmV); azot : Linde Gaz România , 6.0 (puritate 99,9999 %); temperatura de lucru: 27<sup>0</sup> - 28<sup>0</sup>C ; volumul total cuvei de sticlă: 150 mL; volumul total al celulei fotoacustice: 1000 mL ;

Pentru a analiza conținutul probelor, am vidat mai întâi celula fotoacustica și intreg sistemul, apoi am spălat și curățat sistemul cu azot pur la presiune atmosferică (aproximativ 10-15 minute).

S-a conectat proba investigată la detector printr-un sistem etanș, proba din incinta fiind circulată cu un flux de gaz (de aer sintetic) la presiune atmosferică (1037 mbar ) după care gazul rezultat din cuva de sticlă a fost transferat în detector și analizat in timp real.

Măsurările au fost efectuate pe semintele de *Triticum aestivum* la temperatura camerei.

Germinarea graului comun a fost realizata pentru 6 g de seminte cu o cantitate totala de 0.1 mL metal greu diluat cu 10 mL apa distilata (analiza gazelor din respiratia semintelor germinate la: 93 ore). Pentru referinta s-au utilizat 6 g seminte cu 10 mL apa distilata. Gazul utilizat pentru antrenarea etilenei si a amoniacului a fost aerul sintetic la presiune atmosferica.

Figuram8 si tabelul 3, prezinta emisia de etilena si amoniac la semintele de *Triticum aestivum* germinate cu metal greu diluat cu apa distilata (Zn, Cu, Pb, Cd) corelata cu emisia de etilena si amoniac a semintelor germinate doar cu apa distilata (la 93 h).

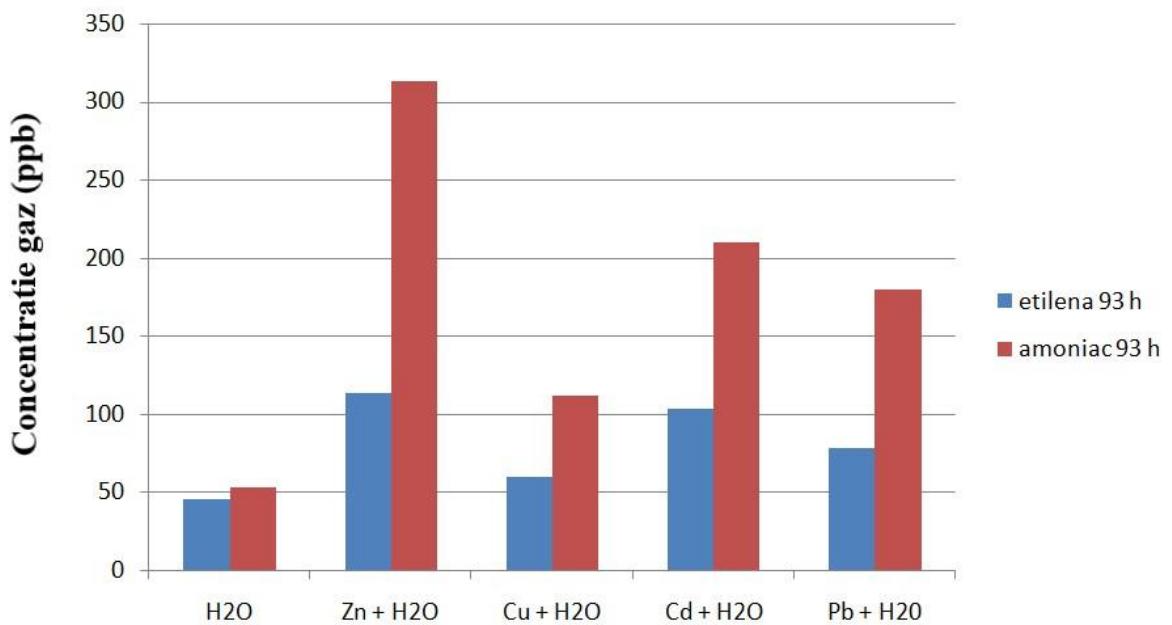


Fig. 8. Rata de producere a amoniacului si etilenei realizata pe semintele de *Triticum aestivum* germinate cu 0.1 mL metal greu diluat in apa distilat (10 mL) in comparatie cu semintele de *Triticum aestivum* germinate cu apa distilata 10 mL (Control).

Tabel 3. Concentratia de gaz in ppb

	Etilena (ppb) la 93 ore	Amoniac (ppb) la 93 ore
H <sub>2</sub> O	45	53
Zn + H <sub>2</sub> O	113	313
Cu + H <sub>2</sub> O	60	112
Cd + H <sub>2</sub> O	103	210
Pb + H <sub>2</sub> O	78	180

#### Activitatea A 4.2. Integrarea biosenzorilor enzimatici si microbieni intr-o retea

In aceasta ultima etapa de implementare a proiectului s-a tinut seama de rezultatele obtinute in etapele anterioare de executie lea proiectului care au condus la urmatoarele concluzii privind reteaua de biosenzori pentru monitorizarea gradului de contaminare cu metale grele si radionuclizi:

- in conditiile in care nu au fost obtinute rezultate bune utilizand micro-organismele ca si elemente de bio-recunoastere, pentru indeplinirea obiectivelor proiectului, tinand seama si de faptul ca enzima specifica ce participa in mecanismele de metabolizare a metalelor grele de catre *Pseudomonas aeruginosa* este fosfataza alcalina produsa de microrganism (vezi raport stiintific –etapa I), s-a luat decizia ca, in continuare, **biosenzorii microbieni sa fie inlocuiti de biosenzorii pe baza de fosfataza alcalina**. Aceasta decizie este sustinuta si de analiza cost-beneficiu, avand in vedere ca, din punct de vedere al realizarii demonstratorului pentru reteaua de senzori, utilizarea unei singure tehnici analitice de monitorizare conduce la rezultate mai fezabile si la instrumente de masura mai simple.
- Au fost optimizate doua unitati de biosenzori componente ale retelei:

1. **Unitatea 1** – C-SPE\_Grafit\_Lacc; potential de lucru: -0.025 V; analiza Pb (II); domeniul util de concentratii Pb(II): 6.6 ppb – 240 ppb; timp de viata 120 zile; nivel de curent masurat zeci/sute nA
2. **Unitatea 2** – Au-SPE/polyMB\_ALP; potential de lucru: +0.200 V; analiza Hg(II) si/sau  $(UO_2)^{2+}$ ; domeniul util de concentratii 30 ppb – 160 ppb; timp de viata 7 zile; nivel de curent masurat zeci/sute nA

In varianta constructiva optimizata se observa ca, pe domeniul de concentratii in care raspunsul la inhibitor este deschis de o ecuatie liniara, se evita si competitivitatea inhibtiei, raportul  $K_{inh}/K_{app,M}$  fiind subunitar. Ca urmare, pentru realizarea retelei de biosenzori este recomandabila utilizarea acestei variante pentru unitatile dedicate analizei Hg (II) si radionuclizilor. Daca necesitatile de analiza specifica, de teren, o cer, trebuie optimizata reteaua de senzori din punct de vedere al conditiilor de selectivitate (determinarea constantei de selectivitate si modulare a valorii pH-ului si a tariei ionice) pentru analiza in prezenta a mercurului si uraniului (VI).

In aceasta ultima etapa a proiectului, pentru ambele unitati, 1 si 2 - care functioneaza utilizand principiul inhibtiei activitatii enzimatico- a fost reconsiderat parametrul „timp de inhibtie”, pentru a ne asigura ca determinarile se fac la valorile maxime ale semnalelor de raspuns si ca este satisfacuta conditia sensibilitatii maxime a raspunsului. In conditiile optime de timp de inhibtie au fost apoi validate raspunsurile unitatilor de biosenzori (sensibilitatilor de raspuns) in conditiile de lucru optime stabilite anterior.

In figura 9 este prezentat profilul curbei de raspuns de inhibtie in functie de timpul de incubare al biosenzorului, pentru U (VI) si Hg (II). S-a ajuns la concluzia ca pentru determinarea U (VI) si Hg (II) timpul de incubare cu contaminantul, trebuie sa fie de 10 minute. La timpi mai mari inhibitia este completa.

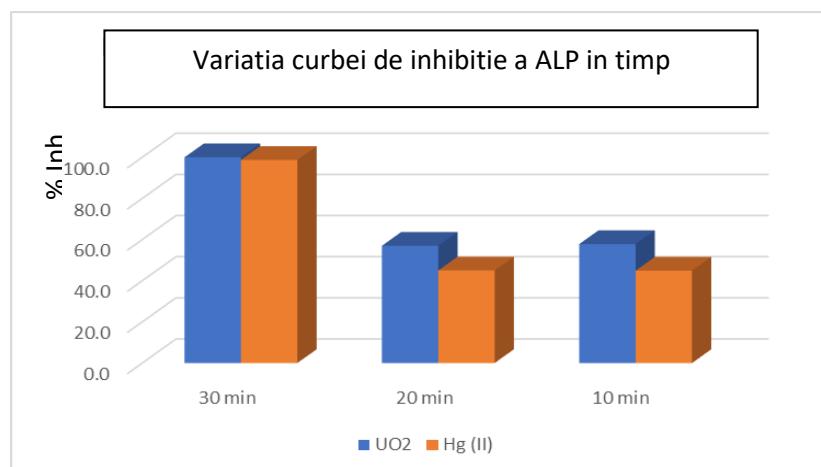


Fig. 9. Variatia gradului de inhibtie a ALP cu timpul de incubare – instrument de masura biosenzori Au-SPE/polyMB\_ALP

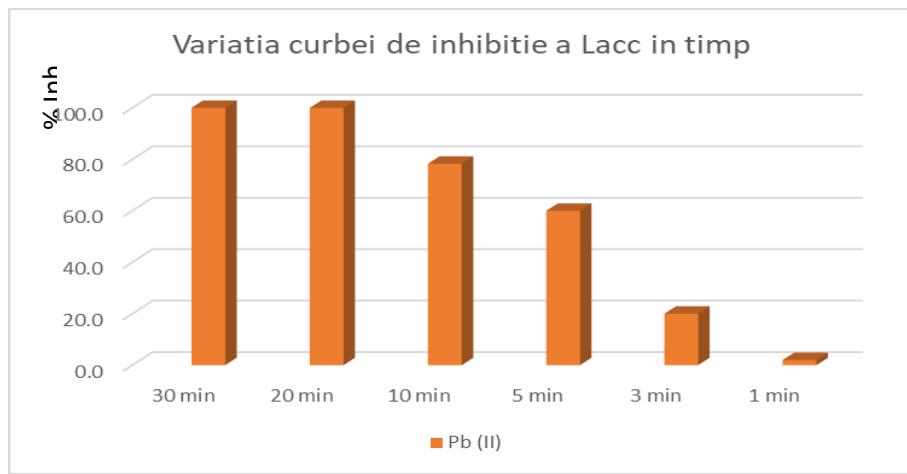


Fig. 10. Variatia gradului de inhibitie a Lacc cu timpul de incubare-instrument de masura biosenzori C-SPE\_Grafit\_Lacc

Dupa cum se observa din figura 8, timpul optim de incubare a biosenzorului cu solutia care contine contaminantul Pb (II) este intre 5 si 10 minute. S-a decis, pe baza stabilitatii si reproductibilitatii raspunsului la 10 min de incubare ca acesta va fi timpul pentru masurari.

**S-a dezvoltat o a treia unitate de senzori, pentru determinarea Zn(II) utilizand celulele screen-printate disponibile comercial, furnizate de catre DROPSENS. Cele doua metale nu pot fi determinate in prezena, caracteristicile de raspuns pentru senzorul electrochimic fiind**

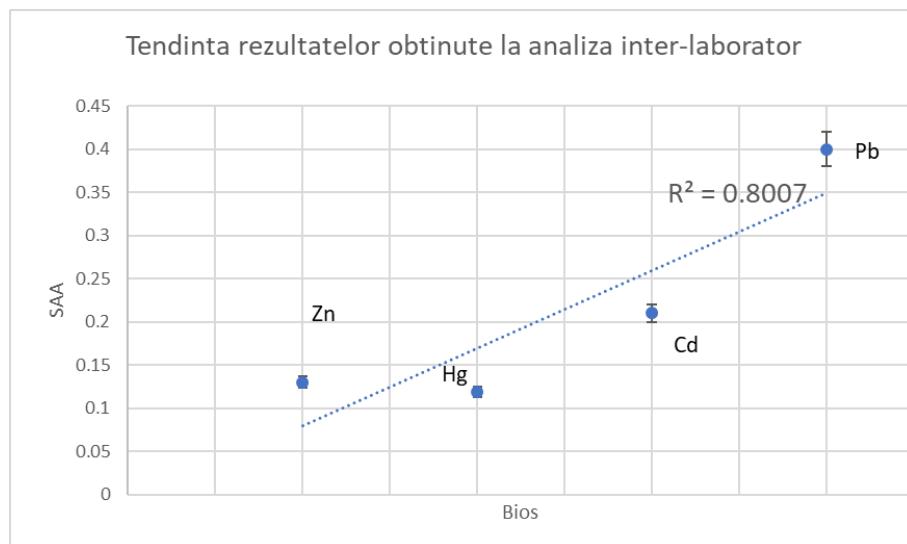
Parametru	Caracteristica
Raspuns senzor	Ec. curbei de raspuns $I (\text{nA}) = 2680,70 \times C (\text{mmolL}^{-1}) - 90,47; R=0,9920$
Domeniul dinamic de raspuns	$2.00 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1} - 2.50 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$
Limita de detectie	$1.05 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$
Timp de viata	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Stabilitate la stocare 36 luni</li> <li>▪ Stabilitate operationala 10 masurari consecutive</li> </ul>

Principalele dezavantaje ale acestei unitati sunt: raspunsul este afectat de interferente majore (inclusiv raspunsul electrochimic al oxigenului) atunci cand se aplica tehnica cronoamperometrica, datorita valorii potentialului specific al Zn.

#### A 4.3 Comparari inter-laborator.

Probele cu continut cunoscut de metale grele si radionuclizi au fost furnizate de catre INCDMRR catre CO -INCDSB, P2-INFLPR si CPMed Laboratory. Determinarile au fost realizate de catre INCDMRR prin SAA, de catre CO-INCDSB utilizand unitatile de biosenzori ai retelei si de catre P2 pentru probele ca atare. Rezultatele obtinute sunt prezentate comparativ in figura 11.

Dupa cum se observa, corelatia intre determinarile concentratiilor de metale grele efectuate prin SAA, respectiv prin analiza utilizand biosenzori este satisfacatoare, ne-existant, desigur, o suprapunere perfecta intre valorile obtinute. Cea mai mare eroare se obtine la analiza Pb (II), Hg (II) contribuind la abaterea de la liniaritate, probabil datorita raspunsului complex al biosenzorului Au-SPE/polyMB\_ALP.



Rezultatele valideaza raspunsurile biosenzorilor.

Pentru probele cu Cu (II) supuse tehnologiei de bioremediere au fost realizate determinari inainte si dupa tratarea tehnologica.

Rezultatele obtinute sunt prezentate in tabelul 4.

Proba	Concentratie metal inainte de bioremediere		Concentratie metal dupa bioremediere
	Calculata	Determinata SAA	
Cu	100 mg/L	99.987 mg/L	41.966 mg/L

Eficienta tehnologiei de bioremediere cu *P. Aeruginosa* este foarte ridicata la concentratii mici ale Cu (II), cca 76%, pe masura ce creste concentratia eficacitata metabolizarii scazand, dar mentionandu-se la valori acceptabile pentru concentratii de 100 ppm Cu (II).

#### Activitatea A4.5. Diseminare rezultate

Articole in care sunt aduse multumiri proiectului 72/2014:

ISI:

1. C. Popa (Achim) et al., "Photoacoustic response of cherry tomatoes contaminated with car engines pollution and UV radiation", OPTOELECTRONICS AND ADVANCED MATERIALS – RAPID COMMUNICATIONS, Vol. 11, No. 3-4, (2017), p. 262 – 266.
2. C. Popa (Achim), M. Petrus,"Heavy metals impact at plants using photoacoustic spectroscopy technology with tunable CO<sub>2</sub> laser in the quantification of gaseous molecules", Microchemical Journal Vol. 134, (September 2017), p. 390–399, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.07.006>
3. M. Petrus, A.M. Bratu and C. Popa (Achim), Rom. Rep. Phys. 69, No.2, p. 609 (2017).

Non ISI:

1. Cristina Achim (Popa), et al. "Impactul metalelor grele asupra plantelor/ REVISTA STIINTA & TEHNICA 61 Noiembrie, 104-107 (2016).

Capitole carte

1. C. Popa, M. Petrus, A.M. Bratu, M. Patachia, S. Banita, D.C. Dumitras, "Food safety test by laser photoacoustic spectroscopy assessment"/, Editura Universitatii Transilvania, Brasov, Editor. Florescu Monica, Chapter in "Biophysics for Biomedical and Environmental Sciences", pages: 65-82, 2016, ISBN 978-606-19-0768-7.
2. C. Popa and M. Petrus, "Spectroscopic analysis of some heavy metals on the contaminated vegetation", Editura Universitatii Transilvania, Brasov/ Editor. Florescu Monica, Chapter in "Biophysics for Biomedical and Environmental Sciences", pages: 83-108, 2016, ISBN 978-606-19-0768-7.

## **CONCLUZII**

Unitatile de biosenzori optimizate anterior au fost validate, si au fost utilizate cu rezultate bune in studii inter-laborator.

A fost dezvoltata si o a treia unitate de senzori electrochimici, pe baza de film de bismut, pentru determinarea Zn(II) si au fost stabiliti parametrii optimi de lucru.

S-a realizat modelul demonstrator si s-a validat functionalitatea acestuia; in acest scop a fost construit un prototip de laborator pentru bioreactor, au fost testate conditiile specifice tehnologiei de bioremediere utilizand *P. Aeruginosa* tulipa ATCC 27853 si s-au validat ipotezele de lucru utilizand ca model bioremedierea unei solutii de Cu(II) de concentratie 100ppm. S-a demonstrat aplicabilitatea tehnologiei pe un domeniu mai larg de concentratii, cuprins intre 5 ppm si 286 ppm, eficienta procesului de bioremediere fiind foarte buna pana la 180 ppm.