



MD 4200 C1 2013.09.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4200** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int.Cl: *B82Y 5/00* (2011.01)
B82Y 35/00 (2011.01)
C12N 1/12 (2011.01)
C12Q 1/02 (2011.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

<p>(21) Nr. depozit: a 2012 0058 (22) Data depozit: 2012.07.05</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2013.02.28, BOPI nr. 2/2013</p>
<p>(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: RUDIC Valeriu, MD; CEPOI Liliana, MD; RUDI Liudmila, MD; MISCU Vera, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; SADOVNIC Daniela, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p>	

(54) **Procedeu de apreciere a toxicității nanoparticulelor cu ajutorul microalgei roșii *Porphyridium cruentum***

(57) Rezumat:

1 Invenția se referă la nanobiotehnologie, în
special la un procedeu de apreciere a toxicității
5 nanoparticulelor pentru microalge și poate fi
utilizată în calitate de parte componentă a
sistemelor de monitorizare a calității mediului
10 și a inofensivității proceselor tehnologice de
sinteză și utilizare a nanoparticulelor.

Procedeul, conform invenției, include culti-
15 varea microalgei roșii *Porphyridium cruentum*

2 timp de 6 ore pe mediu nutritiv, cu adăugarea
5 peste o oră după inocularea microalgei a
nanoparticulelor în diferite concentrații, după
care în biomasa algală se determină conținutul
10 de dialdehidă malonică, totodată sunt consi-
derate toxice concentrațiile de nanoparticule
care provoacă creșterea conținutului de
15 dialdehidă malonică în biomasă.

Revendicări: 1

MD 4200 C1 2013.09.30

(54) Method for assessing the toxicity of nanoparticles by means of red microalga *Porphyridium cruentum*

(57) Abstract:

1
The invention relates to nanobiotechnology, in particular to a method for assessing the toxicity of nanoparticles to algae and can be used as component part of the systems for monitoring the environment quality and safety of nanoparticle utilization and synthesis technological processes.

The method, according to the invention, comprises the cultivation of red microalga *Porphyridium cruentum* for 6 hours on a nutrient medium with addition in an hour after

2
microalga inoculation of nanoparticles in different concentrations, afterwards in the alga biomass is determined the content of malonic dialdehyde, at the same time are considered toxic the concentrations of nanoparticles that cause the enhancement of malonic dialdehyde content in the biomass.

Claims: 1

(54) Способ оценки токсичности наночастиц при помощи красной микроводоросли *Porphyridium cruentum*

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к нанобиотехнологии, в частности к способу оценки токсичности наночастиц для микроводорослей и может быть использовано в качестве составной части систем мониторинга качества среды и безопасности технологических процессов синтеза и использования наночастиц.

Способ, согласно изобретению, включает культивирование красной микроводоросли *Porphyridium cruentum* в течение 6 часов на питательной среде, с добав-

2
лением через час после инокуляции микроводоросли наночастиц в разных концентрациях, после чего в биомассе водоросли определяется количество малонового диальдегида, при этом считаются токсичными концентрации наночастиц которые способствуют повышению количества малонового диальдегида в биомассе.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la nanobiotehnologie, în special la procedeele de stabilire a toxicității nanoparticulelor cu ajutorul indicatorilor biologici în baza activității antioxidante a biomasei și poate fi utilizată în calitate de parte componentă a sistemelor de monitorizare a calității mediului și a inofensivității proceselor tehnologice de sinteză și utilizare a nanoparticulelor.

Dezvoltarea nanotehnologiei care se înregistrează în ultimele decenii a înregistrat deosebite succese, în special la nivelul nanomaterialelor, care se caracterizează prin eminență atât din punct de vedere al cunoașterii fundamentale, cât și din punct de vedere al aplicărilor practice.

Paralel cu dezvoltarea acestei ramuri de perspectivă a științei, crește riscul expunerii omului și a mediului la acțiunea nanomaterialelor. Deoarece mediul acvatic este foarte vulnerabil față de contaminarea directă sau indirectă cu nanoparticule, studiul reacțiilor de răspuns a organismelor acvatice la acțiunea acestor materiale este foarte oportună.

Sistemele hibride nanomateriale – microorganismele, oferă posibilitatea de a efectua un studiu perfect al toxicității nanoparticulelor asupra organismului și al posibilelor efecte benefice ale lor.

Microalgele prezintă obiecte foarte comode și reprezentative, care oferă facilități enorme în modelarea diferitor efecte și stabilirea mecanismelor de acțiune a diferitor compuși asupra proceselor vitale din celulă, de aceea anume aceste obiecte acvatice sunt obiecte model foarte comode pentru stabilirea posibilelor efecte toxice.

În prezent mai multe specii de microalge (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Euglena gracilis*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus sp.* ș.a.) sunt utilizate în calitate de modele pentru stabilirea toxicității diferitor tipuri de nanomateriale. În calitate de repere se apreciază diferiți indicatori fiziologici, biochimici și genetic moleculari.

Este cunoscut procedeul de stabilire a toxicității nanoparticulelor cu utilizarea microalgei *Chlorella vulgaris*, care presupune efectuarea testului de inhibiție a creșterii algei. Procedeul presupune expunerea culturii de microalgă, aflată la etapa de creștere exponențială, acțiunii nanomaterialelor în diferite concentrații și calcularea ratei de inhibiție a creșterii în baza relației matematice: $RI(\text{rata de inhibiție}) = (1 - N/N_0) \times 100\%$, unde N – numărul de celule într-un ml de suspensie cu adaos de nanomateriale, iar N_0 – numărul de celule într-un ml de suspensie a culturii control [1].

Neajunsul acestui procedeu constă în faptul că diferențe semnificative în rata de creștere a microalgei la diferite concentrații de nanoparticule pot fi înregistrate la cel puțin 72 ore de la expunere. Astfel, durata totală a cultivării clorelei este de minimum 8 zile, ceea ce ridică semnificativ costul aplicării procedurii dat. Răspunsul cu referire la nivelul de toxicitate al nanoparticulelor, de asemenea, poate fi obținut nu mai devreme decât în acest termen.

Mai este cunoscută și aplicarea testelor antioxidante în scopul stabilirii toxicității diferitor substanțe pentru culturile microalgale. Astfel, pentru a aprecia toxicitatea diferitor substanțe pentru *Euglena gracilis* în calitate de reper sunt aplicate atât teste de stabilire a activității antioxidante, cât și teste de microscopie. Acest test include cuantificarea radicalului OH, stabilirea activității antioxidante totale, testul microscopic de viabilitate cu aplicarea diacetatului de fluoresceină [2]. Acest test este recomandat în calitate de test biologic *in vitro* pentru stabilirea toxicității poluanților acvatici.

Neajunsul acestui tip de testare constă în faptul că procedura este una foarte laborioasă, care necesită aplicarea tehnicilor sofisticate de analiză (gaz-cromatografie, microscopie fluorescentă) și investiții materiale și de timp substanțiale.

Cea mai apropiată soluție de obiectul revendicat constituie procedeul de evaluare a toxicității nanoparticulelor cu utilizarea algei verzi *Chlamydomonas reinhardtii*. Acest model include aprecierea creșterii culturii, nivelul de peroxidare lipidică, transcripția genelor *cat*, *sodl*, *gpx*, *ptox2*. În cadrul acestui model unul din teste este cel de determinare a nivelului de dialdehidă malonică (DAM) în biomasa microalgală. Esența acestui model constă în aplicarea în ansamblu a acestor teste specifice [3].

Neajunsul acestui procedeu constă în faptul că pentru a stabili nivelul de toxicitate al nanoparticulelor este necesar de a efectua mai multe teste costisitoare. Cantitatea dialdehidei malonice în biomasa de clamidomonadă crește, atingând maximum la 12 ore de contact al celulelor cu nanoparticulele, după care scade esențial. Microalga

Chlamydomonas reinhardtii apare în cadrul acestui studiu ca un obiect incomod pentru aplicarea testului de cuantificare a dialdehidei malonice în aprecierea gradului de toxicitate al nanoparticulelor. Aceasta reiese din lipsa corelației între cantitatea de dialdehidă malonică în biomasă la etapele incipiente de acțiune și cantitatea de biomasă obținută la finele ciclului de creștere a microalgei.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu sigur, eficient, reproductibil, rapid și ușor de realizat, de stabilire a toxicității nanoparticulelor cu utilizarea microalgei roșii *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neplatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM la data de 09.08.2004.

Esența invenției constă în aceea că se propune un procedeu de apreciere a toxicității nanoparticulelor pentru microalge, care constă în cultivarea microalgei roșii *Porphyridium cruentum* timp de 6 ore pe un mediu nutritiv cu adăugarea peste o oră după inocularea microalgei a nanoparticulelor în diferite concentrații, după care în biomasa algală se determină conținutul de dialdehidă malonică, totodată sunt considerate toxice concentrațiile de nanoparticule care provoacă creșterea conținutului de dialdehidă malonică în biomasă.

Rezultatul tehnic al invenției constă în faptul că nivelul de toxicitate al nanoparticulelor poate fi stabilit în termen de 8 ore, rezultatele fiind sigure și reproductibile.

Rezultatul tehnic obținut se datorează faptului că biomasa de *Porphyridium cruentum* conține cantități mari de acizi grași polinesaturați, care sunt supuși peroxidării în cazul acțiunii toxice a xenobioticelor. Reacția de răspuns la acțiunea substanțelor străine este una promptă, care se manifestă din primele ore de interacțiune. Nivelul de DAM, înregistrat în primele ore de interacțiune a microalgei *Porphyridium cruentum* cu xenobioticele, corelează cu cantitatea de biomasă la finele ciclului vital al culturii. Astfel decade necesitatea de a reproduce ciclul vital integral pentru a observa efectul de inhibare a productivității, toxicitatea fiind exprimată prin creșterea nivelului de dialdehidă malonică.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Stabilirea toxicității nanoparticulelor de ZnSe

Se prepară mediul nutritiv cu următoarea componență, g/l: NaCl – 7,0; KCl – 7,5; MgSO₃·7H₂O – 1,8; Ca(NO₃)₂·4H₂O – 0,15; KBr – 0,05; KI – 0,05; K₂HPO₄ – 0,2 și 1,0 ml/l soluție de microelemente, ce conține, mg/l: FeCl₃·6H₂O – 2,7; NaVO₃ – 0,05; ZnSO₄·5H₂O – 0,02; CuSO₄·5H₂O – 0,05; MnSO₄·5H₂O – 0,3; H₃BO₃ – 0,6; MoO₃ – 0,02. În mediul preparat se adaugă inoculum de *Porphyridium cruentum* în cantitate de 0,6 g/l biomasă absolut uscată. Cultura este expusă la temperatura de 22°C, la iluminare constantă de 3000 lx cu agitare periodică.

Peste o oră după inocularea microalgei la suspensia celulară se adaugă nanoparticule de ZnSe (cu dimensiunea de 3...5 nm) în cantități de 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l. Proba martor este expusă la condiții similare în lipsa nanoparticulelor. După 6 ore de interacțiune probele se separă în două. Din prima porție biomasa de microalgă este separată de mediul nutritiv prin centrifugare, spălată cu soluție izotonică de acetat de amoniu și standardizată la concentrația de 10 mg/l. În biomasa obținută a fost determinată cantitatea de dialdehidă malonică.

Pentru aceasta la probele de biomasă (1 ml biomasă standardizată) se adaugă 1 ml acid tiobarbituric 0,67% și 1 ml acid tricloracetic 15%, după care probele sunt supuse incubării pentru 1 oră la 95°C. Probele se răcesc pe gheață timp de 5 min și se centrifughează timp de 15 min la 3000 g. Concentrația dialdehidei malonice se măsoară la 532 nm, iar calculul se efectuează cu utilizarea coeficientului extincției molare a complexului dialdehidei malonice calculat la proteină sau % inhibiție față de proba martor pozitiv. Formula de calcul aplicată este:

$C = \text{Abs} \cdot f / K$, unde:

C – concentrația dialdehidei malonice, mol/ml;

Abs – absorbanta probei la lungimea de undă de 532 nm;

f – coeficientul de diluție;

K – coeficientul de extincție DAM ($1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Valorile calculate pentru probele experimentale sunt raportate la valoarea DAM in proba martor și se exprimă în % M.

Sunt considerate toxice concentrațiile de nanoparticule de ZnSe care provoacă creșterea veridică din punct de vedere statistic a conținutului de dialdehidă malonică în biomasă.

Pentru a confirma rezultatele obținute prin aplicarea procedurii propusă cea de a doua parte a probelor este lăsată pentru a parcurge întregul ciclu de dezvoltare a culturii, iar la începutul etapei staționare de creștere se apreciază cantitatea de biomasă obținută.

Rezultatele sunt prezentate în tab. 1.

10

Tabelul 1

Nivelul de dialdehidă malonică și cantitatea de biomasă de *Porphyridium cruentum* la acțiunea diferitor concentrații de nanoparticule de ZnSe

Indicatorul monitorizat	Concentrația nanoparticulelor de ZnSe, mg/l				
	0,1	0,5	1,0	1,5	2,0
Biomasa, % M	102,2±3,1	78,7±3,0*	54,6±2,4*	51,6±3,2*	47,6±3,0*
DAM, % M	100,9±2,6	124±2,6*	132,2±1,8*	135,3±3,0*	135,9±2,6*

15

* - $p < 0,01$

Datele din tab. 1 demonstrează că creșterea conținutului de DAM în biomasa de microalgă, după 6 ore de contact cu nanoparticulele de ZnSe în concentrații de la 0,5 mg/l în sus, se asociază cu o scădere a cantității de biomasă care se acumulează la finele ciclului de creștere a culturii. Rezultatele prezentate confirmă posibilitatea aprecierii precoce a nivelului de toxicitate al nanoparticulelor în baza testului de determinare a produselor peroxidării lipidelor.

20

Aprecierea cantității de biomasă la finele ciclului de cultivare a culturii de *Porphyridium cruentum* a fost efectuată doar pentru a confirma veridicitatea testului de apreciere a DAM în biomasă și nu reprezintă o parte componentă a procedurii propusă.

25

Exemplul 2

Stabilirea toxicității nanoparticulelor de ZnS

Se prepară mediul nutritiv cu următoarea componență, în g/l: NaCl – 7,0; KCl – 7,5; MgSO₃·7H₂O – 1,8; Ca(NO₃)₂·4H₂O – 0,15; KBr – 0,05; KI – 0,05; K₂HPO₄ – 0,2 și 1,0 ml/l soluție de microelemente, ce conține, mg/l: FeCl₃·6H₂O – 2,7; NaVO₃ – 0,05; ZnSO₄·5H₂O – 0,02; CuSO₄·5H₂O – 0,05; MnSO₄·5H₂O – 0,3; H₃BO₃ – 0,6; MoO₃ – 0,02. În mediul preparat se adaugă inoculum de *Porphyridium cruentum* în cantitate de 0,6 g/l biomasă absolut uscată. Cultura este expusă la temperatura de 22°C, la iluminare constantă de 3000 lx cu agitare periodică.

30

Peste o oră după inocularea microalgei la suspensia celulară se adaugă nanoparticule de ZnS (cu dimensiunea de 30...35 nm) în cantități de 2, 4, 6, 8, 10 mg/l. Proba martor este expusă la condiții similare în lipsa nanoparticulelor. După 6 ore de interacțiune probele se separă în două. Din prima porție biomasa de microalgă este separată de mediul nutritiv prin centrifugare, spălată cu soluție izotonică de acetat de amoniu și standardizată la concentrația de 10 mg/l. În biomasa obținută a fost determinată cantitatea de dialdehidă malonică. Pentru aceasta la probele de biomasă (1 ml biomasă standardizată) se adaugă 1 ml acid tiobarbituric 0,67% și 1ml acid tricloracetic 15%, după care probele sunt supuse incubării timp de 1 oră la temperatura de 95°C. Probele se răcesc pe gheață timp de 5 min și se centrifughează timp de 15 min la 3000 g. Concentrația dialdehidei malonice se măsoară la lungimea de undă de 532 nm, iar calculul se efectuează cu utilizarea coeficientului extincției molare a complexului dialdehidei malonice calculat la proteină sau % de inhibiție față de proba martor pozitiv. Formula de calcul utilizată:

35

$C = \text{Abs} \cdot f / K$, unde:

C – concentrația dialdehidei malonice, mol/ml;

Abs – absorbția probei la lungimea de undă de 532 nm;

50

f – coeficientul de diluție;

K – coeficientul de extincție DAM ($1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Valorile calculate pentru probele experimentale sunt raportate la valoarea DAM din proba martor și se exprimă în % M.

Pentru a confirma rezultatele obținute în cadrul procedurii propusă cea de a doua parte a probelor este lăsată pentru a parcurge întregul ciclu de dezvoltare a culturii, iar la începutul etapei staționare de creștere se apreciază cantitatea de biomasă obținută.

Rezultatele sunt prezentate în tab 2.

5

Tabelul 2

Nivelul de dialdehidă malonică și cantitatea de biomasă de *Porphyridium cruentum* la acțiunea diferitor concentrații de nanoparticule de ZnS

Indicatorul monitorizat	Concentrația nanoparticulelor de ZnS, mg/l				
	2	4	6	8	10
DAM, % M	114,5±2,6	126,7±3,0*	134,2±2,7*	135,6±2,5*	145,0±2,1*
Biomasa, % M	82,3±2,6	60,7±1,7*	53,6±2,4*	50,9±3,3*	45,1±3,0*

10

* - $p < 0,01$.

Datele din tab. 2 denotă că creșterea conținutului de DAM în biomasă de microalgă după 6 ore de contact cu nanoparticulele de ZnS în concentrații care depășesc valoarea de 4 mg/l se asociază cu o scădere a cantității de biomasă care se acumulează la finele ciclului de creștere a culturii. Rezultatele prezentate confirmă posibilitatea aprecierii precoce a nivelului de toxicitate al nanoparticulelor în baza testului de determinare a produselor peroxidării lipidice.

15

Aprecierea cantității de biomasă la finele ciclului de cultivare a culturii de *Porphyridium cruentum* a fost efectuată doar pentru a confirma veridicitatea testului de apreciere a DAM în biomasă și nu reprezintă o parte componentă a procedurii propusă.

20

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Johnstone C., Staines H., Benson E. An in vitro oxidative stress test for determining pollutant tolerance in algae. *Ecological Indicators*, 2006, vol. 6, p. 770-779
2. Gong N., Shao K., Feng W., Lin Z., Liang Ch., Sun Y. Biototoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere*, 2011, vol. 83, p. 510-516
3. Wang J., Zhang X., Chen Y., Sommerfeld M., Hu Q. Toxicity assessment of manufactured nanomaterials using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere*, 2008, 73(7), p. 1121-1128

(57) Revendicări:

Procedeu de apreciere a toxicității nanoparticulelor pentru microalge, care constă în cultivarea microalgei roșii *Porphyridium cruentum* timp de 6 ore pe mediu nutritiv cu adăugarea peste o oră după inocularea microalgei a nanoparticulelor în diferite concentrații, după care în biomasă algală se determină conținutul de dialdehidă malonică, totodată sunt considerate toxice concentrațiile de nanoparticule care provoacă creșterea conținutului de dialdehidă malonică în biomasă.

Șef Secție: IUSTIN Viorel

Examinator: LUPAȘCU Lucian

Redactor: LOZOVANU Maria