

UTILIZAREA NANOPARTICULELOR DE AUR ȘI ARGINT ÎN CULTIVAREA MICROALGEI *DUNALIELLA SALINA*

Maftai Elena, Rudic Valeriu

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

Rezumat

A fost demonstrat efectul stimulator al nanoparticulelor de aur și argint cu dimensiunile de 5 nm și acoperite cu polietilenglicol. Nanoparticulele au fost suplimentate din prima zi la mediul de cultivare a algei verzi *Dunaliella salina* CNMN-AV-02 cu salinitate de 120g/l NaCl. Nanoparticulele Ag(PEG) au stimulat producția de biomasă cu 33% și sinteza β -carotenului cu 36%. Nanoparticulele de Au(PEG) au stimulat carotenogeneza cu 20%. Efecte toxice ale nanoparticulelor de inhibare a productivității microalgei nu au fost observate în intervalul concentrațiilor aplicate.

Cuvinte cheie: Au nanoparticule, Ag nanoparticule, *Dunaliella salina*, biomasă, caroten.

Depus la redacție 26 decembrie 2018

Adresa pentru corespondență: Maftai Elena, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, str. Academiei, 1, MD-2028 Chișinău, Republica Moldova; e-mail: lena_maftai@mail.ru; tel. +373 22 725 306.

Introducere

Dunaliella salina este o microalgă eucariotă care se caracterizează prin producerea unor cantități semnificative de substanțe biologice active, cum ar fi carotenoizi, glicerol, lipide, fitosteroli, vitamine, minerale și proteine. *Dunaliella salina* este cunoscută ca cea mai performantă sursă naturală de β -caroten. Acumularea intensă a β -carotenului în biomasa de dunalielă are loc la cultivarea ei în condiții de intensitate înaltă a luminii, temperatură sporită, salinitate ridicată și deficit de nutrienți [14]. Producerea industrială a β -carotenului din biomasa de *Dunaliella salina* este pusă la punct de mai multe companii așa ca: Western Biotechnology LTD și Betatene LTD din Australia și multe alte companii de producere din Israel, Statele Unite ale Americii și China [3].

Dunaliella salina este utilizată în cercetările de determinare a toxicității și a impactului unor nanomateriale noi asupra mediului [1].

Nanotehnologiile sunt în dezvoltare continuă, având domenii de aplicare inepuizabile, acestea fiind producerea materialelor de construcție și a coloranților, tehnologiile alimentare, industria farmaceutică și cosmetică, protecția mediului și medicină cu scop diagnostic și tratament [8].

În paralel cu dezvoltarea tehnologiilor de producere a nanomaterialelor și cu diversificarea domeniilor de utilizare a lor devin foarte actuale cercetările cu privire la problema toxicității lor și impactul asupra mediului. Principalele probleme cu impact major asupra mediului sunt cele asociate cu toxicitatea acută și de durată a nanoparticulelor pentru organismele vii [10]. Cu toate acestea, unele studii au elucidat efectele pozitive ale acestor materiale asupra creșterii celulare sau a activității metabolice [11].

Datorită dimensiunilor mici (<100 nm), nanoparticulele pot interacționa cu ușurință cu suprafața celulară și chiar pot pătrunde în citozol [19]. Biodisponibilitatea considerabilă a nanoparticulelor susține ipoteza că ele pot fi o sursă mai favorabilă de oligoelemente decât analogii sub formă de săruri și pot fi utilizate în scopul îmbunătățirii funcțiilor vitale ale diferitor organisme. Astfel, nanoparticulele de fier zero-valent sunt cunoscute ca un agent de remediere a apelor și solurilor contaminate. Fierul este microelementul esențial pentru o serie de procese din organismele procariote și eucariote, incluzând respirația, fotosinteza, transportul oxigenului sau proliferarea celulară [5].

Nanoparticulele de argint (AgNP) sunt dintre cele mai utilizate nanomateriale și se găsesc în componența multor produse de consum uman. Nanoparticulele de argint, datorită activității antibacteriene și antifungice au o largă aplicare în medicină și cosmetologie [13]. Cu toate acestea, impactul nanoparticulelor de argint asupra ecosistemelor acvatice sunt încă necunoscute.

Dimensiunile mici ale nanoparticulelor de argint facilitează interacțiunea lor cu compartimentele celulare și intercelulare [12]. Este cunoscut faptul că AgNP generează radicali liberi în microorganisme și afectează funcțiile celulare [5].

Nanoparticulele metalice pot în mod direct sau indirect afecta activitatea sistemelor fotosintetice a algelor și reduce conținutul pigmentilor fotosintetici. Reducerea fotosintezei la alga *Chlamydomonas reinhardtii*, indusă de nanoparticule de aur acoperite cu glicodendrimer, a fost cauzată de agregarea celulelor algale [13]. Nanoparticule de oxid de cupru de tip core-shell au deteriorat sistemul fotosintetic la *C.*

reinhardtii, cauza fiind acumularea speciilor reactive de oxigen [17]. Pentru *Dunaliella tertiolecta* a fost determinată toxicitatea nanoparticulelor de oxid de zinc care au inhibat producerea de biomasă [18]. Toxicitatea nanoparticulelor de argint pentru alga *C. reinhardtii* a fost determinată de interacțiunea directă a celulelor cu AgNP [8]. A fost studiată acțiunea nanoparticulelor de argint cu dimensiunile de 50 nm în concentrațiile 0-10 mg/l asupra microalgelor *Chlorella vulgaris* și *Dunaliella tertiolecta* pe durata a 24 ore. *Chlorella vulgaris* s-a dovedit a fi mai sensibilă la acțiunea nanoparticulelor, fiind algă de apă dulce [1].

A fost stabilit efectul de bioacumulare a nanoparticulelor de aur învelite în polietilen glicol în biomasa microalgei *Dunaliella salina* în lipsa modificărilor morfologice a celulelor algale [6]. Rezultatele acțiunii nanoparticulelor asupra microalgelor sunt foarte variate, iar efectele lor depind de natura și dimensiunile nanoparticulelor, dar și de speciile microalgelor testate și condițiilor de cultivare.

În scopul elucidării acțiunii nanoparticulelor de aur și argint de dimensiuni foarte mici asupra algelor halofite au fost efectuate experiențe de cultivare a algei verzi *Dunaliella salina* în prezența nanoparticulelor de aur și argint.

Material și metode

Tulpina algei verzi *Dunaliella salina* CNM-AV-02 este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie. Productivitatea tulpinii constituie 0,9-1,2 g/l. Biomasa uscată de *Dunaliella* în dependență de condițiile de cultivare și mediul nutritiv utilizat, conține 38-43% proteină, 25-30 % glicerol, 5-8% lipide, 8-10% hidrați de carbon, 3,2-3,8% acizi nucleici, 5-7 % β -caroten, 80-90 mg/100g acid ascorbic, 20-25 mg/100 g BAU tocoferol, vitaminele grupei B, fitosteroli ș.a.

Cultivarea microalgei se efectuează pe mediul mineral Ben –Amotz [2]. cu următoarea componență: *macroelemente în g/l*: NaCl - 120; NaNO₃ - 0,5; NaHCO₃ - 2,0; KH₂PO₄ - 0,05; MgSO₃·7H₂O - 0,75; Fe-EDTA - 0,05 ml; *soluția de microelemente 1ml/l, ce conține în mg/l*: H₃BO₃-2,86; MnCl₂·4H₂O-1,81; CuSO₄·5H₂O-0,08; MoO₃-0,015. Temperatura optimă pentru această tulpină este de 27-29°C, pH-ul se înscrie în limitele de 8,0-8,5. Cantitatea de inoculum este de 0,40-0,45 g/l. Volumul probelor experimentale a fost de 500 ml, pentru care s-au utilizat baloane conice cu volumul total de 1000 ml. Cultura se agită periodic. Durata cultivării a fost de 10 zile.

Au fost utilizate nanoparticule de aur Au(PEG) și argint Ag(PEG), producător cu dimensiunea de 5 nm în polietilen glicol. Nanoparticulele au fost suplimentate la mediul mineral din prima zi de cultivare [16].

Biomasa colectată se separă de mediul de cultivare prin centrifugare și se supune demineralizării cu soluție izotonică de acetat de amoniu. Conținutul de biomasă algală se determină spectrofotometric cu recalculul masei celulare la biomasa absolut uscată (BAU) în baza ecuației de regresie, care reflectă relația între cantitatea de biomasă absolut uscată și densitatea optică a probei examinate.

Extragerea carotenoizilor din biomasa algală se efectuează cu alcool etilic. Pentru aceasta, la 10,0 mg biomasă se adaugă 2,0 ml alcool etilic de 96%. Extragerea are loc la temperatura camerei și agitare continuă timp de 120 min. Extractul etanolic se separă de biomasă prin centrifugare. Conținutul de β -caroten se determină spectrofotometric la lungimea de undă de 450 nm [15].

Rezultate și discuții

Microalga *D. salina* CNMN-AV-02 a reacționat, la prezența în mediul de cultivare a nanoparticulelor de argint, prin creșterea productivității (Figura 1). Concentrațiile de 0,054-0,108 mg/l AgNP s-au dovedit a fi cu efect stimulator. Conținutul de biomasă este cu 12-33% mai mare comparativ cu probele control. Concentrația de 0,054 mg/l AgNP a sporit productivitatea cu 33% comparativ cu proba martor.

Un posibil efect toxic moderat a fost stabilit în varianta experimentală cu aplicarea nanoparticulelor în concentrația de 0,135 mg/l, care a redus conținutul de biomasă cu 15%. Dublarea concentrației de nanoparticule la 0,27 mg/l nu a modificat conținutul de biomasă în cultura microalgală, iar concentrația de 0,5 mg/l a readus cultura la nivelul probelor martor. Prin urmare, pentru nanoparticulele de argint de dimensiunile de 5 nm nu a fost stabilit un efect toxic de inhibare a productivității microalgei *D. salina* CNMN-AV-02, în limitele concentrațiilor aplicate și a salinității mediului de cultivare.

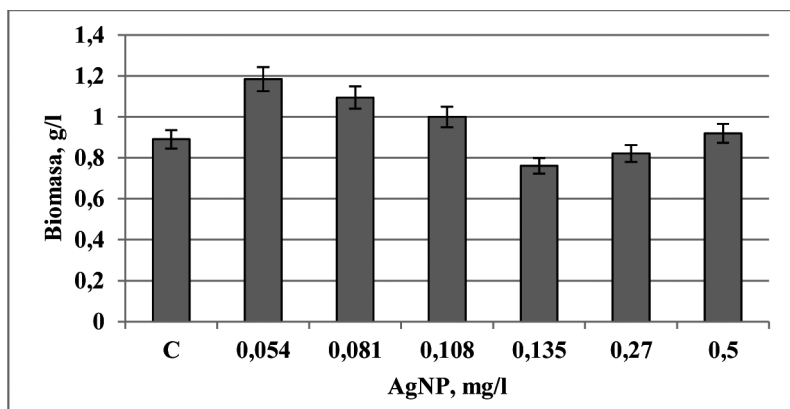


Figura 1. Biomasa (g/l) microalgei *D. salina* CNMN-AV-02 la cultivare în prezența AgNP.

Nanoparticulele Ag(PEG) testate, s-au manifestat ca fiind stimulatori pentru alga verde studiată, productivitatea căreia a crescut în limita unor concentrații aplicate.

Toxicitatea nanoparticulelor poate fi determinată în baza rezultatelor modificării conținutului de β -caroten în biomasă.

Carotenul în calitatea sa de antioxidant, reacționează la acumularea radicalilor liberi în biomasă algală prin creșterea conținutului lui în cazul unei reacții oxidative de sensibilizare și prin reducerea masivă în cazul unui stres oxidativ sever. Rezultatele determinării conținutului de caroten în variantele experimentale sunt prezentate în figura 2.

Concentrațiile de 0,054 mg/l, 0,081 mg/l și 0,108 mg/l nanoparticule de argint au stimulat sinteza carotenului. Astfel, concentrația de 0,054 mg/l AgNP a sporit conținutul de β -caroten în biomasă algală cu 33%, iar concentrațiile de 0,081 mg/l și 0,108 mg/l AgNP au majorat conținutul carotenului cu 20%. În varianta experimentală cu aplicarea nanoparticulelor în concentrația, determinată ca inhibitorie de 0,135 mg/l, conținutul de β -caroten nu se modifică. Concentrațiile de 0,27 și 0,5 mg/l a nanoparticulelor de argint în mediul de cultivare a dunaliei a stimulat sinteza carotenului, conținutul căruia a crescut cu 20% comparativ cu proba martor.

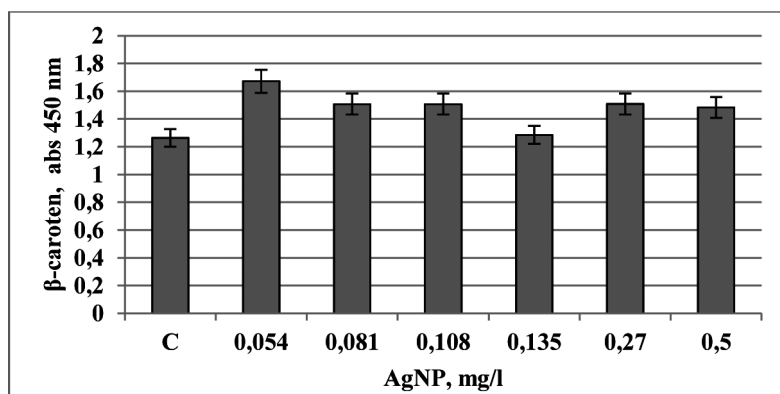


Figura 2. Conținutul de β -caroten în biomasa microalgei *D. salina* CNMN-AV-02 la cultivare în prezența AgNP.

O creștere cu 20% a conținutului de caroten în biomasă a fost determinată și în variantele cu concentrații mici ale AgNP în mediul de cultivare. Prin urmare nu a fost stabilită careva dependență dintre concentrația nanoparticulelor de argint în mediul de cultivare a dunaliei și răspunsul culturii microalgale. Nu a fost determinată concentrația, în limita dozelor de compus testate, care poate fi considerată toxică pentru *Dunaliella salina*, dar a fost stabilită concentrația cu efect de stimulare a producerii de biomasă și a sintezei β -carotenului.

Un efect de stimulare a fost determinat și în cazul aplicării nanoparticulelor de aur (Figura 3)

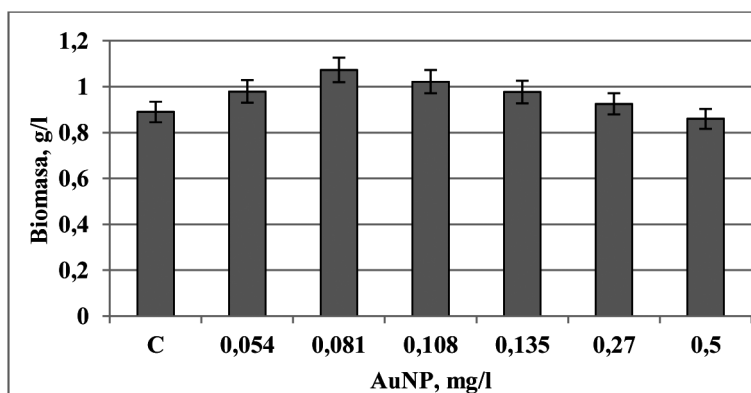


Figura 3. Biomasa (g/l) microalgei *D. salina* CNMN-AV-02 la cultivare în prezența AuNP.

Acumularea maximală a biomasei de *Dunaliella* a fost determinată în varianta cu aplicarea concentrației de 0,081 mg/l AuNP, producerea de biomasă a crescut cu 21%. Spre deosebire de cazul nanoparticulelor de argint, nu a fost stabilită concentrația, din variantele aplicate, care a inhibat producerea de biomasă algală. Concentrația de 0,5 mg/l AuNP, care este maximală din dozele aplicate, nu a modificat acumularea biomasei, dar a dus la un spor cu 20% a conținutului de β -caroten în biomasă (Figura 4).

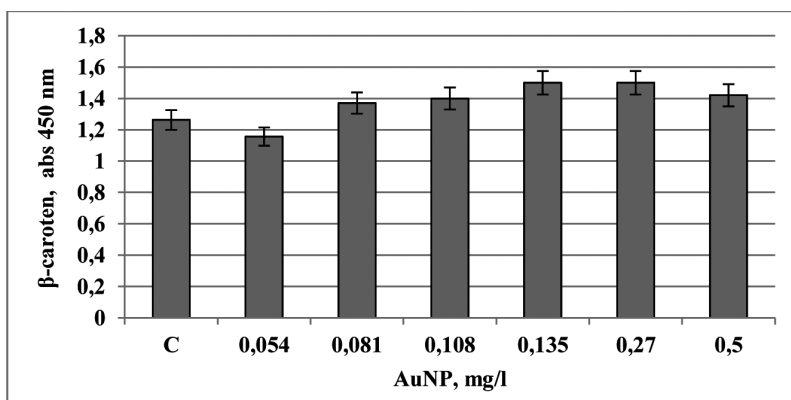


Figura 4. Conținutul de β -caroten în biomasa microalgei *D. salina* CNMN-AV-02 la cultivare în prezența AuNP.

Concentrațiile de 0,054 mg/l nanoparticule de aur a avut un efect de inhibiție nesemnificativă a sintezei carotenului. Concentrațiile următoare au stimulat sinteza carotenului, în mediu cu 20% și creșterea concentrației lui în biomasă. Nu a fost determinată concentrația nanoparticulelor de aur, în limita dozelor de compus testate, care poate fi considerată toxică pentru *Dunaliella salina*.

Concluzii:

- Nanoparticulele de Ag(PEG) și Au(PEG) cu dimensiunea de 5 nm, suplimentate la mediul de cultivare a microalgei *D. salina* CNMN-AV-02 nu s-au manifestat ca toxice.
- Nanoparticulele de Ag, aplicate în concentrația de 0,054 mg/l la mediul de cultivare a microalgei *D. salina* CNMN-AV-02, au stimulat producerea de biomasă și sinteza β -carotenului.
- Nanoparticulele de Au(PEG) în concentrația de 0,27mg/l, suplimentate la mediul de cultivare a algei *D. salina* CNMN-AV-02, au stimulat producerea de biomasă algală și sinteza β -carotenului
- Nanoparticulele de Ag(PEG) și Au(PEG) cu dimensiunea de 5nm pot fi aplicate în tehnologiile de cultivare a microalgei *D. salina* CNMN-AV-02 în calitate de stimulatori ai carotenogenezei.

Bibliografie:

1. Abdallah Oukarroum et al. Temperature influence on silver nanoparticles inhibitory effect on photosystem II photochemistry in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. Environ Sci Pollut Res (2012) 19:1755–1762.
2. Ben-Amotz A., Avron M. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. Trends in Biotechnology (1990) 8:121-126.
3. Garcsia-Gonzalez M.et al. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis-carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. J. Biotechnol. (2005) 115:81–90.
4. Kadar E., Rooks P., Lakey C., White DA. The effect of engineered iron nanoparticles on growth and metabolic status of marine microalgae cultures. Sci Total Environ (2012) 439:8–17.
5. Kim J.S., Kuk E., Yu K.N. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine: NBM (2007) 3:95–101.

6. Larguinho M., Correia D., Diniz MS., Baptista P.V. Evidence of one-way flow bioaccumulation of gold nanoparticles across two trophic levels. *J Nanoparticle Res* (2014) 16:2549.
7. Liu W.T. Nanoparticles and their biological and environmental applications”, *Journal of Bioscience and Bioengineering* (2006) 102: 1–7.
8. Navarro E., Piccapietra F., Wagner B., et al. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ Sci Technol* (2008) 42:8959–8964.
9. Nel A., Xia T., Madler L., Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* (2006) 311:622–627.
10. Pádrová K., Lukavský J., Nedbalová L., et al. Trace concentrations of iron nanoparticles cause overproduction of biomass and lipids during cultivation of cyanobacteria and microalgae. *Appl Phycol* (2015) 27:1443–1451.
11. Pal S., Tak Y.K., Song J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* (2007) 73:1712–1720.
12. Park M.H., et al. Selective inhibitory potential of silver nanoparticles on the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Biotechnol. Lett.* (2010) 32:423–428.
13. Perreault F., Bogdan N., Morin M., et al. Interaction of gold nanoglycodendrimers with algal cells *Chlamydomonas reinhardtii* and their effect on physiological processes. *Nanotoxicology* (2011) 1–12.
14. Raja R. et al. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Crit. Rev. Microbiol.* 2008, 34:77–88.
15. Rodriguez-Amaya D.A *Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. Washington: International Life Sciences Institute. 2001, 65 p.
16. Rudic, V et al. *Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale și realizări practice*. Chișinău: Elena VI (2007) 362 p.
17. Saison C., Perreault F., Daigle J-C. et al. Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat Toxicol* (2010) 96:109–114.
18. Sonia Manzo, Maria Lucia Miglietta, Gabriella Rametta, et al. Toxic effects of ZnO nanoparticles towards marine algae *Dunaliella tertiolecta*. *Science of the Total Environment* (2013) 445:371–376.
19. Verma A., Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* (2011) 6:12–21.