

<https://doi.org/10.52388/1857-064X.2021.2.12>

UNELE ASPECTE ALE APLICĂRII NANOPARTICULELOR DE AUR ÎN BIOTEHNOLOGIA MICROALGEI *Porphyridium cruentum*

Rudi Ludmila, Cepoi Liliana, Chiriac Tatiana, Valuța Ana, Djur Svetlana, Miscu Vera, Dumbrăveanu Veronica, Codreanu Liviu, Tașcă Ion, Rotari Ion, Rudic Valeriu

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

Rezumat

Articolul prezintă rezultatele obținute la investigarea acțiunii nanoparticulelor de aur (AuNP) asupra productivității microalgei roșii *Porphyridium cruentum* și conținutului unor compuși biologic activi de interes tehnologic în biomasă pe durata unui ciclu de cultivare. Au fost utilizate AuNP stabilizate în citrat, cu dimensiunile de 5 nm în concentrații de la 0,5 la 1,5 nM, și de 10 nm în concentrații cuprinse între 0,005 și 0,1 nM. Rezultatele obținute demonstrează lipsa toxicității nanoparticulelor respective, confirmată prin păstrarea unui nivel adecvat al productivității microalgei și a conținutului de proteine în biomasă. Pentru fiecare dintre AuNP aplicate au fost stabilite concentrațiile, care asigură o acumulare sporită a ficobiliproteinelor în biomasa de porfiridium.

Cuvinte cheie: nanoparticule de aur, citrat, *Porphyridium cruentum*, biomasă, proteine, ficobiliproteine.

Depus la redacție: 29 noiembrie 2021

Adresa pentru corespondență. Rudi Ludmila, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, str. Academiei, 1, MD-2028 Chișinău, R. Moldova, e-mail: rudiludmila@gmail.com

Introducere

Nanotehnologia reprezintă un domeniu al cercetării în continuă dezvoltare. O direcție nouă în cadrul nanotehnologiei este studiul procesului de obținere a nanoparticulelor funcționalizate și de stabilire a proprietăților acestora. Din varietatea de nanoparticule explorate în prezent în diverse cercetări, nanoparticulele de aur (AuNP) sunt extrem de remarcabile datorită funcționalității lor multiple și proprietăților unice [1, 21].

Se știe, că nanoparticulele din mediul acvatic pot modifica rata creșterii microalgelor și valoarea nutritivă a biomasei (diverse macromolecule biologice și compuși fenolici) care este apreciată în calitate de supliment alimentar [9].

Aurul, fiind un element coloidal, este folosit de ani de zile ca vector în terapia tumorală. AuNP sunt utilizate în producerea de conductoare și catalizatori, în calitate de componente pentru cosmetice anti – îmbătrânire; în producerea de coloranți; producerea dispozitivelor de memorie [8, 18, 27]. AuNP sunt cunoscute și pentru diverse aplicații medicale și activități biologice [6].

Aurul este considerat a fi un metal mai puțin toxic pentru organisme, cu excepția dimensiunilor nano, despre care se cunoaște că sporesc toxicitatea lui [18].

S-a stabilit, că toxicitatea nanoparticulelor pentru microalge depinde de natura lor (dimensiunea particulelor, starea de oxidare, structura cristalină), dar și de concentrația,

mediile și condițiile de cultivare, precum și de caracteristicile de specie ale microalgelor. În cazul microorganismelor acvaticе, toxicitatea AuNP depinde de natura învelișurilor și de capacitatea acestora de a forma conglomerate [10]. S-a demonstrat, că nanoparticulele de aur cu dimensiuni mici, nefuncționalizate, sunt mai toxice pentru unele specii de microalge de apă dulce, astfel ca *Chlamydomonas reinhardtii*, dar și marine, precum *Phaeodactylum tricoratum* [17, 23].

Cu toate acestea, au fost inițiate cercetări de evaluare a efectelor stimuloare ale nanoparticulelor în cultivarea microalgelor în scopul intensificării activității lor biosintetice [26]. Spre exemplu, aplicarea AuNP stabilizate cu polietilenglicol de dimensiuni mici la cultivarea în condiții de laborator a microalgei halofile *Dunaliella salina*, a condus la stimularea cu circa 21% a productivității și cu circa 20 - 36% a conținutului de β -caroten în biomasă [14]. Efectul de stimulare a productivității a fost caracteristic și pentru AuNP stabilizate în polivinilpirolidonă (PVP) cu dimensiunile cuprinse între 20 - 50 nm, la aplicarea lor în concentrația de 0,014 mg/ml la cultivarea microalgei *Raphidocelis subcapitata* [5].

Dimensiunile mici și învelișul din polietilenglicol au determinat un nivel scăzut de toxicitate pentru AuNP utilizate în procesul de cultivare în volume mici și în sistem închis a cianobacteriei *Spirulina platensis*. A fost obținută o creștere cu 29,4 - 35,8% a conținutului de biomasă la cultivarea spirulinei în prezența concentrațiilor de 0,025 - 0,5 μ M a acestor nanoparticule [3].

Microalga roșie *Porphyridium cruentum* este cunoscută în calitate de producător al unui șir de compuși biologic valoroși, printre care proteinele, ficobiliproteinele, acizii grași polienici omega-3, polizaharidele sulfatate, ultimele cu acțiune antivirală pronunțată prin inhibarea replicării retrovirusurilor [7, 12, 13].

În calitate de stimulatori ai proceselor biosintetice la porfiridium au fost propuse diferite substanțe – compuși organici, compuși minerali și coordinați ai 3-d metalelor [4, 12]. Sunt puține lucrări, care descriu rezultatele interacțiunii porfiridiumului cu nanoparticulele. Spre exemplu, a fost demonstrat că această microalgă poate servi drept matrice pentru biosinteza nanoparticulelor metalice [2]. De asemenea, a fost demonstrat că nanoparticulele de CdSe, în concentrații de 4,0 – 8,0 mg/l, asigură o creștere cu 18,4 - 47% a cantității de biomasă – efect datorat, probabil, formării unui sistem hibrid „NP – ficoeritrină”, care captează foarte eficient lumina [20].

În această lucrare ne-am propus drept scop investigarea posibilității aplicării AuNP de dimensiuni mici (5 - 10 nm) în calitate de stimulatori în biotehnologia microalgei *Porphyridium cruentum*.

Material și metode

În studiul dat au fost utilizate nanoparticule de aur (AuNP) cu dimensiunile de 5 și 10 nm (TEM), stabilizate în citrat (Merk).

În calitate de obiect de studiu a fost utilizată tulpina microalgei roșii *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01 depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neptogene (Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, Chișinău, Republica Moldova). Pentru creșterea porfiridiumului s-a utilizat mediul nutritiv mineral Brody. Condițiile de cultivare au fost următoarele: cantitatea de inoculum – 0,55 – 0,6 g/l biomasă absolut uscată (BAU); temperatura de 25 - 28°C, pH-ul mediului 6,8 - 7,2, iluminarea continuă de 50 - 57 μ mol photons $m^{-2} s^{-1}$. Cultivarea microalgei a fost realizată în baloane Erlenmeyer de 100 ml, cu volumul experimental de 50 ml în regim de agitare periodică lentă. Durata ciclului de cultivare – 14 zile.

Cantitatea de biomasă a fost determinată prin înregistrarea absorbanței suspensiei microalgale la lungimea de undă de 565 nm și recalculul cantitativ în baza curbei de calibrare. Conținutul de ficobiliproteine în biomasă a fost determinat în extractul hidric în baza formulelor de calcul [24], iar cel de proteine – prin metoda Lowry [11].

Rezultate și discuții

AuNP cu dimensiunile de 5 nm stabilizate în citrat au fost adăugate în mediul de cultivare al *P. cruentum* în concentrații de la 0,5 la 1,5 nM, iar cele cu dimensiunea de 10 nm - în concentrații de la 0,005 la 0,1 nM. Cultura de porfiridium a fost în contact cu nanoparticulele pe durata întregului ciclu de cultivare. La final, biomasă microalgală a fost colectată, determinată cantitatea ei și în aceasta, conținutul unor compuși biochimici de interes – proteine și ficobiliproteine.

Cantitatea de biomasă produsă de către *P. cruentum* pentru fiecare variantă experimentală de aplicare a AuNP este prezentată în figura 1.

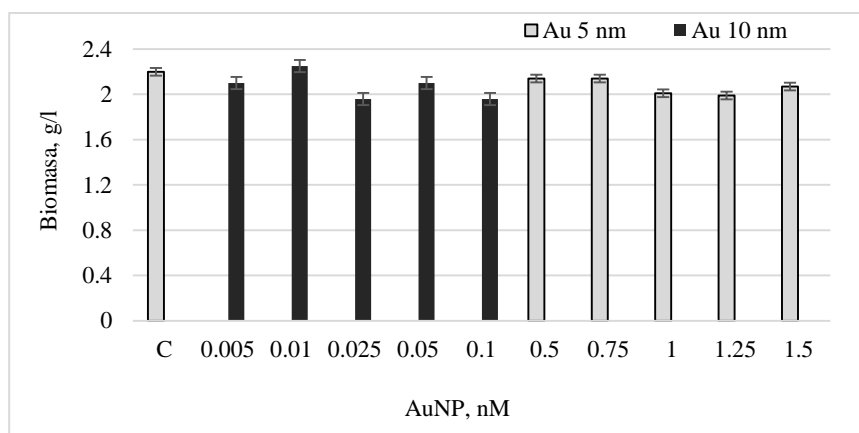


Figura 1. Cantitatea de biomasă produsă la cultivarea *P. cruentum* în prezența AuNP stabilizate în citrat

Concentrațiile mici ale AuNP cu dimensiunile de 5 nm stabilizate cu citrat, nu au influențat procesul de acumulare a biomasei de porfiridium. Cantitatea de biomasă produsă de către microalgă a fost la limita de jos a valorilor specifice pentru tulpina utilizată în acest studiu. O reducere cu 11% a cantității de biomasă a fost stabilită în varianta experimentală cu utilizarea AuNP cu dimensiunile de 10 nm aplicate în concentrațiile 0,025 - 0,1 nM.

Astfel, rezultatele obținute demonstrează lipsa unui efect toxic al AuNP stabilizate cu citrat. Se consideră, că compușii organici sau bioorganici aplicați în calitate de stabilizatori pentru acoperirea nucleelor metalice ale nanoparticulelor, pot influența în mod diferit culturile de microalge și cianobacterii [25]. Până în prezent nu a putut fi demonstrat rolul învelișurilor organice în calitate de factor care ar modifica clar efectul toxic al lor. Unii autori afirmă că stabilizatorii reduc toxicitatea nanoparticulelor, în timp ce alții demonstrează efectul lor invers. Astfel, AuNP nestabilizate, cu dimensiunile de 42 - 44 nm au inhibat cu 50% productivitatea algei *D. subspicatus*, în concentrația de 0,028 mg/ml și cea a algei *R. subcapitata*, în concentrația de 0,014 mg/ml. În cazul AuNP stabilizate cu polivinilpirolodona (PVP), o reducere cu 50% a productivității microalgale a fost stabilită la concentrația nanoparticulelor de 0,4823 mg/ml [4]. AuNP stabilizate în

polietilenglicol, suplimentate la mediul mineral în concentrații de 0,054 – 0,135 mg/l au stimulat cu circa 16 - 21% acumularea de biomasă a microalgei *D. salina* [14]. AuNP stabilizate cu manoză, în concentrații mici au indus agregarea celulară în cultura microalgei *C. reinhardtii*, iar AuNP stabilizate cu citrat au provocat o inhibiție a creșterii microalgelor *C. autotrophica*, *N. atomus* și *P. tricorutum* [17, 18]. În studiul realizat, concentrațiile AuNP stabilizate în citrat, în limitele aplicate, nu au modificat semnificativ cantitatea de biomasă produsă de către *P. cruentum*, care la sfârșitul ciclului de cultivate a fost în limita valorilor specifice tulpinii date. În acest caz, nu este evident un patern specific de acțiune, dar se poate afirma, că AuNP cu dimensiunile de 5 și 10 nm stabilizate în citrat, în limitele de concentrații testate, nu sunt toxice pentru această cultură microalgală.

Conținutul de proteine este unul dintre parametrii biochimici importanți, care caracterizează calitatea biomasei microalgale. Acest parametru a fost monitorizat în cadrul cercetării, iar rezultatele obținute pot fi urmărite în figura 2.

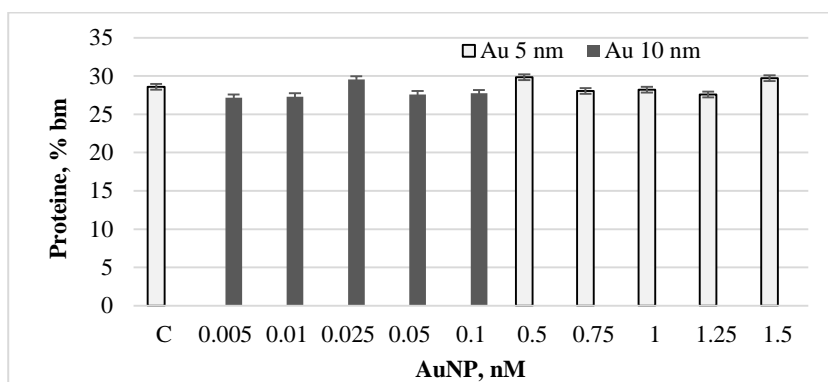


Figura 2. Conținutul de proteine (%) în biomasa produsă la cultivarea *P. cruentum* în prezența AuNP stabilizate în citrat

În majoritatea variantelor experimentale studiate, conținutul de proteine în biomasa de porfiridium a oscilat în limitele caracteristice matorului. Astfel, pentru ambele tipuri de nanoparticule studiate, în limita concentrațiilor aplicate, nu a fost caracteristic nici efectul de stimulare, nici cel de reducere, clar conturate pentru sinteza proteinelor.

Unii autori sugerează ideea acumulării proteinelor în prezența concentrațiilor mici de nanoparticule, ca rezultat al includerii mecanismelor de detoxifiere [15, 16]. În cazul nostru, în baza lipsei modificării conținutului de proteine în biomasa microalgală poate fi presupusă lipsa efectului toxic pentru concentrațiile aplicate de AuNP stabilizate în citrat.

Ficobiliproteinele sunt printre compușii biologic activi importanți ai porfiridiumului și s-a demonstrat, că sinteza și respectiv, acumularea lor este dependentă de diferiți factori, printre care prezența metalelor în mediul de cultivare. Spre exemplu, pentru această microalgă a fost stabilită o stimulare a sintezei ficobiliproteinelor la cultivarea ei în prezența fierului și cobaltului în concentrații de 3,15 și 6,30 ppm. A fost demonstrată corelarea directă dintre acumularea metalelor în biomasă și sporul de ficobiliproteine [19].

Nanoparticulele metalice pot fi utilizate în calitate de stimulatori ai sintezei ficobiliproteinelor la diverse cianobacterii și microalge. Spre exemplu, aplicarea

nanoparticulelor de oxid de titan în procesul de cultivare a cianobacteriei *Synechocystis sp.* a condus la stimularea sintezei ficobiliproteinelor la cultura dată, sporind cu 33,8 - 55% conținutul acestor pigmenți în biomasă [28].

Figura 3 prezintă datele obținute referitor la modificările induse de AuNP incluse în acest studiu asupra procesului de acumulare a ficobiliproteinelor în biomasă *Porphyridium cruentum*.

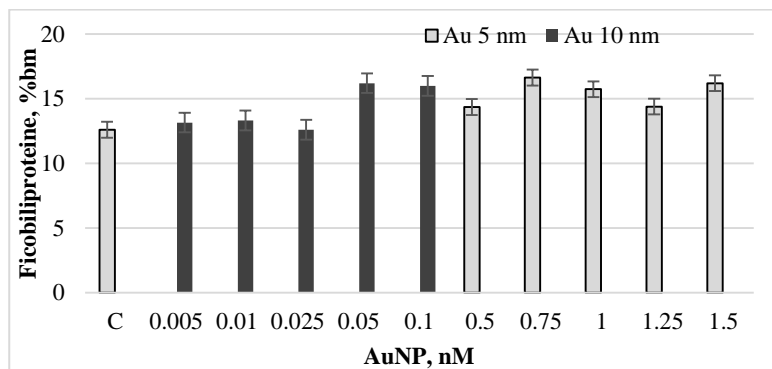


Figura 3. Conținutul de ficobiliproteine în biomasă produsă la cultivarea *P.cruentum* în prezența AuNP stabilizate în citrat

Toate concentrațiile de AuNP stabilizate în citrat și cu dimensiunile de 5 nm aplicate la mediul de cultivare a porfiridiumului au indus o stimulare a sintezei ficobiliproteinelor. Nu a fost determinată o corelare dintre concentrația nanoparticulelor și valorile acestor proteine - pigmenți în biomasă de porfiridium ($r=0,217$). O creștere cu circa 13 - 32% a conținutului de ficobiliproteine în biomasă, a fost stabilită la aplicarea concentrațiilor de 0,5 - 1,5 nM, maximumul efectului de stimulare fiind caracteristic pentru concentrațiile de 0,75 nM și de 1,5 nM a AuNP stabilizate în citrat. În cazul AuNP stabilizate în citrat de 10 nm, concentrațiile de 0,005 - 0,025 nM ale lor nu au modificat conținutul de ficobiliproteine în biomasă microalgă.

Concentrațiile de 0,05 - 0,1 nM ale AuNP stabilizate în citrat de 10 nm au sporit cu circa 27 - 28% valorile ficobiliproteinelor în cultura microalgă. A fost stabilită corelarea directă puternică dintre concentrațiile acestor nanoparticule și valorile ficobiliproteinelor ($r=0,812$).

Prin urmare, AuNP stabilizate în citrat, cu dimensiunile de 5nm și 10 nm, aplicate la cultivarea microalgei *P. cruentum* se manifestă ca stimulatori ai sintezei ficobiliproteinelor, iar efectul exercitat depinde de dimensiunea și concentrația nanoparticulelor.

Concluzii

AuNP stabilizate în citrat și cu dimensiunile de 5 nm și 10 nm aplicate în procesul de cultivare dirijată a *P. cruentum*, nu induc modificări în productivitatea microalgei și conținutul de proteine în biomasă, iar menținerea acestor parametri la un nivel acceptabil din punct de vedere biotehnologic demonstrează lipsa efectului toxic al nanoparticulelor studiate, în limita concentrațiilor aplicate.

Concentrația nanoparticulelor reprezintă factorul principal, care determină modificările în componența conținutului de ficobiliproteine în direcția stimulării sintezei acestor pigmenți de către cultura de porfiridium. Un screening detaliat al concentrațiilor

de nanoparticule de dimensiuni mici stabilizate în citrat poate evidenția concentrațiile lor optime pentru dirijarea proceselor biosintetice la această cultură microalgală în scopul obținerii biomasei cu un conținut biochimic programat.

În baza rezultatelor obținute se conturează posibilitatea dezvoltării unor tehnologii de cultivare a microalgei *P. cruentum*, în care AuNP stabilizate în citrat și de dimensiuni mici au rol de stimulatori care asigură o acumulare dirijată a anumitor compuși biologic activi de interes tehnologic în biomasă.

Rezultatele expuse în această lucrare sunt parte a proiectului de cercetare 20.80009.5007.05 „Nanoparticule metalice biofuncționalizate – obținerea cu ajutorul cianobacteriilor și microalgelor” din cadrul Programului de Stat (2020-2023), Prioritatea Strategică Materiale, tehnologii și produse inovative.

Bibliografie:

1. Bundschuh M., Seitz F., Rosenfeldt R.R. et al. Effects of nanoparticles in fresh waters: Risks, mechanisms and interactions. *Freshwater Biol.* 2016, 61, p. 2185–2196.
2. Cepoi L., Rudi L., Zinicovscaia I et al. Biochemical changes in microalga *Porphyridium cruentum* associated with silver nanoparticles biosynthesis. *Arch Microbiol.* 2021, 203, p. 1547-1554.
3. Cepoi L., Zinicovscaia I., Rudi L. et al. Effect of PEG-coated silver and gold nanoparticles on *Spirulina platensis* biomass during its growth in a closed system. *Coatings.* 2020, 10 : 717. doi:org/10.3390/coatings10080717.
4. Coropceanu E., Rudic V., Cepoi L. et al. Synthesis and cristal structure of [Co(DmgH)₂(Thio)₂F][PF₆]. The effect of fluorine-containing Co(III) dioximates on the physiological proceses of themicroalga *Porphyridium cruentum*. *Russ J Coord Chem.* 2019, 45, p. 200-207.
5. Dedcova K., Bures Z., Palarcik J., Vlcek M., Kukutschova J. Acute aquatic toxicity of gold nanoparticles to freshwater green algae. *NanoCon, 6th International Conference, 2014.* Brno, Czech Republic.
6. Hu X., Zhang Y., Ding T., Liu J., Zhao H. Multifunctional gold nanoparticles: a novel nanomaterial for various medical applications and biological activities. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020, 8: 990. doi: 10.3389/fbioe.2020.00990.
7. Ismail M. M., Alotaibi B. S., El-Sheekh M. M. Therapeutic uses of red macroalgae. *Molecules.* 2020, 25(19): 4411
8. Klaine S. J., Alvares P. J. J., Batley G. E., et al. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2008, 27(8), p. 1825-1851.
9. Koyande A. K., Chew K. W., Rambabu K. et al. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Sci. Hum. Wellness.* 2019, 8, p. 16–24.
10. Libralato G., Galdiero E., Falanga A. et al. Toxicity effects of functionalized quantum dots, gold and polystyrene nanoparticles on target aquatic biological models: A review. *Molecules.* 2017, 22 : 1439; doi:10.3390/molecules22091439.
11. Lowry O. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951, 193(1), p. 265-275.
12. Lu X., Nan F., Feng J. et al. Effects of different environmental factors on the growth and bioactive substance accumulation of *Porphyridium purpureum*. *Int J Environ Res Public Health.* 2020, 17(7), p. 2221.
13. Lutz G.A., Zgang L., Zgang Z et al. Feasibility of attached cultivation for polysaccharides production by *Porphyridium cruentum*. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2017, 40, p. 73-83.
14. Maftai E., Rudic V. The use of gold and silver nanoparticles in cultivation of microalga *Dunaliella salina*. *Buletinul AȘM. Științele vieții.* 2018, 3(336), p. 159-165.

15. Marchello A. E., Barreto D. M., Lombardi A. T. Effects of titanium dioxide nanoparticles in different metabolic pathways in the freshwater microalgae *Chlorella sorokiniana* (Trebouxiophyceae). *Water Air Soil Pollut.* 2018, 229(48). doi:org/10.1007/s11270-018-3705-5.
16. Miao A. J., Schwehr K.A., Xu C. et al. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environ Pollut.* 2009, 157, p. 3034–3041.
17. Moreno-Garrido I., Perez S., Blasco J. Toxicity of silver and gold nanoparticles on marine microalgae. *Marine Environmental Research.* 2015, 111, p. 60-73.
18. Perreault F., Bogdan N., Morin, M. et al. Interaction of gold nanoglycodendrimers with algal cells (*Chlamydomonas reinhardtii*) and their effect on physiological processes. *Nanotoxicology.* 2012, 6(2), p. 109–120.
19. Priatni S., Ratnaningrum D., Warya S., Audina, E. Phycobiliproteins production and heavy metals reduction ability of *Porphyridium* sp. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 2018, 160:012006. doi :10.1088/1755-1315/160/1/012006.
20. Rudic V., Cepoi L., Gutsul T. et al. Red algae *Porphyridium cruentum* growth stimulated by CdSe quantum dots covered with thioglycerol. *J Nanoelectron Optoelectron.* 2012, 7(7), p. 681-687.
21. Rudramurthy G. R., Swamy M. K. Potential applications of engineered nanoparticles in medicine and biology: An update. *J Biol Inorg Chem.* 2018, 23, p. 1185–1204.
22. Schiavo S., Douroudier N., Bilbao E. et al. Effects of PVP/PEI coated and uncoated silver NPs and PVP/PEI coating agent on three species of marine microalgae. *Sci Total Environ.* 2016, 577, p. 45-53.
23. Sendra M., Yeste M.P., Gatica J.M. Direct and indirect effects of silver nanoparticles on freshwater and marine microalgae (*Chlamydomonas reinhardtii* and *Phaeodactylum tricornutum*). *Chemosphere.* 2017, 179, p. 279-289.
24. Siegelman H., Kycia H. Algal biliproteins. In: HELLEBUST, J., CRAIGIE, J. eds. *Handbook of Phycological Methods.* Cambridge University Press, Cambridge, 1978, p. 72-78. ASIN B000OB0F1Y.
25. Tsiola A., Pitta P., Callol A.J. et al. The impact of silver nanoparticles on marine plankton dynamics: Dependence on coating, size and concentration. *Sci Total Environ.* 2017, 601–602, p. 1838–1848.
26. Vargas-Estrada L., Torres-Arellano S., Longoria A. et al. Role of nanoparticles on microalgal cultivation: A review. // *Fuel* 2020, 280:118598 doi:org/10.1016/j.fuel.2020.118598.
27. Yah C. S. The toxicity of gold nanoparticles in relation to their physiochemical properties. *Biomedical Research.* 201, 24(3), p. 400-413.
28. Zahra Z., Kim S.Y., Kim H.Y. et al. Phycobiliproteins production enhancement and lipidomic alteration by titanium dioxide nanoparticles in *Synechocystis* sp. PCC 6803 culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2018, 66(32), p. 8522-8529.