

Raport de activitate

Contract Nr. PD 51 din 07/08/2020

ADSORBȚIA CYANOTOXINEI CYLINDROSPERMOPSIN LA SUPRAFAȚA NANOPARTICULELOR PLASMONICE, DETECȚIA ULTRASENSIBILĂ ȘI EVALUAREA PREZENȚEI ACESTEIA ÎN SITU, ÎN APE DIN TRANSILVANIA ȘI ÎN PRODUSE AQUATIC

Acronym: CYANOTOXRO



Etapa. Nr. 3

Testarea tehnicii de detectare a CYN-lui în apele de mediu și în produsele acvatice

Perioada: 18/12/2021 - 16/12/2022

Rezumatul etapei

A doua etapă a proiectului constă în: obținerea și interpretarea spectrelor vibraționale SERS în diferite condiții de pH și de concentrație, obținerea și interpretarea spectrelor obținute din ape din mediu și în produse acvatice.

Analiza SERS a toxinelor din ape de mediu se bazează pe date de referință solide pentru aplicații de monitorizare și screening rapide și eficiente. În această etapă sunt furnizate date vibraționale SERS corespunzătoare toxinei Cylindrospermopsin (CYN) și atribuirea vibrațională completă a acestor, care a fost realizată folosind calcule de tip DFT. S-a descoperit că toxina este chemisorbită pe nanoparticulele de argint, iar semnalul SERS este ușor dependent de concentrație. S-a folosit raportul intensității SERS al benzilor cheie ale CYN pentru a construi o curbă de calibrare pentru un interval de concentrație care cuprinde patru ordine de mărime, de la valori micro- până la valori sub nanomolare. S-a realizat detectarea și cuantificarea toxinei CYN în țesut de pește folosind SPR-SERS din nanoparticule metalice obținute în laborator.

Pentru fiecare activitate, în continuare sunt prezentate rezultatele obținute:

3.1. Obținerea unei set de date vibraționale de CYN în diferite condiții de concentrație și pH

O serie de spectre SERS de soluție CYN de 2,18 μM a fost înregistrată. Ca substrat metallic, au fost utilizate două stocuri de AgNPs distincte și au fost efectuate experimente SERS după deschiderea imediată a fiolei de toxină, precum și în trei luni consecutive după deschidere. Același experiment s-a derulat și cu un stoc independent de AgNPs, de 3 ori consecutiv, pentru a verifica reproductibilitatea și potențiale modificări sau apariția unor produși de degradare ai toxinei. Spectrele SERS la trei luni de la deschiderea și utilizarea fiolei cu toxină indică același semnal, cu stocuri independente de AgNPs, ceea ce confirmă păstrarea identității speciei moleculare inițiale la adsorbția pe AgNPs. Au fost atribuite benzile SERS. SERS a arătat o reproductibilitate excelentă

Spectrele SERS la diferite concentrații, variind de la 0,218 nmol l^{-1} la 2,18 $\mu\text{mol l}^{-1}$, au fost înregistrate din depunerea în picătură a probelor lichide pe un substrat hidrofob. În comparație cu măsurătorile SERS pe o probă lichidă, această tehnică (DCDR - drop coating deposition Raman) a permis un screening mai rapid pe probe mai multe, iar reproductibilitatea lor a fost excelentă. Au fost observate modificări ușoare a intensității relative a mai multor benzi. Cel mai important semnal SERS este ușor modificat odată cu variația concentrației. Se pot identifica cel puțin două tipuri de semnal SERS, unul caracteristic concentrațiilor nanomolare în timp ce la concentrații micro-molar și sub-micro-molar, aceste benzi au apărut cu intensitate mai mică. În plus o mică deplasare a poziției benzii SERS Ag-N al CYN-ului chemisorbit (în proba lichidă și DCDR) la concentrații micro-molare spre numere de unde mai mici în intervalul de concentrații nanomolar, împreună cu celelalte modificări, au sugerat o reorientare a structurii CYN pe suprafața de AgNPs, prin intermediul ringului guanidină al structurii moleculare.

Banda la 1616 cm^{-1} a rămas nedeplasată indiferent de valorile concentrației, astfel, am folosit intensitatea sa relativă la banda Ag-N pentru a construi o curbă de dependență de concentrație a semnalului SERS. Scăderea intensității benzii Ag-N este legată de scăderea numărului de evenimente chemisorbite prin intermediul atomului de azot din gruparea guanidina a moleculei.

În general, aceste rezultate sugerează că pentru intervale de concentrații mici, care nu depășesc un ordin de mărime, ar putea fi construită o curbă de calibrare liniară pentru determinarea cantitativă a CYN prin SERS.

Orientarea fiind dependentă de concentrație, spectrele SERS sugerează coexistența unor molecule cu orientări ușor diferite. Astfel, conform regulilor de selecție SERS, componenta de polarizabilitate perpendiculară pe suprafață va fi amplificată preponderent. Ținând cont de faptul că adsorbția moleculei este un proces colectiv, este dificil (dacă nu imposibil) de prezis câte molecule adoptă anumite orientări și câte sunt orientate diferit la o anumită concentrație. Astfel, răspunsul spectral SERS (modurile amplificate) reflectă acest proces cu modificări ușoare de la un spectru la următorul înregistrat pentru valorile concentrației date.

În concluzie, prezenta analiză confirmă și descrie corect comportamentul SERS al toxinei pe intervalul de concentrație de trei ordine de mărime.

Molecula CYN a fost stabilă la temperatura camerei (21 ± 1 °C) și la 40 °C în 4 ore la diferite valori ale pH-ului. Fierberea (100 °C) nu duce la descompunerea toxinei incubate în soluții tampon cu pH 3, 5 și 7, în timp ce fierberea la pH 10 și 12 reduce concentrația de CYN în 4 ore până la 47% și, respectiv, 18% din valoarea inițială. Astfel în intervalul de valori pH acide toxina este stabilă dar se justifică analize suplimentare ale comportamentului toxinei în medii foarte alcaline (pH peste 10) la temperaturi înalte.

În comparație cu alte cianotoxine, CYN este mai stabilă într-o gamă largă de pH și temperatură (21-100 °C) în condiții de laborator. Stabilitatea ridicată a CYN la acești factori poate fi o problemă în eliminarea sa din apă potabilă și din rezervoarele de agrement și agricole utilizate domestic.

3.2. Colectarea de probe de apă brută din diferite lacuri cu pești și lacuri sarate și analizarea răspunsului SERS al apei Millipore filtrate și nefiltrate: colectarea de probe de apă din pastravaria din Gilău, apele județului Cluj: Cojocna Balneary Resort, Durgău, și din bazine de pește și fructe de mare disponibile în supermarketuri pentru consumatorii din Județul Cluj și înregistrarea datelor SERS experimentale ale probelor colectate

Colectarea de probe de apă, s-a realizat prin prelevare unui volum de 500 ml apă din bazinele de la păstrăvaria din Gilău (Jud. Cluj), lacuri balneare (Cojocna și Durgău), precum și din bazinele disponibile în supermarketuri locale pentru comercializarea de pește și fructe de mare.

Prelevarea s-a realizat în flacoane de sticlă de 500 ml și au fost obținute acordurile de prelevare experimentală a probelor de apă din partea organismelor responsabile cu gestionarea lacurilor și bazinelor de pește respective. Probele au fost transportate imediat în laborator și depozitate în frigider și apoi pregătite pentru măsurători.

Au fost măsurate spectrele SERS pentru fiecare probă, colectată. În cazul apelor din lacuri cu apă dulce agregarea este foarte slabă (sau deloc), nanoparticulele coloidale nu-și schimbă culoarea, iar semnalele obținute prezintă câteva benzi slabe, care pot proveni cel mai probabil de la prezența citratului din coloid de argint dar și de la eventuale urme de fosfat. Aceste rezultate nu sunt surprinzătoare, având în vedere că este de așteptat să găsim urme de nutrient în lacurile din păstrăvărie. În cazul lacurilor sărate, se observă o agregare puternică a nanoparticulelor, cum era de așteptat, și apariția unei benzi intense la 242 cm^{-1} , banda SERS caracteristică Ag-Cl. Datorită agregării prea intense, posibilele capture moleculare ale agregatelor nu sunt rezolvate prin apariția unor benzi intense, altele decât de la agregate (242 cm^{-1}).

Nu s-au detectat benzi caracteristice cianotoxinei!

3.3. Pregătirea în laborator de nanoparticule de metal nobil cu rezonanță plasmonică în intervalul vizibil și NIR: pregătirea de diferite stocuri de coloizi de argint

Ca suprafețe active SERS s-a folosit un coloid de argint redus cu hidroxilamină. Proprietățile optice ale stocurilor de AgNP preparate au fost în concordanță cu datele lor raportate anterior verificate prin înregistrarea spectrului Raman normal în volum și a extincției UV-VIS. Maximul de extincție a fost la 418 nm.

3.4. Obținerea și interpretarea datelor SERS pentru probele de apă de mediu și pentru probele de apă contaminate artificial cu CYN și pentru produsele acvatice (pește proaspăt): înregistrarea spectrelor experimentale SERS ale probelor de apă contaminate artificial cu cianotoxina

Spectrele SERS ale probelor de apă colectate din lacuri au fost obținute prin depunerea unei cantități de 10 μl de apă la 500 μl de coloid de argint. Măsurătorile s-au derulat pe probele proaspăt preparate în triplicat. Pentru optimizarea semnalului, s-au probat diferiți timpi de expunere și respectiv, s-a variat numărul de acumulări Raman pentru o înregistrare. De asemenea, pe lichide s-a probat aplicarea unui interval mare de valori ale puterii laserului. Testele SERS pe apele prelevate indică, în funcție de sursă, prezența unui semnal de la beta-caroten, asimilat cu detecția cyanobacteriilor, dar și cazuri de semnal SERS slab, sau lipsa semnalului, în

intervalul 300-1800 cm^{-1} , datorită agregării excesive a nanoparticulelor în prezența probelor din lacuri sărate.

Pentru înregistrarea spectrelor experimentale SERS ale probelor de apă contaminate artificial cu CYN a fost prelevat dintr-o probă de apă sărată 10 μl și din soluția stoc de CYN tot 10 μl și s-a amestecat într-o cuva. Pe această probă de apă contaminată artificială cu CYN a fost adăugat 500 μl coloid de argint. Din această probă SERS 10 μl a fost picurată pe un substrat hidrofob și au fost colectate spectrele SERS. Comparând spectrul SERS obținut pe proba de apă sărată contaminată cu CYN depus pe substrat hidrofob cu spectrul SERS al toxinei CYN se pot observa fără ambiguitate benzile principale toxinei, dar acoperite cu alte semnale de la alte specii din apă sărată.

3.5. Obținerea și analizarea spectrelor Raman și SERS din celulele cianobacteriei: înregistrarea spectrelor Raman și SERS ale celulelor cianobacteriale

Utilizând metoda drop coating deposition Raman (DCDR) s-au obținut câteva mostre de microorganisme pentru investigarea Raman și SERS la nivel de o singură celulă. Organismele observate din probele prelevate din natura arată diferite morfologii, mărimi și respectiv semnale spectroscopice foarte variate. Spre exemplu, organisme de dimensiuni de 10-50 μm , prezintă semnale specifice sărurilor anorganice (sulfat, fosfat, carbonat), sugerând ca ele sunt acoperite cu aceste săruri în urma evaporării apei din picatura DCDR. Altele prezintă semnal intens specific carotenoizilor, sugerând natura lor fotosintetică. Altele, identificarea unor organisme de tip *Dunaliella salina*, microalge unicelulare verzi (halofile) specifice mediilor hipersaline, cum sunt lacurile sărate de la Cojocna, este posibilă.

3.6. Obținerea și interpretarea datelor SERS ale produselor acvatice normale și ale produselor contaminate artificial cu CYN și evaluarea capacității de discriminare directă: înregistrarea spectrelor experimentale SERS ale produselor acvatice normale și ale produselor contaminate artificial cu CYN, atribuite cu modurile vibraționale caracteristice

S-au înregistrat o serie de spectre SERS în condiții similare din probe de țesut de pește normal și intoxicat. Diferența spectrală dintre țesutul toxic și cel normal a arătat benzi semnificative în ceea ce privește profilul și intensitatea relativă, cu accent pe diferențele observate în intervalul 1600-1700 cm^{-1} , precum și în jurul valorii de 1400 cm^{-1} . Cu toate acestea, benzile SERS distincte sunt încă greu de observat, din cauza suprapunerii puternice a semnaturii CYN cu semnalul caracteristic al țesutului biologic.

În ceea ce privește experimentul SERS cu soluții CYN, cea mai bună performanță se obține atunci când linia 532 nm este utilizată pentru excitarea rezonanței plasmonilor nanoparticulelor utilizate. S-a folosit raportul de intensitate SERS al benzilor cheie SERS ale CYN pentru a construi o curbă de calibrare pentru un interval de concentrații care cuprinde patru ordine de mărime, de la valori micro- până la valori sub-nanomolare. În plus, este descrisă analiza SERS a țesutului de pește care conține 8,3 μg toxină/g țesut (20 μg toxină/g este aportul zilnic tolerabil de către OMS).

3.7. Diseminarea rezultatelor: 1 articol ISI și 2 conferințe internaționale

În etapa curentă, pe lângă partea experimentală, conceperea și redactarea Rapoartelor experimentale, au fost îndepliniți toți indicatorii prevăzuți:

- ✓ Design, completarea și actualizarea sit-ului web al proiectului: <https://www.itim-cj.ro/PNCDI/cyanotoxro/>
- ✓ Articole științifice:
 - Cs. Müller Molnár, S. Cintă Pînzaru, V. Chiș, I. Feher and B. Glamuzina, “*SERS of Cyindrospermopsin Cyanotoxin: Prospects for Quantitative Analysis in Solution and in Fish Tissue*”, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, Volume 286, 5 February 2023, 121984. Jurnal care aparține quartilei (Q1), <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121984>.
 - Pregătirea și trimiterea spre publicare la revista International Journal of Molecular Sciences, jurnal care aparține quartilei (Q1), a unui articol ISI cu titlul: “*Detection and characterization of nodularin by using label-free surface-enhanced spectroscopic techniques*”, Autori: Ioana Andreea Brezeștean, Ana Maria Raluca Gherman, Alia Colniță, Nicoleta Elena Dina, Müller Molnár Csilla, Daniel Marconi, Vasile Chiș, Leontin David, Simona Cîntă-Pînzaru.
- ✓ Participarea cu 2 prezentari (de tip poster) la conferințe internaționale:
 - The 6th edition of International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences (IC-ANMBES 2022), 8-10 Iunie, 2022, Brașov, România.
Cs. Müller Molnár, S. Cîntă Pînzaru, *Quantitative SERS Analysis of Cyindrospermopsin Cyanotoxin in Solution and in Fish Tissue*.
<https://icanmbes2020.sciforum.net/#custom1150>.
 - 14th International Conference on Physics of Advanced Materials ICPAM – 14, University of Dubrovnik, Croația, 8-15 Septembrie, 2022.
Cs. Müller Molnár, S. Cîntă Pînzaru, B. Glamuzina, *SERS assessment of Cyindrospermopsin Cyanotoxin in environmental waters from Transylvania, Romania, and in fish tissue*.
<https://icpam.ro/>.
- ✓ Organizarea unui Workshop
 - ✓ Workshop-ul cu titlul:” **Workshop on nano-biosensing with portable/handheld Raman systems: From food products, toxins, safety and molecular contaminants to knowledge transfer to economic partners - With practical demos!**” s-a desfășurat în cadrul a patru proiecte de cercetare, intersectate datorită utilizării aceluiași metode analitice prin spectroscopie Raman și SERS.
<http://ro.itim-cj.ro/wp-content/uploads/2022/09/Workshop-on-Food-Control-6-oct2022.pdf>.

Toate activitățile acestei etape au fost realizate cu succes!

Director Proiect,
Dr. Molnár Csilla

