

Raport de activitate

Contract Nr. PD 51 din 07/08/2020

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

Acronym: CYANOTOXRO



Etapa. Nr. 4

Testarea monitorizării in-situ a toxinei cu Raman portabil

Perioada: 17/12/2022 - 08/11/2023

Rezumatul etapei

A patra etapă a proiectului constă în obținerea setului de date experimentale Raman și SERS al toxinei CYN cu echipamentul Raman portabil și testarea capacității de identificare a toxinei CYN în probele de apă și în produsele acvatice.

Etapa anterioară ne-a furnizat date vibraționale SERS corespunzătoare toxinei Cyindrospermopsin (CYN) și atribuirea vibrațională completă a acestora. S-a descoperit că toxina este chemisorbită pe nanoparticulele de argint, iar semnalul SERS este ușor dependent de concentrație. Folosind raportul intensității SERS ale benzilor cheie ale CYN și construind 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 calculat limita de detecție în probele de apă și s-a realizat detectarea și cuantificarea toxinei CYN în țesut de pește. În plus în probele SERS de apă au fost analizate cu tehnica Transmission electron microscopy (TEM), pentru identificarea și caracterizarea cianobacteriilor.

În această etapă s-a testat rezultatele obținute în laborator privind reproductibilitatea CYN-lui cu echipamentul Raman portabil pentru monitorizarea in situ a cianotoxinei

Pentru fiecare activitate, în continuare sunt prezentate rezultatele obținute:

4.1. Determinarea limitei de detecție: determinarea limitei de detecție a CYN în produsele acvatice și în probele de apă de mediu

Folosind raportul intensității SERS ale benzilor cheie ale CYN (Raportare etapa 3) și construind o curbă de calibrare pentru intervalul de concentrație, de la valori micro- până la valori sub nanomolare, se poate calcula limita de detecție a toxinei CYN în probele de apă și cuantificarea acestora în țesut de pește.

Pentru determinarea limitei de detecție (LD) s-a folosit metoda curbei de calibrare, care se bazează pe deviația standard (SD) a răspunsului (σ) și panta (s) a curbei de calibrare [2]. SD (σ) poate fi calculat pentru interceptarea Y și utilizat pentru a calcula LD pentru o curbă standard folosind funcția de regresie din Origin după cum urmează:

a. S-a construit o curbă de dependență de concentrație a semnalului SERS de la 1616 cm^{-1} și 242 cm^{-1} .

b. S-a efectuat o analiză de regresie utilizând funcția de fitting – linear fit. Funcția de regresie furnizează trei rezultate: statistici de regresie, ANOVA și coeficienți. Statisticile de regresie vă spun cât de bine se potrivește ecuația de regresie cu datele, ANOVA vă oferă nivelul de variabilitate din modelul de regresie, iar coeficienții (partea cea mai utilă) includ panta curbei și SD-ul interceptului Y:

Equation	$y = a + b \cdot x$		
Weight	Instrumental		
Residual Sum of Squares	12.57		
Pearson's r	0.9497		
Adj. R-Square	0.8692		
		Value	Standard Error
B	Intercept	2.12	0.1442
	Slope	0.2839	0.05405

c. Utilizând valorile σ și s am calculat valoarea de DL
 $DL = 3,3 (\sigma / S) = 3,3(0,1442/0,2839) = 1,6761 \mu\text{M}$

4.2. Alocarea semnalului Raman / SERS a probelor de apă normale și intoxicate și a produselor acvatice: Testarea capacității de identificare a toxinei CYN în probele de apă

Pentru a testa capacitatea de identificare a toxinei CYN în probele de apă, s-au selectat cele două lacuri din Cojocna, deoarece comunitatea lor microbiană halofilă a evidențiat, printre altele, Dunaliella salina în cantități abundente, precum și mai multe tipuri de cianobacterii filamentoase care pot înflori și elibera toxine atunci când nivelul nutrienților crește odată cu creșterea temperaturii în sezonul primăvara-vara. Nouă luni consecutive au fost monitorizate cianotoxinele în cele două lacuri sărate din Cojocna, România. În plus, s-au efectuat analize spectroscopice ale apei din cele două lacuri sărate

Spectrele Raman au fost înregistrate din depunerea în picătură (drop coating deposition Raman (DCDR)) a probelor de apă pe un substrat hidrofob utilizând un microscop Renishaw InVia Reflex Raman, excitare 532 nm de laser. Principalele benzi din spectre Raman sunt observate la 978 cm^{-1} și atribuite modului de întindere simetric al sulfatului, împreună cu benzile tipice Raman ale apei la aproximativ 1636 cm^{-1} (modul de deformare a apei) iar modurile de întindere (stretching) intense în jur de 3200 cm^{-1} .

Probele SERS au fost preparate prin adăugarea de 10 μL de apă brută la 00 μl AgNPs. Probele SERS au fost măsurate în fiole de sticlă cu capac de 1 ml. Experimentele SERS au fost reproduse de trei. Toate spectrele SERS au fost înregistrate la temperatura camerei, cu un spectrometru portabil, Wasatch Photonics fully modular Raman Spectrometer (WP 532-A -SR-IC) folosind linia laser 532 nm. Software-ul OriginPro 8.5 (OriginLab, Northampton, SUA), a fost utilizat pentru procesarea datelor spectrale (corecția liniei de bază, normalizarea la [0,1]). Benzile SERS observate în experimentul de monitorizare a șase luni de iarnă și 3 luni de vară, au evidențiat semnal SERS reproductibil al beta-carotenului adsorbit, care provine din interacțiunea cianobacteriilor cu AgNP-urile. Cu cât densitatea cianobacteriilor este mai mare, cu atât semnalul SERS este mai mare.

Pentru înregistrarea spectrele SERS ale probelor de apă intoxicate cu CYN s-au adăugat 50 μl de soluție stoc de toxină (24 pM) la 50 μl de apă de lac. Probele de apă din lacurile L1 și L2, colectate în august 2023, au fost utilizate pentru experimentele SERS. Probele SERS au fost realizate prin adăugarea a 1 μl de soluție mixtă la 200 μl de AgNPs, astfel încât concentrația de toxină a fost de 0,119 μM .

S-a colectat o serie de spectre SERS (expunere 5 s, 10 acumulări, putere laser 30 mW, excitare 785 nm, obiectiv 20X) din probele de țesut de pește (Fig.3) normal și intoxicat. Pentru a înregistra spectrele SERS ale țesutului de pește intoxicat, 50 μl de soluție stoc de CYN de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a fost pipetat pe suprafața țesutului cu o greutate de 60 mg, rezultând astfel o concentrație de toxină în țesut de 8,3 mg/kg. 20 μg toxină/g este aportul zilnic tolerabil de către OMS. Țesutul intoxicat a fost ulterior incubat cu nanoparticule de argint și după aproximativ 15 min au fost înregistrate spectrele SERS.

Diferențele spectrale dintre țesutul intoxicat și cel normal au arătat diferențe semnificative în ceea ce privește formele benzilor și intensitatea relativă. Cu toate acestea, benzile SERS al CYN distincte sunt încă greu de observat, din cauza suprapunerii puternice a semnăturii CYN cu semnalul caracteristic al țesutului biologic. De aceea am investigat în continuare discriminarea SERS a țesutului de pește intoxicat artificial de cel normal, folosind analiza discriminantă liniară

4.3. Extragerea concluziilor privind validitatea rezultatelor prin comparație cu metodele biologice convenționale pentru identificarea și caracterizarea cianobacteriilor (în cooperare cu Departamentul de Biologie de la UBB): Confirmarea metodei de detectare Raman cu metodele biologice convenționale

Imaginile microscopiei electronice cu transmisie (TEM) ale celor două probe SERS de apă arată diferite specii de cianobacterii. Imaginile TEM arată o mare varietate de cianobacterii incubate cu nanoparticule de argint și sunt responsabile pentru semnalul SERS observat. Abundența și diversitatea microorganismelor din apă este remarcabilă. Ele determină culoarea verzuie (uneori maro verzui) a apelor, datorită pigmentilor pe care îi conțin (carotenoizi). Concentrația lor variază în funcție de temperatură și nutrienți, într-o dinamică continuă Lacul 1 este întotdeauna " decât Lacul 2.

Lacurile de la Cojocna au niveluri ridicate de nutrienți, inclusiv azot și fosfor, care pot promova creșterea plantelor acvatice și a algelor. Doar un număr limitat de microorganisme eucariote sunt capabile să supraviețuiască în medii foarte saline, inclusiv anumite specii de alge verzi din genul *Dunaliella*, *Picocystis salinarum* și unele diatomee capabile să crească în concentrații de sare de

până la 150 g/l [9–11]. Dunaliella este cunoscută pentru producția sa remarcabilă de β -caroten, atingând niveluri de până la 12% din substanța uscată. Această microalgă este o sursă naturală de carotenoide pentru anumite specii de creveți, precum Artemia Salina bogată în cantaxantina.

4.4. Testarea rezultatelor obținute în laborator privind reproductibilitatea CYN-lui cu echipamentul Raman portabil pentru monitorizarea in situ a cianotoxinei: Obținerea setului de date experimentale Raman și SERS al toxinei CYN cu echipamentul Raman portabil

Setul de date experimentale Raman și SERS al toxinei cu echipamentul Raman portabil s-a înregistrat în laborator cu echipamentul Wasatch Photonics fully modular Raman Spectrometer (WP 532-A -SR-IC). Utilizând aparatul portabil, spectrele SERS arată o reproductibilitate excelentă.

Zona spectrală SERS semnificativă între 1800-1550 cm^{-1} indică trei benzi prominente în spectrul SERS, observate la 1646, 16196 15859 cm^{-1} . Aceste benzi au fost atribuite modurilor de tip stretching (C=O) respectiv bending (CNC) în ringul uracil respectiv stretching CN în ringul guanidina al structurii moleculare a CYN (RST – Etapa nr. 1). În plus, prezența benzii SERS la 239 cm^{-1} atribuită N-Ag, confirmă chemisorbția moleculară a CYN pe suprafața AgNPs.

4.5. Compararea a datelor obținute în laborator al toxinei libere și adsorbite pe suprafața metalică cu cele furnizate de instrumentul portabil: tragerea concluziilor pentru eficiența echipamentului Raman portabil

Benzile SERS observate au evidențiat semnal SERS reproductibil al beta-carotenului adsorbit, semnal asimilat detectării cianobacteriilor.

Compararea datelor de laborator ale toxinei libere și adsorbite cu cele furnizate de instrumentul portabil duc la concluzii ca echipamentului Raman portabil este eficient pentru monitorizarea toxinei CYN în apele din mediu.

4.6. Diseminarea rezultatelor: 1 articol ISI, 1 conferința internațională, 1 workshop cu mediu economic

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

- ✓ Design, completarea și actualizarea sit-ului web al proiectului: <https://www.itim-cj.ro/PNCDI/cyanotoxro/>.
- ✓ Articole științifice:
 - Pregătirea și trimiterea spre publicare la revista Biosensors, jurnal care aparține quartilei (Q1), a unui articol ISI cu titlul: “Nanotechnology for ultrasensitive monitoring salt lakes waters: a winter-months SERS pilot experiment”, autori: Csilla Molnár, Teodora-Diana Drigla, Ilirjana Bajama, Lucian Barbu-Tudoran, Victor Cureau, Simona Cîntă Pînzaru, Manuscript ID: biosensors-2726737.
- ✓ Participarea cu 3 prezentari (de tip poster) la conferințe internaționale:
 - INTERNATIONAL CONFERENCE AIR AND WATER - COMPONENTS OF THE ENVIRONMENT, 15th Edition, 17 – 19 March 2023, Cluj-Napoca, ROMÂNIA. Cs. Müller Molnár, Teodora-Diana Drigla, S. Cîntă Pînzaru, Nanotechnology for ultrasensitive monitoring salt lakes waters: A winter-months SERS experiment. <http://aerapa.conference.ubbcluj.ro/2023.htm>.

- 17th International Summer Schools on N&N, OE & Nanomedicine (ISSON23), 1-8 July 2023, Thessaloniki, Greece.
Cs. Müller Molnár, Teodora-Diana Drigla, S. Cîntă Pînzaru, Nanotechnology to monitor the SERS response of SALT LAKES FROM Cojocna BALNEARY RESORT, Transylvania, ROMANIA.
<https://www.nanotexnology.com/index.php>.
- 12th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, August 27th- September 1st, 2023, Krakow.
Molnár Cs., Drigla T. D., Barbu-Tudoran L., Cîntă Pînzaru S., Trace detection and evaluation of the presence in situ of Cyindrospermopsis cyanotoxin in environmental waters from Cojocna Transylvania, Romania.
<https://icavs.org/registration-and-abstracts/abstracts>.
- ✓ Organizarea unui Workshop in 2022.
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 acelorși metode analitice prin spectroscopie Raman și SERS.
<http://ro.itim-cj.ro/wp-content/uploads/2022/09/Workshop-on-Food-Control-6-oct2022.pdf>
- ✓ **Banner publicitar**
Banner publicitar expus la intrarea în Băile Cojocna din Cluj-Napoca, la data de 1 Iunie 2023 la deschiderea sezonului estival publicului larg, cu rezultatele obținute privind monitorizarea apei din cele două lacuri importante pentru balneo-terapia populară din zonă.
- ✓ **Mediatizare radio și TV**
 - Au fost prezentate în emisiunea “Turism și relaxare la Cojocna” pe postul de la Radio Cluj, printre altele, și rezultatele cercetării furnizate pentru publicului larg prin afișarea bannerului publicitar 5 Iulie 2023.
<https://www.youtube.com/watch?app=desktop&v=OeIRqIVM9iA>.
 - Doamna prof. dr. Simona Cîntă Pînzaru, a dat un interviu în cadrul emisiunii „Vară pentru voi” pe postul TVR Cluj, în data de 28 august 2023, unde a prezentat rezultatele și importanța monitorizării apei din mediu cu metode spectroscopice RAMAN.
<https://www.youtube.com/watch?v=8LeyTnewIs8>.

Toate activitățile acestei etape au fost realizate cu succes!

Director Proiect,
Dr. Molnár Csilla

