

RECEȚIONAT

Agenția Națională pentru Cercetare
și Dezvoltare _____
_____ 2020

AVIZAT

Secția AȘM _____
_____ 2020

RAPORT ANUAL

privind implementarea proiectului din cadrul proiect bilateral (2019-2020)

***”Acțiunea specifică a nanozimelor multifuncționale asupra organismelor vegetale și
microbiene în condițiile agriculturii durabile”***

cifrul 19.80013.51.07.09A/BL

Conducătorul proiectului: Rastimeșina Inna _____

Directorul organizației Codreanu Svetlana _____

Consiliul științific/Senatul Codreanu Svetlana _____

L.Ș.

Chișinău 2020

1. Scopul etapei conform proiectului depus la concurs

1. Sinteza și determinarea proprietăților nanoparticulelor cu funcție de nanozime (nanozime multifuncționale).
2. Studiul influenței nanozimelor multifuncționale asupra creșterii și dezvoltării plantelor, utilizate pentru fitoremedierea solurilor contaminate cu POP.
3. Determinarea acțiunii nanozimelor multifuncționale asupra celulei microorganismului-destructor POP în stare liberă și imobilizată.
4. Imobilizarea nanozimelor multifuncționale pe suprafața celulelor microorganismului-destructor POP.

2. Obiectivele etapei

1. Sinteza nanoparticulelor compușilor de fier, ce posedă funcția enzimelor și studierea proprietăților fizico-chimice ale nanozimelor obținute;
2. Determinarea influenței nanozimelor multifuncționale asupra creșterii și dezvoltării plantelor, utilizate pentru fitoremedierea solurilor contaminate cu POP;
3. Imobilizarea celulelor microorganismului-destructor POP pe suprafața suporturilor anorganice;
4. Testarea acțiunii nanozimelor multifuncționale asupra microorganismului-destructor POP în stare liberă și imobilizată;
5. Imobilizarea prin adsorbție a nanozimelor multifuncționale pe suprafața celulelor microorganismului-destructor POP și obținerea nanobiosistemelor;
6. Evaluarea capacității nanobiosistemelor obținute de a degrada POP.

3. Acțiunile planificate pentru realizarea scopului și obiectivelor

1. Sinteza nanoparticulelor în baza compușilor de fier, cu proprietățile nanozimelor multifuncționale.
2. Determinarea proprietăților fizico-chimice ale nanozimelor.
3. Stabilirea acțiunii enzimelor multifuncționale asupra creșterii și dezvoltării plantelor, utilizate în fitoremediere solului, poluat de POPs.
4. Imobilizarea celulelor microorganismului-destructor POP pe suprafața suporturilor anorganice.
5. Testarea interacțiunii dintre nanozimele multifuncționale și celulele microorganismului-destructor POP, în stare liberă și imobilizată.
6. Obținerea nanobiosistemelor din celulele microorganismului-destructor POP și nanozimele multifuncționale.
7. Testarea capacității nanobiosistemelor obținute de degrada POP.

4. Acțiunile realizate pentru atingerea scopului și obiectivelor etapei anuale)

1. Au fost sintetizate nanoparticulele de magnetită Fe_3O_4 prin metoda modificată a coprecipitării, folosind soluțiile apoase de sulfat de fier (II), clorură de fier (III), în prezența poli-*N*-vinilpirolidonei (PVP). Raportul PVP față de componentele inițiale a variat în limitele de la 0,1 la 0,3.

Au fost sintetizate nanoparticulele de magnetită Fe_3O_4 SR1, prin metoda coprecipitării, la reactorul multifuncțional VGR-5D, care permite obținerea unei cantități mai mari de

nanoparticule.

2. A fost confirmată structura cristalină a nanomaterialului sintetizat. Analiza mostrelor prin difracția razelor X a fost efectuată la difractometrul DRON-UM folosind radiația $e\text{-}K_{\alpha}$, $\lambda = 1.93604 \text{ \AA}$, în domeniul $2\theta = 10^{\circ}\text{--}80^{\circ}$, la temperatura camerei.

Nanomaterialele obținute au fost analizate prin spectroscopia FTIR, cu spectrometrul Perkin Elmer Spectrum 100FT-IR în domeniul spectral $650\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$. Domeniul spectral în vazelină cuprinde $400\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$.

Au fost înregistrate imaginile microscopiei electronice de scanare (SEM) cu microscopul electronic Quanta 200, cu tensiunea de operare de 30 kV și electroni secundari retroîmprăștiați în regim de vid înalt.

Au fost măsurate caracteristicile magnetice pentru mostra $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PVP}$, la $T = 300 \text{ K}$.

A fost analizată capacitatea nanoparticulelor de magnetită Fe_3O_4 S29 și SR1 de a manifesta activitate de tip catalază (metoda Dorey et al, 1998).

A fost analizată capacitatea nanoparticulelor de magnetită Fe_3O_4 S29 și SR1 de a manifesta activitate de tip peroxidază (metoda Gao et al, 2007).

3. A fost determinat efectul soluțiilor coloidale de nanoparticule Fe_3O_4 S29 și SR1 în concentrație de 1-100 mg/L asupra ratelor de germinare și creștere a semințelor de dovlecel (*Cucurbita pepo* L.) și ovăz (*Avena sativa* L.) (ГОСТ 12038-84).

A fost determinată acțiunea nanoparticulelor de Fe_3O_4 S29 și Fe_3O_4 SR1 asupra lungimii rădăcinilor și coleoptilelor de ovăz, rădăcinilor și hipocotilelor de dovlecel, masei medii a rădăcinilor de ovăz și dovlecel.

4. Prin metoda spectrofotometrică a fost estimată cantitatea de biomasă de rodococi imobilizată, prin măsurarea densității optice D_{540} a suspensiei celulare, înainte și după imobilizare.

A fost determinat numărul unităților formatoare de colonii (UFC) prin metoda diluțiilor succesive, însămânțarea și numărarea coloniilor crescute din celulele bacteriene viabile, inoculate pe mediul TS agarizat.

Pentru imobilizarea bacteriilor de rodococi au fost testate 4 suporturi naturale anorganice, silicații: bentonită, kieselgur, perlită și diatomită granulată INZ-600, fracțiunea 0,25-0,50 mm.

A fost evaluat gradul de imobilizare a celulelor *R. rhodochrous* CNMN-Ac-05 pe suprafața suporturilor anorganice.

5. A fost determinată acțiunea soluțiilor coloidale ale nanoparticulelor (NP) de magnetită Fe_3O_4 S29, Fe_3O_4 SR1 și fulerenei C_{60} asupra creșterii celulelor bacteriene *Rhodococcus rhodochrous* CNMN-Ac-05. Concentrația UFC/ml a fost determinată prin inocularea suspensiei bacteriene, tratată cu nanoparticule, pe mediul agarizat TS în cutii Petri și numărarea coloniilor crescute în ziua a 4-a.

Au fost observate modificările fenotipice ale coloniilor de rodococi, după contactul celulelor bacteriene cu nanomaterialele, în dependență de concentrațiile nanomaterialului.

6. Nanoparticulele de magnetită Fe_3O_4 S29 și Fe_3O_4 SR1 au fost imobilizate pe suprafața celulelor bacteriei *Rh. rhodochrous* CNMN-Ac-05, conform protocolului: (1) obținerea biomasei de *Rh. rhodochrous*, (2) pregătirea suspensiei de bacterii; (3) pregătirea soluției coloidale de nanoparticule; incubarea amestecului de celule bacteriene și nanoparticule pe

agitator; separarea celulelor de rodoci acoperite cu nanoparticule; (4) imobilizarea bacteriilor de rodoci acoperite de nanoparticulele pe suprafața suporturilor anorganice – obținerea nanobiosistemelor.

7. A fost testată capacitatea nanobiosistemelor de a descompune trifluralina în soluție apoasă, concentrația inițială a pesticidului – 50 mg/L. Au fost colectate probe de soluție apoasă la începutul experimentului T_0 și peste 7 zile de incubare.

Analiza probelor a fost efectuată la cromatograful lichid „Agilent 1200” cu detectorul DAD (2005).

5. Rezultatele obținute

A fost demonstrat, că maximele de difracție observate corespund fazei cubice ale nanoparticulelor de Fe_3O_4 (grupa spațială $Fd3m$, $a = 8.3952 \text{ \AA}$). Maxima principală de difracție corespunde planurilor cristalografice spinelului cubic inversat Fe_3O_4 .

A fost demonstrat, că coordinarea PVP cu nanoparticulele de magnetită are loc prin legăturile de azot și oxigen din PVP. Deci, PVP este folosit în calitate de stabilizator polimeric al nanoparticulelor de magnetită. Introducerea polimerului în timpul sintezei presupune formarea grupei carbonil, încărcată negativ pe suprafața nanoparticulelor de magnetită, ceea ce contribuie la formarea unei soluții coloidale stabile.

A fost demonstrată morfologia mostrelor de nanomagnetită sintetizată în prezența PVP, cu globule vizibile de nanoparticule înconjurate de PVP.

A fost constatat, că sinteza orientată a nanoparticulelor de dimensiunea dorită depinde de raportul dintre PVP și componentele inițiale ale sintezei. În funcție de concentrația PVP, dimensiunea nanoparticulelor poate varia între 20-60 nm.

A fost constatat, că nanoparticulele obținute au proprietăți superparamagnetice.

A fost demonstrat, că nanoparticulele Fe_3O_4 /PVP posedă activitate de tip catalază și peroxidază și sunt nanozime multifuncționale.

Analiza rezultatelor obținute a arătat că, indiferent de metoda de obținere, nanoparticulele Fe_3O_4 nu au efect pronunțat asupra creșterii rădăcinilor și coleoptilelor de ovăz. De asemenea, aceste nanoparticule nu au influențat creșterea rădăcinilor și hipocotilelor de dovlecel.

Nanoparticulele studiate au favorizat creșterea masei medii, atât a rădăcinilor de ovăz (concentrații de 1-10 mg/L), cât și a celor de dovlecel (concentrația 25 mg/L). Datele obținute indică asupra faptului că nanoparticulele de Fe_3O_4 influențează dezvoltarea sistemului radicular, ceea ce este un factor important pentru fitoremediere.

În toate variantele experimentale a fost observat un nivel ridicat de adsorbție a celulelor bacteriene. Cel mai înalt grad de imobilizare a fost obținut pe suporturile de kieselgur – 97,30, și perlită – 98,74%.

A fost arătat că după ce suportul diatomită, cu dimensiunea granulelor de 0,25-0,50 mm, a fost mărunțit, până la obținerea fracțiunilor cu o dimensiune de 0,05-0,1 mm, gradul de imobilizare a celulelor a crescut de la 74,76% la 94,18%.

A fost demonstrat, că în procesul imobilizării tulpina *R. rhodochrous* a disociat, formând colonii inițiale de tip S, colonii rugoase (R) și colonii S altercoler. După contactul celulelor cu bentonita variabilitatea tulpinii alcătuia 0,88%. Pe kieselgur a fost observată apariția tipului R și S altercoler, variabilitatea fiind de 1,05%.

A fost stabilit că acțiunea nanoparticulelor depinde de concentrația și de metoda de obținere a lor. În prezența nanoparticulelor de magnetită are lor stimularea creșterii celulelor bacteriene, exprimată prin sporirea numărului de UFC/ml cu 147,77-176,11% față de martor. Creșterea ulterioară a concentrației de nanoparticule a dus la scăderea efectului stimulator până la 112,96-167,16% față de martor.

La creșterea în prezența a 100 mg/l NP Fe₃O₄ a fost stabilită nu doar scăderea numărului de CFU, dar și disocierea tulpinii în 4 tipuri de colonii: S, S altercoler, R și S-R, totuși tipul de bază S rămânând predominant – 99,5%.

A fost elaborat protocolul preparării nanobiosistemelor din celulele bacteriei *Rh. rhodochrous* CNMN-Ac-05 și nanoparticulele de magnetită Fe₃O₄ S29 și Fe₃O₄ SR1, imobilizate pe suporturi anorganice. Conform protocolului raportul ”suportul : biomasa : nanomaterialul” este ”100 : 15 : 1” (m/m/m).

Utilizarea nanobiosistemelor a sporit degradarea trifluralinei, până la 3 zile, comparativ cu celulele bacteriene în stare liberă.

Eficiența degradării trifluralinei nu depindea de metoda preparării a nanoparticulelor de magnetită.

6. Diseminarea rezultatelor obținute în formă de publicații.

1. Articole în reviste științifice

2.1. în reviste din străinătate recunoscute

POSTOLACHI, O., RASTIMESINA, I., JOSAN, V., GUTUL, T. Viability and phenotypic heterogeneity of *Rhodococcus rhodochrous* CNMN-Ac-05 in the presence of magnetite nanoparticles. In: *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*. University of Oradea Publishing House. 2020, vol. 27, nr. 2. Print-ISSN: 1224-5119, e-ISSN: 1844-7589 (*în tipar*).

RASTIMESINA, I., POSTOLACHI, O., JOSAN, V. Dissociation of *Rhodococcus rhodochrous* population after the whole cells immobilization. In: *Bulletin of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture*. 2020, vol. 77, pp. (*în tipar*).

2. Teze în culegeri științifice

4.1. în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare)

RASTIMESINA, Inna, POSTOLACHI, Olga, JOSAN, Valentina. Dissociation of *Rhodococcus rhodochrous* population after the whole cells immobilization. In: *Book of Abstract 19th International Conference "Life Sciences for Sustainable Development"*, September 24-26, 2020, Cluj-Napoca, Romania, p. 176.

7. Diseminarea rezultatelor obținute în formă de prezentări (comunicări, postere, teze/rezume/abstracte) la foruri științifice

RASTIMESINA, I., POSTOLACHI, O., JOSAN, V. Dissociation of *Rhodococcus rhodochrous* population after the whole cells immobilization. *19th International Conference "Life Sciences for Sustainable Development"*, USAMV Cluj-Napoca, Romania, 24-26 septembrie, 2020. Comunicare orală.

8. Protecția rezultatelor obținute în formă de obiecte de proprietate intelectuală

Nu este caz

9. Materializarea rezultatelor obținute

10. Dificultățile în realizarea proiectului

11. Concluzii .

Nanoparticulele de magnetită, obținute prin metoda modificată de co-precipitare și identificate prin metodele analizei chimice, XRD, FTIR-spectroscopiei și SEM-microscopiei, sunt stabilizate de poli-N-vinilpirolidonă, posedă suprafața încapsulată și păstrează proprietățile magnetice în prezența învelișului polimeric. Nanoparticule Fe₃O₄/PVP posedă activitate de tip catalază și peroxidază și sunt nanozime multifuncționale. Prin modificarea raportului dintre PVP și componentele inițiale ale sintezei nanomaterialului, poate fi realizată sinteza orientată a nanoparticulelor de dimensiuni dorite.

Acțiunea nanoparticulelor de magnetită asupra germinării și parametrilor de creștere a semințelor de dovlecel și ovăz nu depinde de metoda de sinteză a nanoparticulelor (coprecipitare în condiții de laborator sau la reactorul multifuncțional). Nanoparticulele Fe₃O₄ S29 și SR1 nu acționează asupra lungimii rădăcinilor și hipocotilelor la dovlecel și coleoptilelor la ovăz, dar, în dependența de concentrație, stimulează masa medie a rădăcinilor.

Din 4 suporturi naturale anorganice testate, cel mai înalt grad de imobilizare a celulelor bacteriene *Rhodococcus rhodochrous* CNMN-Ac-05 a fost obținut pe suporturile de kieselgur și perlită. Prelucrarea fizică a granulelor de diatomită a sporit gradul de imobilizare a celulelor bacteriene.

În prezența nanoparticulelor de magnetită are loc stimularea creșterii celulelor bacteriene, acțiunea nanoparticulelor fiind dependentă de concentrația și metoda de obținere a lor. În procesul imobilizării, și ca rezultat al contactului cu nanomaterialele, tulpina *Rhodococcus rhodochrous* CNMN-Ac-05 a disociat, formând colonii de tip S, SR R și S altercoler.

Utilizarea nanobiosistemelor a sporit degradarea trifluralinei, până la 3 zile, comparativ cu celulele bacteriene în stare liberă. Eficiența degradării trifluralinei nu depindea de metoda preparării a nanoparticulelor de magnetită.

Conducătorul de proiect

_____ / Rastimeșina Inna

Data: _____

LȘ