



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2013 00987

(22) Data de depozit: 13.12.2013

(41) Data publicării cererii:
30.10.2015 BOPI nr. 10/2015

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE VEST "VASILE
GOLDIȘ" DIN ARAD, BD. REVOLUȚIEI
NR. 94-96, ARAD, AR, RO

(72) Inventatori:
• PETRESCU CONSTANTIN-MARIAN,
ALEEA ROMANȚA NR. 2, SC. B, AP. 17,
ET. 3, ARAD, AR, RO;

• TURCUȘ VIOLETA, STR. TÂRGULUI
NR. 5-7, BL. 15, SC. A, ET. 3, AP. 16, ARAD,
AR, RO;
• ARDELEAN AUREL,
SPLAIUL TOTH SANDOR NR. 6/B, ARAD,
AR, RO;
• BRATOSIN DANIELA, STR. TRESTIANA
NR. 5, BL. 9, SC. 1, ET. 6, AP. 24,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO

(54) METODĂ DE DETERMINARE A ECOTOXICITĂȚII PENTRU
BIOMONITORIZAREA POLUĂRII MEDIULUI ACVATIC

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de determinare a ecotoxicității pentru monitorizarea poluării mediului acvatic. Metoda conform invenției constă în citometria în flux a procentului de celule moarte, pe baza modificărilor de autofluorescență în FL3/FSC - autofluorescență/talie celulară - sau FL3/SSC - autofluorescență/conținut celular - sub acțiunea substanțelor poluante, a algelor

verzi unicelulare, atunci când acestea intră în contact cu diverși poluanți, și analiza citogramelor, pentru aprecierea gradului de poluare a mediului.

Revendicări: 1
Figuri: 4



a 2013 001987
13.12.2013

48

DESCRIEREA INVENȚIEI

METODA DE DETERMINARE A ECOTOXICITĂȚII PENTRU BIOMONITORIZAREA POLUĂRII MEDIULUI ACVATIC.

Societatea umană se confruntă în prezent cu probleme majore care vizează poluarea mediului și calitatea alimentației, care de altfel se găsesc într-o dependență directă. În acest context, evaluarea poluării mediului acvatic natural și a celui din fermele piscicole în particular ca și aprecierea gradului de risc pe care îl are asupra calității viitorului produs alimentar este extrem de importantă.

Pentru a răspunde acestor nevoi, ecotoxicologia mediului acvatic s-a dezvoltat bazându-se pe analiza chimică a micropoluantilor dar și pe metode biologice de evaluare, respectiv pe teste de ecotoxicologie (bioanalize sau bioteste). Pe de o parte tehnicile de analiză au devenit din ce în ce mai precise și mai sensibile, cum ar fi cromatografia în fază gazoasă cuplată cu spectroscopia de masă pentru micropoluantii organici și spectrometria de masă în plasmă pentru metalele grele, ambele permițând analiza unui spectru larg de poluanți, iar pe de altă parte tipurile de bioteste ecotoxicologice s-au multiplicat înainte de a cunoaște o perioadă de standardizare la scară internațională (norme ISO, CEN, linii directoare OCDE).

Un test ecotoxicologic este un test experimental care determina efectul unuia sau mai multor produse pe un grup de organisme selectionate, în condiții bine definite. (Keddy *et al.*, 1994). Testele de toxicitate sau ecotoxicitate reprezintă însă o componentă importantă pentru evaluarea impactului substanțelor chimice asupra ecosistemelor deoarece acestea indică efectele toxice ale amestecurilor chimice complexe. În general, în testele de toxicitate, grupuri de organisme selectate sunt expuse la materiale de testare (probe de apă, sedimente sau sol), în condițiile definite pentru a determina potențialele efecte adverse și ele au un rol esențial în procesul de evaluare a riscurilor ecologice. Testele de toxicitate au ca scop furnizarea de date asupra efectelor obținute pe un esantion, în scopul aprecierii prin extrapolare a pericolului exercitat de ansamblul din care a fost prelevat esantionul asupra mediului inconjurator. Efectele toxice sunt măsurate în laborator expunând organisme indicatoare acțiunii esantionului de testat

Amara
2
yruy

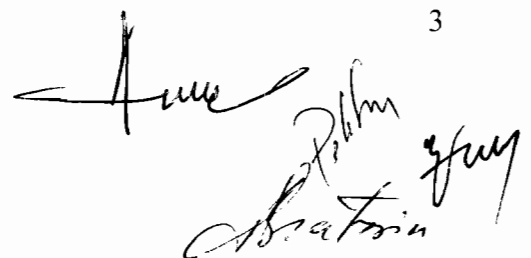
și prin compararea cu un esanțion de control ca martor (fără contaminant) bazându-se pe principiul de cauzalitate între doză și răspuns.

Domeniile de aplicare a biotestelor ecotoxicologice sunt multiple, precum: înregistrarea de noi substanțe chimice (fitosanitare, pesticide, detergenți, etc.), supravegherea apelor uzate menajere și industriale la intrarea și ieșirea din stațiile de epurare, stabilirea ecotoxicității deșeurilor speciale și evaluarea riscului ecotoxicologic pentru siturile contaminate, controlul apelor de percolare și al nămolurilor din stațiile de epurare. Rezultatele biotestelor servesc drept complement datelor chimice pentru stabilirea criteriilor de calitate și concentrațiilor maxime admise.

Biotestele de laborator folosite în prezent se realizează în general cu nevertebrate (testul pe *Daphnia* (EN ISO 6341, NF T 90-378, OCDE 202), alge (testul pe Specia *Pseudokirchneriella subcapitata* (NF T 90-375), bacterii (testul pe bacteria marină *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum* NRRL B-11177), teste pe organisme terestre precum orz, cresson, salată verde (ISO 11269-1, -2, NF X 31-203) și utilizează diferite mijloace pentru măsurarea toxicității produsului. Maniera cea mai comună utilizată este măsurarea mortalității sau reproducerii sau cuantificarea vitezei de creștere a rădăcinilor, de germinare sau de creștere a plantelor, ceea ce face ca aceste teste să nu fie nici ușor de realizat și nici foarte exacte prin metodele de evaluare folosite, constituind dezavantaje ce se încearcă a fi depășite. Pe plan mondial, în prezent există un interes crescut în identificarea și utilizarea de parametri mult mai sensibili, cercetătorii încercând imaginarea continuă de noi metode (teste) biologice de identificare, bazate pe noi biomarkeri sensibili pentru cunoașterea efectelor imediate și a celor îndepărtate, ale diverselor substanțe asupra vieții acvatice în general și asupra sănătății omului în particular.

În acest context, invenția ce face obiectul prezentei cereri de brevet reprezintă o nouă metodă de determinare (test) toxi- și ecotoxicologică bazată pe utilizarea microalgei *Chlorella sp.* și analiza prin citometrie în flux a acesteia pentru determinarea procentului de celule moarte, pe baza modificărilor de fluorescență în FL3/FSC (autofluorescența/talie celulară) sau FL3/SSC (autofluorescența/conținut celular) sub acțiunea substanțelor poluante, metoda ce poate fi utilizată pentru aprecierea gradului de poluare a apelor și pentru biomonitorizarea acestora.

Microalgele pot fi considerate ca celule ideale pentru a fi utilizate în ecotoxicologie dar și pentru analiza prin citometrie în flux. În aceste condiții am considerat că putem utiliza microalgele ca „senzori” sensibili de apreciere a poluării și s-a elaborat un biotest de apreciere a



gradului de toxicitate sau poluare a mediului acvatic pe bază de citometrie în flux cu microalge precum *Chlorella sp.*, biotest ușor de realizat și mult mai rapid în comparație cu celelalte bioteste folosite în prezent.

Totodată, fiind bazat pe citometrie în flux, acest biotest imprumută din avantajele citometriei în flux (analiza celulă de celulă, pe un număr foarte mare de celule, viteza mare de analiză (10 000 celule sau mai mult/minut) și o interpretare statistică a datelor. În analiza prin citometrie în flux, o celulă vie prezintă anumite caracteristici care constituie baza de evaluare a viabilității celulare, respectiv: talia sau forma (FSC) și refringenta (SSC), care sunt condiționate de nivelul de hidratare al celulei, de starea citoscheletului și a organelor. Când o celulă este alterată, ea începe să piardă aceste caracteristici. Estimarea viabilității celulare prin măsurarea absorbției și difuziei luminii, cunoscută și ca "analiza directă în sistem FSC/SSC", (light scatter measurements) deoarece nu implică utilizarea niciunui reactiv, este deosebit de simplă și sensibilă. După interceptarea luminii incidente, celula emite un anumit număr de semnale. Lumina difuzată sub un unghi ascuțit sau în ax (FSC) poate fi corelată cu talia celulară, permițând astfel de a distinge o celulă de agregate sau resturi celulare și a aprecia viabilitatea celulară, deoarece celulele moarte difuzează mai slab lumina în această direcție. Lumina difuzată sub un unghi drept (SSC) permite studierea refringentei citoplasmice, a conținutului celular și a raportului nucleu-citoplasmatic.

În plus, microalgele conțin pigmenți de fotosinteză precum clorofila a, carotenoizi și cateodată ficobiline care sunt taxon specifici și care depind de condițiile de cultivare (iluminare, compoziția în nutrienți, temperatura, pH-ul mediului, expunerea la inhibitori de fotosinteză) și care în plus conferă autofluorescența celulară. Deoarece compoziția în pigmenți este specifică pentru speciile de microalge, analiza prin citometrie în flux a autofluorescenței este utilizată recent pentru clasificarea fitoplanctonului prelevat din mediul înconjurător. Clorofila a este singurul pigment prezent în toate microalgele fotoautotrofe. Ea emite în intervalul spectral roșu (> 650 nm), deci în FL3. Celelalte clorofile, b, c și d, capturează fotoni și trec astfel la clorofila a. Mai mult decât atât, autofluorescența clorofilei fiind un biomarker unic al organismelor fotosintetizante, ea permite stabilirea unei „porți” sau „ferestre” (flow cytometric gate) pentru separarea microalgelor de alte particule sau microorganisme din proba. În plus, se pot utiliza alți coloranți fluorescenți specifici ce pot furniza informații despre starea fiziologică a microalgelor.

4
Aure
Palm
yany
Abatone

Invenția ce face obiectul prezentei cereri de brevet reprezintă o nouă metodă de determinare prin citometrie în flux a procentului de celule moarte, pe baza modificărilor de fluorescență în FL3/FSC (autofluorescența / talie celulară) sau FL3/SSC (autofluorescența/conținut celular) sub acțiunea substanțelor poluante, metoda ce poate fi utilizată pentru aprecierea gradului de poluare a apelor și pentru biomonitorizarea acestora.

În cazul analizelor noastre de citometrie, corelate cu imagini complementare de microscopie, așa cum se prezintă în Figura 1 se observă că prezența clorofilei permite o separare populațională în funcție de acest parametru printr-o analiză de tip „dot-plot biparametric”, respectiv FL3/FSC (autofluorescența/talie celulară) și mai ales FL3/SSC (autofluorescența/conținut celular). Subpopulația cu autofluorescență mare, conținută în regiunile R1 și R3 din figura 1A are o autofluorescență exprimată printr-un MFI (Media de Intensitate a Fluorescenței) de 2121,27 în timp ce aceeași subpopulație dintr-un eșantion cultivat în condiții de poluare (Figura 1 B) prezintă doar un MFI de 1063,53.

Analiza citometrică a celor două eșantioane de microalge mai permite deasemeni prin utilizarea aceluiași indicatori, respectiv talie, conținut celular și autofluorescență, determinarea % de celule non-clorotice, deci cu conținut mare de clorofilă și respectiv % de celule clorotice, sau celule cu conținut scăzut de clorofilă. În primul caz (Figura 1A) se observă că avem o subpopulație non-clorotică majoritară de 97,76%, procentaj obținut din ambele tipuri de citograme dot-plot (FL3/FSC și FL3/SSC), în timp ce sub-populația de celule clorotice reprezintă doar 2,24.

Pentru eșantionul B din Figura 1B, cu microalgele aflate sub influența unor poluanți, heterogenitatea populațională se traduce printr-un procent de 59,9% celule non-clorotice, viabile și 40,11% celule clorotice, non-viabile, procentaje obținute identic din ambele tipuri de dot plot (FL3/FSC și FL3/SSC).

În urma acestor rezultate prezentate se poate observa că prin citometrie în flux directă (talie celulară, conținut celular și autofluorescența conferită de clorofila a) se poate obține o analiză a heterogenității celulare (celule non-clorotice și clorotice) ceea ce reflectă implicit starea de „sănătate” a unei culturi de microalge.

Astfel se obține procentul de celule moarte ce va fi luat în calcul pentru trasarea curbelor „concentrație-răspuns” celular necesare în vederea calculării concentrației de poluant care induce un efect toxic de 50% asupra indivizilor (CE50), conform Figura 2. Această concentrație, numită

Handwritten signature and stamp at the bottom right of the page.

și concentrație eficientă $50 = CE_{50}$, este mediana calculată după relația doză-răspuns. Cu ajutorul acestor curbe se pot determina și valorile NOEC și LOEC.

În cadrul testului, pentru un eșantion toxic, relația între concentrații și răspunsuri se prezintă adesea sub forma unei curbe sigmoide precum cea din Figura 2. Curbele tip "concentrație-răspuns" au pe abscisă concentrațiile de poluant iar pe ordonată procentul efectului toxic urmărit, care în cazul nostru este reprezentat de procentul de celule moarte rezultate din analiza prin citometrie în flux a eșantioanelor. Din aceste curbe, se află EC_{50} , în cazul nostru aceasta fiind reprezentată de concentrația de poluant care a indus moartea a 50 % din celulele de microalga *Chlorella* supuse analizei, mai exact a 50 % din celulele care au intrat în contact cu eșantionul de apă de testat.

Calculul final al gradului de toxicitate (concentrație eficace = C_{Ex}) se efectuează cu datele obținute în urma analizei de citometrie de flux, iar în paralel se efectuează un test martor pozitiv unde se utilizează un poluant cunoscut.

Conform normelor recent adoptate ISO 11348-3 se cere utilizarea de substanțe de referință pentru bioteste, recomandându-se spre exemplu pentru testele cu *Daphnia*, *Vibrio* sau alge verzi utilizarea 3,5-dichlorophenol, $K_2Cr_2O_7$, sau $Zn SO_4 \cdot 7 H_2O$. Noi considerăm ca se impune spre comparație în momentul efectuării biotestului folosirea unui metal greu luat ca standard. Numeroase soft-uri permit în general calculul pentru CE_{50} , dar această valoare poate fi calculată foarte simplu pe curba concentrație-răspuns, conform Figurii 2. Cu cât concentrația eficientă CE_{50} este mai scăzută, cu atât eșantionul este mai toxic.

Metoda noastră de determinare a ecotoxicității pentru biomonitorizarea poluării mediului acvatic presupune parcurgerea mai multor etape de lucru:

- 1) Prelevarea, transportul și păstrarea eșantioanelor (probelor) de analizat
- 2) Prepararea eșantioanelor
- 3) Obținerea unei suspensii de microalge (*Chlorella*)
4. Expunerea celulelor de *Chlorella* într-o suspensie de BBM (Bold Basal Medium) la $20^{\circ}C$ și la obscuritate, pentru câteva zile (3-6 zile), în plăcuțe de culturi de celule continand dilutii ale esantionului de apa poluata pentru evaluare. În cadrul biotestului, expunerea microalgelor se face:

6



- 4.1) în diluții seriale sau într-o progresie geometrică din eșantionul de analizat ceea ce permite obținerea mai multor răspunsuri cuprinse între 10% și 90% mortalitate (ex: o gamă de 8-10 concentrații din proba de analizat).
- 4.2) într-un poluant cu concentrații alese (*pentru a acoperi mai multe ordine de mărime în scopul delimitării gamei de răspuns celular între 0% și 100% celule moarte*)
- 4.3) într-un mediu standard, non toxic
- 4) Determinarea toxicității esantionului prin analiza microalgelor de *Chlorella* prin citometrie în flux.
- 5) Determinarea procentului de celule moarte, pe baza modificărilor de fluorescență în citograme FL3/FSC (autofluorescența/talie celulară) sau FL3/SSC (autofluorescența/conținut celular) sub acțiunea substanțelor poluante.
- 6) Exprimarea rezultatelor de toxicitate prin trasarea curbelor concentrație-răspuns.

EXEMPLU

Pentru evaluarea gradului de poluare acvatică se parcurg următoarele etape, conform principiilor generale de analiză ecotoxicologică, după cum urmează:

1. Prelevarea eșantionului de apă de testat, cu mențiunea că flacoanele pentru prelevarea eșantioanelor și tot materialul care vine în contact cu proba trebuie să fie curat, chimic inert, ușor de curățat și rezistent (sticlă, polietilen sau PTFE). Se recomandă umplerea flacoanelor în întregime pentru transport care trebuie să se efectueze la rece ($\leq 10^{\circ}\text{C}$) și cât mai repede posibil.

2. Aducerea eșantionului la temperatura ambiantă și omogenizarea sa prin agitare manuală. În scopul reducerii interferenței între materiile în suspensie, soluțiile de testat sunt constituite din supernatantul rezultat din decantarea timp de 2 ore la temperatura ambiantă și prelevat prin pipetare la jumătatea distanței între suprafața materiilor decantate și suprafața lichidului. Dacă turbiditatea după decantare este susceptibilă de a influența cuantificarea prin citometrie în flux se recomandă ca etapă suplimentară o centrifugare complementară (10 minute la 4500 ± 1500 g). În măsura posibilului, o filtrare pe filtre de 0,45 μm , spre exemplu pe membrane inerte de esteri celulozici este de preferat înainte de aplicarea biotestului celular.

Dacă studiul presupune utilizarea unui solvent organic miscibil cu apa pentru solubilizarea sau concentrarea micropoluantilor organici, spre exemplu pentru o extracție de



sediment, este necesar să utilizăm un martor realizat în paralel. Concentrația solventului (acetona, etanol, metanol, dimethylformamida, triethylen glycol, dimethyle sulfoxyde) nu trebuie să depășească 0,1 ml de solvent/litru de mediu pentru analizat și doar în cazuri excepționale poate atinge concentrația de 1% maximum. În toate cazurile, este indispensabilă includerea unui martor care simulează toate fazele de extracție cu solventul.

În cazul extracției poluanților dintr-un eșantion solid, nu există o metodă standard universal aplicabilă. Alegerea unui protocol trebuie să țină cont de obiectivul studiului și de avantajele și limitele acestuia.

3. **Prepararea suspensiei de microalge verzi (*Chlorella*).**

În vederea obținerii suspensiei de microalge verzi se efectuează o subcultura de alge unicelulare de *Chlorella*. Recipientele cu inoculii de alge au fost puse pe rafturi în camera de creștere, sub lumina tuburilor fluorescente cu emisie de lumină albă. Culturile de alge au fost biometrizate periodic la 7, 14, și 30 de zile prin efectuarea de observații ochiometrice. Din cultura de alge se prepară o suspensie de microalge din 25 microlitri (25μl) sediment în 1ml mediu BBM (Bold Basal Medium).

3. **Realizarea unui test preliminar.** Se efectuează un test preliminar, prin expunerea suspensiei de microalge la concentrații alese ale unui poluant cunoscut pentru a acoperi mai multe ordine de mărime în scopul delimitării gamei de răspuns celular între 0% și 100% celule moarte.

4. **Realizarea testului propriu-zis.** Testul definitiv se realizează prin expunerea suspensiei de microalge de *Chlorella* la eșantioanele de analizat pentru care s-au realizat diluții seriale sau într-o progresie geometrică, ceea ce permite obținerea mai multor răspunsuri cuprinse între 10% și 90% mortalitate (ex: o gamă de 8-10 concentrații din proba de analizat). În aceleași condiții se celulele microalgei *Chlorella* și în mediul standard BBM folosit drept control. Important, atât în cazul controlului, a testului preliminar dar și în cazul testului definitiv, suspensia celulară se expune în plăcuțe de culturi de celule continuând diluții ale eșantionului de apă poluată, timp de câteva zile (3-6 zile), la 20°C și în condiții de obscuritate. Dacă este necesar, (în prezența de miros, suspiciune de substanțe volatile, etc.) plăcuța se poate astupa cu un film de parafină.

5. **Determinarea procentului de celule moarte prin citometrie în flux.**

Determinarea procentului de celule moarte prin citometrie în flux conform prezentei invenții, pe baza modificărilor de fluorescență în FL3/FSC (autofluorescența / talie celulară) sau

FL3/SSC (autofluorescența/conținut celular), realizandu-se separat, pentru fiecare set de expunere. Evaluarea rezultatelor pentru biotest se bazează pe examenul citogramelor FL3/FSC sau FL3/SSC, conform cu datele statistice furnizate de programul citometrului pentru cele doua regiuni R1(celule non-clorotice) si R2 (celule clorotice), în corelare cu diluțiile făcute. Procentul de celule moarte (celule clorotice) poate fi calculat din procentul total de celule (100%) din care se scad celulele viabile din cadranul dreapta (celule non-clorotice), conform Figurii 1.

Dacă se face analiza microalgelor de *Chlorella* incubate cu diferitele diluții seriale de Aluminiu (1-6), după 6 zile de incubare, prin citometrie în flux în sistem FL3/FSC (autofluorescența conferită de clorofila a /talie celulară) așa cum este ea prezentată în Figura 3 și corelăm % de celule clorotice din R2 cu același procentaj pentru martorii din Figura 1 se observă că aceste procentaje de celule moarte sunt proporționale cu concentrația de metal greu, respectiv de Aluminiu, variind pentru celulele clorotice din R2 de la 96,25% pentru concentrația de 1mg/ml până la 31,9 în cazul concentrației de 0,0039 mg/ml, față de 40,11% pentru martorul de incubare. Astfel se obține procentul de celule moarte ce va fi luat în calcul pentru trasarea curbelor „concentrație-răspuns” celular necesare în vederea calculării concentrației de poluant care induce un efect toxic de 50% asupra indivizilor (CE50), conform schemei din Figura 2.

6. **Interpretarea testului**

Pe baza % de celule clorotice din R2 obținute la diferite concentrații (Figura 2), se poate trasa curba din Figura 4, curba doză-răspuns pentru calculul EC-50, unde pe abscisă este înscrisă concentrația de poluant, în cazul nostru de Aluminiu.

Din curbele „doza-raspuns” se află CE50, în cazul nostru aceasta fiind reprezentată de concentrația de poluant care a indus moartea a 50 % din microalgele supuse analizei, mai exact a 50 % din celulele care au intrat în contact cu eșantionul de apă de testat, respectiv .

7. **Exprimarea rezultatelor de toxicitate**

În cadrul testului, pentru un eșantion toxic, relația între concentrații și răspunsuri se prezintă adesea sub forma unei curbe sigmoide precum cea din Figura 2. Cel mai frecvent, pentru testele ecotoxicologice, rezultatele sunt exprimate condensat prin concentrația care induce un efect toxic de 50% asupra indivizilor (mortalitate celulară sau a organismelor) sau o inhibiție de 50% a activității organismelor (luminescență, creștere) în comparație cu martorul. Această concentrație, numită și concentrație eficientă 50 = CE₅₀, este mediana calculată după relația doză-răspuns. Pragurile de toxicitate pot fi exprimate fie printr-o valoare particular calculată precum

CEx, cu x cuprins între 1 și 20%, fie prin CSEO (concentrația fără efect observat) numită și NOEC (concentrația fără efect observabil), care este prima concentrație fără efect observabil sau LOEC (concentrația cea mai slabă cu efect observabil) prima concentrație cu efect vizibil (Figura 2). Aceste 2 valori, NOEC și LOEC depind direct de gama de concentrații alese de experimentator în efectuarea biotestului.

Numeroase soft-uri permit în general calculul pentru CE_{50} , dar această valoare poate fi calculată simplu pe curba concentrație-răspuns (Figura 2).

Cu cât concentrația eficientă CE_{50} , respectiv CL_{50} sau CI_{50} este mai scăzută, cu atât eșantionul este mai toxic.

În cazul nostru, după aflarea procentului de celule moarte conform analizei din Figura 3, respectiv din regiunea R2 (celule clorotice) prin tehnica citogramelor FL3/FSC (autofluorescența / talie celulară) sau FL3/SSC (autofluorescența/conținut celular), se trece la trasarea curbelor "concentrație-răspuns" celular în vederea calculării valorii CE_{50} , conform Figurii 4, unde se calculează CE_{50} atât pentru martor cât și pentru eșantioanele de testat, ca fiind concentrația care a dus la un efect toxic ce a provocat moartea a 50% din indivizii analizați (în cazul nostrumicroalgele de *Chlorella*). Calculul final al gradului de toxicitate (concentrație eficace = CEx) se efectuează cu datele finale obținute (cu cât concentrația eficientă CE_{50} este mai scăzută, cu atât eșantionul este mai toxic) și trebuie reamintit că paralel, în condiții identice, se poate efectua un test martor pozitiv unde se utilizează un poluant cunoscut și se trasează o curbă tip concentrație-răspuns celular și pentru acest eșantion, conform normelor recent adoptate ISO 11348-3 pentru alte bioteste, (3,5-dichlorophenol, $K_2Cr_2O_7$, sau $Zn SO_4 \cdot 7 H_2O$), sau cu un alt metal greu luat ca standard..

Această metodă de determinare a ecotoxicității permite elaborarea unui biotest de apreciere a gradului de toxicitate sau poluare a mediului acvatic pe bază de citometrie în flux, ușor de realizat și mult mai rapid în comparație cu celelalte bioteste folosite în prezent. Metoda fiind bazată pe citometrie în flux permite o interpretare statistică a datelor pe un număr foarte mare de celule (10 000 celule sau mai mult), într-un timp scurt de 1-2 minute, fiind destinat studiului ecotoxicologic al amestecurilor complexe de poluanți, iar pe de altă parte, un sistem alternativ pentru monitorizarea ecologică a mediului acvatic.

Problema pe care o rezolvă invenția este reprezentată de evaluarea gradului de toxicitate a mediului acvatic în ansamblul ei printr-o metodă nouă ce se bazează pe determinarea prin

citometrie in flux a procentului de celule moarte, pe baza modificărilor de fluorescență în FL3/FSC (autofluorescența/talie celulară) sau FL3/SSC (autofluorescența/conținut celular) sub acțiunea substanțelor poluante pentru microalge verzi (ex. *Chlorella* sp.) atunci când acestea intră în contact cu diverșii poluanți și aprecierea toxicității acestora.

În acest context, prezenta metodă propusă spre brevetare este de maximă importanță, deoarece rezolvă o problemă cheie în ecotoxicologie și în particular în problematica națională a României, contribuind la evaluarea gradului de poluare a apelor și biomonitorizarea poluării acestora printr-o soluție originală, simplă, sensibil și rapidă.

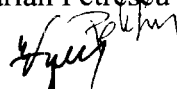


BIBLIOGRAFIE

1. Afkar E., Ababna H., Fathi A.A., 2010, *Toxicological Response of the Green Alga Chlorella vulgaris, to Some Heavy Metals*, American Journal of Environmental Sciences, vol. 6, nr. 3, pp. 230-237.
2. Apel K., Hirt H., 2004, *Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction.*, Ann. Rev. Plant Biol., vol. 55, pp. 373-399
3. Bratosin D., 2007, *Explorarea structurii și funcțiilor celulare prin citometrie în flux*, 2007, Vasile Goldiș University Press, Arad, 245 pg., ISBN: 978- 973-664-213-5.
4. Franqueira D., Orosa M., Torres E., Herrero C., Cid A., 2000, *Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae*, Sci. Total Environ., vol. 247, pp. 119-126.
5. Keddy C, Greene JC and Bonnell MA. 1994. *A review of whole organism bioassays for assessing the quality of soil, freshwater sediment and freshwater in Canada Ecosystem Conservation*, Directorate Scientific Series No. 198, Ottawa, Canada, 185 pp.
6. Prado R., Garcia R., Rioboo C., Abalde J., Cid A., 2009, *Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a microalga exposed to the herbicide paraquat.*, Environ Int 35, 240-247.

REVENDICĂRI

1. Metoda originală de determinare prin citometrie în flux a procentului de celule moarte pe baza modificărilor de autofluorescență în FL3/FSC (autofluorescența/talie celulară) sau FL3/SSC (autofluorescența/conținut celular) sub acțiunea substanțelor poluante a algelor verzi unicelulare (*Chlorella sp*) atunci când acestea intră în contact cu diverșii poluanți și aprecierea toxicității acestora pentru biomonitorizarea poluării mediului acvatic.

Inventatori:

1. Asist.cerc.drd. Constantin-Marian Petrescu
2. Conf.univ.dr. Violeta Turcuș 
3. Prof.univ.dr. Aurel Ardelean 
4. Prof.univ.dr. Daniela Bratosin 

FIGURI

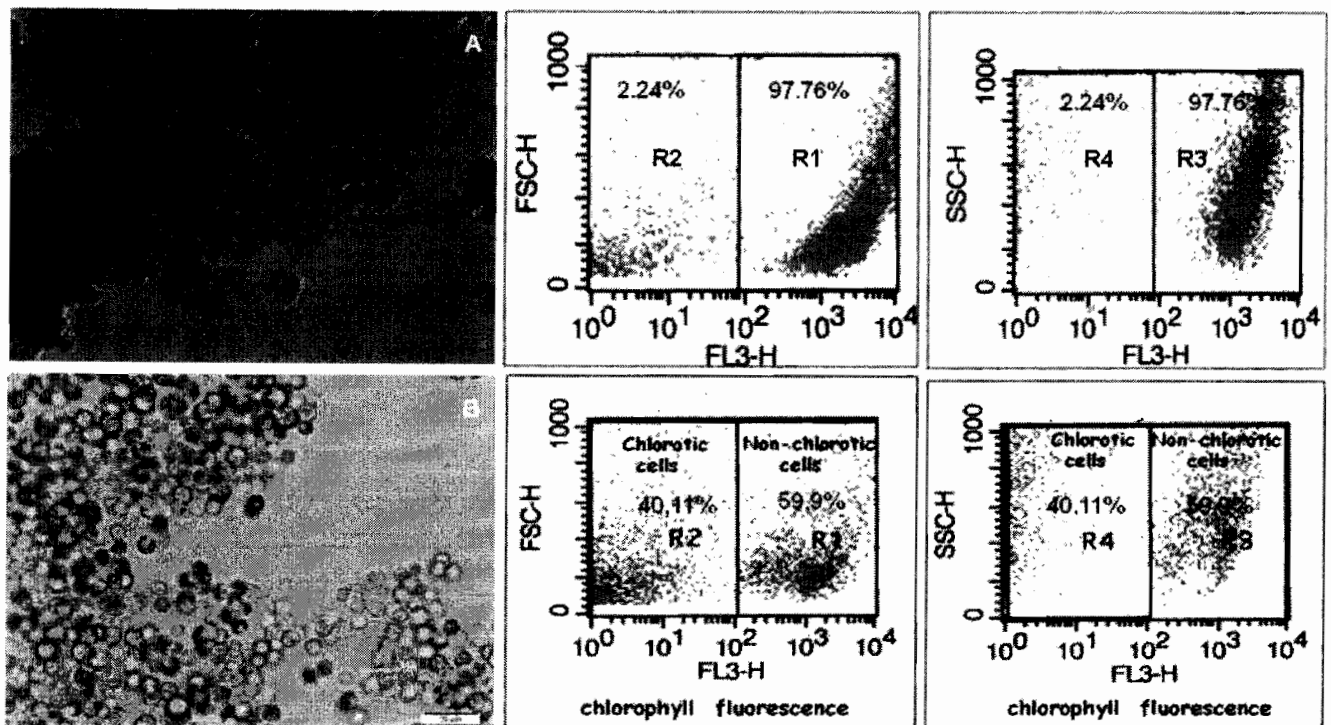


Figura 1. Analiza comparativă în sistem biparametric (dot-plot) FL3/FSC (autofluorescența conferită de clorofila a /talie celulară) și FL3/SSC (autofluorescența conferită de clorofila a /conținut celular) pentru două eșantioane de microalge *Chlorella fusca* cultivate în condiții diferite. A-Microalga *Chlorella* cultivată în mediu normal; B- Microalga *Chlorella* cultivată în mediu preparat cu un eșantion de apă poluată.

(analiza realizată pe un citometru FACScan-Becton Dickinson)

Aanu

Popescu
Gheorghe
Stancu

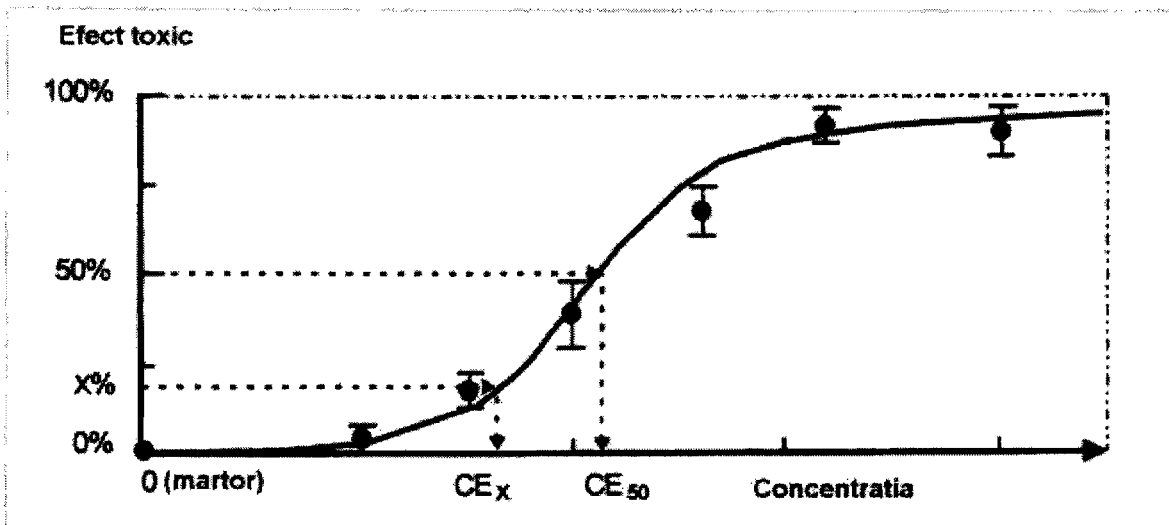


Figura 2. Exemplu de curbă „concentrație-răspuns” (schema de calcul).

Handwritten signature

Handwritten signature

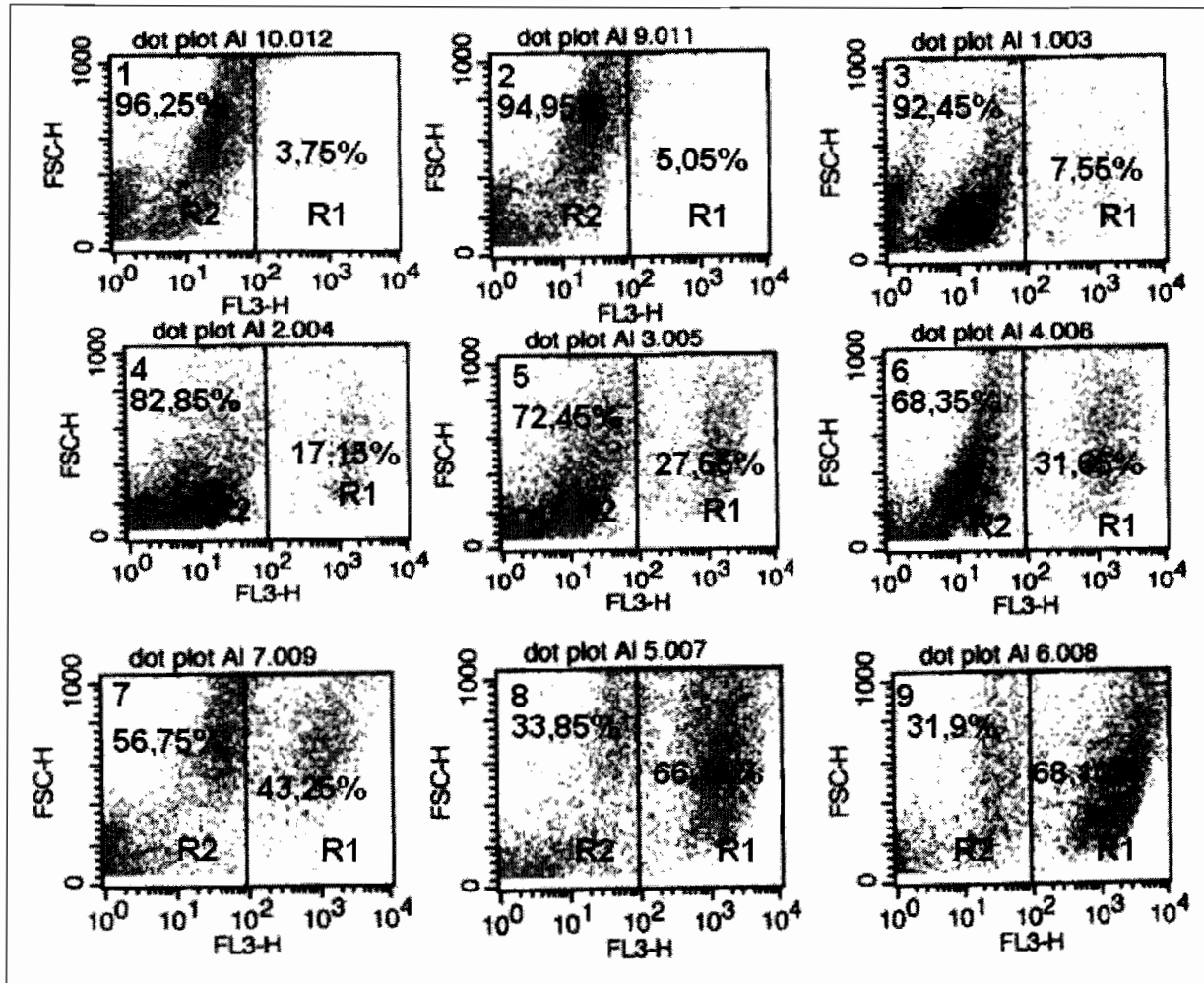


Figura 3. Analiza prin citometrie în flux în sistem FL3/FSC (autofluorescența conferită de clorofila a /talie celulară) pentru calculul celulelor moarte (microalge clorotice de *Chlorella sp.* incubate cu diferite diluții seriale (1-9) de AI cuprise între 1mg/ml și 0,0039mg/ml) după 6 zile de incubare.

(analiza realizată pe un citometru FACScan-Becton Dickinson)

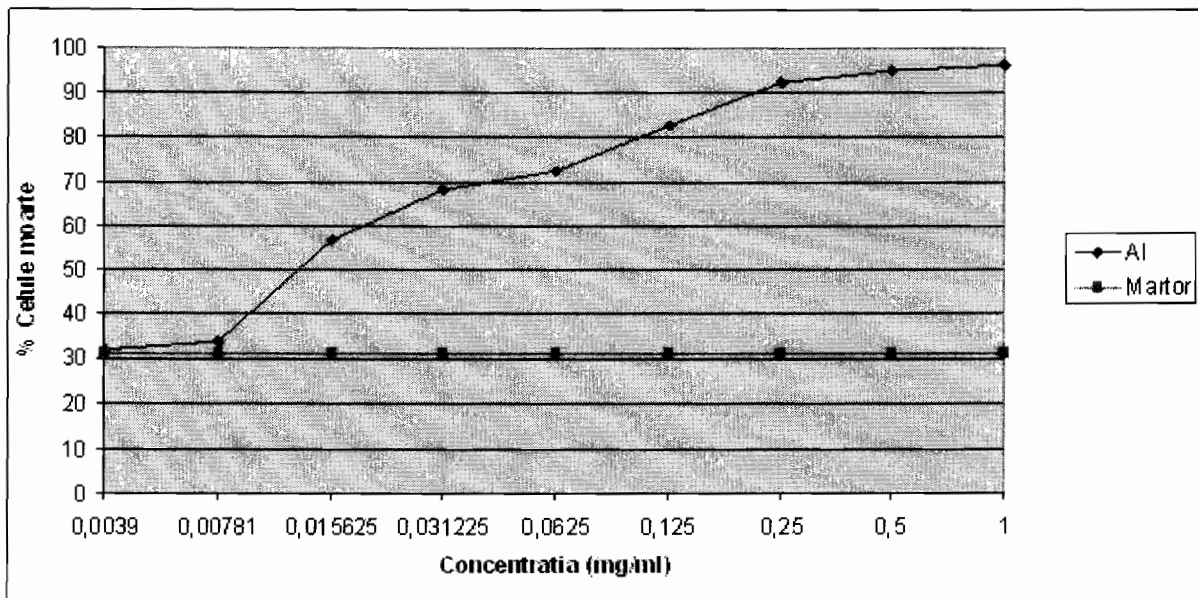


Figura 4. Exemplu de curbă doză-răspuns pentru calculul EC-50 conform cu % de microalge clorotice de *Chlorella sp.* (microalge moarte). Abscisă: concentrația de Aluminiu. Ordonată: % de microalge clorotice de *Chlorella sp.* corespunzătoare regiunii R2(celule clorotice, moarte) din dot-ploturile prezentate în figura 3.

15
[Signature]