

Adaptarea la cultivarea în condiții de bio-reactor a microorganismului *Paenarthrobacter nicotinovorans* pA01



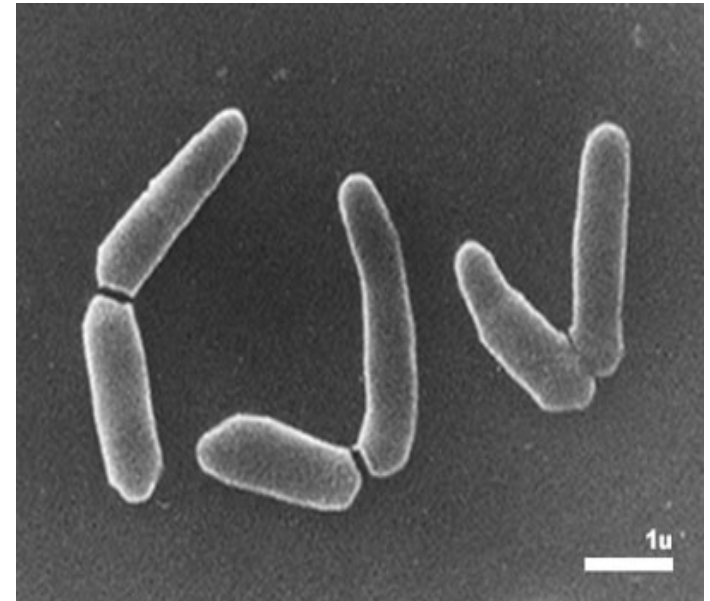
Ignat Ana, Marius Mihășan*



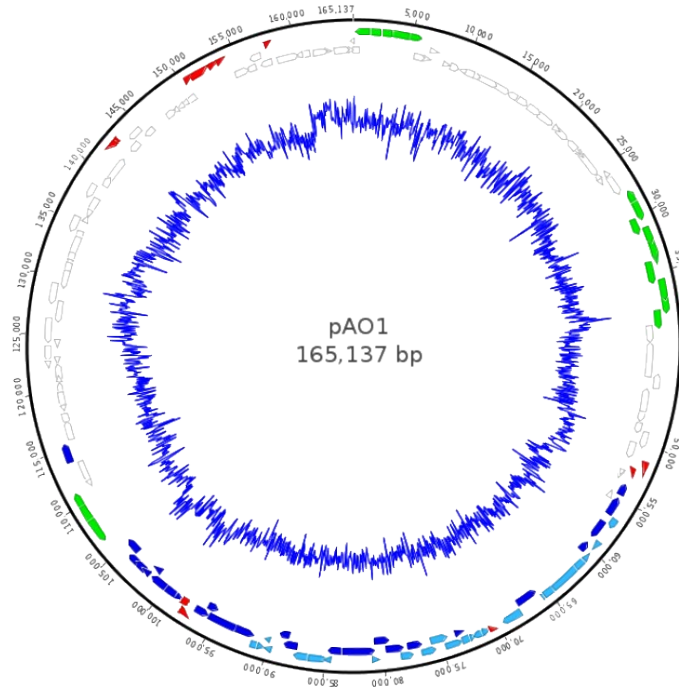
1. Ce este *Paenarthrobacter nicotinovorans*?
2. De ce este util *Paenarthrobacter nicotinovorans*?
3. 6-Hidroxi-nicotina este un compus neuroprotectiv;
4. Cum se obține 6-Hidroxi-nicotina?
5. Materiale și metode;
6. Rezultate și discuții;
7. Concluzii



- Microorganism izolat din solurile cultivate cu tutun
- **Are un metabolism foarte versatil**
- Este capabil să degradeze substanțe extrem de toxice **→ Nicotina**








Paenarthrobacter sp. Fotografie: T. Tamura, T. Nishii & K. Hatano



Brandsch și colab., Universitatea Albert Ludwig din Freiburg, Germania

Izolarea și secvențierea plasmidului

Arthrobacter Oxydans 1–**pAO1**

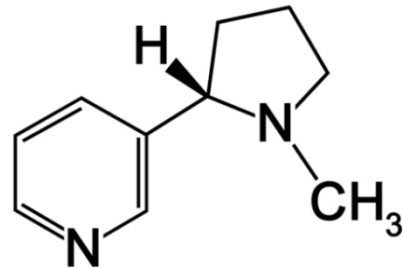
- | | | | | |
|---|---|-------------------------|---|--|
|  |  | Metabolismul nicotinei |  | Transpozoni |
|  | | Catabolismul glucidelor |  | Replicarea plasmidului, diviziune și conjugare |



Paenarthrobacter nicotinovorans poate crește pe medii cu un conținut de 6 g/L de nicotină



Nicotiana tabacum



Nicotina:







- Principalul alcaloid produs de planta de tutun
- **Substanța responsabilă de instalarea dependenței**
- Poate fi letală pentru om (LD₅₀ 0.5 - 1.0 mg/kg)
- **Îmbunătățește percepția, atenția și memoria**
- **O alternativă terapeutică pentru îmbunătățirea deficiențelor cognitive și pentru reducerea daunelor oxidative**



De ce este util *Paenarthrobacter nicotinovorans*?



- Industria de tutun produce anual 300 000 tone de deșeuri cu un conținut de nicotină de 18g/kg

Țara/regiunea	Producția (tone)
 La nivel global	7.176.000
 China	2.995.000
 Brazilia	862.000
 India	720.000
 SUA	397.000
 Uniunea Europeană	262.000


Potrivit datelor FAOSTAT, 2014



GHS06

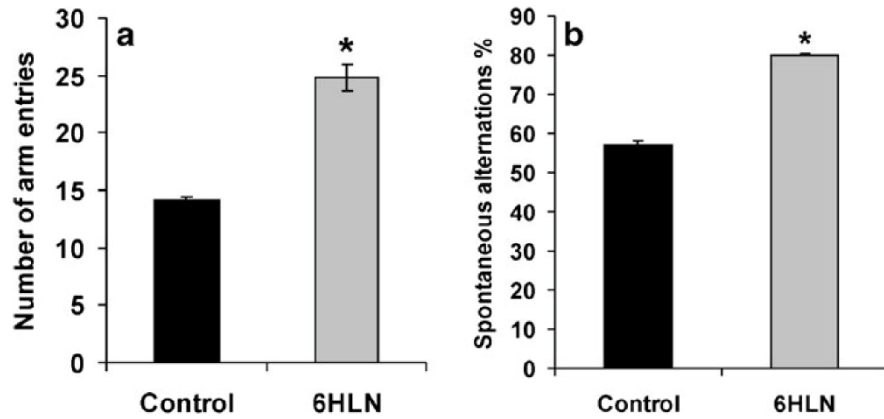


GHS09

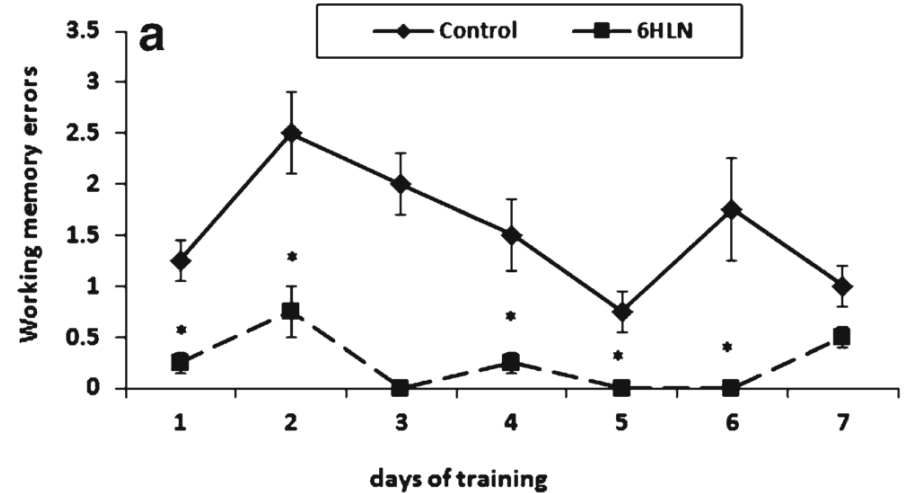
- Aceste deșeuri sunt aruncate, fără a fi prelucrate și depozitate corespunzător
- Deșeuri cu conținut de nicotină  substanțe cu proprietăți farmaceutice



Y-maze task Values are mean \pm S.E.M.
(n=10 animals per group), *p<0.0001 vs. control group



Radial arm-maze task Values are mean \pm S.E.M. (n=10 animals per group), *p<0.0001 vs. control group



Biomedicine & Pharmacotherapy

Volume 86, February 2017, Pages 102–108



Original article

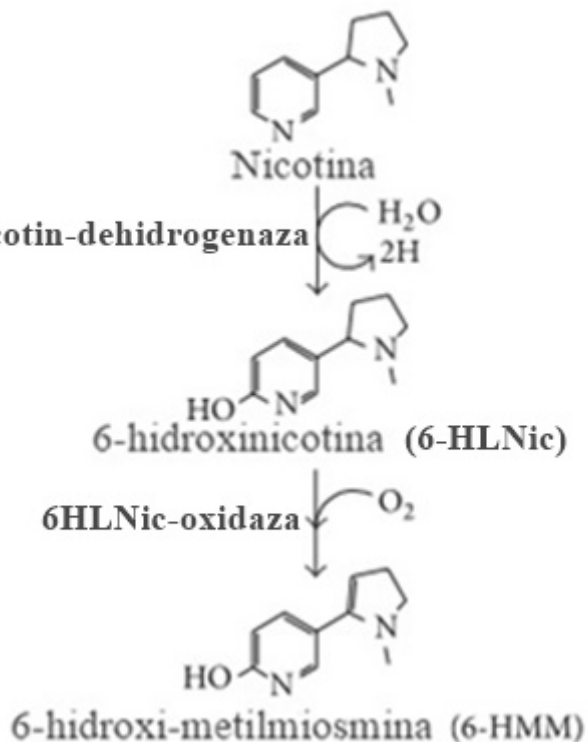
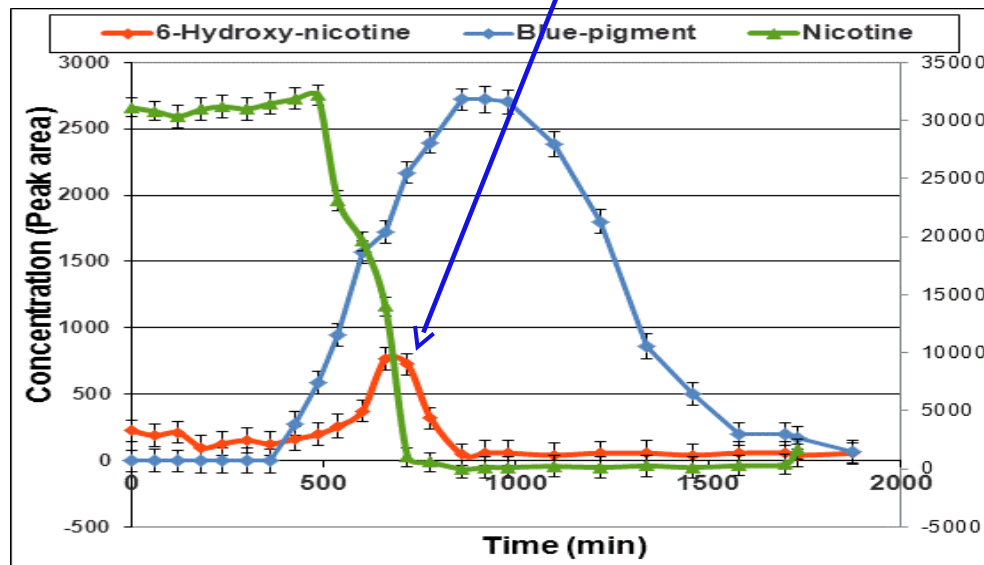
Nicotine versus 6-hydroxy-L-nicotine against chlorisondamine induced memory impairment and oxidative stress in the rat hippocampus

Lucian Hritcu , Radu Ionita, Diana Elena Motei, Cornelia Babii, Marius Stefan, Marius Mihasan

Cum se obține 6-hidroxi-nicotina?



- 6HNic se acumulează în mediu pentru o perioada scurtă de timp



- Sunt necesare metode mai eficiente de cultivarea a tulpinii de *Paenarthrobacter nicotinovorans* și de conversie a nicotinei în 6-hidroxi-nicotina



- **Bioreactorul este un sistem avansat de cultivare a microorganismelor**
- Permite cultivarea în condiții aseptice
- Menține parametri optimi de cultivare la valori constante:
 - Sistem de încălzire-răcire și de monitorizare a temperaturii
 - Sistem de monitorizarea și controlul pH-ului, DO
 - Sistem de agitare
- Vizualizarea și înregistrarea datelor în timp real

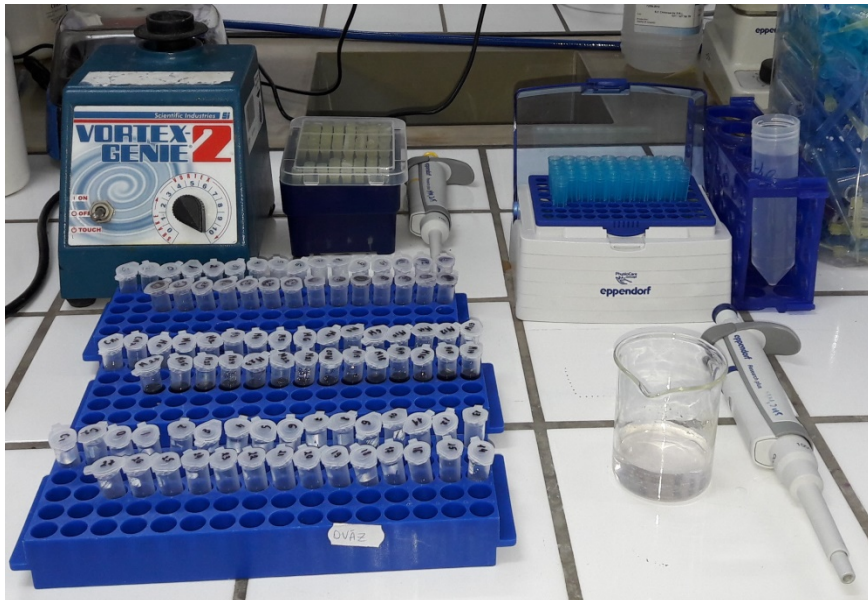
Scopul lucrării **→** acomodare și stabilirea condițiilor de cultivare în bioreactor a tulpinii tulpinii *Paenarthrobacter nicotinovorans*

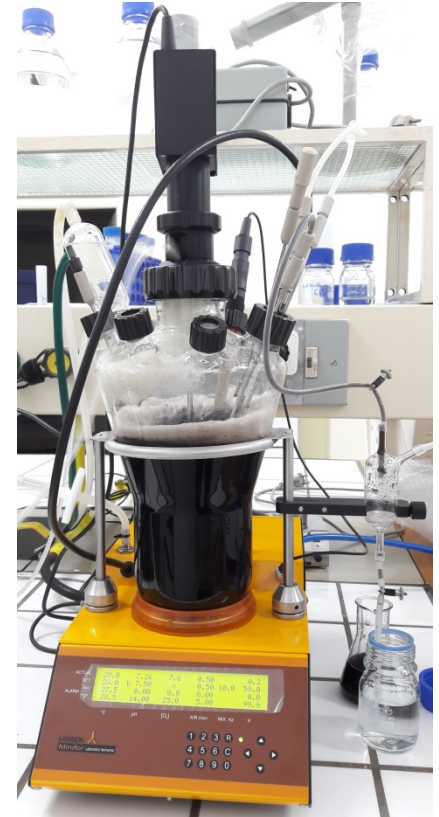
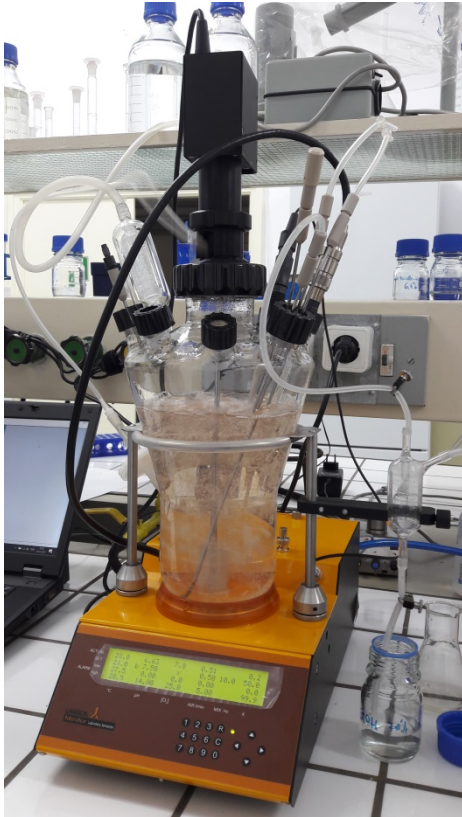


obținerea de 6HNic



1. Tulpini utilizate: *Paenarthrobacter nicotinovorans* pAO1
2. Bioreactor LAMBDA Minifor cu vas de cultură de 3L
3. Mediu citrat, kanamicină, nicotină, soluție de minerale
4. Monitorizarea creșterii → măsurarea densității optice $\lambda=660$ nm
5. Monitorizarea acumulării pigmentului albastru de nicotină → măsurarea densității optice $\lambda=580$ nm



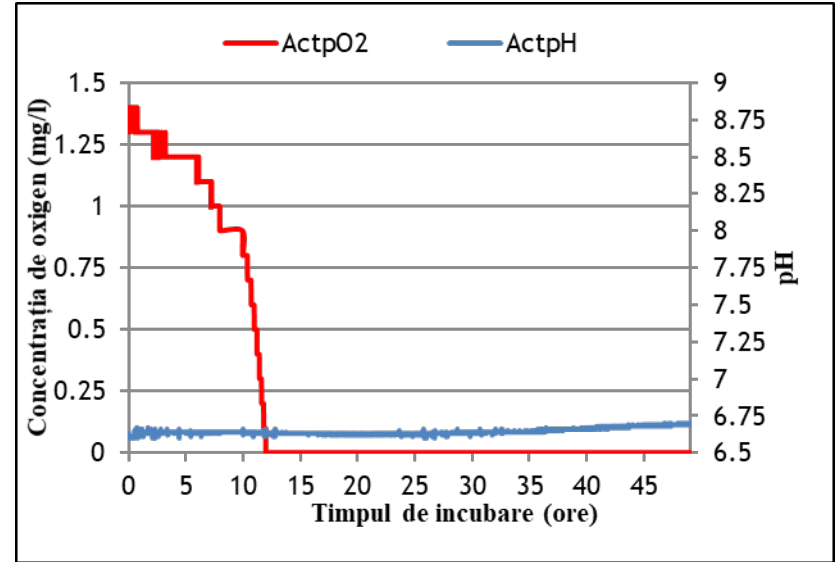
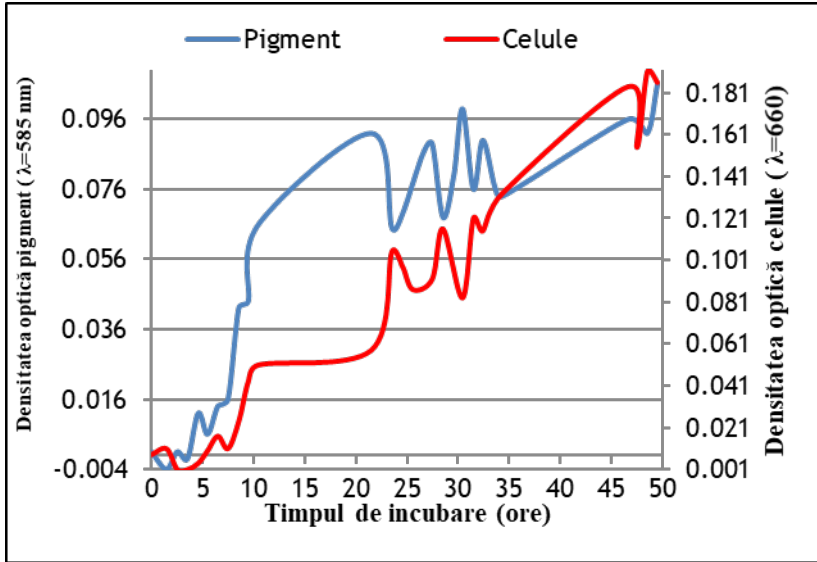


- Aspectul culturii în decurs de 48 ore
- Formarea pigmentului albastru de nicotină → indicator al metabolizării nicotinei de către *P. nicotinovorans*

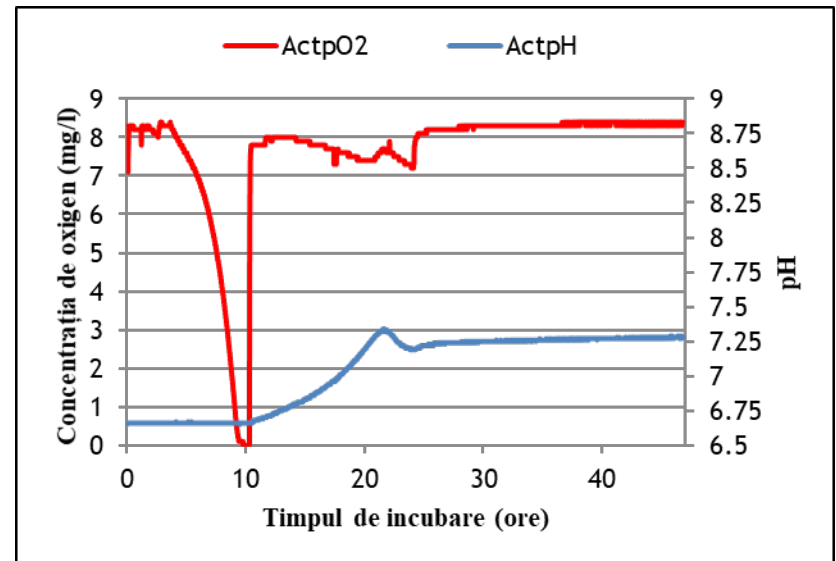
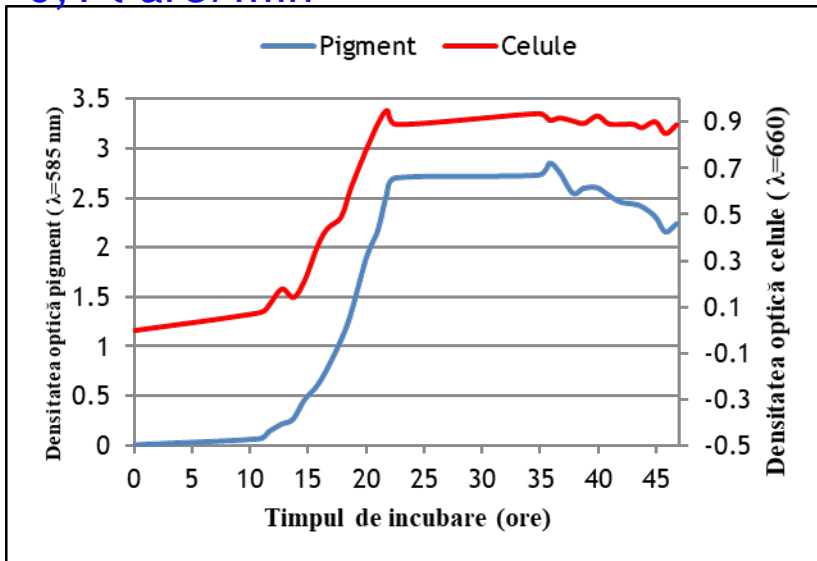
Rezultate și discuții



Fara aerare



0,1 l are/min



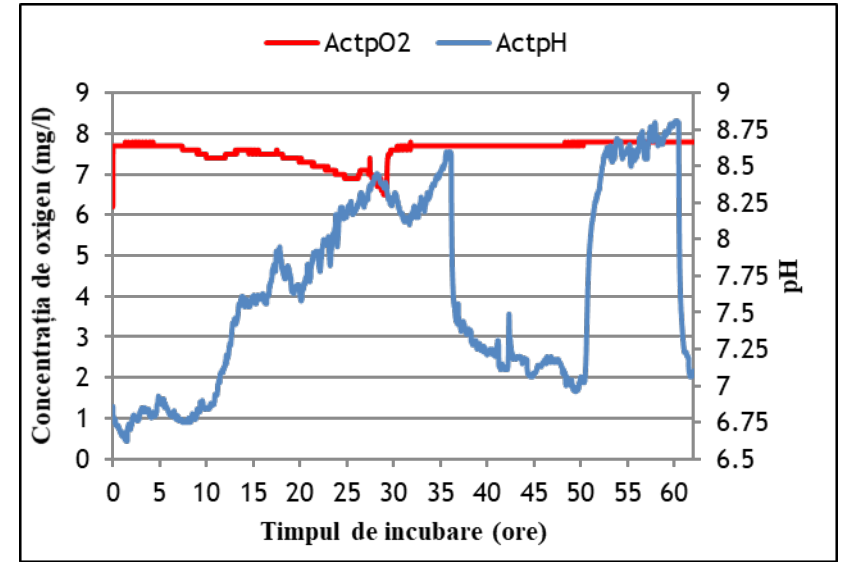
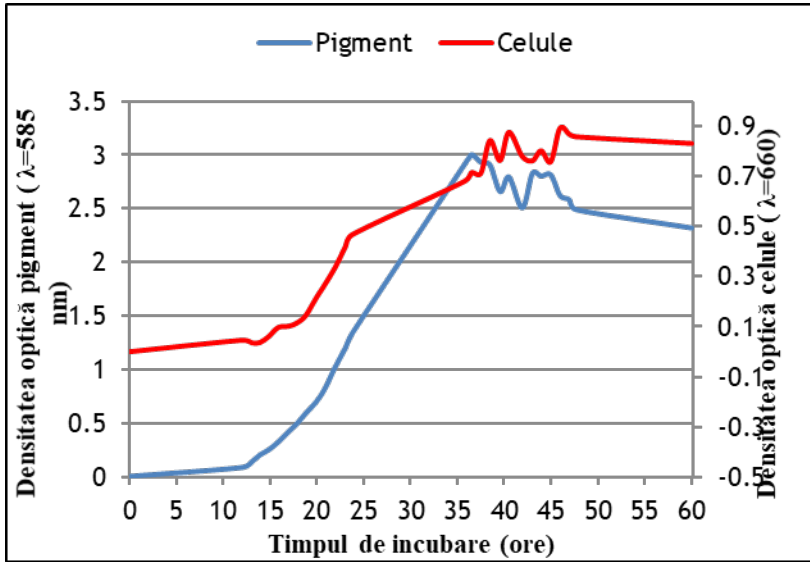
Rezultate și discuții



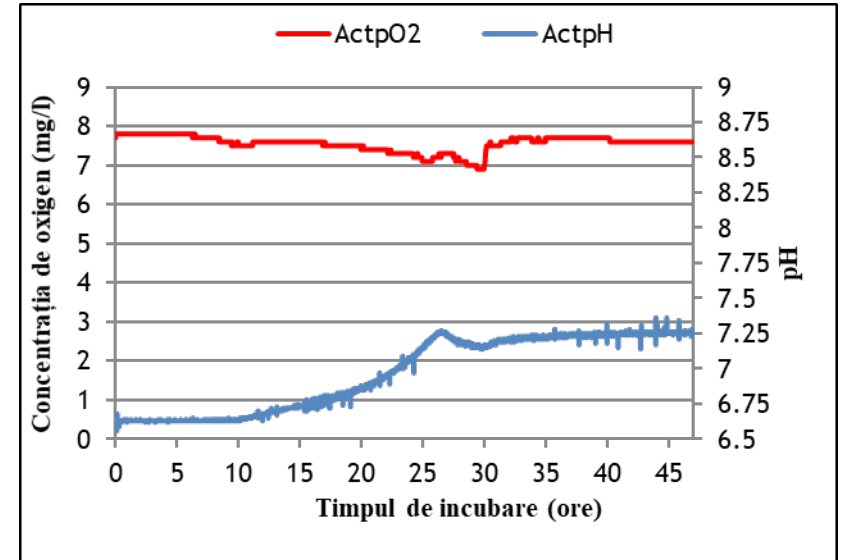
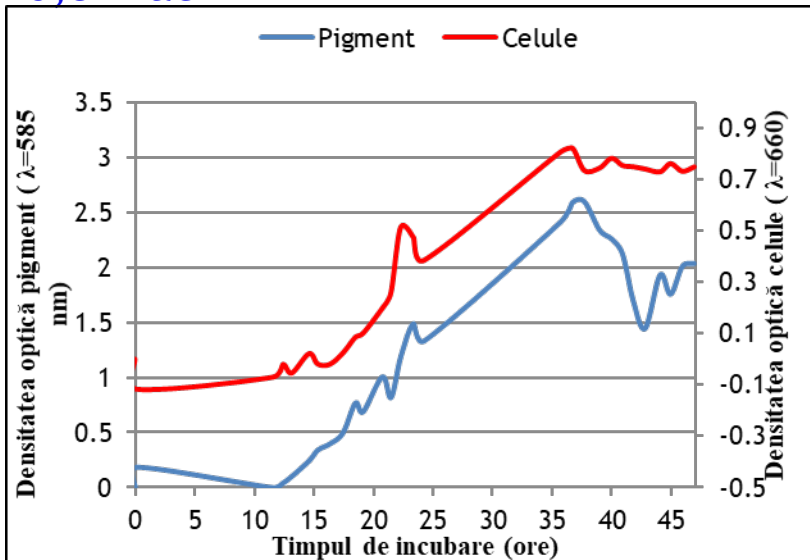
ALEXANDRU IOAN CUZA UNIVERSITY of IAȘI

www.uaic.ro

0,25 L aer/min



0,5 L aer/min



Concluzii



Industria de tutun produce cantități imense de deșeuri toxice cu conținut de nicotină

P. nicotinovorans este capabil să degradeze nicotina, datorită enzimelor codificate de megaplasmidul pAO1

Acest microorganism poate fi folosit pentru reciclarea deșeurilor cu conținut de nicotină și transformarea în compuși utili, cum ar fi 6HNic

6HNic este un compus cu proprietăți terapeutice, are efecte pozitive asupra memoriei spațiale și în daunele provocate de stresul oxidativ

Tulpina de *P. nicotinovorans* poate fi cultivată în bioreactorul LAMBDA Minifor, care permite monitorizarea parametrilor dezvoltării pe tot parcursul cultivării

Utilizarea bioreactorului reprezintă un pas important în îmbunătățirea condițiilor de cultivare a tulpinii *P. Nicotinovorans* și în obținerea de 6HNic





