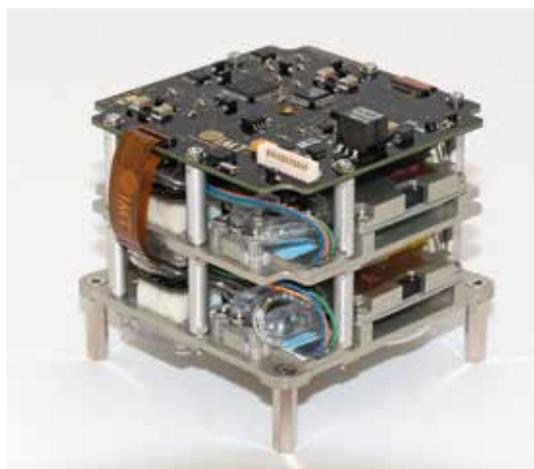


TEST RESPIROMETRICO SU CELLULE DI LIEVITO SITUATE IN UN PICCOLO SATELLITE

IL PRINCIPALE OBIETTIVO DELLA RICERCA È QUELLO DI INDAGARE L'ATTIVITÀ RESPIRATORIA (TERMODINAMICA E CINETICA) DI CELLULE EUCARIOTE IN AMBIENTE DI MICROGRAVITÀ. L'ESITO DELLA RICERCA FORNIRÀ INFORMAZIONI PREZIOSE AI FINI DELLE ATTIVITÀ UMANE NELLE STESSE CONDIZIONI DI MICROGRAVITÀ E ALLO SCOPO DI UNA POSSIBILE APPLICAZIONE NEL CAMPO DEL MONITORAGGIO AMBIENTALE ATTRAVERSO LA RESPIROMETRIA



Lo sviluppo di un sensore ambientale da poter impiegare in missioni umane è di cruciale importanza per future applicazioni spaziali. Alcuni tra i fattori dell'ambiente spaziale sono potenzialmente dannosi per la salute dei membri dell'equipaggio. Tra questi vi è la microgravità, la presenza di radiazioni elettromagnetiche e ionizzanti, la presenza di sostanze tossiche. Nell'ambito del bando POR FESR LAZIO 2007/2013 - Asse 1 - Attività 1, la rete d'impresa formate dalle società IMT srl (Capofila), GELCO SpA, CeCaSa srl hanno progettato e realizzato un sistema di rilevamento ambientale, avvalendosi di un biosensore, in grado di funzionare in ambiente spaziale e tale da poter essere incorporato all'interno di un nanosatellite della classe cubesat (Progetto ERMES Cod. FILAS-CR-2011-1071).

Il sistema di rilevamento consiste in una misura respirometrica su delle cellule di lievito (*Saccharomyces cerevisiae*) effettuata in condizioni di microgravità. I lieviti sono tra gli organismi più sensibili alle variazioni delle condizioni ambientali, tra cui la presenza di agenti inquinanti. Infatti le sostanze tossiche

rallentano il metabolismo ossidativo dei lieviti causando, di conseguenza, una diminuzione del consumo di ossigeno. Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è evolutivamente più vicino agli umani rispetto ad altri organismi eucarioti e presenta la stessa struttura interna complessa delle piante e degli animali; inoltre è uno tra gli organismi maggiormente studiati dalla biologia molecolare e cellulare per via della sua semplicità di coltura. La maggior parte delle scoperte scientifiche fatte usando il lievito come organismo modello sono risultate valide anche per i mammiferi, compresi gli umani.

Metodi di misura

Test respirometrico sui lieviti classico

La misura dell'attività metabolica viene effettuata misurando la diminuzione di ossigeno a seguito dell'aggiunta di un substrato nutriente (glucosio). In presenza di ossigeno i lieviti svolgono la respirazione cellulare consumando ossigeno e producendo anidride carbonica. Il test respirometrico sulle cellule di lievito è una tecnica usata con succes-

so per la determinazione della tossicità ed è applicabile in maniera concreta a molteplici campioni di cibo, acqua, particolati, terreno ecc. [1-3].

Test respirometrico sui lieviti eseguito su un nanosatellite

L'ambiente spaziale e i requisiti di volo impongono condizioni molto più restrittive rispetto a quelle delle attività svolte in un normale laboratorio. La differenza è dovuta principalmente alle variazioni di temperatura e gravità, a requisiti meccanici, quali la capacità del dispositivo di sopportare le vibrazioni, e restrizioni su peso e ingombro. Per la misura dell'ossigeno, a causa del ridotto spazio disponibile, si è scelto un sistema di misura amperometrico, nello specifico un trasduttore SPE (Screen Printed Electrode) posto all'interno di una cella di flusso appositamente realizzata da IMT. Le differenze rispetto ad un classico test respirometrico sono:

- il sistema è chiuso e isolato, non c'è scambio di O₂ con l'esterno;
- le cellule di lievito e l'apparato di test lavora-



Tab. 1
Parametri ottimizzati per riproducibilità e sensibilità

Concentrazione di lievito	100 g/l
Concentrazione di glucosio	100 g/l
Dimensione del particolato	Agitazione meccanica e filtraggio attraverso un filtro di carta da 25 µm
Pulizia superficiale dell'elettrodo	Tensioattivo anionico (Sodium Laurylsolfate) 1 mg/l
Bolle di gas	Rimozione attraverso sistema di flussaggio sulla cella di flusso realizzata da IMT
Portata	3,5 ml/min. (100 Hz)
Invecchiamento dei lieviti (agglomerati oltre i 25 µm)	<6% in 72 h
	<8% in 720 h
Range di temperatura	20 °C < T < 50 °C

ranno in condizioni di microgravità;
- il dispositivo è miniaturizzato e completamente automatizzato.
Per questo sistema il comportamento della curva respirometrica è riportato in Fig. 1. I valori dei parametri ottimizzati al fine di ottenere la maggiore riproducibilità e sensibilità sono riportati in Tab. 1.

Assemblaggio dell'apparato sperimentale

L'apparato sperimentale (Fig. 2) è stato assemblato usando una micro-pompa piezoelettrica, valvole latching a 3 vie, una cella di flusso custom realizzata da IMT, un elettrodo SPE ed elettronica di controllo custom realizzata da IMT.

Risultati e discussione

Riproducibilità e sensibilità

I risultati ottenuti dalla sessione di test confermano una buona sensibilità e riproducibilità del metodo quando il parametro osservato è il dl/dt della curva respirometrica. I risultati salienti sono riassunti in Tab. 2.

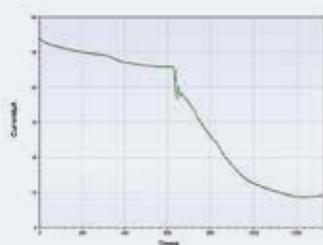


Fig. 1
Curva respirometrica ottenuta da un sistema chiuso

Robustezza e risposta agli agenti tossici

Al fine di valutare la robustezza del metodo e la sensibilità alle sostanze tossiche sono stati condotti dei test mettendo a contatto i lieviti con sostanze tossiche, quali i tensioattivi cationici, a varie concentrazioni. La sensibilità ai tensioattivi cationici (didecyl-dimethylammonium chloride) è stata osservata misurando il rapporto tra il segnale ottenuto dal sistema contaminato e un segnale di riferimento ottenuto nelle stesse condizioni ma in assenza di agente tossico. I risultati riguardo la sensibilità agli agenti tossici mostrano che in presenza di DDAC la velocità di consumo dell'ossigeno si riduce al 30,3% con 160 ppm di DDAC e al 7,6% con 400 ppm di DDAC.

Conclusioni

Si può ipotizzare che il test respirometrico possa essere un valido approccio al monitoraggio ambientale in missioni spaziali, a patto di osservare le condizioni di ottimizzazione (Tab. 1).

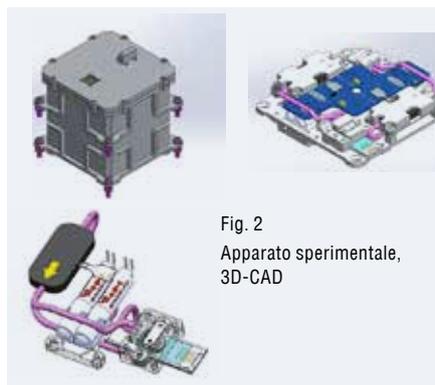


Fig. 2
Apparato sperimentale, 3D-CAD

Tab. 2
Principali risultati Riproducibilità (parametro osservato dl/dt)

Riproducibilità (parametro osservato dl/dt)	$\mu = 0,1132 \mu\text{A/s}$ $\sigma = 0,0086 \mu\text{A/s}$ $\sigma/\mu = 0,0759$ $\% \pm \sigma = 83\%$ $\% \pm 2\sigma = 100\%$ $\% \pm 3\sigma = 100\%$
Sensibilità	$1,132 \times 10^{-3} \mu\text{A/l/sg}$

BIBLIOGRAFIA

- [1] R. Dragone *et al.*, *Ecotox. Environ. Safe*, 2009, **72**, 273.
- [2] C. Frazzoli *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **389**, 2185.
- [3] L. Campanella *et al.*, *Inquinamento*, 2005, **73**, 64.

Respirometric Tests on Yeast Cells in a Small Satellite System

The primary aim of the research (founded by Latium Region POR FSER LAZIO 2007/2013 Asse I - Attività I "ERMES") is to investigate about the respiratory activity (thermodynamics and kinetics) of eukaryotic cells in micro gravity medium. This information can be precious both with reference to human activity in the same conditions and to possible applications to environmental sensing by respirometry.

LUIGI CAMPANELLA^a, GIOVANNI MEROLA^a
SUSANNE HEIDI PLATTNER^a, ANDREA NEGRI^b,
CESARE PEPPONI^b, MASSIMO PERELLI^b

^aDIPARTIMENTO DI CHIMICA
UNIVERSITÀ DI ROMA "LA SAPIENZA"

LUIGI.CAMPANELLA@UNIROMA1.IT

^bIMT SRL
ROMA

ANDREA.NEGRI@IMTSRL.IT