

## ROLUL NANOPARTICULELOR ZnO (<50 nm) ÎN PROCESUL DE CULTIVARE A LEVURII *RHODOSPORIDIUM TORULOIDES* CNMN-Y-30

Usafii Agafia, Beșliu Alina, Efremova Nadejda

*Institutul de Microbiologie și Biotehnologie*

### Rezumat

Viabilitatea și potențialul de biosinteză a principiilor bioactive de către tulpina levuriană pigmentată *Rhodospiridium toruloides* CNMN-Y-30 la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni < 50 nm, în diapazonul de concentrații de la 1 mg/L la 70 mg/L, prezintă modificări în funcție de concentrațiile utilizate. Este pusă în evidență vulnerabilitatea celulelor în primele 24 ore de contact cu nanoparticulele în concentrație de 70 mg/L. Pe durata de 120 ore de contact, cultura de levuri se adaptează la influența nanoparticulelor oxidului de zinc, astfel că producția de biomasă celulară rămâne la nivelul valorilor martor. S-a stabilit că nanoparticulele în concentrațiile 20-30 mg/L stimulează procesele de biosinteză a proteinelor și carbohidraților. Valorile estimative ale efectelor nanoparticulelor demonstrează că ZnO (<50 nm) prezintă oportunitate de aplicare în tehnologia de cultivare a levurii *Rhodospiridium toruloides* CNMN-Y-30.

*Cuvinte cheie:* *Rhodospiridium toruloides*, nanoparticule ZnO (< 50 nm), viabilitate celulară, biomasa celulară, proteine, carbohidrați.

*Depus la redacție* 30 iulie 2018

*Adresa pentru corespondență:* Usafii Agafia, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, str. Academiei 1, MD-2028 Chișinău, Republica Moldova; E-mail: usaty.agafia@gmail.com; tel. +373(22)73-80-13.

### Introducere

Există dovezi că nanoparticulele influențează dezvoltarea microorganismelor [2, 4]. Perspective biotehnologice privind aplicarea nanoparticulelor ZnO în diferite domenii sunt menționate în publicațiile diferitor autori, care evocă funcționalitatea acestora [5, 13]. Conform cercetărilor unor autori, mecanismul de acțiune a nanoparticulelor asupra celei microbiene este complex și atrage asupra sa modificări atât în membrana celulară cât și în citoplasmă [15]. Aceste efecte pot fi specifice și de durată în funcție de tipul nanoparticulelor, dimensiunile și durata de contact cu celula microbiană. Datorită unor particularități ale acțiunii nanoparticulelor, utilizarea lor în biotehnologia microbiologică este de mare perspectivă. Astfel, în vederea dezvoltării posibilităților tehnologice de producere a noi bioproduse destinate diferitor ramuri ale economiei naționale este important de a cerceta detaliat efectul nanoparticulelor asupra dezvoltării și producerii de metaboliți cu destinație biotehnologică. În acest sens este acumulat un material științific variat [6, 14]. Este evident însă, că pentru a utiliza nanoparticulele în biotehnologia cultivării levurilor și obținerii produselor bioactive de diversă natură, sunt necesare cercetări detaliate privitor la reacția celulelor la nanoparticule de diferit tip. Investigațiile din acest domeniu poartă un caracter atât teoretic, cât și practic.

În cazul nostru, studiul urmărește aprecierea impactului nanoparticulelor ZnO (<50 nm) asupra componentelor celulare în vederea stabilirii relevanței utilizării nanoparticulelor în procesul de cultivare a levurii *Rhodospiridium toruloides* CNMN-Y-30 și parametrilor optimați de sporire a conținutului unor principii bioactive celulare.

### Materiale și metode

*Obiect de studiu, mediu și condiții de cultivare.* În cadrul cercetărilor s-a utilizat levura pigmentată *Rhodosporidium toruloides* (*Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30), selectată și păstrată în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene ca producător de proteine și carotenoide. Pentru inoculare și cultivarea levurii s-a utilizat mediul YPD [1]. Cultivarea submersă a fost efectuată în baloane Erlenmeyer cu capacitate de 1,0 L, pe agitator cu viteza de rotație 200 rot./min, la temperatura de +25°C, durata de cultivare 120 ore. Mediul lichid de fermentare s-a însămânțat în volum de 5% cu inocul  $2 \times 10^6$  celule/ml.

În cercetări s-au utilizat nanoparticule ZnO cu dimensiuni de <50 nm, (ALDRICH), sub formă de pulbere, sinteză chimică, puritate >97%, conține 6% Al dopant, aria suprafeței >10,8 m<sup>2</sup>/g. Soluția stoc de nanoparticule a fost preparată conform metodei specificate [9]. Concentrațiile nanoparticulelor utilizate în experiențe la cultivarea levurii au constituit 1, 5, 10, 20, 30, 50, 70 mg/L. În calitate de martor s-a cercetat varianta fără aplicarea nanoparticulelor.

*Metode de realizare a cercetărilor. Viabilitatea celulelor* (numărul de colonii formate pe plăcile cu YPD agarizat) și indicii concentrației maximal eficiente EC50/IC50 au fost determinați conform metodelor cunoscute [10, 11]. *Biomasa levuriană* s-a determinat gravimetric [7]. *Proteina* a fost determinată spectrofotometric conform metodei Lowry, utilizând în calitate de standard albumina cristalină din serul bovinelor [8]. *Carbohidrații* totali în biomasa de levuri au fost determinați la spectrofotometrul PG T60 VIS Spectrophotometer la lungimea de undă 620 nm cu utilizarea reactivului antron și D-glucozei în calitate de standard [3]. *Prelucrarea statistică* a rezultatelor a fost efectuată cu ajutorul setului de programe Statistica 7.

### Rezultate și discuții

În cercetările anterioare s-a constatat că nanoparticulele Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> și TiO<sub>2</sub> în funcție de concentrație și nanostructură, manifestă la tulpina de levuri pigmentată *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30, efecte de toxicitate asupra acumulării β-carotenului și enzimei antioxidante catalaza [12]. Oportune în acest context apar investigațiile menite să elucideze gradul de acțiune a nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni de <50 nm asupra altor componente celulare, cunoștințe ce pot promova idei de valorificare eficientă a acestora. În publicațiile taxonomice recente, este utilizată denumirea științifică *Rhodosporidium toruloides* cu indicarea sinonimului *Rhodotorula gracilis*.

Datele obținute în experimentele de laborator demonstrează faptul că nanoparticulele ZnO (<50 nm) induc modificări semnificative ale viabilității celulelor levurii *Rhodosporidium toruloides* CNMN-Y-30. Particularități deosebite au fost evidențiate atât după 6 ore de contact cu nanoparticule, cât și după 24 de ore, când viabilitatea celulelor nanomodificate sub acțiunea concentrațiilor de 50-70 mg/L scade cu peste 40% (fig. 1).

S-a constatat că gradul de viabilitate este asociat cu concentrațiile utilizate în experiențe. Coeficientul de determinare (R<sup>2</sup>) în urma corelării valorilor viabilității celulare după 6 și 24 ore de contact cu cele ale concentrațiilor nanoparticulelor, evidențiază o corelație bună între cei doi factori, R<sup>2</sup> = 0,8858 și respectiv R<sup>2</sup> = 0,9487 (fig. 2).

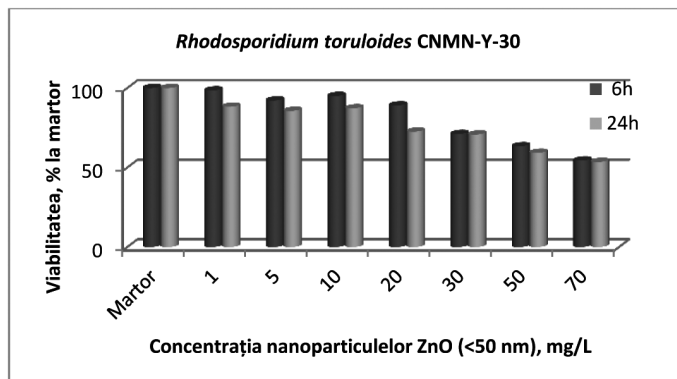


Figura 1. Valorile procentuale față de martor ale viabilității celulare a *Rhodosporidium toruloides* CNMN-Y-30, la contact cu nanoparticule ZnO (<50 nm).

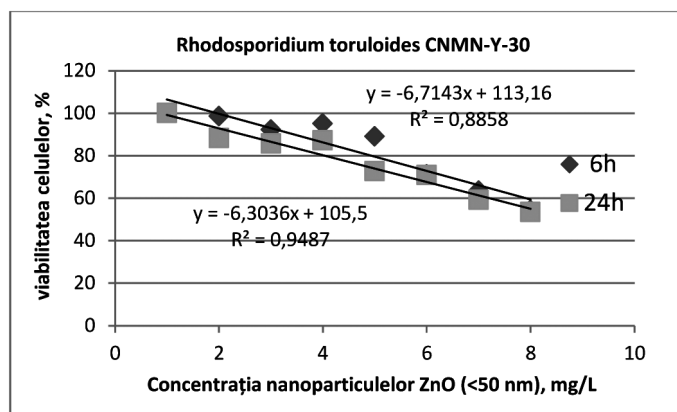


Figura 2. Relația dintre valorile viabilității și concentrațiile nanoparticulelor în biomasa *Rhodosporidium toruloides* CNMN-Y-30, la contact cu nanoparticule ZnO (<50 nm), în funcție de concentrație și durata de contact. 2 - 1 mg/L; 4 - 10 mg/L; 6- 30 mg/L; 8 - 70 mg/L.

Estimarea mediei de inhibare a viabilității celulare cu 50% (IC50) demonstrează că după 24 h efectul maximal de răspuns al culturii se observă la concentrația nanoparticulelor ZnO (<50 nm) de 70 mg/L.

Analizând datele obținute privind acțiunea nanoparticulelor asupra proceselor biosintetice la levura în studiu s-au constatat unele diferențe. Conform studiilor, nanoparticulele în concentrațiile 1-70 mg/L nu manifestă modificări substanțiale ale producției de biomasă celulară, ceea ce conduce spre ideea că cultura de levuri pe perioada de contact de 120 ore, se adaptează ușor la nanoparticulele oxidului de zinc. Valorile cantității de biomasă obținută la 1 L mediu de cultură sunt situate în limita erorii admisibile față de martor (fig. 3). Determinarea gradului de corelare între cantitatea de biomasă celulară acumulată și concentrațiile de nanoparticule a demonstrat o legătură slabă. Coeficientul de determinare este de  $R^2 = 0,3727$ .

Identificarea caracterului de acțiune al nanoparticulelor ZnO (<50 nm) asupra procesului de biosinteză a proteinelor la tulpina *Rhodosporidium toruloides* CNMN-Y-30 a evidențiat că, conținutul acestora în biomasa celulară, sub influența concentrațiilor de nanoparticule de la 5 la 30 mg/L, este în creștere cu până la 38% (fig. 4). Totodată, concentrațiile mari a nanoparticulelor (50-70 mg/L), conduc la diminuarea nesemnificativă a cantității de proteine. Astfel s-a stabilit că concentrația eficientă a nanoparticulelor ZnO (<50 nm) pentru stimularea procesului de biosinteză a proteinelor se situează în diapazonul 20-30 mg/L.

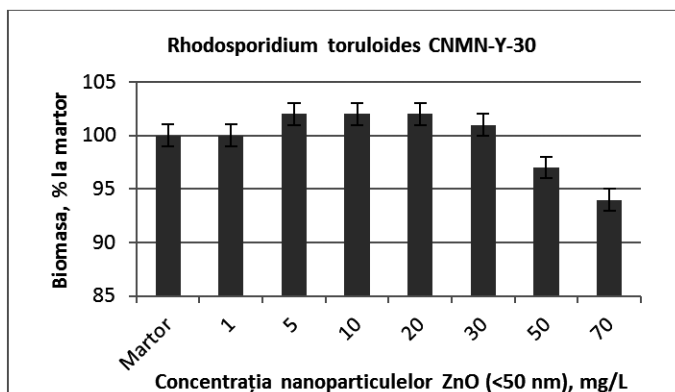


Figura 3. Valorile procentuale față de martor ale acumulării biomasei celulare *Rhodosporidium toruloides* CNMN-Y-30 la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO (<50 nm), în funcție de concentrație.

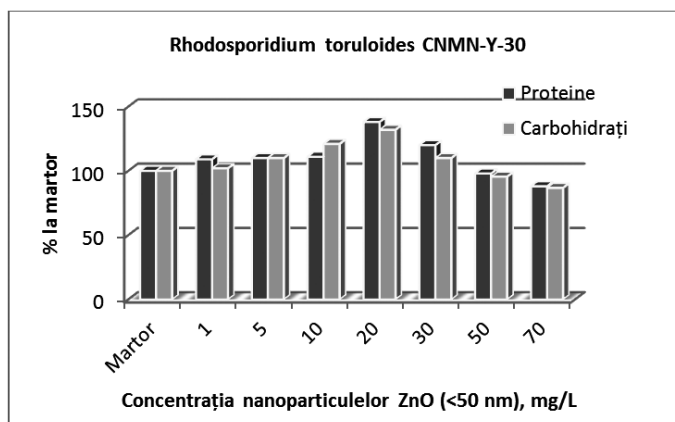


Figura 4. Valorile procentuale față de martor ale acumulării proteinelor și carbohidraților în biomasa *Rhodosporidium toruloides* CNMN-Y-30 la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO (<50 nm), în funcție de concentrație.

O tendință similară a efectelor nanoparticulelor dioxidului de zinc s-a observat și la analiza datelor conținutului de carbohidrați. Cercetările au pus în evidență trendul pozitiv al procesului de biosinteză al carbohidraților în variantele în care s-au aplicat concentrațiile de la 5 mg/L până la 30 mg/L. Cantitatea carbohidraților acumulați în biomasa levuriană crește cu până la 32% față de martor (fig. 4). În probele experimentale în care concentrația nanoparticulelor a constituit 50-70 mg/L, se observă o micșorare relativ moderată a cantității acestora acumulate în biomasa levurii. Astfel putem deduce, că concentrația eficientă a nanoparticulelor ZnO (<50 nm) pentru stimularea procesului de biosinteză a carbohidraților este de 20 mg/L.

Generalizând rezultatele obținute în acest studiu putem menționa, că pentru rezolvarea obiectivelor au fost aplicate 7 concentrații ale nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni de <50 nm. Cercetările au implicat analiza viabilității celulelor nanomodificate prin metoda stabilirii numărului de colonii formate pe plăcile Petri cu mediu nutritiv (Standard Colony Forming Unit – CFU), determinată cantitatea de biomasă celulară raportată la 1 L mediu de cultură, stabilit conținutul de proteine și carbohidrați în biomasa levuriană, în funcție de concentrație și durata de contact.

Experiențele efectuate au demonstrat că parametrii bioproductivi ai tulpinii de interes biotehnologic *Rhodosporidium toruloides* CNMN-Y-30, la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO (<50 nm), se modifică în funcție de concentrațiile utilizate. Vulnerabilă la acțiunea nanoparticulelor oxidului de zinc este viabilitatea celulelor în

primele 24 ore de contact cu concentrațiile de 50-70 mg/L. Cuantificarea numărului de colonii formate pe plăcile cu YPD agarizat a demonstrat că concentrația minim inhibitorie (IC50%) a nanoparticulelor ZnO (<50 nm) constituie 70 mg/L. Analizând datele obținute privind producția de biomasă și conținutul cantitativ al componentelor celulare la cultivarea levurii în prezența nanoparticulelor timp de 120 ore, s-au constatat unele diferențe în efectele produse de către nanoparticule. Sub influența concentrațiilor până la 20 mg/L, cantitatea de proteine și carbohidrați este în creștere cu 38% respectiv 32%, dar concentrațiile nanoparticulelor de 50-70 mg/L, inițiază o micșorare relativ moderată a acestor două componente celulare. Astfel, valorile estimative ale efectelor nanoparticulelor demonstrează că ZnO (<50 nm) în concentrație de 20 mg/L prezintă oportunitate de aplicare în tehnologia de cultivare a levurii *Rhodospordium toruloides* CNMN-Y-30, din punct de vedere al sporirii cantității de proteine și carbohidrați în biomasa celulară.

### Concluzii

1. Viabilitatea și parametrii bioprodactivi ai tulpinii de interes biotehnologic *Rhodospordium toruloides* CNMN-Y-30, la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO (<50 nm), se modifică în funcție de concentrațiile utilizate.

2. Cuantificarea numărului de colonii formate pe plăcile cu YPD agarizat a demonstrat că în primele 24 ore de contact cu nanoparticulele ZnO (<50 nm), viabilitatea celulelor *Rhodospordium toruloides* CNMN-Y-30 este în scădere. Concentrația minim inhibitorie (IC50%) a nanoparticulelor constituie 70 mg/L.

3. Nanoparticulele în concentrațiile 1-70 mg/L nu manifestă modificări substanțiale a producției de biomasă celulară, ceea ce confirmă că cultura de levuri aflată în contact timp de 120 ore se adaptează la influența nanoparticulelor oxidului de zinc.

4. Concentrația eficientă a nanoparticulelor ZnO (<50 nm) pentru stimularea proceselor de biosinteză a proteinelor și carbohidraților se situează la nivelul 20 mg/L.

5. Valorile estimative ale efectelor nanoparticulelor demonstrează că ZnO (<50 nm) prezintă oportunitate de aplicare în tehnologia de cultivare a levurii *Rhodospordium toruloides* CNMN-Y-30, din punct de vedere al sporirii cantității de proteine și carbohidrați în biomasa celulară.

### Bibliografie

1. Aguilar-Uscanga, B., Francois, J.M., A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. //Letters in Applied Microbiology, 2003, 37: 268-274.

2. Ban Deependra Kumar, Subhankar Paul. Zinc Oxide Nanoparticles Modulates the Production of  $\beta$ -Glucosidase and Protects its Functional State Under Alcoholic Condition in *Saccharomyces cerevisiae*. //Appl. Biochem Biotechnol, 2014, 173:155-166 DOI 10.1007/s12010-014-0825-2

3. Dey, P., Harborne, J. *Methods in Plant Biochemistry*. Carbohydr. Academic Press, 1993, v. 2, 529 p.

4. El-Diasty Eman M., Ahmed M.A, Nagwa Okasha, Salwa F. Mansour, Samaa I. EL-Dek, Hanaa M. Abd el-Khalek, Mariam H. Youssif. Antifungal activity of Zinc Oxide Nanoparticles against dermatophytic lesions of cattle. //Romanian J. Biophys., Bucharest, 2013, Vol. 23, No. 3, P. 191-202

5. Espita, P., Soares, N., Coimbra, J., Nélío, J., Cruz, R., Medeiros, E. Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications. //Food Bioprocess Technol. 2012, 5:1447–1464 DOI 10.1007/s11947-012-0797-6
6. Ingale, A.G, Chaudhari A.N. Biogenic Synthesis of Nanoparticles and Potential Applications: An Eco-Friendly Approach. //J. Nanomed. Nanotechol., 2013 4:2, 165-172. doi:10.4172/2157-7439.1000165
7. Liu Hong-Zhi, Qiang Wang, Yuan-Yuan Liu, Fang Fang. Statistical optimization of culture media and conditions for production of mannan by *S. cerevisiae*. //Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2009,14: 577-583 DOI/10.1007/s12257-008-0248-4
8. Lowry, O., Rosebough N., Farr A. Protein measurement with the folin phenol reagent. //J. Biol. Chem., 1951, 193: 265-275.
9. Otero-Gonzalez Lila, Citlali Garcia-Saucedo, James A. Field, Reyes Sierra-Alvarez. Toxicity of TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, Fe<sub>0</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles to the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. //Chemosphere, 2013, 93: 1201–1206.
10. Sahayaraj K., Rajesh S. Bionanoparticles: synthesis and antimicrobial applications. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. A. Méndez Vilas (Ed.) FORMATEX 2011. 228-244.
11. Sebaugh, J.L. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. Pharmaceutical Statistics, 2011, 10, 2: 128-134. Online ISSN:1539-1612, <https://doi.org/10.1002/pst.42>
12. Usatii, A., Beșliu, A., Efremova, N. Effect of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and TiO<sub>2</sub> nanoparticles on catalase activity and β-carotene content at pigmented yeast strain *Rhodotorula gracilis*. //Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology. Vol. XXI (2017) no.1, p. 35-40. ISSN 2344-1496.
13. Vaseem Mohammad, Ahmad Umar, Yoon-Bong Hahn. ZnO Nanoparticles: Growth, Properties, and Applications. Metal Oxide Nanostructures and Their Applications. Chapter 4, 2010. ISBN: 1-58883-170-1 Copyright © 2010 by American Scientific Publishers All rights of reproduction in any form reserved. Edited by Ahmad Umar and Yoon-Bong Hahn Volume 5: Pages 1–36
14. Wang, E.C., Wang, A.Z. Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology. //Integr. Biol., 2014, 6, 9-26, DOI: 10.1039/c3ib40165k
15. Ya-Nan Chang, Mingyi Zhang, Lin Xia, Jun Zhang and Gengmei Xing. The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. //Materials, 2012, 5, 2850-2871; doi:10.3390/ma5122850