

EFFECTUL NANOPARTICULELOR TiO_2 ASUPRA REPRODUCERII CELULELOR ȘI CONȚINUTULUI DE PROTEINE LA LEVURI

Usatîi Agafia, Chiselița Natalia, Molodoi Elena, Bejenaru Ludmila,
Chirița Elena, Beșliu Alina, Borisova Tamara

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei

Rezumat

Lucrarea oferă informații despre influența diferitor concentrații de nanoparticule TiO_2 asupra levurilor din genurile *Saccharomyces* și *Rhodotorula*. S-a constatat că nanoparticulele TiO_2 în concentrații de 0,5 până la 15,0 mg/L nu modifică în mod semnificativ multiplicarea și producția de biomasă la *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, *Rhodotorula gracilis* II/6, dar determină scăderea conținutului de proteine în biomasa levurilor genului *Saccharomyces*. Efectul pozitiv al nanoparticulelor de TiO_2 a fost marcat pentru acumularea de proteine la tulpina de levuri pigmentate *Rhodotorula gracilis* II/6.

Cuvinte cheie: nanoparticule TiO_2 , *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, reproducere, proteine.

Depus la redacție 11 septembrie 2015

Adresa pentru corespondență: Usatîi Agafia, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei, str. Academiei, 1, MD-2028 Chișinău, Republica Moldova; tel. (+37322)73-80-13; E-mail: usaty.i.agafia@gmail.com

Introducere

Funcționalitatea nanoparticulelor (NPs) de TiO_2 este expusă în diferite publicații în care se menționează eficiența utilizării acestora în industria alimentară, medicină, microbiologie, la producerea vopselelor, pigmentilor, aplicarea în cosmetologie. Aplicarea nanoparticulelor anorganice la cultivarea microorganismelor reprezintă

un domeniu recent în cercetările de nanobiotehnologie [11, 14, 15]. Există ipoteza că mai multe nanocompozite posedă activități toxice, dar și stimulatorii asupra microorganismelor, care se manifestă în dependență de compoziția nanocompozitelor și concentrația aplicată.

Un număr mare de experiențe sunt destinate studiului influenței nanoparticulelor dioxidului de titan. Conform rezultatelor din literatura de specialitate, concentrația minimă inhibitorie (MIC - minimum inhibitory concentration) a nanoparticulelor este variată și depinde de microorganismul cercetat. Spre exemplu, pentru *Escherichia coli* și *Candida albicans* MIC a NPs TiO_2 constituie $9,7 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, iar pentru *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* MIC este de $19,0-19,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [13]. Posibile mecanisme de influență a nanoparticulelor TiO_2 la nivel celular au fost cercetate de către mai mulți specialiști în domeniu, care au elucidat unele procese ce au loc în cazul aplicării NPs [5, 7, 9].

Un studiu de evaluare a influenței nanoparticulelor TiO_2 , ZrO_2 și Fe_2O_3 , asupra consumului de O_2 și integrității membranei celulare la drojdia *Saccharomyces cerevisiae* a efectuat Lila Otero-Gonzalez, care a stabilit că concentrațiile până la 1000 mg/L nu sunt toxice pentru drojdie [12].

Despre efectele de stimulare a nanoparticulelor se comunică în publicațiile autorului Kiran [6], care menționează că utilizarea nanoparticulelor de fier în concentrație de 10 mg/L sporește cu 80% producția glicolipidelor biosurfactante la cultura marină *Nocardia sp.* MSA13A. În ceea ce privește alte nanoparticule, este de menționat faptul că pentru *Saccharomyces cerevisiae*, concentrațiile mai mari de 50 ppm (50 mg/L) a ZnO , sunt toxice [4].

Cele expuse mai sus determină importanța teoretică și practică majoră a cercetărilor asupra posibilităților de aplicare a nanoparticulelor anorganice în biotehnologia cultivării levurilor.

Prezenta lucrare este dedicată elucidării efectelor nanoparticulelor TiO_2 asupra reproducerii celulelor și acumulării proteinelor în biomasa levurilor din genurile *Saccharomyces* și *Rhodotorula*.

Materiale și metode

Obiecte de studiu, medii de cultură, condiții de cultivare. În cadrul cercetărilor s-au utilizat tulpinile de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, selectată ca producător de β -glucani [3], *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, selectată ca producător de manani [16], levura pigmentată *Rhodotorula gracilis*– II/06, selectată ca producător de carotenoide. Tulpinile sunt păstrate în colecția Laboratorului Biotehnologia Levurilor și în Colecția de Microorganisme Neapatogene a IMB al AȘM.

În cercetări s-au utilizat nanoparticule TiO_2 , elaborate de cercetătorii Institutului de Inginerie Electronică și Nanotehnologii al AȘM. Particulele au fost dispersate în apă. Concentrațiile NPs utilizate în experiențe la cultivarea levurilor au constituit $0,5$; 1 ; 5 ; 10 și 15 mg/L . În calitate de martor s-a cercetat varianta fără aplicarea nanoparticulelor.

Pentru inoculare și cultivarea submersă a levurilor s-au utilizat mediile de fermentație specifice tulpinilor în studiu YPD și must de malț [1, 2]. Cultivarea submersă s-a efectuat în baloane Erlenmeyer cu capacitate de $1,0 \text{ L}$, pe agitator cu viteza de rotație 200 r.p.m. , la temperatura de 25°C , gradul de aerare $81,3...83,3 \text{ mg/L}$, durata de

cultivare submersă 120 ore. Mediul lichid de fermentare s-a însămânțat în volum de 5% cu inocul 2×10^6 celule/ml. Conținutul de oxigen s-a măsurat cu Oximetrul portabil – Oxi-315i/SET 2B10-0011. Valorile pH-ului mediului de cultivare s-au determinat cu pH-316i MeBketten WTW, Germania.

Metode de cercetare. Numărul de celule dezvoltate pe mediul lichid s-a estimat spectrofotometric conform metodelor cunoscute [10]. Biomasa levuriană s-a determinat gravimetric [7]. Conținutul de proteină s-a măsurat spectrofotometric conform metodei Lowry [8], utilizând în calitate de standard albumina cristalină din serul bovinelor.

Prelucrarea statistică a rezultatelor s-a realizat cu ajutorul setului de programe Statistica 7.

Rezultate și discuții.

Studierea și evidențierea particularităților de acțiune a nanoparticulelor dioxidului de titan asupra proliferării celulelor s-a monitorizat timp de 48 ore de cultivare în profunzime, perioada care cuprinde toate fazele procesului de creștere a populației: lag, log, staționară, declin și moarte celulară. Rezultatele experimentale ale influenței NPs TiO_2 asupra reproducerii celulelor sunt afișate în figurile 1 și 2 din care desprindem că densitatea optică (OD), determinată la lungimea de undă $\lambda=670$ nm, în probele experimentale ale tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 nu diferă substanțial de martor (figura 1). Procesele care au loc în fiecare din etapele vitale ale levurii parcurg în conformitate cu schemele clasice.

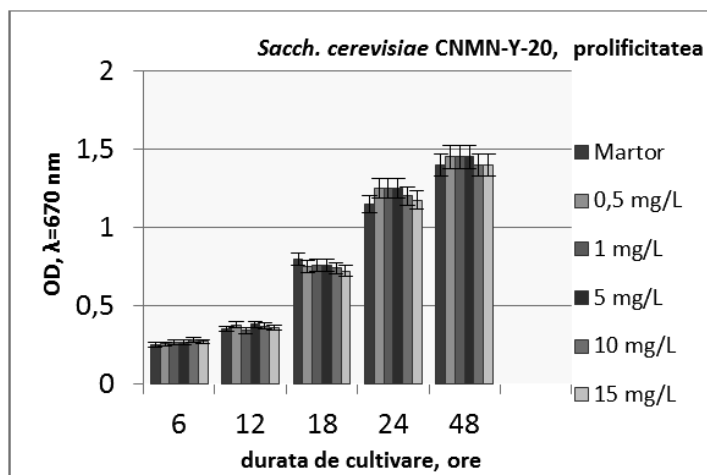


Figura 1. Valorile densității optice (OD) a celulelor *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivarea în prezența NPs TiO_2 .

Cercetările asupra tulpinii de levuri pigmentate *Rhodotorula gracilis* II/6 au demonstrat că, pe durata ciclului de cultivare de 48 ore, nanoparticulele dioxidului de titan în concentrații de 0,5 și 1,0 mg/L, rețin multiplicarea celulelor, efect mai pronunțat observandu-se după 18-24 ore de cultivare (Figura 2). Cu referire la concentrația de 15 mg/L a NPs TiO_2 , din datele prezentate observăm după 48 ore de cultivare în profunzime o micșorare a numărului de celule comparativ cu proba martor. Rezultatele obținute sugerează ideea că NPs TiO_2 ar putea influența nivelul de rezistență a celulelor pigmentate față de nanoparticule. Ipoteza dată urmează a fi verificată și confirmată prin analiza altor teste legate de procesele fiziologice care decurg în paralel cu multiplicarea.

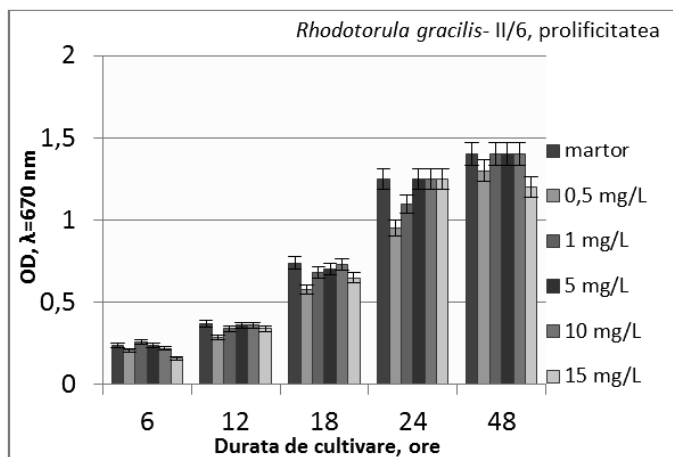


Figura 2. Valorile densității optice (OD) a celulelor *Rhodotorula gracilis* II/6 la cultivare în prezența NPs TiO₂.

Pentru tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 menționăm că la suplimentarea mediului cu NPs TiO₂ ciclul de multiplicare în probele experimentale nu diferă substanțial de martor. Astfel, rezultatele obținute indică că pentru a stabili concentrațiile minime inhibitorii ale nanoparticulelor (IC₅₀) sau concentrația la care populația prezintă un răspuns (EC₅₀), este evidentă necesitatea efectuării experiențelor cu aplicarea concentrațiilor mai mari.

Observațiile microscopice denotă că modificări vizibile ale morfologiei celulelor levurilor *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 și *Rhodotorula gracilis* II/6 la cultivare în prezența nanoparticulelor nu s-au produs.

Deoarece în condițiile fizico-chimice modificate de cultivare, cultura își poate schimba indicatorii de productivitate ca o reacție de răspuns, în continuare a fost studiat potențialul de producere de către levuri a biomasei celulare. Studiul privind conținutul de biomasă uscată obținută după 120 ore de cultivare în profunzime a tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 relevă sub influența nanoparticulelor dioxidului de titan o micșorare nesemnificativă (cu 3-6%) comparativ cu indicii martorului (Figura 3).

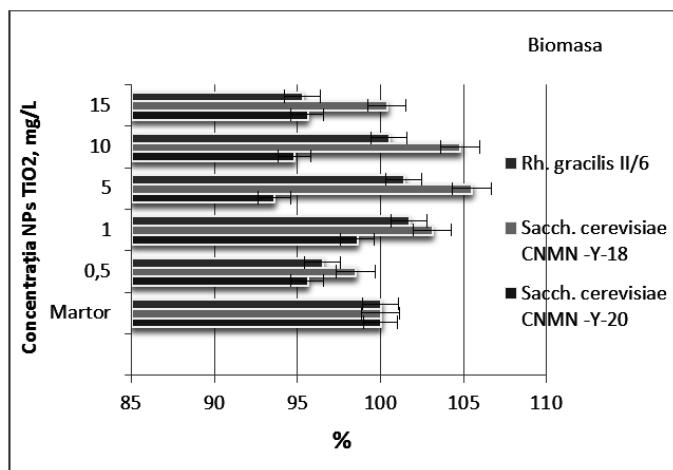


Figura 3. Efectul nanoparticulelor TiO₂ asupra conținutului de biomasă la tulpinile de levuri.

Cercetările experimentale cu tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 au demonstrat că concentrațiile utilizate de nanoparticulele ale dioxidului de titan sunt tolerate de către levură. Conținutul de biomasă în probele experimentale (concentrații de 5,0 - 10,0 mg/L) crește nesemnificativ (cu 3-5% comparativ cu martorul) și variază în limitele 5,58 - 5,61 g/L s.u., rezultate care sunt apropiate martorului (5,32 g/L s.u.). Analiza influenței nanoparticulelor dioxidului de titan la cultivarea tulpinii de levuri pigmentate *Rhodotorula gracilis* II/6 a relevat că concentrațiile utilizate, de asemenea nu inițiază careva dereglări esențiale în dezvoltarea levurii pe mediul YPD (Figura 3).

Generalizând rezultatele prezentate putem afirma că nanoparticulele dioxidului de titan adăugate la mediul de cultivare al tulpinilor *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 și *Rhodotorula gracilis* II/6 în intervalele de concentrații 0,5 - 15,0 mg/L manifestă capacitatea de a modifica nesemnificativ acumularea de biomasă față de proba de referință. Efectul poate fi explicat prin faptul, că concentrațiile mici utilizate de nanoparticule sunt insuficiente pentru a obține un rezultat sesizabil. Deaceia, pentru sporirea capacităților de acumulare a biomasei la levuri, este oportun de a mări concentrațiile nanocompusului dioxidului de titan.

Din punct de vedere biotehnologic este important de a stabili gradul de modificare a capacităților biosintetice a culturii de levuri la acțiunea nanoparticulelor aplicate în procesul de cultivare. Unul din indicatorii importanți, care caracterizează desfășurarea proceselor metabolice a culturilor supuse acțiunii diferitor factori de cultivare, este conținutul de proteină.

Fiind formate exclusiv din aminoacizi, proteinele se întâlnesc în celule alături de alți compuși importanți de tipul polizaharidelor, lipidelor, acizilor nucleici, etc. Proteinele pot fi enzime care catalizează diferite reacții biochimice în organism, altele pot juca un rol important în menținerea integrității celulare (proteinele din peretele celular), în răspunsul imun și autoimun al organismului.

Analiza comparativă a rezultatelor prezentate în figura 4 a pus în evidență că în biomasa levurii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, la cultivare în variantele experimentale cu aplicarea NPs TiO₂, cantitatea de proteină indică valori sub nivelul martorului. Semnificative (cu 14,5-19,5% mai jos față de proba de referință) sunt probele experimentale în care au fost aplicate concentrațiile 0,5-1,0 mg/L de NPs TiO₂.

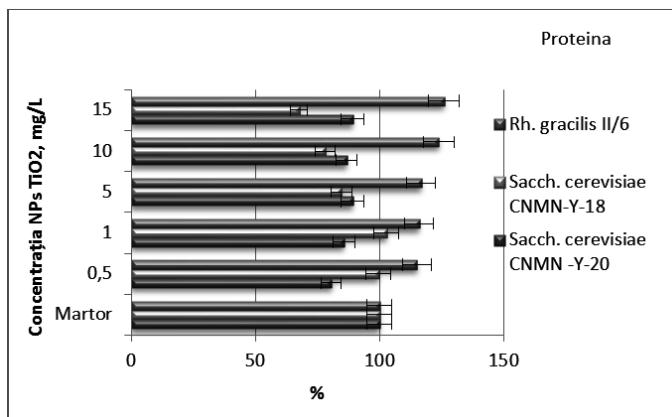


Figura 4. Efectul nanoparticulelor TiO₂ asupra conținutului de proteină în biomasa levuriană.

Rezultatele răspunsului tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 la nanoparticulele TiO_2 prezentate în figura 4, indică că concentrațiile mici 0,5 și 1,0 mg/L nu modifică semnificativ conținutul de proteine în biomasă. Variațiile înregistrate în această serie de experiențe sunt în intervalul de 2-3 %, ceea ce ne permite să afirmăm că conținutul de proteină rămâne în limitele normale pentru această cultură. În același timp, în variantele experimentale în care concentrația nanoparticulelor dioxidului de titan a fost majorată până la 15,0 mg/L conținutul de proteină în biomasa levuriană se micșorează cu 15,4 - 32,5%.

Spre deosebire de efectul negativ al NPs TiO_2 observat la tulpinile din genul *Saccharomyces*, un spor semnificativ al conținutului de proteină, cu 15-17% comparativ cu martorul, s-a obținut la tulpina de levuri pigmentate *Rhodotorula gracilis* II/6. Concentrațiile 0,5; 1,0 și 5,0 mg/L de nanoparticule TiO_2 adăugate în mediul nutritiv, inițiază o acumulare evidentă a proteinei, conținutul căreia variază în limitele 44,6... 45,3% în biomasa levuriană, comparativ cu martorul care conține 38,7% (Figura 4). Concentrațiile NPs TiO_2 de 10 și 15 mg/L produc o majorare cu 23,8-25,9 % comparativ cu probele martor a conținutului de proteină în biomasa levuriană. Deci, necătând la păstrarea nivelului de productivitate a biomasei celulare la nivelul martorului, sub acțiunea nanoparticulelor TiO_2 în interiorul celulei levuriene, se inițiază o creștere a conținutului de proteină, probabil pentru a menține echilibrul proceselor metabolice.

Astfel, finalizând această analiză, putem afirma că nanoparticulele dioxidului de titan prezintă un factor important pentru biotehnologia cultivării levurilor din genurile *Saccharomyces* și *Rhodotorula*.

Concluzii

1. În concentrații de 0,5-15,0 mg/L, nanoparticulele TiO_2 nu modifică semnificativ procesul de reproducere a celulelor și producția de biomasă la levurile *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, *Rhodotorula gracilis* II/6.

2. Nanoparticulele TiO_2 induc o micșorare a conținutului de proteină cu 14,5-19,5% la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 și cu 15,4-32,5% la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, ceea ce indică un efect negativ asupra proceselor de sinteză a unor componente intracelulare.

3. Sporirea randamentului de acumulare a proteinei se produce la tulpina *Rhodotorula gracilis* II/6, la cultivare pe mediul nutritiv suplimentat cu nanoparticulele dioxidului de titan în concentrații de 10,0 - 15,0 mg/L.

Investigațiile au fost realizate în cadrul proiectului 15 817 05 16A finanțat de CSSDT al AȘM.

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. Anghel I., Voica, C., Toma N., Cojocaru I. Biologia și tehnologia drojdiilor. București: Editura Tehnică. 1991, vol. 2, 385 p.

3. Chiselița O., Usatii A., Taran N., Rudic V., Chiselița N., Adajuc V. Tulpină de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* – sursă de β -glucani. Brevet de invenție MD 4048. MD-BOPI, 6/2010.

4. Citlali Garcia Saucedo. Developing a Yeast Cell Assay for Measuring the Toxicity

of Inorganic Oxide Nanoparticles. //Chemical & Environmental Engineering Department University of Arizona. May 6th 2010. www.CitlaliGarcia_UA 5-6-10

5. *El-Said Karim Samy, Ehab Mostafa Ali, Koki Kanehira, Akiyoshi Taniguchi.* Molecular mechanism of DNA damage induced by titanium dioxide nanoparticles in toll-like receptor 3 or 4 expressing human hepatocarcinoma cell lines. //Journal of Nanobiotechnology 2014, 12:48.

6. *Kiran George Seghal, Lipton Anuj Nishanth, Sethu Priyadharshini, Kumar Anitha, Joseph Selvin.* Effect of Fe nanoparticle on growth and glycolipid biosurfactant production under solid state culture by marine *Nocardopsis* sp. MSA13A. //BMC Biotechnology, 2014, 14:48.

7. *Liu Hong-Zhi et al.* Statistical optimization of culture media and conditions for production of mannan by *S. cerevisiae*. //Biotech. and Bioprocess Engineering, 2009, vol. 14(5), p. 577-583.

8. *Lowry O., Rosebough N., Farr A. et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. //J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265-275.

9. *Minju Jeong, Jeong Min Park, Eun Jeong Lee, Yea Seul Cho, Chunghyun Lee, Jeong Moo Kim, Sang Soo Hah.* Cytotoxicity of Ultra-pure TiO₂ and ZnO Nanoparticles Generated by Laser Ablation. //Bull. Korean Chem. Soc. 2013, Vol. 34, No. 11 3301-3306.

10. *Mitchell Desma N., Hilary Arnold Godwin, Elizabeth Claudio.* Nanoparticle Toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*: A Comparative Study Using Au Colloid, Ag Colloid, and HAuCl₄ • 3H₂O in Solution. //Nanoscape, Spring 2004, Issue 1, 59-69.

11. *Nasr N. F.* Applications of Nanotechnology in Food Microbiology. //Int.J.Curr. Microbiol.App.Sci (2015) 4(4): 846-853.

12. *Otero-Gonzalez Lila, Citlali Garcia-Saucedo, James A. Field, Reyes Sierra-Alvarez.* Toxicity of TiO₂, ZrO₂, FeO, and Mn₂O₃ nanoparticles to the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. //Chemosphere 93 (2013) 1201–1206.

13. *Pişkin Sabriye, Arzu Palantöken, and Müge Sari Yılmaz.* Antimicrobial Activity of Synthesized TiO₂ Nanoparticles. //International Conference on Emerging Trends in Engineering and Technology (ICETET'2013) Dec. 7-8, 2013. Patong Beach, Phuket (Thailand). <http://dx.doi.org/10.15242/IIE.E1213004>.

14. *Quiñones-Jurado Zoe Vineth, Miguel Ángel Waldo-Mendoza, Hugo Marcelo Aguilera-Bandin, Edgar Giovanni Villabona-Leal, Elsa Cervantes-González, Elías Pérez.* Silver Nanoparticles Supported on TiO₂ and Their Antibacterial Properties: Effect of Surface Confinement and Nonexistence of Plasmon Resonance. //Materials Sciences and Applications, 2014, 5, 895-903. Published Online October 2014 in SciRes.

15. *Rai Mahendra, Nelson Duran.* Metal Nanoparticles in Microbiology. 2011, 305 p. ISBN 978-3-642-18311-9 e-ISBN 978-3-642-18312-6 DOI 10.1007/978-3-642-18312-6 Springer Heidelberg Dordrecht London New York.

16. *Usafii Ag., Molodoi E., Efremova N., Chiselita N., Borisova T., Fulga L.* Tulpină de drojdii *Saccharomyces cerevisiae* – producătoare de manani. Brevet de invenție MD 4216, BOPI 4/2013, p. 24.

17. *Yinxia Li., Wei WangI, Qiuli Wu, Yiping Li, Meng Tang, Boping Ye, Dayong Wang.* Molecular Control of TiO₂-NPs Toxicity Formation at Predicted Environmental Relevant Concentrations by Mn-SODs Proteins. //PLOS ONE. September 2012, Volume 7, Issue 9, e44688, 1-12.