

CZU: 582.282.123.2:579.22:620.3

DOI: <http://doi.org/10.5281/zenodo.4431546>

EFFECTUL NANOPARTICULELOR SUPLIMENTATE ÎN MEDIUL LIOPROTECTOR ASUPRA VIABILITĂȚII TULPINII *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11

Ion TIMUȘ

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

Rezultatele obținute în urma studierii acțiunii nanoparticulelor suplimentate în mediul lioprotector asupra viabilității tulpinii fungice *P. funiculosum* CNMN FD 11 au demonstrat că nanoparticulele acționează diferit asupra viabilității microorganismelor după liofilizare. Astfel, nanoparticulele de ZnO suplimentate în mediul lioprotector în concentrații mici (0,1-0,5 mg/l) acționează pozitiv sau neutru, iar în concentrații mari (5-10mg/l) – negativ, dar nanoparticulele de Fe₂O₃ și de Fe₂ZnO₄ în concentrație de 5mg/l pot stimula viabilitatea tulpinii după liofilizare. De asemenea, s-a stabilit că modalitatea de congelare (treptată sau rapidă) nu influențează semnificativ asupra viabilității culturii după liofilizare.

Cuvinte-cheie: nanoparticule (NP), mediu lioprotector, congelare, liofilizare, viabilitatea culturii.

EFFECT OF NANOPARTICLES SUPPLEMENTED IN LIOPROTECTIVE MEDIUM ON THE VIABILITY OF *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11 STRAIN

The results obtained in the study of the action of nanoparticles supplemented in the lyoprotective medium on the viability of the fungal strain *P. funiculosum* CNMN FD 11 demonstrated that nanoparticles act differently on the viability of microorganisms after lyophilization. Thus, ZnO nanoparticles supplemented in the lyoprotective medium in low concentrations 0.1-0.5 mg / l act positively or neutrally, and in high concentrations (5-10mg / l) negatively, but the nanoparticles of Fe₂O₃ and Fe₂ZnO₄ in a concentration of 5mg / l can stimulate the viability of the strain after lyophilization. It has also been established that the method of freezing (gradual or rapid) does not significantly influence the viability of the culture after lyophilization.

Keywords: nanoparticles (NP), lyoprotective medium, freezing, lyophilization, culture viability.

Introducere

Actualmente, un interes deosebit prezintă aplicațiile multiple ale nanoparticulelor metalice în diverse domenii: medicină, agricultură, ecologie, industria alimentară etc. Datorită dimensiunilor foarte mici (de la 1 nanometru până la câteva sute de nanometri), comparativ cu cele ale celulelor și organelor celulare, ele sunt capabile să pătrundă în microstructura organismului, să se acumuleze pe suprafața celulei sau să penetreze peretele celular, modificând astfel funcționarea sistemelor biologice [1-4].

Numeroase cercetări demonstrează acțiunea benefică a nanoparticulelor asupra celulelor vii. Însă, ca și orice tehnologie nouă, cea cu nanoparticule prezintă un risc deosebit cu privire la posibilele efecte adverse precum modificarea ADN-ului, accelerarea proceselor de îmbătrânire și moartea celulelor etc. [1,3,5,6]. Conform rezultatelor din diverse publicații științifice, efectul nanoparticulelor asupra activității biosintetice a microorganismelor variază în funcție de compoziția chimică, mărimea și concentrația particulelor, precum și de particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinilor luate în studiu [7-11]. Astfel, K.Kotzybik și coautorii, analizând influența nanoparticulelor pe bază de SiO₂ și argint (dimensiunile 0,65 nm și 200 nm) asupra ciupercii filamentoasă micotoxigenă *Penicillium verrucosum*, au constatat că concentrația, durata, mărimea și compoziția chimică au o influență decisivă asupra creșterii și biosintezei micotoxinelor [12]. Efectul nanoparticulelor (NP) de Fe₃O₄ și de Fe(0) asupra creșterii micromicetelor din genul *Penicillium* și *Trichoderma*, atât în lipsa, cât și în prezența trifluralinei (TF), depinde de dimensiunile și concentrațiile utilizate. S-a stabilit că NP de Fe₃O₄ cu mărimea de 20-25 nm, în concentrații mici (1-10 mg/l), stimulează creșterea micromicetelor în prezența trifluralinei [13]. De asemenea, s-a constatat că nanoparticulele de Fe₃O₄, în concentrații de 0,5-30,0 mg/l, nu modifică semnificativ producția de biomasă celulară, însă schimbă compoziția biochimică a levurii *Rhodotorula gracilis* CNMNY-30, micșorează conținutul de carbohidrați și proteine, iar în concentrații mari provoacă dereglări semnificative în activitatea catalazei [14]. La rândul lor, nanoparticulele de TiO₂, în concentrații de 0,5 - 15,0 mg/l, nu modifică în mod semnificativ multiplicarea și producția de biomasă la *Saccharomyces cerevisiae* CNMNY-20, *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, *Rhodotorula gracilis* II/6, dar determină scăderea conținutului de proteine în biomasa levurilor genului *Saccharomyces* și acumularea de proteine la tulpina de levuri pigmentate *Rhodotorula gracilis* II/6 [15].

Conform datelor din literatură, efectul nanomaterialelor de TiO_2 , Fe_3O_4 , ZnO , MgO , ZnO/MgO (1:4) asupra tulpinilor de micromicete producătoare de enzime *T. koningii*, *F. gibbosum* și *A. niger* variază în funcție de compoziția și concentrația compușilor, precum și de particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinilor și de specificitatea complexului enzimatic sintetizat. Astfel, a fost relevată acțiunea particulelor de ZnO și de Fe_3O_4 și a amestecului ZnO/MgO asupra sintezei proteazelor (în special proteazelor neutre), sporul activității enzimatice variind în limita de 25,0-188,1%. În cazul micromicetei *A. niger* CNMN FD 06 – producătoare de amilaze, efectul nanooxizilor a fost preponderent inhibitor, cu excepția compusului ZnO ce nu a afectat activitatea enzimatică [16].

De asemenea, nanoparticulele de ZnO cu dimensiuni de 10, 30 nm și ≤ 100 nm modifică cantitatea de proteine și activitatea enzimei antioxidante catalaza la cultivarea tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, în funcție de dimensiunile și concentrațiile utilizate [17].

Nanoparticulele pot servi și ca biostimulatori ai proprietăților biosintetice ale microorganismelor de interes agricol. Astfel, nanoparticulele pe bază de silice și argint, cu dimensiunile de 0,65 - 200 nm, utilizate la cultivarea ciupercii filamentoză *Penicillium verrucosum*, exercită o influență puternică asupra creșterii și biosintezei micotoxinelor, care depinde de concentrația aplicată, durata, mărimea și compoziția chimică a particulelor. S-a demonstrat că nanoparticulele de argint cu dimensiuni de 0,65 nm și 5 nm pătrund în interiorul celulei, formează aglomerate în citoplasmă și se asociază cu organele celulare [18].

Utilizarea la scară industrială a microorganismelor, ca agenți biotehnologici pentru obținerea unei game largi de produse utile, impune conservarea acestora, adică menținerea viabilității, a stabilității genetice, a purității și, implicit, a capacității lor bioproductive. Condițiile de conservare pot influența o serie de caracteristici ale microorganismelor, în special potențialul bioproductiv al acestora. Metodele de conservare prin liofilizare și crioconservare sunt cele mai răspândite, datorită duratei îndelungate de păstrare.

Liofilizarea este o metodă de conservare a microorganismelor ce constă într-un proces de înghețare-uscarea bazat pe îndepărtarea apei din materialul celular înghețat, prin sublimare în vid.

Viabilitatea microorganismelor după liofilizare depinde de mai mulți factori. Printre aceștia sunt mediile de cultivare, mediile de protecție și regenerare a culturilor.

Reieșind din cele menționate, scopul cercetărilor a constat în studierea efectului nanoparticulelor suplimentate în mediul lioprotector asupra viabilității tulpinii *P. funiculosum* CNMN FD 11.

Material și metode

Ca obiect de studiu a servit tulpina *P. funiculosum* CNMN FD 11.

Pentru liofilizarea tulpinii a fost utilizat mediul de protecție lapte degresat +7% glucoză ca martor, iar variantele cercetate au fost suplimentate cu nanoparticule (NP). Au fost testate nanoparticulele de ZnO , Fe_2O_3 și de Fe_2ZnO_4 în diferite concentrații (mg/l): 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0. Mărimea nanoparticulelor a constituit: NP de ZnO – 20-30 nm; NP de Fe_2O_3 – 2-10 nm; NP de Fe_2ZnO_4 – 8-15nm. NP de ZnO au fost sintetizate de către cercetătorii științifici de la Universitatea de Stat Sud-Vest din Kursk (Rusia), iar NP de Fe_2O_3 și de Fe_2ZnO_4 – de către cercetătorii de la Institutul de Chimie din R. Moldova și puse la dispoziția noastră, cărora le mulțumim.

Au fost utilizate două modalități de congelare: 1) congelarea la temperatura inițială de -50°C (congelarea bruscă) și 2) congelarea cu scăderea treptată a temperaturii până la -50°C (treptată).

Congelarea a fost efectuată în refrigeratorul Ult Freezer DW86L626/386/286. În procesul de liofilizare a fost utilizată sistema de sublimare „LABCONCO 6 plus”.

Viabilitatea tulpinilor până și după liofilizare (exprimate în unități formatoare de colonii UFC ml^{-1}) a fost determinată prin metoda contării coloniilor pe mediul agarizat Czapek pe cutiile Petri. După efectuarea diluțiilor succesive și inocularea acestora pe mediu agarizat Czapek s-a efectuat calculul unităților formatoare de colonii peste 14 zile de incubare la 28°C . Numărul de celule viabile a fost exprimat prin \log_{10} a unităților formatoare de colonii (UFC) în 1,0 ml de suspensie.

Pentru aflarea numărului de germeni viabili s-a utilizat formula de calcul: $\text{UFC}/\text{ml} = \text{numărul de colonii } x (\text{coeficientul diluției}) \times 10^x / (\text{volumul suspensiei utilizate} - 1 \text{ ml})$.

Viabilitatea a fost calculată conform formulei $\text{BSR} = (\log\text{BL}/\log\text{AL}) \times 100$, unde BSR este viabilitatea tulpinii în %, $\log\text{BL}$ – logaritmul numărului UFC până la liofilizare și $\log\text{AL}$ – logaritmul numărului UFC după liofilizare sau păstrare [19,20].

Viabilitatea tulpinii după liofilizare în % VB = $(\log\text{DL} / \log\hat{\text{I}}\text{L}) \times 100$, unde: VB este raportul logaritmului numărului de celule fungice prezente în suspensie DL la numărul de celule viabile $\hat{\text{I}}\text{L}$ înmulțit cu 100%.

Prelucrarea statistică a datelor s-a efectuat cu ajutorul programului MS Office Excel 2010.

Rezultate și discuții

Conform datelor obținute, în experiențele montate cu scăderea treptată a temperaturii de congelate până la -50°C (congelarea treptată), în variantele cu NP de ZnO în concentrații mici, viabilitatea tulpinii *P. Funiculosum* CNMN FD 11 după liofilizare a fost aproape sau la nivelul variantei martor, iar cu majorarea concentrației NP viabilitatea a scăzut semnificativ (Fig.1). Astfel, la concentrația NP de ZnO de 0,1 mg/l viabilitatea a fost de 83,6%, iar în varianta martor – de 83,7%, comparativ cu titrul inițial al suspensiei de spori supuse liofilizării, însă la concentrația NP de ZnO de 10mg/l – de doar 75,6% log. La utilizarea NP de Fe_2O_3 și de Fe_2ZnO_4 viabilitatea maximă a tulpinii a fost obținută la concentrații mari (5-10 mg/l). Concentrațiile mici ale acestor NP au acționat negativ asupra viabilității tulpinii date, iar odată cu mărirea concentrației de NP în mediul lioprotector viabilitatea s-a majorat semnificativ. Astfel, viabilitatea tulpinii în varianta cu NP de Fe_2O_3 în concentrație de 5 mg/l a constituit 87,4% , iar în varianta cu NP de Fe_2ZnO_4 în aceeași concentrație (5mg/l) – 84,2%. Mărirea în continuare a concentrației de NP în mediul lioprotector a dus la diminuarea viabilității tulpinii.

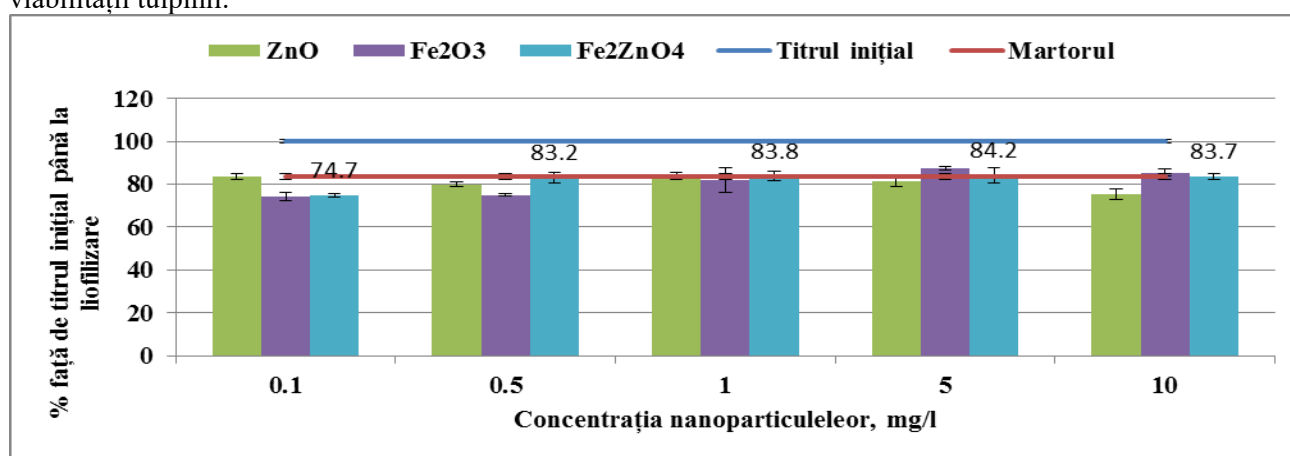


Fig.1. Viabilitatea tulpinii *P. funiculosum* CNMN FD 11 după liofilizare, în varianta cu scăderea lentă a temperaturii de congelare până la -50°C .

În experiențele cu utilizarea temperaturii inițiale de congelare -50°C (congelarea rapidă) rezultatele obținute au demonstrat aceeași legitate (Fig.2). Utilizarea NP de ZnO în concentrații mici (0,1-0,5mg/l) acționează benefic, stimulând nesemnificativ viabilitatea comparativ cu varianta martor, iar cu majorarea concentrației (1-10mg/l) viabilitatea scade semnificativ. La fel și în variantele cu NP de Fe_2O_3 și de Fe_2ZnO_4 , în concentrații mici, acestea acționează ca inhibitori, iar în concentrații mari (5-10mg/l) contribuie la stimularea viabilității tulpinii după liofilizare comparativ cu varianta martor. Viabilitatea maximă a tulpinii *P. funiculosum* CNMN FD 11 după liofilizare a fost obținută în variantele experimentale cu NP de Fe_2O_3 , și de Fe_2ZnO_4 în concentrație de 5 mg/l și constituie 88,7% și, respectiv, 86% comparativ cu concentrația inițială a sporilor supuși liofilizării.

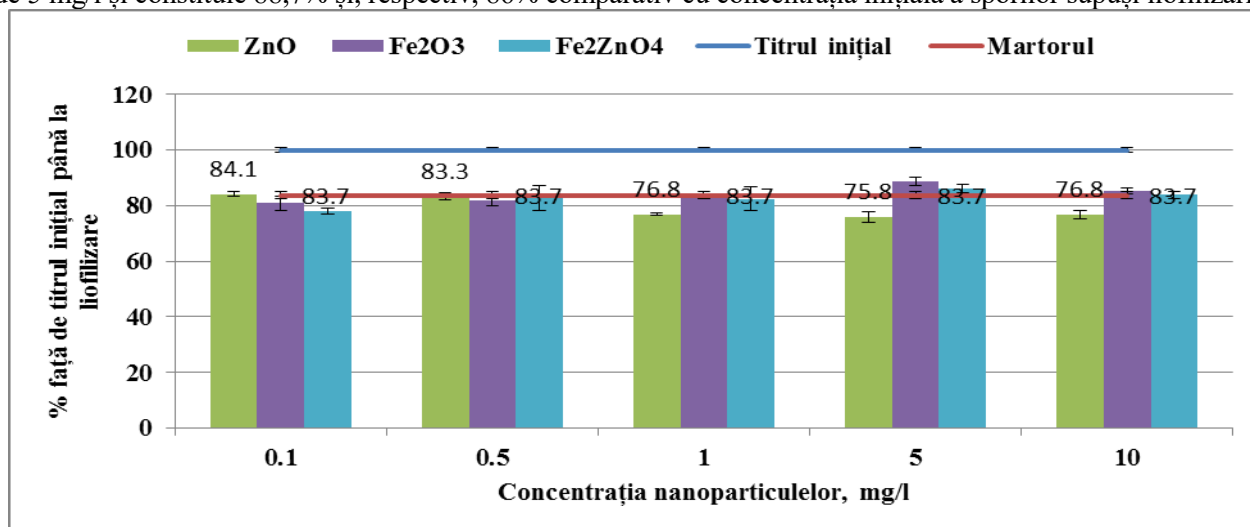


Fig.2. Viabilitatea tulpinii *P. funiculosum* 11 după liofilizare, congelată la temperatura inițială de -50°C .

Astfel, putem constata că modalitatea de congelare (treptată sau rapidă) a suspensiei de spori supusă liofilizării nu a influențat semnificativ asupra viabilității tulpinii după liofilizare. Viabilitatea tulpinii *P. funiculosum* CNMN FD 11 după liofilizare depinde atât de natura NP, cât și de concentrația acestora suplimentată în mediul lioprotector.

Conform datelor din literatură, nanoparticulele de ZnO au capacitatea de a distruge rapid membranele celulare, iar în unele cazuri concentrațiile mici pot acționa benefic asupra celulei microbiene [17,21]. Aceasta ar putea explica efectul NP de ZnO asupra culturii studiate.

Putem presupune că nanoparticulele de Fe₂O₃ și de Fe₂ZnO₄, pătrunzând în lichidul biologic al celulei, intră în contact cu componentele celulare, determinând accelerarea proceselor biosintetice precum enzimele oxidative, care protejează celula de șocul termic în procesul de congelare.

Concluzii

1. Viabilitatea tulpinii *P. funiculosum* CNMN FD 11, liofilizată în medii de protecție suplimentate cu NP, depinde de natura nanoparticulelor și de concentrația acestora.
2. Nanoparticulele de ZnO suplimentate în mediul de protecție în concentrații mici (0,1- 0,5 mg/l) acționează pozitiv sau neutru, iar în concentrații mari (5-10mg/l) acționează negativ asupra viabilității tulpinii studiate, indiferent de modalitatea de congelare.
3. Nanoparticulele de Fe₂O₃ și de Fe₂ZnO₄ suplimentate în mediul lioprotector în concentrație de 5 mg/l, indiferent de modalitatea de congelare, pot stimula viabilitatea tulpinii după liofilizare.

Referințe:

1. CEPOI, L., GUTSUL, T., MISCU, V., RUDI, L., IAȚCO, I., CHIRIAC, T., TODOSICIUC, A. Antioxidant activity of the system astaxanthine-nano Ag. NANO-2011. In: *Coperation and Networking of Universities and Reseach. Abstract Book*, Kishinev, 2011, p.15.
2. CHEN, Z., MENG, H., XING, G., CHEN, C., ZHAO, Y., JIA, G., WANG, T., YUAN, H., YE, C., ZHAO, F., CHAI, Z., ZHU, C., FANG, X., MA, B., WAN, L. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. In: *Toxicology Letters.*, 2006, vol.163, p.109–120.
3. REGUȘ-SESERMAN, O. Terapia cu nanoparticule pentru micșorarea tumorilor. În: *Viața medicală*, 2018, nr.47 (1504).
4. *Microbiologie aplicată* http://www.biotehnologii.usamv.ro/images/pdf/MICROBIOLOGIE_APLICATA.pdf
5. ALAHMADI, N.S., BETTS, J.W., CHENG, F. and WADHAWAN AL. Synthesis and antibacterial effects of cobalt-cellulose magnetic nanocomposites. In: *RSC Advances*. Issue 32, 2017, Issue in Progress. Doi:10.1039/C7RA00920H
6. ARTIOMOV, L. Nanotehnologiile alimentare în contextul siguranței consumatorului. În: *Materialele Conferinței științifico-practice internațională „Dezvoltarea inovativă, colaborativă, incluzivă a cooperativelor: teorie, practică, perspective”*, 2018, Chișinău, p.50-59.
7. FARZANA, R., IQRA, P., SHAFQAQ, F., SUMAIRA, S., ZAKIA, K, et al. Antimicrobial Behavior of Zinc Oxide Nanoparticles and β-Lactam Antibiotics against Pathogenic Bacteria. In: *Arch Clin Microbiol*, 2017, vol.8, no.4, p.57. Doi:10.4172/1989-8436.10005
8. KITCHING, M. et al. Fungal biosynthesis of gold nanoparticles: mechanism and scale up. In: *Microbiol. biotechnology*, 2014, p.1-14.
9. LEVINE, M. Differentiation of *B. coli* and *B. aerogenes* on a simplified eosin-methylene blue agar. In: *J. Infect Dis.*, 1918, no.23, p.43–47. Doi:10.1086/infdis/23.1.43
10. LIRA-SALDIVAR, R.H., HERNÁNDEZ-SUÁREZ, M., CORRALES-FLORES. In: *J. Nanotecnología para la agricultura sustentable*. www.fan.org.ar/.../Nanotecnologia-y-agricultura-sustentable
11. MADIGAN, M., MARTINKO, J. *Brock Biology of Microorganisms*. Ed. 11th. Prentice Hall, 2005. ISBN 0-13-144329-1
12. KOTZYBIK, K., et al. Influence of different nanomaterials on growth and mycotoxin production of *Penicillium verrucosum*. In: *PLOS*, Published: March 14, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150855>
13. SÎRBU, T., ZOP, A., GUȚUL, T. Acțiunea nanoparticulelor de Fe₃O₄ și Fe(0) asupra creșterii micromicetelor în prezența trifluralinei. În: *Buletinul AȘM. Seria Științele vieții*, 2017, nr.1(331) p.117-124.
14. USATÎI, A., BEȘLIU, A., CHIRIȚA, E., BORISOVA, T. Efectele nanoparticulelor Fe₃O₄ asupra parametrilor bio-productivi ai levurii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30. În: *Buletinul AȘM. Seria Științele vieții*, 2017, nr.1(331) p.111-117.
15. USATÎI, A., CHISELIȚA, N., MOLODOI, E., BEJENARU, L., CHIRIȚA, E., BEȘLIU, A., BORISOVA, T. Efectul nanoparticulelor TiO₂ asupra reproducerii celulelor și conținutului de proteine la levuri. În: *Buletinul AȘM. Seria Științele vieții*, 2015, nr.3(327) p.149-155.
16. ЧИЛОЧИ, А., ТЮРИНА, Ж., ЛАБЛЮК, С., ДВОРНИНА, Е., КЛАПКО, С., БИВОЛ, Ч., ГУЦУЛ, Т., РУССУ, Е., НИКОРИЧ, А. Влияние нанокислов некоторых металлов на биосинтез внеклеточных гидролаз микромицетов. În: *Buletinul AȘM. Seria Științele vieții*, 2016, nr.3(330), p.164-171.

17. USATÎI, A., CHISELIȚA, N. Profilul activității catalazei și producerii de proteine la *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 sub influența nanoparticulelor ZnO. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Seria Științe reale și ale naturii*, 2018, nr.1(111), p.92-96.
18. GLAZKO, V.I., BELOPUHOV, S.A. *Nanotehnologii i nanomaterialy v sel'skom hozyajstve*. RGAU – MSHA, 2008. 220 s.
19. ЗОЛОТИЛОВА, Г.Д., ШАКИРЗЯНОВА, М.Р. Жизнеспособность коллекционного фонда бактерий при длительном хранении. În: *Доклады Академии Республики Узбекистан*, 2004, nr.2, p.84-90.
20. НЕТРУСОВ, А.И. *Практикум по микробиологии*. Москва, 2005, 603 с.
21. STRACHOWSKI, T., GRZANKA, E., LOJKOWSKI, W., PRESZ, A., GODLEWSKI, M., YATSUNENKO, S., MATYSIAK, H., PITICESCU, R.R., MONTY, C.J. Morphology and luminescence properties of zinc oxide nanoparticles doped with aluminum ions obtained by hydrothermal and vapor condensation methods. In: *J. Appl. Phys*, 2007, no.102, p.073513.

Date despre autor:

Ion TIMUȘ, cercetător științific la Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

E-mail: timus_ion@mail.ru

Prezentat la 10.04.2020