

INFLUENȚA NANOPARTICULELOR TiO_2 ȘI Fe_3O_4 ASUPRA CREȘTERII ȘI COMPOZIȚIEI BIOCHIMICE A TULPINII DE LEVURI

RHODOTORULA GRACILIS CNMN-Y-30

Alina BEȘLIU, Elena CHIRIȚA, Agafia USATÎ

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

În lucrare sunt prezentate rezultatele cercetării privind influența nanoparticulelor anorganice TiO_2 și Fe_3O_4 cu dimensiunea de 30 nm, în diferite concentrații, asupra procesului de creștere și componenței biochimice a biomasei tulpinii de levuri *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30. S-a constatat că nanoparticulele în concentrații de 0,5 până la 5,0 mg/L nu modifică în mod semnificativ procesul de reproducere a celulelor și productivitatea levurii. Efectul pozitiv se manifestă prin modificări favorabile ale conținutului de carbohidrați și proteine la cultivare în prezența nanoparticulelor TiO_2 și Fe_3O_4 .

Cuvinte-cheie: nanoparticule, cultivare, levuri, celule, productivitate, proteină, carbohidrați.

INFLUENCE NANOPARTICLES Fe_3O_4 AND TiO_2 ON GROWTH AND BIOCHEMICAL COMPOSITION OF YEAST STRAIN *RHODOTORULA GRACILIS* CNMN-Y-30

The present work provides the results of the research of the influence of the inorganic nanoparticles TiO_2 and Fe_3O_4 with the size of 30 nm, in different concentrations, on the growth process and biochemical composition of biomass stalk of the yeast *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30. It has been found that nanoparticles at concentrations of 0.5 to 5.0 mg/L did not significantly alter the reproduction of the cells and the productivity of the yeast. The positive effect is manifested by favorable changes in carbohydrate and protein content, at the cultivation in the presence of the nanoparticles TiO_2 and Fe_3O_4 .

Keywords: nanoparticles, cultivation, yeast cells, productivity, protein, carbohydrates.

Introducere

Dezvoltarea nanochimiei a permis de a crea structuri cu dimensiuni situate în diapazonul de 100 nm (10^{-9} m), care și-au găsit aplicare în diverse ramuri ale activității umane. Proprietăți caracteristice nanoparticulelor sunt forma, dimensiunile, suprafața specifică mărită.

La moment, direcția nanotehnologică, legată cu influența posibilă a nanoobiectelor asupra funcțiilor organismelor vii și structurilor celulare, rămâne puțin studiată. Reieșind din aceste considerente, oportune devin cercetările științifice ale influenței nanoparticulelor metalice asupra microorganismelor și altor organisme vii și, de asemenea, utilizarea lor în biotehnologie. O mare atenție se acordă evaluării influenței nanoparticulelor asupra funcțiilor vitale ale microorganismelor, în special asupra modificărilor proprietăților morfologice, gradului de inhibare a creșterii și dezvoltării populației celulare, de modificare a activității metabolice și al. [1]. Utilizarea microorganismelor ca obiecte de studiu al efectelor nanoparticulelor dispune de un număr mare de avantaje, dintre care menționăm dimensiunile reduse ale microorganismelor și o suprafață mare de contact cu mediul, viteza sporită de creștere și reproducere, care permite a urmări într-un timp scurt influența unor substanțe pe mai multe generații de organisme, oferă posibilitatea de a analiza efectul factorilor de studiu asupra proprietăților morfologice, fiziologice, genetice etc.

Unii cercetători au demonstrat posibilitatea de utilizare a nanoparticulelor de fier, cobalt și cupru asupra dezvoltării *Candida ssp.* și *Aspergillus ssp.* S-a constatat că nanoparticulele de fier nu au efect pronunțat asupra fungilor, în timp ce nanoparticulele de cupru inhibă dezvoltarea *Candida albicans* și *Aspergillus niger* [2].

Nanoparticulele și nanocompozitele sunt utilizate pe scară largă în cataliză, cercetarea cosmonautică și al. [3]. În ultimul timp se efectuează investigații privind utilizarea nanoparticulelor în medicină. De exemplu, pentru elaborarea unor substanțe sanitare-igienice de generație nouă, a implantelor, a sistemelor de livrare a medicamentelor, a straturilor antimicrobiene pentru ambalarea dispozitivelor biomedicale [4].

În acest context prezintă interes studiul influenței nanoparticulelor de TiO_2 și Fe_3O_4 asupra creșterii tulpinii de levuri *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 și al componenței biochimice a biomasei celulare levuriene.

Material și metode

Obiect de studiu. În cadrul cercetărilor a fost utilizată levura pigmentată *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30, selectată ca producător de proteine și carotenoide. Tulpina este depozitată în colecția Laboratorului Biotehnologia Levurilor și în Colecția de Microorganisme Neapatogene a IMB al AȘM.

Nanomateriale: În cercetări au fost utilizate nanoparticule TiO_2 (30 nm) și Fe_3O_4 (30 nm), stabilizate în polivinilpirolidon (PVP), puse la dispoziția noastră cu multă amabilitate de către cercetătorii Institutului de Inginerie Electronică și Nanotehnologii „D.Ghițu” al AȘM.

Concentrațiile nanoparticulelor utilizate în experiențe la cultivarea levurii au constituit 0,5, 1,0, 5,0 mg/L. În calitate de martor a fost cercetată varianta fără aplicarea nanoparticulelor.

Medii de cultură. Pentru inoculare și cultivarea submersă a levurii au fost utilizate mediile de fermentație specifice tulpinilor în studiu YPD și must de malț [5].

Cultivarea submersă s-a efectuat în baloane Erlenmeyer cu capacitatea de 1,0 L, pe agitator cu viteza de rotație 200 rot./min, la temperatura de 25°C, gradul de aerare 80,0...83,0 mg/L, durata de cultivare submersă 120 ore. Mediul lichid de fermentare a fost însemănat în volum de 5% cu inocul 2×10^6 celule/ml.

Metode de realizare a cercetărilor. Numărul de celule dezvoltate pe mediul lichid a fost determinat spectrofotometric conform metodelor cunoscute [6]. Biomasa levuriană a fost determinată gravimetric [7]. 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 [8]. Proteina a fost determinată spectrofotometric conform metodei Lowry [9], utilizând în calitate de standard albumina cristalină din serul bovinelor.

Conținutul de oxigen a fost măsurat cu Oximetrul portabil – Oxi-315i/SET 2B10-0011 (2008).

Valorile pH-ului mediului de cultivare au fost determinate cu pH-316i MeBketten WTW, Germania (2008).

Prelucrarea statistică a rezultatelor s-a realizat cu ajutorul setului de programe Statistica 7; veridicitatea – în comparație cu martorul - $p \leq 0,05$.

Rezultate și discuții

În studiu, rezultatele cărui sunt prezentate în continuare, au fost monitorizați următorii indici de dezvoltare a levurii: reproducerea celulelor, producția de biomasă celulară, conținutul de proteine și carbohidrați.

Studierea particularităților de reproducere a celulelor s-a monitorizat timp de 48 ore de cultivare în profunzime. Cercetările au demonstrat că, pe durata ciclului de cultivare, nanoparticulele TiO_2 în concentrație de 0,5 și 1,0 mg/L rețin multiplicarea celulelor, efect mai pronunțat observându-se după 18 ore de cultivare (Fig.1). În experiențele cu nanoparticulele Fe_3O_4 , valorile densității optice a celulelor *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 nu s-au modificat esențial în comparație cu condițiile standard de cultivare, cu excepția concentrației de 5 mg/L care reține neesențial reproducerea celulelor.

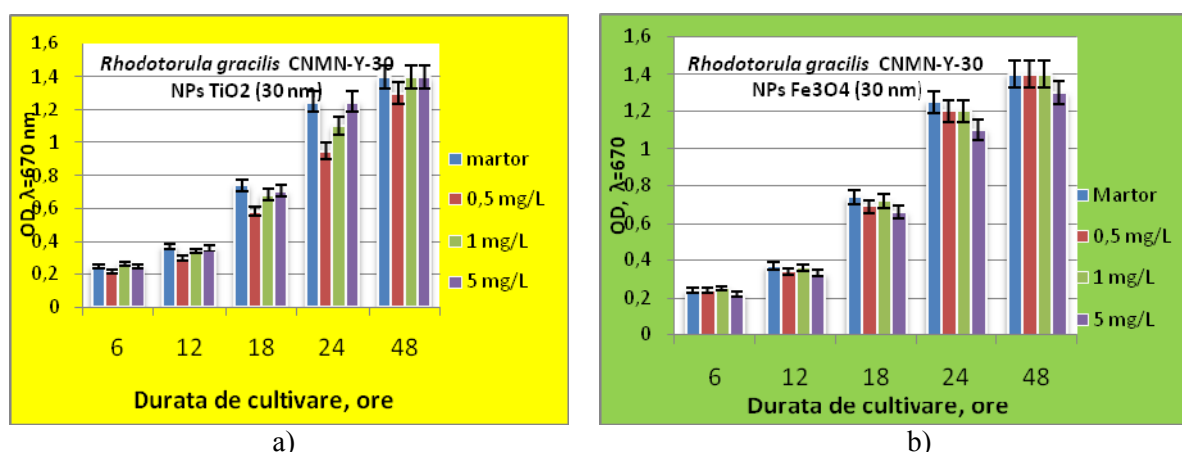


Fig.1. Valorile densității optice (OD) a celulelor tulpinii de levuri *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 la cultivare în prezența NPs TiO_2 (a) și Fe_3O_4 (b).

Studiul privind productivitatea biomasei uscate obținute după 120 ore de cultivare în profunzime a relevat că concentrațiile nanoparticulelor TiO_2 și Fe_3O_4 utilizate la cultivarea tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 nu inițiază dereglări esențiale în dezvoltarea levurii pe mediul YPD (Fig.2).

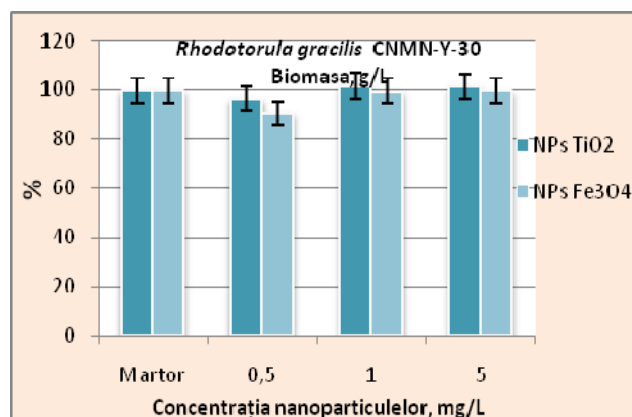


Fig.2. Influența nanoparticulelor TiO_2 (30 nm) și Fe_3O_4 (30 nm) asupra acumulării biomasei tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30.

Analiza rezultatelor obținute în cazul determinării conținutului de proteine în biomasa levurii indică un spor cu 15% pentru nanoparticulele TiO_2 și cu 23% pentru Fe_3O_4 , comparativ cu proba martor (Fig.3).

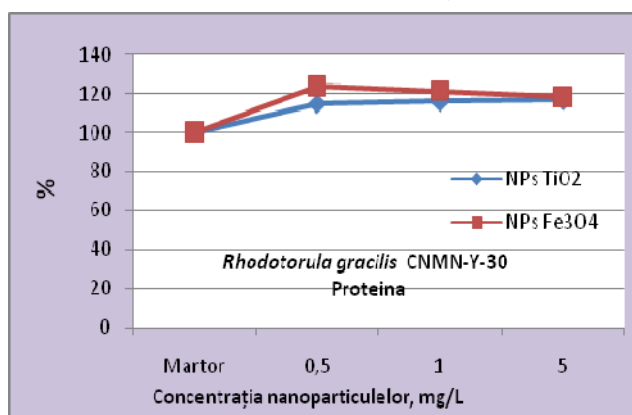


Fig.3. Efectul nanoparticulelor TiO_2 (30 nm) și Fe_3O_4 (30 nm) asupra conținutului de proteine la tulpina *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30.

Reacția de răspuns a tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 se manifestă prin modificări favorabile ale conținutului de carbohidrați. La concentrațiile nanoparticulelor TiO_2 și Fe_3O_4 de 0,5, 1,0 și 5,0 mg/L în mediul de cultivare, conținutul de carbohidrați sporește cu 10%, respectiv, cu 15% față de martor (Fig.4), ceea ce poate fi considerat că nanoparticulele testate prezintă un factor preferențial pentru dezvoltarea culturii levuriene.

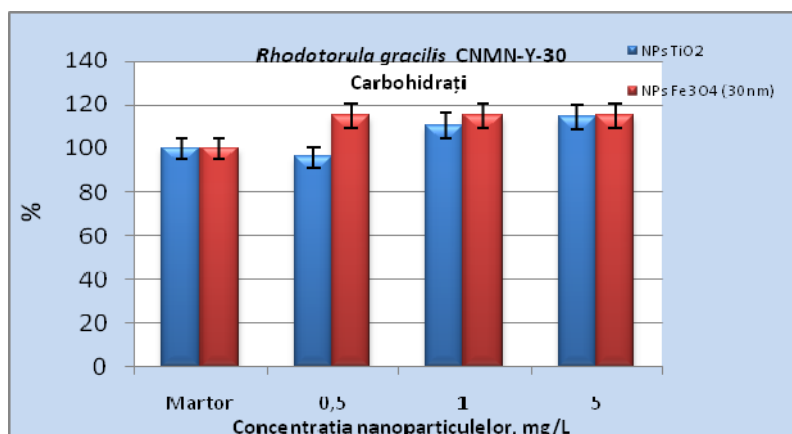


Fig.4. Efectul nanoparticulelor TiO_2 (30 nm) și Fe_3O_4 (30 nm) asupra conținutului de carbohidrați la tulpina *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30.

Concluzii

S-a constatat că nanoparticulele cu compoziție diferită TiO_2 (30 nm) și Fe_3O_4 (30 nm), în concentrații de 0,5, 1,0 și 5,0 mg/L, nu modifică semnificativ procesul de reproducere a celulelor și producția de biomasă a levurii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30.

Efectul nanoparticulelor TiO_2 (30 nm) și Fe_3O_4 (30 nm) se manifestă prin sporirea conținutului de proteine și carbohidrați în biomasa probelor experimentale ale culturii de levuri pigmentate *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30.

Referințe:

1. МАЛЬТАНОВА, А., КОЧЕРЫГИН, Б. Влияние наночастиц Au, Au-Sn и Cu на биологические системы. В: *Вестник ВДУ*, 2011, №6(66), с.31-35. УДК 577.3.
2. КОНОПЛЕВА, В.А. и др. Влияние металлических и гидроксидных наночастиц железа, меди и кобальта на *Candida ssp.* и *Aspergillus ssp.* В: *Проблемы медицинской микологии*, 2010, №2, с.101.
3. DARRIUS, V., MING, S., LEI, F. The Multivariate Potentials of Iron Oxide Nanoparticles in Drug Delivery. In: *Nanoscape*, Spring 2004, Issue 1, p.71-75.
4. MRINMOY, DE., PARTHA, S., GHOSH., VINCENT, M. Applications of Nanoparticles in Biology. *Adv. Mater.* 2008, p.20. ISSN 4225-4241 DOI: 10.1002/adma.200703183
5. AGUILAR-USCANGA, B., FRANCOIS, J. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. In: *Letters in Applied Microbiology*, 2003, p.268-274.
6. БУРЬЯНЬ Н. *Практическая микробиология виноделия*. Симферополь: Таврида, 2003, с.560.
7. HONG-ZHI LIU, QIANG WANG, XIAO-YONG LIU, SZE-SZE TAN. Effects of spaceflight on polysaccharides of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, p.543-550.
8. DEY, P.M. & HARBORNE, J.B. *Methods in Plant Biochemistry*. Vol.2. Carbohydrates, Academic Press, 1993, p.529.
9. LOWRY, O., ROSEBOUGH, N., FARR, A. et. al. Protein measurement with the folin phenol reagent. In: *J. Biol. Chem.*, 1951, vol.193, p.265-275.

Prezentat la 08.02.2015