

CZU: 582.232:581.19:546.47-31

## EVALUAREA IMPACTULUI NANOPARTICULELOR DE OXID DE ZINC ASUPRA TULPINII DE LEVURI PIGMENTATE *RHODOTORULA GRACILIS* CNMN-Y-03

Alina BEȘLIU, Nadejda EFREMOVA, Agafia USATÎI, Ludmila BATÎR

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

În lucrare sunt prezentate informații noi despre influența nanoparticulelor de ZnO cu dimensiuni de <50 nm și <100 nm asupra levurii pigmentate *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03. S-a constatat că viabilitatea, conținutul de pigmenți carotenoidici și carbohidrați la tulpina în studiu se modifică în funcție de dimensiunile și concentrațiile utilizate. S-a demonstrat că viabilitatea celulelor levuriene depinde de timpul de contact pentru ambele tipuri de nanoparticule utilizate. Rezultatele au pus în evidență că concentrațiile de 1-20 mg/l sporesc cantitatea de carbohidrați și mențin la nivelul probei de control conținutul pigmenților carotenoidici, pe când concentrațiile de 30-70 mg/l devin toxice pentru tulpina studiată.

**Cuvinte-cheie:** *Rhodotorula gracilis*, nanoparticule de ZnO, citotoxicitate, viabilitate celulară, pigmenți carotenoidici, carbohidrați.

### THE ASSESSMENT OF IMPACT OF ZINC OXIDE NANOPARTICLES ON PIGMENTED YEASTS *RHODOTORULA GRACILIS* CNMN-Y-03

The paper provides new information on the influence of ZnO nanoparticles of <50 nm and <100 nm on pigmented yeast *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03. It has been established that the viability, carotenoid and carbohydrate content of the strain has changed according to the size and used concentration. It has been demonstrated that the viability of yeast cells depends on the contact time for both types of nanoparticles. The results have highlighted that concentrations of 1-20 mg/l increased the amount of carbohydrates and maintained the content of carotenoid pigments at the level of the control sample, whereas the concentrations of 30-70 mg/l become toxic for the studied strain.

**Keywords:** *Rhodotorula gracilis*, ZnO nanoparticles, cytotoxicity, cell viability, carotenoid pigments, carbohydrates.

### Introducere

În prezent, în cercetările științifice o deosebită atenție se acordă studierii și aplicării în practică a nanoparticulelor. Nanoparticulele de oxid de zinc sunt printre cele mai utilizate în numeroase produse de consum, în special în produsele cosmetice în care participă la blocarea razelor ultraviolete (UV) [1,2]. Proprietățile fotocatalitice ale nanoparticulelor de ZnO prezintă interes pentru degradarea poluanților organici, cum ar fi coloranții, detergenții, atibioticele și acetaldehidele care sunt utilizate industrial și sunt eliberate în mediul înconjurător [3]. De asemenea, nanoparticulele de ZnO posedă proprietăți antimicrobiene și antivirale [4] considerate a fi mediate prin eliberarea ionilor de zinc ( $Zn^{2+}$ ) și generarea de specii reactive de oxigen (ROS) [5]. Aceste proprietăți au fost studiate extensiv în legătură cu tratamente potențiale antivirale și anticancerigene [6].

În pofida proprietăților potențial benefice ale nanoparticulelor, preocupările legate de siguranța acestora au fost ridicate în ultimul deceniu, deoarece există mai multe studii *in vitro* care au demonstrat efectele toxice nedorite ale nanoparticulelor de ZnO, cum ar fi inducerea stresului oxidativ, moartea celulelor, leziuni celulare și genotoxicitate [2]. Citotoxicitatea nanoparticulelor de ZnO și interacțiunea acestora cu sistemele biologice este încă neclară [7]. Astfel, expunerea directă la acțiunea nanoparticulelor determină necesitatea urgentă de a înțelege citotoxicitatea și de a evalua riscurile utilizării. Prin urmare, efectele adverse ale nanoparticulelor de ZnO trebuie în mod evident să fie studiate pe diferite organisme celulare pentru a putea evalua riscurile [7].

Astfel, ca organism model pentru studierea influenței nanoparticulelor asupra mecanismelor moleculare și celulare pot servi tulpinile de levuri pigmentate *Rhodotorula gracilis*. Structura celulară, organizarea funcțională, capacitatea de biosinteză a compușilor antioxidanți biochimici poziționează acest organism eucariot unicelular ca un model pentru evaluarea răspunsurilor celulare la acțiunea nanoparticulelor și studiul citotoxicității. Parametri importanți pentru determinarea acțiunii nanoparticulelor asupra celulelor levuriene sunt studierea viabilității, compoziției antioxidante și biochimice.

Reieșind din cele expuse, scopul cercetărilor rezidă în evaluarea impactului nanoparticulelor oxidului de zinc asupra tulpinii de levurii pigmentate *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03.

### Material și metode

**Obiectul de studiu.** În calitate de obiect de studiu a servit tulpina de levuri pigmentate *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 depozitată ca sursă de pigmenți carotenoidici în Colecția Națională de Microorganisme Neputogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie.

**Nanomateriale:** În cercetări au fost utilizate nanoparticule anorganice de ZnO <50 și <100 nm (Sigma-Aldrich); suspensia a fost preparată conform metodei descrise în [8], asistată cu ultrasunet. Concentrațiile nanoparticulelor utilizate în experiențe la cultivarea levurii au constituit 0,5, 1,0, 5,0, 10,0, 20,0, 30,0, 50 și 70 mg/l; în calitate de martor a fost cercetată varianta fără aplicarea nanoparticulelor.

**Medii de cultură.** Pentru inoculare și cultivarea submersă a levurilor vor fi utilizate mediile de fermentație specifice tulpinii în studiu YPD și must de malț [9]. Cultivarea submersă a fost efectuată în baloane Erlenmeyer cu capacitatea de 1,0 l, pe agitator cu viteza de rotație 200 rot./min, la temperatura de +25...27°C, gradul de aerare 81,3...83,3 mg/l, durata de cultivare submersă 96-120 de ore. Mediul lichid de fermentare a fost însământat în volum de 5% cu inocul  $2 \times 10^6$  celule/ml.

**Metode de realizare a cercetărilor.** Viabilitatea celulelor a fost stabilită prin metoda de determinare a numărului total de colonii ce constă în efectuarea diluțiilor seriate ale suspensiei de levuri cu însământare ulterioară în mediul YPD agarizat pe cutii Petri [10].

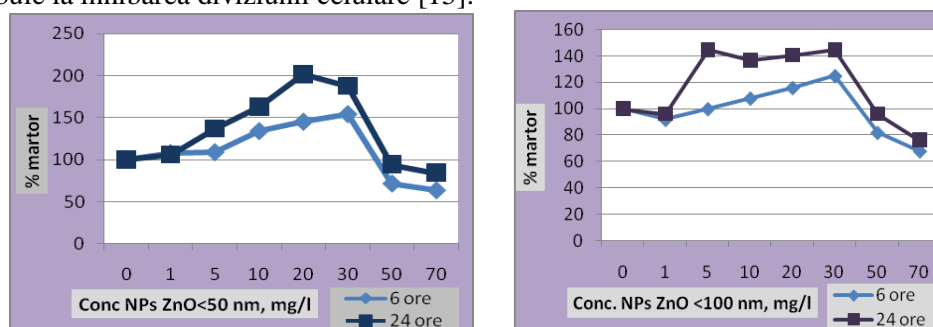
**Pigmenții carotenoidici** au fost extrași din biomasa levuriană și cuantificați spectrofotometric aplicând metoda descrisă în [11,12]. Totalul de *carbohidrați* în biomasa de levuri a fost determinat la PG T60 VIS Spectrophotometer la lungimea de undă 620 nm cu utilizarea reactivului antron și a D-glucozei în calitate de standard [13].

Prelucrarea statistică a rezultatelor a fost efectuată utilizând setul de programe MO Excel și Statistica 9.0. Rezultatele datelor a 3-5 repetări obținute au fost exprimate prin calcularea mediei, deviației standard și a intervalului de încredere pentru o medie. Toate diferențele au fost considerate semnificative statistic pentru  $P \leq 0,05$ .

### Rezultate și discuții

Un element important pentru evaluarea citotoxică a nanoparticulelor de ZnO asupra tulpinii de levuri *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 a fost studierea viabilității celulare. Conform rezultatelor obținute s-a observat o creștere semnificativă după 24 de ore de cultivare comparativ cu primele 6 ore pentru ambele tipuri de nanoparticule utilizate. Acest fapt poate fi explicat prin răspunsul adaptiv al celulelor levuriene la acțiunea nanoparticulelor de ZnO. De asemenea, este cunoscută dependența toxicității nanoparticulelor metalice în timpul incubării. Astfel, de exemplu, în timp de 6 ore de incubare nanoparticulele metalice prezintă cea mai mare toxicitate [14]. La utilizarea nanoparticulelor de ZnO <50 nm în concentrația de 20 mg/l viabilitatea celulelor levuriene după 6 și 24 de ore de cultivare este mai înaltă (cu 45-100% față de martor), pe când la utilizarea nanoparticulelor de ZnO <100 nm – cu 16-41% față de martor, respectiv, în aceeași concentrație. Rezultatele obținute au arătat că viabilitatea celulară este dependentă de timpul de contact și de concentrația nanoparticulelor de ZnO; astfel, efect citotoxic pronunțat se observă odată cu creșterea concentrațiilor mai sus de 50-70 mg/l, care conduc la descreșterea viabilității celulelor levuriene după 6 și 24 de ore de cultivare sub valorile probelor de referință prin afectarea reproducerii (Fig.1).

Este posibil ca nanoparticulele de ZnO <50 nm să interacționeze cu celulele levuriene mult mai ușor decât particulele mai mari ZnO <100 nm, ceea ce este confirmat și prin datele științifice, conform cărora nanoparticulele metalice în concentrații sporite interacționează cu enzimele, proteinele, ARN-ul sau ADN-ul lor, ceea ce contribuie la inhibarea diviziunii celulare [15].



**Fig.1.** Influența nanoparticulelor de ZnO în funcție de dimensiuni și concentrație asupra viabilității celulare a tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03.

Un important rol protector al celulelor levurilor *Rhodotorula gracilis* la acțiunea factorilor nocivi le revine pigmentilor carotenoizi, care datorită structurii lor acționează ca antioxidanți micromoleculari care protejează membrana, captează radicalii  $O_2$  și peroxil [16]. Astfel, carotenoizii pot fi folosiți ca marcheri biologici pentru caracterizarea desfășurării proceselor metabolice și aprecierea nivelului de influență a nanoparticulelor asupra celulelor.

Pentru a stabili gradul de influență a nanoparticulelor de ZnO în funcție de dimensiuni și concentrație, în procesul de cultivare a levurii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 s-a cercetat formarea de pigmenți carotenoidici intracelulari, conținutul de  $\beta$ -caroten, torulină și torularodină.

Astfel, analiza acțiunii nanoparticulelor de ZnO (<50 nm) asupra conținutului de pigmenți carotenoidici la *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 a relevat că concentrațiile de 1...30 mg/l ale nanoparticulelor nu dereglează esențial desfășurarea procesului de biosinteză. La introducerea concentrațiilor de 50-70 mg/l, cantitățile de pigmenți în biomasa levuriană se micșorează nesemnificativ cu 5-10%. În ceea ce privește efectul nanoparticulelor de ZnO (<100 nm), s-a stabilit că suplimentarea mediului de cultură cu concentrația de 30 mg/l de nanoparticule inițiază o scădere esențială cu 29% a cantității de pigmenți carotenoidici în biomasa levuriană (Fig.2).

Astfel, dimensiunile mari și concentrațiile ridicate ale nanoparticulelor examinate ce depășesc 30 mg/l afectează căile de formare a pigmentilor carotenoizi. Probabil, radicalii liberi induc modificări în mecanismul de formare a legăturilor duble cojugate ce răspund de sinteza caratenoidelor.

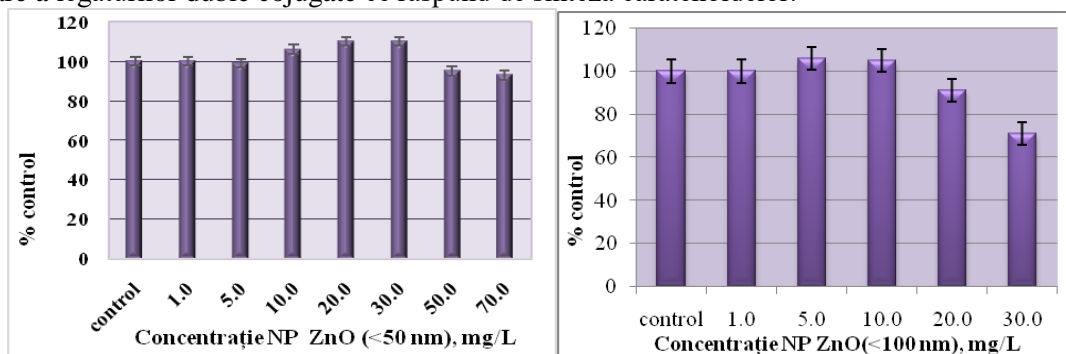


Fig.2. Influența nanoparticulelor de ZnO în funcție de dimensiuni și concentrație asupra conținutului de pigmenți carotenoidici la tulpina *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03.

Un parametru biochimic important pentru evaluarea influenței nanoparticulelor de ZnO asupra celulelor de levuri pigmentate *Rhodotorula gracilis* sunt carbohidrații, care participă în mecanismele reglatoare ale celulei, în special controlează sinteza diferitor substanțe, creșterea și multiplicarea celulară. Conținutul de carbohidrați din biomasa levuriană caracterizează starea fiziologică, aceștia fiind necesari pentru funcționarea corectă a celulelor.

Reieșind din datele obținute, se poate observa că utilizarea nanoparticulelor de ZnO (<50 nm) și (<100 nm) în limitele concentrațiilor de 5-20 și 5-10 mg/l contribuie la sporirea cantității de carbohidrați cu 17-19% și, respectiv, cu 18-20%. Utilizarea concentrațiilor sporite contribuie la scăderea bruscă a valorilor conținutului de carbohidrați sub nivelul determinat în proba de control. Efect semnificativ se poate observa la suplimentarea mediului cu nanoparticule de ZnO <50 nm în concentrația de 70 mg/l.

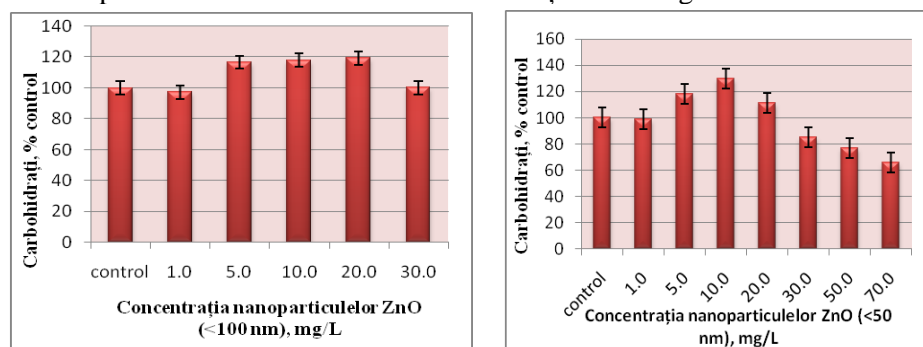


Fig.2. Influența nanoparticulelor de ZnO asupra conținutului de carbohidrați la tulpina *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03.

Posibil, procesul de biosinteză a carbohidraților este afectat de concentrațiile ridicate ale nanoparticulelor care provoacă afectarea membranei celulare și a proceselor metabolice din celule.

Generalizând rezultatele obținute în acest studiu, putem deduce că viabilitatea celulară, conținutul de pigmenți carotenoidici și de carbohidrați la tulpina pigmentată *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03, la contact cu nanoparticulele de ZnO, se modifică în funcție de dimensiunile și concentrațiile utilizate. Astfel, experimentele efectuate demonstrează o sensibilitate înaltă a tulpinii la aplicarea concentrațiilor ridicate ale nanoparticulelor de ZnO și oferă oportunități în modelarea proceselor vitale celulare și evidențierea ca test biologic a parametrilor studiați în sensul stabilirii gradului de acțiune a nanoparticulelor asupra levurilor.

### Concluzii

S-a constatat că nanoparticulele de ZnO au avut efect mai pronunțat asupra viabilității celulare a levurii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 după 24 de ore de cultivare, comparativ cu efectul observat după 6 ore pentru ambele tipuri de nanoparticule utilizate.

Studierea efectului nanoparticulelor de ZnO (<50 nm) și de ZnO (<100 nm) asupra conținutului pigmentilor carotenoidici a demonstrat că, în cazul aplicării concentrațiilor de 1-20 mg/l conținutul acestora în probele experimentale este apropiat de valoarea matorului. Sporirea consecventă a concentrațiilor contribuie la reducerea conținutului de carotenoizi.

Efectul nanoparticulelor de ZnO (<50 nm) și de ZnO (<100 nm) se manifestă prin sporirea conținutului de carbohidrați în limitele concentrațiilor de 5-20 mg/l, utilizarea concentrațiilor mai înalte contribuie la scăderea bruscă a valorilor sub nivelul determinat în proba de control.

### Referințe:

1. FAURE, B., SALAZAR-ALVAREZ, G., AHNIYAZ, A., VILLALUENGA, I., BERRIOZABAL, G., DE MIGUEL, YR., BERGSTRÖM, L. Dispersion and surface functionalization of oxide nanoparticles for transparent photocatalytic and UV-protecting coatings and sunscreens. In: *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 2013, no.14(2), p.23.
2. SHARMA, D., RAJPUT, J., KAITH, B., KAUR, M., SHARMA, S. Synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antibacterial and antifungal properties. In: *Thin. Solid Films*, 2010, no.519, p.1224-1229.
3. WAHAB, R., KHAN, F., AL-KHEDHAIRY, L., AL-KHEDHAIRY, A. Photocatalytic activity and statistical determination of ball-shaped zinc oxide NPs with methylene blue dye. In: *Inorg. Nano-Met. Chem.*, 2017, no.47, p.536-542.
4. BONDARENKO, O., JUGANSON, K., IVASK, A., KASEMETS, K., MORTIMER, M., KAHRU, A. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. In: *Arch. Toxicol.*, 2013, no.87(7), p.1181-200.
5. ESPITA, P., SOARES, N., COIMBRA, J., ANDRADE, N., CRUZ, R., MEDEIROS, E., Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications. In: *Food Bioprocess Technology*, 2012, no.5, p.1447-1464.
6. MISHRA, Y., ADELUNG, R., RÖHL, C., SHUKLA, D., SPORS, F., TIWARI, V. Virostatic potential of micro-nano filopodia-like ZnO structures against herpes simplex virus-1. In: *Antiviral Res.*, 2011, no.92(2), p.305-12.
7. GALVÁN, M., GHIYASVAND, M., MASSARSKY, A. Zinc oxide and silver nanoparticles toxicity in the baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. In: *PLoS One*, 2018, no.13(3), p.19.
8. OTERO-GOZALIEZ, L., GARSIA-SAUCEDO, C., JAMEZ, A., SIERRA-ALVAREZ, R. Toxicity of TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, Fe<sup>0</sup>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles to the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Chemosphere*, 2013, p.1201-1206.
9. 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, no.37, p.268-274.
10. КОИЦЕВАЯ, И.И. *Микробиология. Практическое пособие для студентов специальности Биология (научно-педагогическая деятельность)*. Гомель: УО «ГГУ им. Ф. Скорины», 2011, с.126.
11. FRENGOVA, G., SIMOVA, E., GRIGOROVA, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultra filtrate. In: *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, vol.44, no.8, p.288-294.
12. TAMAS, V., NEAMȚU, G. *Pigmenți carotenoidici și metaboliti*. București: Ceres, 1986, p.269.
13. DEY, P., HARBORN, J. Methods in Plant Biochemistry. In: *Carbohydr. Academic Press*, 1993, vol.2, p.529.
14. NISKA, K., PYSZKA, K., TUKAJ, C., WOZNAK, M., WITOLD, RADOMSKI, M., INKIELEWICZ-STEPNIAK, I. Titanium dioxide nanoparticles enhance production of superoxide anion and alter the antioxidant system in human osteoblast cells. In: *International Journal of Nanomedicine*, 2015, no.10(1), p.1095-1107.
15. GEHRKE, H., PELKA, J., HARTINGER, C.G., BLANK, H., BLEIMUND, F., SCHNEIDER, R., GERTHSEN, D., BRÄSE, S., CRONE, M., TÜRK, M., MARKO, D. Platinum nanoparticles and their cellular uptake and DNA platination at non-cytotoxic concentrations. In: *Arch. Toxicol.*, 2011, no.85(7), p.799-812.

16. MERHAN, O. Biochemistry and Antioxidant Properties of Carotenoids. In: *Intech.*, 2017, p.51-66.

**Notă:** Investigațiile au fost realizate în cadrul Proiectului „Validarea testelor microbiologice și biochimice pentru studii de nanotoxicologie” 18.80012.51.16A.

**Date despre autori:**

**Alina BEȘLIU**, doctorandă, Școala doctorală *Științe Biologice*; cercetător științific în LCȘ *Biotehnologia Levurilor*, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

**E-mail:** besliu.imb@gmail.com

**Nadejda EFREMOVA**, doctor în biologie, conferențiar cercetător, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

**E-mail:** efremova.nadejda@gmail.com

**Agafia USATÎI**, doctor habilitat, profesor universitar, șef LCȘ *Biotehnologia Levurilor*, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

**E-mail:** efremova.nadejda@gmail.com

**Ludmila BATÎR**, doctor în biologie, conferențiar cercetător, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

**E-mail:** batludmila@mail.ru

*Prezentat la 08.02.2019*