

**MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII
UNIVERSITATEA DE STAT « DIMITRIE CANTEMIR »**

Cu titlu de manuscris

C.Z.U.: 507. 663.12/. 604.2: 620.3

BEȘLIU ALINA
EFECTELE NANOPARTICULELOR OXIZILOR METALICI
ASUPRA LEVURILOR DIN GENUL *RHODOTORULA*

167.01 BIOTEHNOLOGIE, BIONANOTEHNOLOGIE

Teză de doctor în științe biologice

Autorul :

Conducător științific:

Usatîi Agafia, doctor habilitat,
profesor cercetător, specialitatea
167.01 Biotehnologie, bionanotehnologie

CHIȘINAU 2020

© Beşliu Alina, 2020

CUPRINS

ADNOTARE (în română și engleză)	5
LISTA TABELELOR	7
LISTA FIGURILOR	9
LISTA ABREVIERILOR	13
INTRODUCERE	14
1 NANOPARTICULE OXIZILOR METALICI CARACTERIZARE ȘI APLICAȚII ÎN MICROBIOLOGIE (REVIUL LITERATURII)	22
1.1. Nanoparticulele oxizilor metalici- clasificare și proprietăți fizico-chimice	23
1.2. Evaluarea influenței nanoparticulelor oxizilor metalici asupra organismelor vii	30
1.3. Perspective de utilizare a nanoparticulelor oxizilor metalici	36
1.4. Oportunitatea studierii levurilor din genul <i>Rhodotorula</i>	40
1.5. Concluzii la capitolul 1	45
2. MATERIALE SI METODE DE CERCETARE	47
2.1. Materiale de studiu	47
2.2. Metode de investigație	47
2.3. Concluzii la capitolul 2	56
3. EFECTELE NANOPARTICULELOR ZnO ASUPRA TULPINILOR DE LEVURI DIN GENUL <i>RHODOTORULA</i>	57
3.1. Validarea testelor microbiologice și biochimice pentru studii de evaluare a efectelor nanoparticulelor ZnO asupra levurilor	57
3.2. Viabilitatea, producția de biomasă celulară și caracterele morfologice a levurilor <i>Rh. gracilis</i> sub influența nanoparticulelor ZnO	65
3.3. Sinteza proteinelor la levurile <i>Rh. gracilis</i> sub influența nanoparticulelor ZnO	71
3.4. Sinteza carbohidraților la levurile <i>Rh. gracilis</i> sub influența nanoparticulelor ZnO	75
3.5. Sinteza carotenoizilor la levurile <i>Rh. gracilis</i> sub influența nanoparticulelor ZnO	76
3.6. Activitatea enzimelor antioxidante catalazei și superoxid dismutazei la <i>Rh. gracilis</i> sub influența nanoparticulelor ZnO	79
3.7. Procedeu de cultivare a levurilor <i>Rh. gracilis</i> cu utilizarera nanoparticulelor ZnO	82
3.8. Concluzii la capitolul 3	85
4. EFECTELE NANOPARTICULELOR Fe ₃ O ₄ ASUPRA TULPINII <i>RH. GRACILIS</i> CNMN-Y-30	87
4.1. Viabilitatea, producția de biomasă celulară și caracterele morfologice a tulpinii <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe ₃ O ₄	87
4.2. Sinteza proteinelor la tulpina <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe ₃ O ₄	95
4.3. Sinteza carbohidraților la tulpina <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe ₃ O ₄	97
4.4. Sinteza carotenoizilor la tulpina <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe ₃ O ₄	99
4.5. Activitatea enzimelor antioxidante catalazei și superoxid dismutazei la tulpina <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe ₃ O ₄	102
4.6. Procedeu de evaluare a impactului nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ cu utilizarea în calitate de model a levurii <i>Rh. gracilis</i>	106

4.7.	Concluzii la capitolul 4	110
5.	REALIZAREA NANOCOMPOZITELOR CHITOSAN–ZINC ȘI CHITOSAN-FIER CU PERSPECTIVE BIOTEHNOLOGICE	112
5.1.	Evaluarea acțiunii nanocompozitului chitosan-zinc asupra activității biosintetice <i>Rh. gracilis</i>	113
5.2.	Evaluarea acțiunii nanocompozitului chitosan-fier asupra activității biosintetice <i>Rh. gracilis</i>	117
5.3.	Concluzii la capitolul 5	126
	CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	127
	BIBLIOGRAFIE	130
	ANEXE	168
	Anexa 1. Brevet de invenție MD 4522 „Procedeu de evaluare a toxicității nanoparticulelor oxizilor de metale cu utilizarea levurilor”	169
	Anexa 2. Brevet de invenție „Procedeu de cultivare a levurilor <i>Rhodotorula gracilis</i> ”	170
	Anexa 3. Recomandări de evaluare a impactului nanoparticulelor oxizilor de metale cu utilizarea levurilor	171
	Anexa 4. Act nr. 121 din 29.11.2018 de implementare a elaborării „Stabilirea efectului nanomaterialelor asupra dezvoltării și productivității levurilor”	173
	Anexa 5. Act nr. 96 din 07.11.2019 de implementare a elaborării „Metodă spectrofotometrică validată de determinare a activității enzimei catalaza	173
	Anexa 6. Diplomă (Medalia de Aur) Expoziția Internațională Specializată INFOINVENT, 2017 „Procedeu de evaluare a toxicității nanoparticulelor oxizilor de metale cu utilizarea levurilor”	174
	Anexa 7. Diplomă (Medalia de Aur) Salonul Internațional de Cercetare, Inovare și Transfer Tehnologic, INVENTICA, 2018 „Assessment method of the effects of nano-oxides with use of yeasts”	175
	Anexa 8. Diplomă (De excelență) Salonul Internațional de Cercetare, Inovare și Transfer Tehnologic, INVENTICA, 2018 „Assessment method of the effects of nano-oxides with use of yeasts”	176
	Anexa 9. Diplomă (Medalia de Aur) Târgul Internațional de Invenții și Idei Practice, INVENT – INVEST, 2018 „Assessment method of the effects of nano-oxides with use of yeasts”	177
	Anexa 10. Diplomă (Medalia de Aur) Expoziția Internațională Specializată INFOINVENT, 2019 „Procedeu de cultivare a levurilor <i>Rhodotorula gracilis</i> ”	178
	Anexa 11. Diplomă (Medalia de bronz) Expoziția Internațională Specializată INFOINVENT, 2019 „Validarea testelor microbiologice și biochimice pentru studii de nanotehnologie”	178
	Anexa 12. Diploma (Medalia de aur) Expoziția Internațională „Cadet Inova ’20”, „Assessment method of the effects of nano-oxides with use of yeasts”.	180
	Anexa 13. Diplomă Premiul municipal pentru tineret în domeniile științei, tehnicii, literaturii, artelor și activism civic, ediția 2018 (secțiunea științe)	180
	Anexa 14. Diplomă de onoare a Ministerului Educației, Culturii și Cercetării	182
	DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	183
	CV-ul autorului	184

ADNOTARE

Beșliu Alina „Efectele nanoparticulelor oxizilor metalici asupra levurilor din genul *Rhodotorula*”. Teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2020.

Teza conține introducere, cinci capitole, concluzii și recomandări, bibliografie cu 361 titluri, 12 anexe, volumul capitolelor 129 pagini, 55 figuri, 19 tabele. Rezultatele obținute sunt reflectate în 46 lucrări științifice publicate la tema tezei.

Domeniul de studiu: Științe ale naturii.

Cuvintele cheie: nanoparticule ZnO, Fe₃O₄, *Rhodotorula gracilis*, viabilitate, caractere morfologice, carbohidrați, proteine, pigmenți carotenoizi, catalaza, superoxid dismutaza.

Scopul lucrării constă în stabilirea gradului de influență a nanoparticulelor oxizilor de metale ZnO și Fe₃O₄ asupra indicilor microbiologici și biochimici la levurile de interes biotehnologic din genul *Rhodotorula* și aprecierea perspectivelor de utilizare în bionanotehnologii.

Obiectivele lucrării: Validarea testelor microbiologice și biochimice în contextul asigurării calificării și calității metodelor utilizate pentru evaluarea efectelor nanoparticulelor oxizilor metalici; Stabilirea particularităților acțiunii nanoparticulelor ZnO și Fe₃O₄ cu diferite dimensiuni asupra levurilor din genul *Rhodotorula*; Elaborarea procedeele de utilizare a nanoparticulelor ZnO și Fe₃O₄ în biotehnologia cultivării levurilor; Obținerea nanocompozitelor chitosan–zinc și chitosan-fier și aprecierea perspective utilizării lor în biotehnologia levurilor pigmentate.

Noutatea și originalitatea științifică. În premieră au fost validate teste microbiologice și biochimice și identificate componentele celulare ale levurilor pigmentate din genul *Rhodotorula*, implicate în răspunsul la acțiunea nanoparticulelor; elucidat caracterul acțiunii nanoparticulelor ZnO și Fe₃O₄ asupra viabilității, producției de biomasă, caracterelor morfologice, conținutului de proteine, carbohidrați, carotenoide, enzimelor antioxidante la levurile din genul *Rhodotorula* în dependență de dimensiuni și concentrație. S-a demonstrat că nanoparticulele ZnO, utilizate în concentrații 1-20 mg/L, influențează pozitiv procesele de multiplicare și biosinteză a proteinelor, carbohidraților și pigmenților carotenoidici. S-a demonstrat că nanoparticulele Fe₃O₄ induc la *Rh. gracilis* modificări semnificative în sistemul de apărare antioxidant, care se manifestă prin scăderea conținutului de carotenoide și enzimei catalaza. În premieră este elucidat caracterul de acțiune a nanocompozitelor chitosan-zinc și chitosan-fier asupra levurilor din genul *Rhodotorula*. Au fost elaborate două procedee noi de sporire a cantității și calității proteinelor cu utilizarea nanoparticulelor ZnO și de evaluare a toxicității nanoparticulelor Fe₃O₄ cu utilizarea în calitate de model a levurii *Rh. gracilis*. Originalitatea procedeele elaborate sunt confirmate de 2 brevete de invenție și o cerere de brevet de invenție.

Problema științifică importantă soluționată în lucrare. Au fost stabilite efectele nanoparticulelor ZnO și Fe₃O₄ asupra levurilor de interes biotehnologic din genul *Rhodotorula*, ceea ce a contribuit la elucidarea unor mecanisme de acțiune a nanoparticulelor, fapt ce a permis aprecierea perspectivelor de utilizare a lor în bionanotehnologii.

Semnificația teoretică. Sunt argumentate științific particularitățile de acțiune a nanoparticulelor ZnO și Fe₃O₄, în funcție de dimensiuni și concentrație, și a nanocompozitelor chitosan-zinc și chitosan-fier asupra indicilor microbiologici și biochimici la levurile din genul *Rhodotorula*, ceea ce a servit ca bază pentru elucidarea unor căi de acțiune și elaborarea procedeele de utilizare în biotehnologia cultivării levurilor.

Valoarea aplicativă. Se propun spre valorificare: un procedeu de sporire a conținutului de proteine la *Rh. gracilis* cu utilizarea nanoparticulelor ZnO; un procedeu nou de testare a gradului de nocivitate a nanoparticulelor Fe₃O₄ cu utilizarea în calitate de model a levurilor pigmentate din genul *Rhodotorula*; un procedeu nou de realizare a nanocompozitelor chitosan–zinc și chitosan-fier cu perspective biotehnologice.

Implementarea rezultatelor. Rezultatele cercetării sunt aplicate în cadrul Institutului de Inginerie Electronică și Nanotehnologii “D. Ghițu”, și în laboratorul Microbiologia solului, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

ANNOTATION

Beşliu Alina „The effects of metal oxide nanoparticles on yeasts of the genus *Rhodotorula*”, PhD thesis in biological sciences, Chisinau, 2020.

The thesis consists of an introduction, five chapters, general conclusions and recommendations, 361 of bibliographic sources, 12 appendices, main text 129 pages, 55 figures, 19 tables. The results were published in 46 scientific papers.

Field of study: Natural sciences.

Keywords: ZnO, Fe₃O₄ nanoparticles, *Rhodotorula gracilis*, viability, morphological characters, carbohydrates, proteins, carotenoid pigments, catalase, superoxide dismutase.

Objectives of the paper: Validation of microbiological and biochemical tests in the context of ensuring the qualification and quality of the methods used to evaluate the effects of nanoparticles of metal oxides; Establishing the particularities of the action of ZnO and Fe₃O₄ nanoparticles with different dimensions on yeasts of the genus *Rhodotorula*; Elaboration of the procedures for the use of ZnO and Fe₃O₄ nanoparticles in the biotechnology of yeast cultivation; Obtaining the chitosan-zinc and chitosan-iron nanocomposites and appreciating the perspectives of their use in the biotechnology of pigmented yeasts.

Scientific novelty and originality. For the first time, microbiological and biochemical tests are validated and the cellular functional groups of pigmented yeasts of the genus *Rhodotorula* have been identified, involved in the response to the action of the nanoparticles. For the first time is elucidated the action character of ZnO and Fe₃O₄ nanoparticles on viability, biomass production, cellular and colonial morphological characteristics, protein content, carbohydrates, carotenoids, antioxidant enzymes in yeasts of the *Rhodotorula* genus depending on size and concentration. It has been shown that ZnO nanoparticles, used in concentrations 1-20 mg/L in *Rh. gracilis* cultivation, positively influence the processes of protein multiplication and biosynthesis, carbohydrates and carotenoid pigments. It has been shown that Fe₃O₄ nanoparticles induce in *Rh.gracilis* significant changes in biosynthetic processes and antioxidant defense system, which is manifested by decreased carotenoid content and catalase enzyme. For the first time, the character of action of chitosan-zinc and chitosan-iron nanocomposites on yeasts of the genus *Rhodotorula* is elucidated. Two new procedures have been developed to increase the quantity and quality of proteins with the use of ZnO nanoparticles and to evaluate the toxicity of Fe₃O₄ nanoparticles with the use of *Rh. gracilis* as a model. The processes are confirmed by 2 patents and patent application.

The important scientific problem solved in the paper. The effects of nanoparticles of ZnO and Fe₃O₄ metal oxides on yeasts of biotechnological interest in the genus *Rhodotorula* have been established, which has contributed to the elucidation of some mechanisms of action, which has allowed to appreciate the prospects for use in bionanotechnologies.

Theoretical significance. The particularities of action of the ZnO and Fe₃O₄ nanoparticles, based on their size and concentration, and of the chitosan-zinc and chitosan-iron nanocomposites on the microbiological and biochemical indices in yeasts of the genus *Rhodotorula*, have been argued, which served as a basis for the elucidation of some of action and elaboration of the procedures for use in the biotechnology of yeast cultivation.

The applicative value. It is proposed for recovery: a process for increasing the protein content of *Rh. gracilis* strains with the use of ZnO nanoparticles; a new process for testing the harmfulness of Fe₃O₄ nanoparticles with the use as a model of pigmented yeasts of the genus *Rhodotorula*; a new process for making chitosan-zinc and chitosan-iron nanocomposites with biotechnological perspectives.

Implementation of results. The results of the research are applied within the Institute of Electronic Engineering and Nanotechnologies “D. Ghiu”, and the practical work in the soil microbiology laboratory, the Institute of Microbiology and Biotechnology.

LISTA TABELELOR		
Nr. d/o	Denumirea tabelului	Numărul paginii
1.1.	Exemple reprezentative de nanomateriale sintetizate din surse naturale	24
1.2.	Exemple de nanomateriale sintetice din sintetizate din surse industriale	25
1.3.	Biopolimeri naturali utilizați pentru acoperirea nanoparticulelor oxizilor metalici	29
3.1.	Precizia intermediară metodei de determinare a numărului total de colonii pentru tulpina <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-03 cu valorile F tab și F cal, intervalul de încredere 95%	58
3.2.	Acuratețea metodei de determinare a numărului total de colonii pentru tulpina <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-03 cu valorile t tab și t cal, intervalul de încredere 95%	59
3.3.	Liniaritatea metodei de determinare a numărului total de colonii pentru tulpina <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-03 cu valorile respective F tab și F cal, intervalul de încredere 95%	59
3.4.	Robustețea metodei de determinare a numărului total de colonii pentru tulpina <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-03	60
	Repetabilitatea metodei de determinare a conținutului de proteine la tulpina	61
3.5.	<i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-03 cu valorile F tab și F cal, intervalul de încredere 95%	
3.6.	Precizia intermediară metodei de determinare a conținutului de proteine la tulpina <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-03 cu valorile F tab și F cal, intervalul	61
3.7.	Robustețea metodei de determinare a conținutului de proteine la tulpina <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-03	62
3.8.	Repetabilitatea metodei de determinare a activității enzimei catalaza la tulpina <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-03 cu valorile F tab și F cal, intervalul de încredere 95%	63
3.9.	Precizia intermediară metodei de determinare a activității enzimei catalaza la tulpina <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-03 cu valorile F tab și F cal, intervalul de încredere 95%	63

3.10.	Robustețea metodei de determinare a activității enzimei catalaza la tulpina <i>Rhodotorula gracilis</i> CNMN-Y-03	64
3.11.	Conținutul de AA esențiali și imunoactivi în mg/100 mg proteine la tulpina <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 sub influența NP ZnO	74
3.12.	Efectele NP ZnO <50 nm asupra conținutului de proteine la tulpinile de levuri <i>Rhodotorula gracilis</i>	83
4.1.	Dimensiunile medii ale celulelor tulpinii de levuri <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30, la cultivare timp de 120 ore în prezența nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ (10 nm)	91
4.2.	Dimensiunile medii ale celulelor tulpinii de levuri <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30, la cultivare timp de 120 ore în prezența nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ (50-100 nm)	91
4.3.	Nivelul activității catalazei și cantității de β-caroten la <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30, la acțiunea diferitor concentrații de nanoparticule Fe ₃ O ₄ (10 nm)	109
4.4.	Nivelul activității catalazei și cantității de β-caroten la <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30, la acțiunea diferitor concentrații de nanoparticule Fe ₃ O ₄ (50-100 nm)	109

LISTA FIGURILOR

Nr. d/o	Denumirea figurii	Nr. paginii
1.1.	Forma de organizare și dimensiunile nanoparticulelor ZnO, TiO ₂ , SiO ₂	26
1.2.	Prezentarea schematică a diferitor căi de inducere a toxicității celulare de nanoparticulele CuO și ZnO	31
2.1.	Aspectul microscopic al celulelor (A) și morfologia macroscopică al coloniilor gigant (B) a tulpinii de levuri <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-03 cultivată în mediu YPD în condiții de laborator	47
2.2.	Aspectul microscopic al celulelor (A) și morfologia macroscopică al coloniilor gigant (B) a tulpinii de levuri <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 cultivată în mediu YPD în condiții de laborator	48
2.3.	Prepararea soluției stoc de nanoparticule procesor cu ultrasunete de 50 W	50
2.4.	Acoperirea NP Fe ₃ O ₄ (50-100 nm) cu chitosan	51
3.1.	Liniaritatea de determinare a conținutului de proteine la tulpina <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-03	62
3.2.	Liniaritatea de determinare a activității enzimei antioxidante catalaza la tulpina <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-03	64
3.3.	Valorile procentuale față de martor ale viabilității celulare a <i>Rh. gracilis</i> la contact cu nanoparticulele ZnO <50 nm în funcție de concentrație și durata de contact	66
3.4.	Valorile procentuale față de martor ale viabilității celulare a <i>Rh. gracilis</i> la contact cu nanoparticulele ZnO <100 nm în funcție de concentrație și durata de contact	67
3.5.	Valorile procentuale față de martor ale acumulării biomasei celulare a levurilor <i>Rh. gracilis</i> sub acțiunea nanoparticulelor ZnO în funcție de concentrație	68
3.6.	Aspectul morfologic al celulelor <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-03 după 24 ore de contact cu nanoparticulele ZnO < 50 nm, (ocular 15/100)	69
3.7.	Aspectul morfologic al celulelor <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 după 24 ore de contact cu nanoparticulele ZnO < 50 nm, (ocular 15/100)	69
3.8.	Morfologia coloniilor <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-03 la contact cu diferite concentrații de nanoparticule ZnO <50 nm timp de 120 ore	70

3.9.	Morfologia coloniilor <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 la contact cu diferite concentrații de nanoparticule ZnO <50 nm timp de 120 ore	71
3.10.	Valorile procentuale față de martor ale acumulării proteinelor în biomasa levurilor <i>Rh. gracilis</i> sub acțiunea nanoparticulelor ZnO în funcție de concentrație	73
3.11.	Valorile procentuale față de martor ale acumulării carbohidraților în biomasa levurilor <i>Rh. gracilis</i> sub acțiunea nanoparticulelor ZnO în funcție de dimensiuni și concentrație	76
3.12.	Valorile procentuale față de martor ale acumulării carotenoidelor în biomasa levurilor <i>Rh. gracilis</i> sub acțiunea nanoparticulelor ZnO <50 nm în funcție concentrație	77
3.13.	Valorile procentuale față de martor ale β -carotenului, torulinei și torularodinei în biomasa levurilor <i>Rh. gracilis</i> sub acțiunea nanoparticulelor ZnO <50 nm în funcție concentrație	78
3.14.	Valorile procentuale față de martor ale acumulării carotenoidelor în biomasa levurilor <i>Rh. gracilis</i> sub acțiunea nanoparticulelor ZnO <100 nm în funcție concentrație	78
3.15.	Valorile procentuale față de martor ale β -carotenului, torulinei și torularodinei în biomasa levurilor <i>Rh. gracilis</i> sub acțiunea nanoparticulelor ZnO <100 nm în funcție concentrație	79
3.16.	Nivelul activității catalazei la <i>Rh. gracilis</i> la acțiunea NP ZnO în funcție de dimensiune și concentrație	80
3.17.	Nivelul activității SOD la <i>Rh. gracilis</i> la acțiunea NP ZnO în funcție de dimensiuni și concentrație	81
3.18.	Schema procedurii de sporire a conținutului de proteine la levurile <i>Rh. gracilis</i> cu utilizarea NP ZnO <50 nm	83
4.1.	Valorile procentuale față de martor a viabilității <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 la cultivare în prezența nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ cu diferite dimensiuni	88
4.2.	Valorile procentuale față de martor a producției de biomasă <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 la cultivare în prezența nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ cu diferite dimensiuni	89
4.3.	Caractere morfologice ale celulelor <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30, sub acțiunea nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ , (10 nm), durata de contact 120 ore, (ocular 15/100)	90

4.4.	Caractere morfologice ale coloniilor <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30, la cultivare în prezența nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ (10 nm), durata de contact 120 ore	92
4.5.	Caractere morfologice ale coloniilor <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30, la cultivare în prezența nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ (30 nm), durata de contact 120 ore	93
4.6.	Caractere morfologice ale coloniilor <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30, la cultivare în prezența nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ (50-100 nm), durata de contact 120 ore	94
4.7.	Valorile procentuale față de martor a conținutului de proteine în biomasa <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ (10 nm)	94
4.8.	Valorile procentuale față de martor a conținutului de carbohidrați în biomasa <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ (30 nm)	96
4.9.	Valorile procentuale față de martor a conținutului de carbohidrați în biomasa <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ (30 nm)	97
4.10.	Valorile procentuale față de martor a conținutului de carbohidrați în biomasa <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ (50-100 nm)	98
4.11.	Valorile procentuale față de martor a conținutului de carotenoide în biomasa <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ cu diferite dimensiuni	98
4.12.	Valorile procentuale față de martor a conținutului de β - caroten, torulină și torularhodină în biomasa tulpinii <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30, la cultivare în prezența nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ cu diferite dimensiuni	100
4.13.	Valorile procentuale față de martora activitatea catalazei la tulpina de levuri <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30, la cultivare în prezența nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ cu diferite dimensiuni	101
4.14.	Valorile procentuale a activității SOD la tulpina de levuri <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30, la cultivare în prezența nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ cu dimensiunea de 50-100 nm	103
4.15.	Schema ipotetică a mecanismului de acțiune a NP Fe ₃ O ₄ asupra tulpinii <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30	104
4.16.	Schema procedului de evaluare a impactului nano-oxizilor metalici cu utilizarea levurilor pigmentate	106
4.17.	Schema procedului de evaluare a impactului nano-oxizilor metalici cu utilizarea levurilor pigmentate	108
5.1.	Efectele nanocompozitului chitosan-zinc asupra viabilității celulare și	115

	producției de biomasă la tulpina de levuri <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30	
5.2.	Viabilitatea celulară a tulpinii de levuri <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 sub acțiunea nanocompozitelor chitosan-fier, obținute prin diferite procedee	116
5.3.	Producția de biomasă la tulpina de levuri <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 sub acțiunea nanocompozitelor chitosan-fier, obținute prin diferite procedee	117
5.4.	Viabilitatea celulară a tulpinii de levuri <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 la acțiunea nanocompozitului chitosan-fier cu diferite concentrații a nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ (50-100 nm)	118
5.5.	Caractere morfologice coloniale a tulpinii de levuri <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 la acțiunea nanocompozitului chitosan-fier cu diferite concentrații a nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ (50-100 nm), durata de contact 48 h	119
5.6.	Producția de biomasă a tulpinii de levuri <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 sub acțiunea nanocompozitului chitosan-fier cu diferite concentrații ale nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ (50-100 nm)	120
5.7.	Cantitatea de proteine în biomasa tulpinii de levuri <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 la cultivare în prezența nanocompozitului chitosan-fier cu diferite concentrații a nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ (50-100 nm)	121
5.8.	Cantitatea de carbohidrați în biomasa tulpinii de levuri <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 sub acțiunea nanocompozitului chitosan-fier cu diferite concentrații ale nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ (50-100 nm)	122
5.9.	Cantitatea de carotenoide în biomasa tulpinii de levuri <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30 la cultivare în prezența nanocompozitului chitosan-fier cu diferite concentrații a nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ (50-100 nm)	122
5.10.	Efectul nanocompozitului chitosan-fier asupra conținutului de β-caroten, torulină, torularhodină în biomasa tulpinii de levuri <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30	123
5.11.	Activitatea SOD în biomasa <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30, cultivată în prezența nanocompozitului chitosan-fier cu diferite concentrații a nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ (50-100 nm)	122
5.12.	Activitatea catalazei în biomasa <i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30, cultivată în prezența nanocompozitului chitosan-fier cu diferite concentrații a nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ (50-100 nm)	123

LISTA ABREVIERILOR

AA	aminoacizi
ADN	acid dezoxiribonucleic
ARN	acid ribonucleic
B.U.	biomasă uscată
CAT	catalaza
CFU	Unități formatoare de colonii;
CNMN	Colecția Națională de Organisme Nematogene
CNMN-Y	Colecția Națională de Organisme Nematogene-Yeasts
Fe ₃ O ₄	Oxid de fier
NP	nanoparticule
PVP	Poli-N-vinilpirolidonă
ROS	Specii reactive de oxigen
RSD	abaterea standard relativă
SOD	superoxid dismutaza
S.U.	substanță uscată
UV	razele ultraviolete
UVA	razele ultraviolete A
UVB	razele ultraviolete B
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose medium
ZnO	Oxid de zinc

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța cercetărilor. Dezvoltarea științei și tehnologiei în ultimul deceniu este caracterizată prin studii intensive privind proprietățile nanoparticulelor și elaborarea diferitor moduri de aplicare practică a acestora. Nanoparticule metalice sunt printre cele mai utilizate pe scară largă, însă există mai multe studii in vitro care au demonstrat efecte toxice nedorite [91, 310]. Citotoxicitatea nanoparticulelor metalice și interacțiunea acestora cu sistemele biologice este încă neclară. Astfel, expunerea directă la acțiunea nanoparticulelor conduc la necesitatea urgentă de a înțelege influența și a evalua riscurile utilizării. Conform unor autori, efectele adverse ale nanoparticulelor trebuie în mod evident să fie evaluate pe diferite organisme celulare [76, 147].

De asemenea sunt importante și actuale cercetările detaliate ale efectelor nanoparticulelor asupra dezvoltării și producerii de metaboliți cu destinație biotehnologică. Este evident însă, că pentru a utiliza nanoparticulele în biotehnologie pentru biosinteza produselor bioactive de diversă natură, sunt necesare cercetări privitor la reacția celulelor la acțiunea nanoparticulelor de diferit tip.

Levurile pigmentate din genul *Rhodotorula* pot servi ca obiecte reprezentative, care oferă posibilitatea de a le propune ca obiecte cu destinație biotehnologică, dar și ca modele adecvate care oferă posibilități enorme în modelarea efectelor și stabilirea mecanismelor de acțiune a nanoparticulelor asupra proceselor vitale în celulă. În calitate de repere se propun diferiți indicatori cum ar fi cei microbiologici și biochimici.

Situația în domeniul de cercetare. În prezent nanotehnologiile se dezvoltă cu pași rapizi în diverse ramuri ale activității umane, oferind oportunități noi de utilizare a nanoparticulelor datorită proprietăților fizico-chimice, optoelectronice și biologice, care pot fi manipulate și modificate pentru a obține rezultatele necesare [75, 226, 278]. O categorie importantă de nanoparticule, printre care se numără ZnO și Fe₃O₄ oferă posibilități atractive de implementare în biomedicină, alimentație, cosmetologie, farmaceutică, protecția mediului și biotehnologie [118, 260]. Însă caracteristicile fizico-chimice care dau nanoparticulelor proprietăți unice sunt responsabile pentru efectele pozitive cât și cele negative. Conform mai multor studii din literatura de specialitate, mecanismul de influență a nanoparticulelor oxizilor metalici asupra celulei este complex și poate provoca efecte toxice și modificări atât în membrana celulară cât și în citoplasmă [88, 91].

O altă direcție importantă pentru lărgirea spectrului de utilizare a nanoparticulelor ZnO și Fe₃O₄ prezintă acoperirea lor cu chitosan. Chitosanul este un polimer, care are o capacitate extraordinară de a forma complexe cu nanoparticule metalice din cauza grupărilor sale amine și a

grupărilor hidroxil. Care contribuie la stabilizarea eficientă a nanoparticulelor oxizilor metalici oferindule o biocompatibilitate crescută, funcționalitatea chimică, reducerea toxicității și oxidării [218].

În Republica Moldova cercetări în domeniu nanotehnologiilor au început în anul 2002, când au fost procurate primele aparate moderne: microscopul electronic cu baleaj și microscopul de forțe atomice achiziționate de Centrul Național de Studiu și Testare a Materialelor, creat în cadrul Universității Tehnice a Moldovei. Crearea centrului, a condus la antrenarea în cercetare și formarea specialiștilor în domeniul nanotehnologiilor și nanomaterialelor sub îndrumarea academiceanului Ion Tighineanu [21]. În prezent la nivel național sunt realizate cercetări privind sinteza nanoparticulelor oxizilor metalici prin diverse metode care să ofere anumite particularități cum ar fi biocompatibilitate, solubilitate și toxicitate scăzută. În cadrul Institutului de Chimie și Institutului de Inginerie Electronică și Nanotehnologii sunt efectuate studii privind sinteza și caracterizarea nanoparticulelor oxizilor metalici Fe_3O_4 , ZnO obținute prin diferite metode fizice și chimice [19, 249]. Cercetări de sinteză biologică a nanoparticulelor oxizilor metalici (Ag , Fe_3O_4) cu utilizarea algelor *Spirulina platensis* și *Dunaliella salina* sunt efectuate în cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie, laboratorul Ficobiotehnologie [1, 20, 87]. În calitate de obiecte de testare a influenței nanoparticulelor oxizilor metalici pot fi utilizate levurile pigmentate din genul *Rhodotorula*.

Astfel, devin importante studiile pentru determinarea mecanismelor de acțiune a nanoparticulelor asupra levurilor, fiind important de a evidenția efectele asupra diferitor indicatori de dezvoltare a populației microbiene.

Problema de cercetare care rezultă din analiza efectuată, constă în necesitatea de a elucida gradul de influență a nanoparticulelor oxizilor metalici asupra tulpinilor de levuri din genul *Rhodotorula* în vederea elaborării unui nou model celular, cunoștințe ce pot promova idei de valorificare eficientă a acestora.

Scopul lucrării constă în determinarea gradului de influență nanoparticulelor oxizilor de metale ZnO și Fe_3O_4 asupra indicilor microbiologici și biochimici la levurile de interes biotehnologic din genul *Rhodotorula* și aprecierea perspectivelor de utilizare în bionanotehnologii.

Obiectivele lucrării:

- o Validarea testelor microbiologice și biochimice în contextul asigurării calificării și calității metodelor utilizate pentru evaluarea efectelor nanoparticulelor oxizilor metalici;

- o Stabilirea particularităților acțiunii nanoparticulelor ZnO și Fe_3O_4 cu diferite dimensiuni asupra levurilor din genul *Rhodotorula*;

o Elaborarea procedeeelor de utilizare a nanoparticulelor ZnO și Fe₃O₄ în biotehnologia cultivării levurilor;

o Realizarea nanocompozitelor chitosan–zinc și chitosan-fier cu perspective biotehnologice.

Ipotezele cercetării:

1. Nanoparticulele ZnO pot fi utilizate în calitate de factori stimulatori a componentelor bioactive a levurilor pigmentate din genul *Rhodotorula*.
2. Levurile pigmentate din genul *Rhodotorula* pot servi ca organism model eficient pentru testarea gradului de nocivitate a nanoparticulelor oxizilor metalici.

Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese:

Conform scopului și obiectivelor înaintate, pentru demonstrarea ipotezei de cercetare, au fost utilizate metode clasice și moderne de determinare a influenței nanoparticulelor asupra levurilor, inclusiv:

-metode de validare a parametrilor microbiologi și biochimici pentru studii de nanotoxicologie;

-metode microbiologice clasice de cultivare a levurilor, evaluarea viabilității și caracterilor morfologice celulare și coloniale;

- metode biochimice de determinare a conținutului de proteine, pigmenți carotenoizi, carbohidrați, enzime antioxidante catalaza și superoxid dismutaza.

- metoda sonochimică de preparare a nanocompozitelor chitosan-Zn și chitosan-Fe₃O₄;

-metode matematice de planificare a cercetărilor;

- metode de prelucrare statistică a rezultatelor.

Importanța teoretică. Sunt argumentate științific particularitățile de acțiune a nanoparticulelor ZnO și Fe₃O₄, în funcție de dimensiuni și concentrație, și a nanocompozitelor chitosan-zinc și chitosan-fier asupra indicilor microbiologici și biochimici la levurile din genul *Rhodotorula*, ceea ce a servit ca bază pentru elucidarea unor căi de acțiune și elaborarea procedeeelor de utilizare în biotehnologia cultivării levurilor.

Valoarea aplicativă. Se propune spre valorificare: un procedeu de sporire a conținutului de proteine la tulpinile *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 și *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 cu utilizarea nanoparticulelor ZnO; un procedeu nou de testare a gradului de nocivitate a nanoparticulelor Fe₃O₄ cu utilizarea în calitate de model a levurilor pigmentate din genul *Rhodotorula*; un procedeu nou de realizare a nanocompozitelor chitosan–zinc și chitosan-fier cu perspective biotehnologice.

Aprobarea rezultatelor. Materialele expuse în teza de doctor au fost prezentate și discutate în cadrul următoarelor manifestări științifice: Conferința Tehnico-Științifică a Colaboratorilor, Doctoranzilor și Studenților, Chișinău, 2016; International Conference „NANO-2016 Ethical, Ecological and Social Problems of Nanoscience and Nanotechnologies”, Chișinău, 2016; International Conference dedicated to the 70th anniversary of foundation of first research institutes of the ASM and the 55th anniversary of the inauguration of the Academy of Sciences of Moldova, Chișinău, 2016; Colocviu științific „Orientări actuale în cercetarea doctorală”, ediția VII-a, 2017; Conferința științifică națională cu participare internațională „Integrare prin cercetare și inovare”, Chișinău, 2018; Conferința Științifică Internațională a Doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”, Chișinău, 2017, 2018, 2019; Conferința Științifică Internațională „Biodiversitatea în contextul schimbărilor climatice”, Chișinău, 2018, 2019;

International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, Chișinău, 2016, 2018; International scientific conference for students and phd students youth and progress of biology dedicated to the 185th anniversary from the birthday of B. Dybowski, Lviv, 2018; Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных „Ломоносов-2018”, Москва, 2018; International congress on oil and protein crops. The congress dedicated to the 50th anniversary of Scientific Association of Geneyicists and Breeders of the Republic of Moldova, Chișinău, 2018; International scientific conference for students and phd students youth and progress of biology dedicated to the 135th anniversary of J. Parnas, Lviv, 2019. Конференция молодых ученых „Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии”, Москва, 2019.

European Exhibition of Creativity and Innovation „EUROINVENT”, Iasi, Romania, 2017; Expoziția Internațională Specializată Infoinvent, Chișinău, Moldova, 2017, 2019; Inventica, Iași, România, 2018; International Student Innovation and Științific Research Exhition „Cadet Inova 2018”, Sibiu, România, 2018; Târgul internațional de invenții și idei practice Invent-Invest, Chișinău, Moldova, 2018; Salonul Internațional de Cercetare, Inovare și Transfer Tehnologic, INVENTICA, 2018.

Volumul și structura tezei. Teza constă din cinci capitole, are un volum de bază de 129 pagini, conține 55 figuri și 19 tabele. Lista surselor bibliografice citate include 361 titluri.

Sumarul compartimentelor tezei. Teza constă din 5 capitole, primul capitol prezintă analiza realizărilor științifice din domeniu de cercetare, iar următoarele patru capitole reflectă asigurarea metodologică și rezultatele cercetărilor obținute.

1. NANOPARTICULELE OXIZILOR METALICI: – CARACTERIZAREA ȘI APLICAȚII (REVIUL LITERATURII) include o analiza amplă a realizărilor științifice la tema de cercetare. Studiul bibliografic conține 361 de lucrări relevante publicate în cercetări din domeniul biotehnologiei, bionanotehnologiei, nanotehnologiei, microbiologiei, biomedicinii și alimentației din întreaga lume. Capitolului 1 este dedicat clasificării, caracterizării și stabilirea proprietăților fizico-chimice ale nanoparticulelor oxizilor metalici.

Elucidării mecanismului celular al toxicității nanoparticulelor și evidențierea principalelor cauze responsabile. Sunt analizate metodele de preparare și stabilizare a nanoparticulelor metalice precum co-precipitare, descompunere termică a precursorilor, hidrotermală, microemulsie, sonochimică, soluție-gel, bioabsorbție, bioreducție și stabilizarea cu polimeri naturali.

O atenție deosebită este orientată spre potențialul înalt de implementare a nanoparticulelor metalice în biomedicină, farmaceutică, alimentație, industrie, protecția mediului și biotehnologia și studierii levurilor din genul *Rhodotorula*. În continuare, este expusă oportunitatea implicării levurilor din genul *Rhodotorula* în nanobiotehnologii și testarea nanotoxicității pentru diferite aplicații. Capitolul se încheie cu expunerea problemei de cercetare și direcțiile de soluționare a acesteia, sunt formulate scopul și obiectivele cercetării.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE include descrierea materialelor și metodelor folosite la realizarea cercetărilor. În cercetări au fost examinate nanoparticulele anorganice metalice: Fe_3O_4 cu dimensiunile de 10 nm, 30 nm, 50 nm, ZnO cu dimensiuni de <50 nm, <100 nm, nanocompozitele chitosan-zinc și chitosan-fier.

În calitate de obiecte de studiu au servit levurile pigmentate *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 producător de pigmenți carotenoizi și *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, producător de proteine și pigmenți carotenoizi. Tulpinile sunt depozitate în colecția laboratorului Biotehnologia Levurilor și Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie.

Pentru realizarea cercetărilor au fost utilizate metode clasice și moderne de determinare a influenței nanoparticulelor asupra levurilor. Au fost utilizate metodele microbiologice de determinare a viabilității celulare prin cuantificarea numărului de colonii formate pe plăcile cu YPD agarizat. Au fost studiate modificările caracterelor morfologice celule induse de nanoparticule testate, cu ajutorul microscopului XSZ-500, ocular 15/100 și camera video – MEM1300, utilizând programul special Future WinJoe. Caracterele morfologice coloniale au fost stabilite conform principiilor și tehnicilor de microbiologie generală.

Pentru a identifica efectele influenței nanoparticulelor oxizilor metalici au fost utilizate un șir de metode biochimice: de determinare a conținutului de proteine, carbohidrați, pigmenți carotenoizi, activitatea enzimelor antioxidante catalaza și superoxid dismutaza. Pentru reducerea toxicității nanoparticulelor Fe_3O_4 și ZnO au fost elaborate și testate diferite procedee de acoperire cu chitosan.

Prelucrarea statistică a rezultatelor a fost efectuată utilizând setul de programe MO Excel și Statistica 9.0. Rezultatele datelor a 3-4 repetări obținute au fost exprimate prin calcularea mediei, deviației standard și intervalului de încredere pentru o medie. Toate diferențele au fost considerate semnificative statistic pentru $P \leq 0,05$.

3. EFECTELE NANOPARTICULELOR ZnO ASUPRA TULPINILOR DE LEVURI DIN GENUL *RHODOTORULA* include rezultatele cercetărilor ce țin de validarea testelor microbiologice și biochimice, care au demonstrat că metodele testate de determinare a viabilității, conținutului de proteine și activității enzimei antioxidante catalaza sunt exacte, robuste și valide și pot fi utilizate pentru testarea influenței nanoparticulelor oxizilor metalici la levuri. Studiul efectelor nanoparticulelor ZnO a demonstrat că dimensiunea de <50 nm interacționează mult mai activ cu celulele levuriene comparativ cu ZnO cu dimensiunea de <100 nm, gradul de acțiune se dezvoltă în funcție de concentrație. S-a stabilit că NP ZnO în concentrații 1-20 mg/L influențează pozitiv procesele de multiplicare și biosinteză a proteinelor, carbohidraților și pigmenților carotenoizi, la tulpinile *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 și *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, acestea prezintă oportunitate de aplicare în tehnologia de cultivare a levurilor. Concentrațiile nanoparticulelor ZnO de 30-70 mg/L, induc inhibarea proceselor de biosinteză a componentelor celulare.

Rezultatele au contribuit la elaborarea unui procedeu nou de cultivare a levurilor din genul *Rhodotorula* cu utilizarea nanoparticulelor ZnO care permite stimularea conținutului de proteine, față de proba control și îmbunătățirea calității aminoacizilor. Procedeu propus este rapid, sigur și eficient.

4. EFECTELE NANOPARTICULELOR Fe_3O_4 ASUPRA TULPINII *RH. GRACILIS* CNMN-Y-30 reflectă rezultatele cercetărilor influenței nanoparticulelor Fe_3O_4 cu diferite dimensiuni și concentrații asupra modificărilor viabilității, caracterelor morfologice celulare și coloniale, conținutului de biomasă și compoziției biochimice a conținutului de proteine, carbohidrați, pigmenți carotenoizi, activitatea enzimelor antioxidante catalaza și

superoxid dismutaza la levurile din genul *Rhodotorula*. În cercetări a fost testată influența nanoparticulelor Fe₃O₄ cu dimensiunile de 10 nm, 30 nm și 50-100 nm.

Rezultatele obținute au demonstrat efectul inhibitor al nanoparticulelor Fe₃O₄ cu diferite dimensiuni care acționează la nivelul sistemelor biochimice de sinteză a componentelor celulare a levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30. Reacția de răspuns a tulpinii la introducerea nanoparticulelor se exprimă prin micșorarea în biomasa levuriană a cantităților de proteine, carbohidrați, carotenoide și activitatea enzimei catalaza. Rezultatele obținute au contribuit la elaborarea unui procedeu nou de evaluare a toxicității nanoparticulelor Fe₃O₄ cu utilizarea levurii pigmentate *Rhodotorula gracilis*, care prevede determinarea concentrațiilor ce provoacă diminuarea cu 50% a conținutului de β-caroten și activitatea enzimei antioxidante catalaza în biomasa levuriană. Procedeu elaborat poate fi utilizat la completarea testelor de estimare a nivelului nocivității și monitorizarea inofensivității nanoparticulelor.

5. REALIZAREA NANOCOMPOZITELOR CHITOSAN-ZINC ȘI CHITOSAN-FIER CU PERSPECTIVE BIOTEHNOLOGICE în cadrul capitolului sunt expuse rezultatele privind estimarea efectelor nanocompozitelor chitosan-zinc și chitosan fier, elaborate prin diferite procedee asupra viabilității, caracterelor morfologice, producției de biomasă, activității biochimice a conținutului de proteine, pigmenți carotenoizi, carbohidrați și enzimelor antioxidante catalaza și superoxid dismutaza la tulpinile de levuri pigmentate *Rh. gracilis*.

Rezultatele obținute au demonstrat că, pentru levurile *Rh. gracilis*, testele de viabilitate și producția de biomasă reflectă adecvat efectele nanocompozitelor chitosan-zinc și chitosan fier, aceștia fiind indici importanți în procesul de evaluare a acțiunii nanocompozitelor obținute prin diferite procedee. Fluctuațiile viabilității și producției de biomasă ce se produc pe parcursul perioadei de cultivare sunt determinate de volumul utilizat al nanocompozitelor. Rezultatele au contribuit la elaborarea a două procedee noi de realizare a nanocompozitelor.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI conțin esența lucrării, formulate concis în concluziile generale, reflectă rezultatele obținute și exprimă valoarea practică a lucrării în recomandările expuse.

BIBLIOGRAFIA include 361 de surse care au fost citate în teză.

Compartimentul ANEXE include copiile titlurilor de brevet de invenție, recomandările metodice, actele de implementare a rezultatelor obținute, copiile diplomelor și medaliilor obținute în cadrul expozițiilor și saloanelor internaționale de invenții.

1. NANOPARTICULE OXIZILOR METALICI: CARACTERIZARE ȘI APLICAȚII ÎN MICROBIOLOGIE (REVIUL LITERATURII)

În ultimul deceniu dezvoltarea științei și tehnologiei este caracterizată prin studii intensive privind proprietățile nanoparticulelor care sunt strâns impregnate la toate nivelurile activității umane și sunt un indicator ferm al progresului omenirii. Nanoparticulele reprezintă o clasă de materiale ultrafine cu dimensiuni situate în diapazonul de 1-100 nm (10^{-9}) [201]. Care au câștigat atenția în progresele tehnologice, datorită proprietăților fizico-chimice reglabile, cum ar fi dimensiunea, punctul de topire, conducerea electrică și termică, care pot fi manipulate și modificate pentru a obține rezultatele necesare [281].

O atenție deosebită este orientată spre utilizarea nanoparticulelor metalice care pot fi aplicate cu succes în diverse domenii cum ar fi medicină, cosmetologie, alimentație, biotehnologie e.t.c [105, 121, 281]. Însă există o serie de riscuri asociate atât producerii, cât și utilizării nanoparticulelor asupra mediului și sănătății oamenilor în egală măsură. Conform studiilor recente s-a demonstrat că nanoparticulele din cauza dimensiunilor mai mici decât cele ale celulelor și organelor celulare, sunt extrem de mobile, atât în organisme vii, cât și în mediul înconjurător, fiind capabile să pătrundă în structurile biologice, afectând funcționarea normală a acestora [81].

Organizațiile mondiale și europene iau măsuri de precauție pentru a oferi reglementări de evaluare a riscurilor nanomaterialelor. Riscurile legate de utilizarea nanoparticulelor pot fi evitate prin testarea modificărilor proprietăților morfologice, gradului de inhibare a creșterii și dezvoltării populației celulare, de modificare a activității biochimice a organismelor vii și componentelor celulare.

Ca model de studiu în biotehnologia microbiană pot fi utilizate levurile, algele și alte microorganisme. Pentru testele funcționale a măsurării gradului de inhibare sau stimulare a unui compus, care se observă prin efectul maxim 50% (curba doză/răspuns), se propune utilizarea termenilor concentrație eficientă (EC50%) sau concentrație a inhibării (IC50%) de către compus [259, 119]. De asemenea este utilizată scara toxicității L(E)C50 ce indică efectele negative care se manifestă într-o perioadă determinată după administrarea unei concentrații unice de substanță. Indicatorii cei mai utilizați pentru aprecierea toxicității sunt: concentrația letală 50 (CL50) și concentrația maximă admisibilă (CMT). Pentru compusul supus cercetării, CL50 reprezintă concentrația unei substanțe, calculată statistic, care provoacă inhibarea activității obiectului biologic cercetat cu 50%, față de martor, după expunerea pentru o perioadă definită într-un

interval de timp determinat. CMT care provoacă semne toxicologice, fără a avea efecte majore asupra supraviețuirii. Așadar, ținând cont de informațiile disponibile privind compusul, se administrează o primă concentrație, care n-ar trebui să determine decât efecte minime. După monitorizarea atentă pe durata unui timp suficient, se administrează concentrații crescătoare, până când se înregistrează efecte evidente de toxicitate [119]. Astfel, aceste teste oferă posibilitatea de a efectua un studiu complet al efectelor nanoparticulelor asupra organismului.

Cele expuse mai sus determină oportunitatea studierii caracteristicilor, proprietăților și efectelor nanoparticulelor menite să elucideze gradul de influență asupra organismelor vii, cunoștințe ce pot promova idei de valorificare eficientă a acestora.

1.1. Nanoparticulele oxizilor metalici – clasificare și proprietăți fizico-chimice

Un parametrul indispensabil în cazul în care sunt solicitate funcții specifice ale nanoparticulelor este clasificarea. Conform cercetărilor orientate în acest domeniu nanoparticule pot fi împărțite în trei categorii după materiale, dimensiune și origine [296].

Clasificarea după materiale de referință permit evidențierea a două grupuri:

1. Nanomateriale organice care includ în structura lor compuși organici în special:

- Lipide;
- Proteine;
- Carbohidrați;
- Dendrimeri;
- Lipozomi;
- Polimeri [97, 137, 200, 326].

2. Nanomateriale anorganice care includ:

- Carbon;
- Metale (Pt, Au, Ag);
- Oxizi metalici (Ti, Zn, Fe).

Clasificarea după dimensiune împart nanomaterialele în trei categorii:

Nanomateriale cu o singură dimensiune (1D) care servesc ca materie primă pentru sinteza nanoparticulelor complexe [296].

Nanomateriale cu două dimensiuni (2D) din care fac parte nanotuburile de carbon care sunt structuri tubulare aranjate în formă de foi de carbon, cu strat unic sau multiplu, cristalele dețin proprietăți electrice unice de conductori, semiconductori sau izolatori. [275]. Pot fi

generate prin diferite metode chimice și fizice care însă necesită catalizatori metalici, procesul de sinteză este unul foarte complex [275].

Nanomateriale cu trei dimensiuni (3D) din care fac parte dendrimerii, fullerenele și punctele cuantice [40, 160]. Dendrimerii sunt nanoparticule unice utilizate în construirea senzorilor biologici. Sunt molecule simetrice bine definite cu structură omogenă, monodisperse, cu nucleu tipic simetric, cu o carcasă interioară și una exterioară.

Fullerenele sunt cunoscute ca bile care au dimensiuni de aproximativ 7 Å în diametru și sunt compuși din 60 atomi de carbon. Este similară cu mingea de fotbal având 20 hexagoane și 12 pentagone și este extrem de simetrică. Există diferite tipuri de fullerene, cum ar fi dopate cu alcalii, endoedere, metalo endoedrale și exoedere.

Punctele cuantice sunt nanocristalele semiconductoare cu dimensiune de 2-10 nm, sunt formate dintr-un miez anorganic semiconductor și o soluție apoasă. Acoperirea organică este pentru a îmbunătăți proprietățile optice și pentru îmbunătățirea solubilității. Stratul apos este disponibil pentru conjugarea cu biomolecule, care pot fi modificate în funcție de biomarkeri [40, 160].

După origine nanomateriale pot fi diferențiate ca fiind naturale sau sintetice [151, 268]. Nanomateriale naturale sunt emise din surse naturale, cum ar fi vulcanii, sedimentele ghețarilor, ape, depozitele de minereuri, dar, în special din organisme vii cum ar fi microorganismele și plantele [101, 229, 245, 282, 283, 284, 287, 325]. În tabelul 1.1 sunt enumerate câteva exemple de nanomateriale care apar din surse naturale.

Tabelul 1.1. Exemple reprezentative de nanomateriale sintetizate din surse naturale

NP	Formula chimică	Originea nanoparticulelor
Aluminiu	Al ₂ O ₃	apele naturale de suprafață [325]
Sulfat de calciu	CaSO ₄	apa de mare [286]
Oxid de siliciu	SiO ₂	erupțiile vulcanice [287]
Oxid de fier	Fe ₃ O ₄	sedimentele ghețarilor [136]
Aur	Au	depozitele de minereuri [153]
Argint Aur Oxid de fier Oxid de zinc	Ag Au Fe ₃ O ₄ ZnO	<i>Nelumbo nucifera</i> (rădăcină), <i>Ribele Embelia</i> (semințe), <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Ocimum basilicum</i> , <i>Petroselinum crispum</i> (frunze și rădăcini), Lămâie (coajă), <i>Vitis vinifera</i> (coajă), <i>Cucumis sativus</i> (coajă), <i>Acalypha</i> (frunze) [229, 245, 282, 283, 284]
Trioxide de seleniu Argint Fer Aluminiu Sulfura de cadmiu	SeO ₃ Ag Fe Al Cds Sb ₂ O ₃	bacterii <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Thiobacillus</i> , <i>Serratia</i> și <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Actinobacter</i> sp., <i>Arthrobacter gangotriensis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> [99, 165, [197,198]

Nanomateriale sintetice sunt produse datorită emisiilor industriale din fabrici (emisii de aer, ape uzate, deșeuri solide), prin scurgeri în timpul transportului și prin intermediul materialelor în timpul utilizării, distrugerii sau degradării [227]. În tabelul 1.2 sunt prezentate câteva exemple de nanomateriale sintetice care apar din surse industriale.

Tabelul 1.2. Exemple de nanomateriale sintetice din sintetizate din surse industriale

NP	Formula chimică	Originea nanoparticulelor
Carbon	C	Din deșeuri de orez [227]
Oxid de titan	TiO ₂	Poluanți organici [51]
Cadmiul	Cd	Rezultatul arderii și prelucrării hainelor ce conțin Cd [51]
Argint	Ag	Arderea gunoaielor [51]

În concluzie, se poate de menționat că NP sunt foarte diverse și activitatea lor depinde în mare măsură de materiale din care sunt formate, dimensiunea particulelor și originea.

Clasificare și proprietăți fizico-chimice ale nanoparticulelor metalice

Un interes deosebit al cercetărilor științifice sunt orientate spre NP oxizilor metalici care prezintă interes datorită proprietăților optice, magnetice, termice, electrice și catalitice [226, 281, 309, 340]. Proprietățile fizice ale nanoparticulelor oxizilor metalici diferă semnificativ de cea a substanțelor convenționale, chiar dacă au aceiași compoziție chimică. Dimensiunea mică, suprafața mare de contact, cât și forma nanoparticulelor le oferă proprietăți variabile ce pot fi controlate în dependență de domeniul de aplicare. Dintre NP oxizilor metalici, a atenție deosebită este orientată spre studiu și utilizarea pe scară largă a NP ZnO și Fe₃O₄. În continuare vor fi caracterizate nanoparticulelor ZnO și Fe₃O₄ după proprietățile care au fost raportate în literatura de specialitate.

Caracteristica NP ZnO

Morfologia nanoparticulelor ZnO depinde de procesul de sinteză [263]. Acestea pot fi plate, sferice, cubice, hexagonale, trepiede și tetrapoduri [194, 267]. Așadar, nanoparticule obținute în baza metalelor sunt variate și se deosebesc după forma de organizare a cristalului (fig. 1.1). Suprafața nanoparticulelor sub formă de cub este mai mare ca a celor sferice ceea ce le conferă NP proprietăți diferite de forma convențională a substanței, cum ar fi cele catalitice și optoelectronice [253].

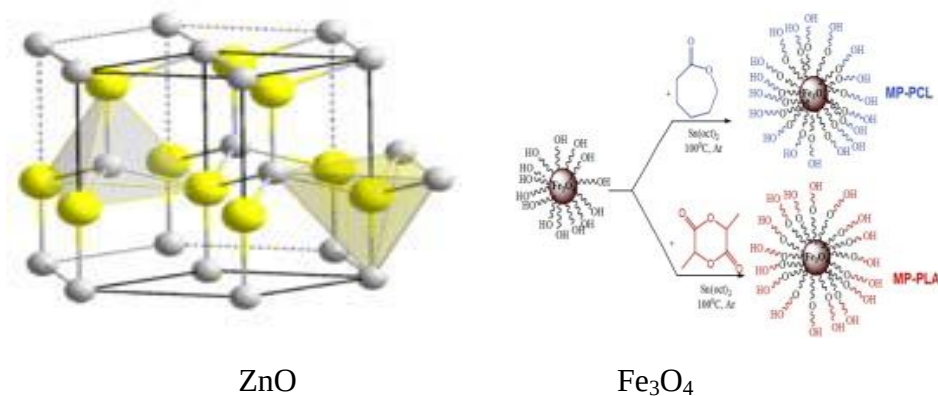


Fig. 1.1. Forma de organizare și dimensiunile nanoparticulelor ZnO (10-30 nm) și Fe₃O₄ [167]

Proprietăți mecanice: Nanoparticule ZnO au o capacitate ridicată de căldură și conductivitatea termică cu expansiune termică scăzută și temperatură ridicată de topire. Dețin un efect piezoelectric înalt, această proprietate îi face candidați perfecți pentru multe aplicații piezoelectrice, care necesită o cuplare electromecanică mare [171]. Din moment ce NP ZnO sunt utilizate pe scară largă în aplicații piezoelectrice, este foarte important să se înțeleagă bine stabilitatea mecanică și fiabilitatea. Deoarece dacă un dispozitiv piezoelectric este fabricat și acesta nu funcționează corect, atunci este greu de înțeles cauza eșecului este al NP sau alți parametrii au influențat. Astfel, un rol important revine caracterizării mecanice a parametrilor precum duritatea, rigiditatea, rezistența la curgere, constanta de rigiditate și aderența la substrat [247, 248]. De asemenea este important de subliniat că dimensiunea influențează proprietățile mecanice. Prin urmare, pentru a avea dispozitive piezoelectrice de încredere, caracterizarea proprietăților sale mecanice este un parametrul esențial [247, 248].

Proprietăți optice: NP de ZnO sunt caracterizate printr-o luminescență excelentă, datorită proprietăților care includ decalajul de bandă directă și largă, legarea excitonilor și emisia defectelor la nivel profund [50]. Proprietățile optice se bazează în mare măsură pe defectele intrinseci și extrinseci prezente în structura cristalului și este posibilă ajustarea proprietăților optice/electrice doar prin manipulare defectelor prezente [124].

Proprietăți electrice: NP de ZnO sunt foarte dificil de măsurat, însă conform datelor din literatura de specialitate se presupune că proprietățile de transport sunt puternic afectate de concentrația defectelor intrinseci. Astfel se consideră că oxigenul este responsabil pentru locurile vacante, pe când interstițiile de zinc sunt responsabile pentru comportamentul electric de tip n a unui ZnO nealiat [254].

Caracteristica NP Fe₃O₄

Morfologia nanoparticulelor Fe₃O₄ este influențată de condițiile experimentale de sinteză [62, 214, 255]. Acestea pot fi plate, sferice, cuburi, concave, tetraedre, octaedre, octapode și ramificate [331, 332, 359].

Proprietăți magnetice a NP Fe₃O₄ în configurația electronică a atomilor de fier, există patru electroni neîmpărțiți în orbitele lor "3d". Ca rezultat, comportamentele magnetice ale compușilor de fier sunt cauzate de activitatea acestor electroni itineranți ca schimb (între atomi magnetici Fe-Fe), schimb dublu (între atomii aceluiași element cu valențe diferite ca (Fe²⁺-Fe³⁺) și schimb între atomii magnetici și nonmagnetici cum ar fi (Fe-O) în benzile de energie atomică. Extinderea acestor intervale este dependentă de separarea interatomică, astfel încât lățimea benzilor este redusă puternic prin creșterea valorilor de separare [84].

Proprietăților magnetice din aceste materiale sugerează că, atunci când densitatea stărilor electronice, rămâne în intervalul determinat, numărul de electroni localizați în orbitele "3d" și de asemenea, direcția de rotire a acestora poate determina tipul și magnitudinea comportamentelor magnetice. Alți parametri care influențiază proprietățile magnetice sunt energia de schimb efectivă a electronilor 3d cuplați, energia de comutare a direcțiilor de rotire și densitatea stării [84].

Astfel, atunci când ambii parametri sunt localizați la nivelele cele mai ridicate, transferul de electroni către starea stabilă din punct de vedere magnetic este crescută [202].

Proprietățile optice ale nanoparticule Fe₃O₄ sunt foarte importante pentru proiectarea dispozitivelor electronice, generarea fotoelectrochimică a hidrogenului, a filtrelor de protecție solară etc. Nanoparticule Fe₃O₄ prezintă tranziții electronice induse termic care manifestă absorbție în regiunea vizibilă și în apropierea regiunii infraroșii [294]. Pentru Fe₃O₄, diferența directă de bandă optică determinată prin ploturile Tauc variază de la 2,0 la 2,7 eV, în timp ce energia de tranziție indirectă este de aproximativ 1,9 eV. Liniile directe de bandă raportate pentru filmele amorfe sunt de 1,73 și 1,97 eVs [109]. Diferența de bandă a Fe₃O₄ este de 2,0 eV, în timp ce nanoparticulele Fe₃O₄ prezintă un decalaj de energie de 2,47 eV datorită efectelor cuantificării cuantice [106].

Proprietățile electrice ale nanoparticulelor Fe₃O₄ preparate prin diferite metode indică că tranziția izolatoarelor metalice în filme depinde de grosimea filmului și condițiile de depunere. Estimările T_v se situează între 75 și 165 K pentru NP de Fe₃O₄ preparate prin diferite metode [236].

Proprietățile semiconductoare ale nanoparticulelor Fe₃O₄ se caracterizează în special prin faptul că lățimea benzii interzise este mică de aproximativ 2eV ceea ce îi conferă proprietăți

absorbante al spectrului vizibil și îl fac un candidat perfect pentru producerea efectului fotovoltaic și fotocatalitic [262].

Funcționalitatea și proprietățile nanoparticulelor oxizilor metalici sunt extrem de dependente de metodele de sinteză. În prezent sunt cunoscute trei metode de sinteză a nanoparticulelor fizice, chimice și biologice care sunt strict controlate în dependență de caracteristicile dorite și domeniul final de aplicare [271].

În mod tradițional nanoparticule oxizilor metalici s-au produs numai prin sinteză chimică și fizică, printre metodele de sinteză sunt enumerate:

- Co-precipitarea [132, 148, 181];
- Metoda de descompunere termică a precursorilor [62];
- Metoda hidrotermală;
- Metoda microemulsie [133, 188];
- Metoda soluție-gel [145, 248];
- Metoda sonochimică [207, 336],

Un mare dezavantaj al utilizării metodelor de sinteză chimică și fizică este gradul redus de stabilitate și toxicitatea înaltă a nanoparticulelor. Astfel, cercetările științifice s-au orientat și spre sinteza biologică cu ajutorul plantelor și microorganismelor. Care au numeroase avantajele printre care se numără lipsa toxicității, producția ecologică, reproductibilitate simplă în producție, stabilitate și morfologie bine definită [210, 233].

Sinteza biologică a nanoparticulelor oxizilor metalici poate fi împărțită în două categorii. Bioreducția, în care ionii metalici sunt reduși chimic în forme mai stabile din punct de vedere biologic. Multe organisme au capacitatea de a utiliza reducerea metalului disimilator, în care reducerea unui ion metalic este cuplată cu oxidarea unei enzime [99]. Această metodă conduce la formarea de nanoparticule metalice stabile și inerte, cu dimensiuni cuprinse între 4,09 -105 nm [243, 295].

A doua categorie este biosorbția, acesta implică legarea ionilor metalici la suprafața biosorbantului care este de origine biologică [206]. Unele plante, bacterii și fungi conțin peptide sau dețin un perete celular modificat care se leagă de ionii metalici și aceștia sunt capabili să formeze complexe stabile sub formă de nanoparticule [342].

Însă sinteza biologică a nanoparticulelor oxizilor metalici este limitată în alegere de apariția rezistenței organismelor la metale [233]. Pentru soluționarea acestei probleme în prezent este utilizată recombinarea genetică [343], care însă este complicată, imprevizibilă și necesită aparataj costisitor.

Acoperirea cu biopolimeri o altă direcție importantă care contribuie la reducerea toxicității, stabilizării și oxidării nanoparticulelor oxizilor metalici. Biopolimerii sunt polimeri produși din surse naturale, fie sintetizați chimic dintr-un material biologic, fie biosintezați în întregime de organisme vii [276, 348]. Ei pot fi clasificați după structură, degradabilitate și compoziția biochimică.

După structura lor polimerică, se împart în următoarele grupuri: poliesteri, polizaharide, policarbonați, poliamide și vinil polimeri. Pe baza degradabilității, biopolimerii pot fi împărțiți în biodegradabili și ne-biodegradabili. În funcție de compoziția biochimică se împart în: polizaharide alcătuite din monomeri de zaharuri [220], proteine compuse din aminoacizi și acizi nucleici formați din nucleotide.

Conform literaturii de specialitate, utilizarea biopolimerilor ca agenți de acoperire pentru sinteza nanoparticulelor oxizilor metalici prezintă o serie de avantaje. În primul rând nu sunt toxici, sunt stabili, interacționează ușor cu celulele vii, au sinecost redus, pot fi obținuți din resurse regenerabile cum ar fi: microorganisme, plante și animale [86]. În continuare vor fi caracterizați cei mai frecvenți utilizați biopolimeri pentru acoperirea nanoparticulelor oxizilor metalici (tab. 1.3).

Tabelul 1.3. Biopolimeri naturali utilizați pentru acoperirea nanoparticulelor oxizi metalici [142]

Biopolimeri	Sursa	NP	Domenii de Aplicare
Gelatina	Proteină obținută din piele, oase și țesuturile animalelor	ZnO [48] Fe ₃ O ₄	Ingineria țesutului osos, tratarea rănilor, livrarea de medicamente [222, 358].
Cheratina	Epiderma și anexele epidermice, cum ar fi părul, penele, unghiile la mamifere, reptile și păsări [250].	MnO ₂ [338] CuO [298]	Purtători eficienți ai medicamentelor anticanceroase care posedă un grad înalt de țintire a tumorii și eliberare controlată a medicamentului [183, 357].
Amidonul	Semințele, fructele și tuberculii plantelor	ZnO [310]	Material al hemostazei, ingineria tisulară, livrare de medicamente, repararea oaselor [196].
Celuloză	Bumbac, in, cânepa, lemn, plante	TiO ₂ [115], ZnO [156] CuO, Fe ₂ O ₃ [360]	Adjuvant farmaceutic, industria alimentară, tratarea rănilor .
Chitosan	Cochilia exterioară a crustaceelor, fungi: Absidiacoerulae [208], <i>Gongronella butleri</i> , <i>Mucorrouxii</i> (Chatterjee, 2005), <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus</i> sp KNO1 și KNO2 [209].	ZnO [325], Fe ₃ O ₄ [203], Fe ₂ O ₃ [137]	Proprietăți de coagulare a sângelui, tratamentul rănilor [179], pansament medical, hidrogel, livrare de medicamente, transfer de gene [196], efect anticancerigen , acoperirea hârtiei [313], curățarea apelor de poluanți organici [137].

În concluzie menționăm, că proprietățile nanoparticulelor ZnO și Fe₃O₄ sunt foarte diverse și țin de condițiile experimentale de sinteză, materialul, forma și dimensiunea particulelor.

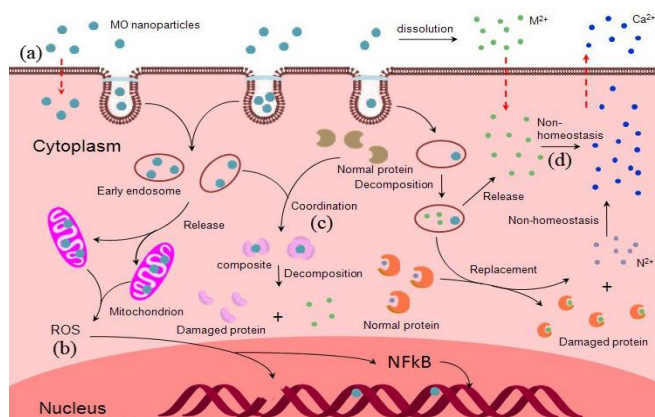
1.2. Evaluarea influenței nanoparticulelor oxizilor metalici asupra organismelor vii

Un parametru important pentru utilizarea și implimentarea nanoparticulelor este evaluarea influenței asupra organismelor vii. Factorii cheie care sunt utilizați pentru a efectua un studiu complet al efectelor nanoparticulelor sunt compoziția chimică, dimensiunea și concentrația [88, 200, 251]. Este foarte important de a înțelege acțiunea acestor factori, în mod ideal ele ar trebui să cauzeze un efect scăzut de toxicitate și să nu deterioreze semnificativ organismele și mediile lor.

Studiul compoziției chimice a nanoparticulelor este un element principal care determină proprietățile și caracteristicile acestora. Astfel, cercetările efectuate în ultimii ani au testat efectele nanoparticulelor în funcție de compoziția chimică asupra unor organisme vii [88, 200, 237, 251]. Așadar, a fost stabilit că nanoparticule ZnO în funcție de dimensiune și concentrații sunt mai eficiente comparativ cu substanțele convenționale împotriva bacteriilor *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* și *Lactobacillus* [263]. De asemenea s-a constatat că nanoparticulele ZnO sunt, în general, mai puțin toxice decât nanoparticulele de argint la aplicarea concentrațiilor de 20 -100 mg/L asupra bacteriilor [78]. S-a stabilit că moartea celulelor bacteriene este asociată cu producția de oxigen reactiv cum ar fi radicali hidroxilici, superoxizi și peroxidul de hidrogen care exercită efect negativ asupra compoziției biochimice bacteriene, cum ar fi proteine, lipide și ADN, care în cele din urmă provoacă apoptoza [349]. Compararea efectelor nanoparticulelor dioxidului de siliciu și oxidului de zinc (20 nm) pe fibroblaste de șoarece au arătat că acestea diferă în ceea ce privește mecanismele de acțiune. Nanoparticulele SiO₂ modifică structura ADN-ului în timp ce nanoparticulele ZnO provoacă stres oxidativ în celulă [339]. Efecte similare au fost obținute și în cazul studiilor prezentate de către Ya-Nan Chang [88] în care mecanismul de influență a nanoparticulelor CuO și ZnO asupra celulei microbiene, este complex și induce modificări semnificative atât în membrana celulară cât și în citoplasmă efectele sunt prezentate în fig. 1.2.

Cea mai comună cauză a efectului toxic al nanoparticulelor care interacționează cu celulele este scurgerea ionilor metalici. Toxicitatea depinde, de asemenea, de compoziția nucleului nanoparticulelor. Unii ioni de metal, cum ar fi Ag și Cd, sunt de fapt toxici și, prin urmare, provoacă leziuni ale celulelor. Alți ioni de metale, cum ar fi Fe și Zn, sunt utili din punct

de vedere biologic, dar, la concentrații ridicate, pot afecta căile celulare și, prin urmare, pot provoca toxicitate ridicată [289].



Legendă: (a) mecanisme potențiale de intrare a CuO și ZnO NP în celule; (b) efectul ROS intracelular a CuO și ZnO NP; (c) efectul de coordonare a Cu₂⁺ și Zn₂⁺ eliberat din NP în celulă; (d) efectul non-homeostaziei perturbate de Cu₂⁺ și Zn₂⁺

Fig. 1.2. Prezentarea schematică a diferitor căi de inducere a toxicității celulare de nanoparticulele CuO și ZnO [88]

De asemenea rezultatele studiilor au furnizat informații noi privind efectul stimulator a acțiunii nanoparticulelor în dependență de compoziția chimică asupra proceselor biosintetice, în acest sens s-a acumulat un material științific variat [200, 251]. Astfel, identificarea caracterului de acțiune a nanoparticule de fier asupra viabilității streptomicetelor a evidențiat că sensibilitatea tulpinilor variază în funcție de forma chimică a NP și de particularitățile individuale ale fiecărei tulpini în cele mai multe cazuri, atât NP Fe₃O₄ cât și fierul zero valent au înregistrat un efect stimulator [237]. Datele asupra compoziției biochimice au confirmat efectul pozitiv al NP Fe₃O₄ și ZnO asupra sintezei carbohidraților, conținutului de pigmenților carotenoizi și activarea enzimelor legată de biosinteza proteinelor la plante [200, 251]. Studiile prezentate de Yasmeen au demonstrat o creșterea conținutului de proteine în celulele semințelor de grâu expuse nanoparticulelor de fier și de cupru [341].

Astfel, s-a demonstrat că efectul nanoparticulelor ZnO și Fe₃O₄ depind în mare măsură atât de compoziția chimică cât și de obiectul biologic cercetat. Cele expuse mai sus determină importanța cercetărilor privind influența compoziției chimice a nanoparticulelor asupra mecanismului de acțiune în cadrul celulelor organismelor vii din diferite grupuri taxonomice.

Este bine cunoscut faptul că majoritatea proprietăților noi ale nanoparticulelor sunt legate de dimensiunea lor. Cercetările efectuate în ultimii ani au arătat că nanoparticule prezintă o

toxicitate mai mare comparativ cu substanțele convenționale dimensiunea este unul dintre factorii cheie care influențează efectul toxic [158, 333]. De exemplu, mărimea descrescătoare duce la creșterea suprafeței specifice, care conduce la creșterea reactivității și îmbunătățirea interacțiunilor dintre nanoparticule și biomolecule [350]. De asemenea dimensiunea mică conduce la o fagocitare slabă de macrofage astfel nanoparticule fiind slab purificate in vivo induc citotoxicitate [259]. Cercetarea prezentată de către Xie și colaboratorii a demonstrat că dimensiunea NP Fe_3O_4 influențează citotoxicitatea celulelor hepatomului. Astfel, NP Fe_3O_4 cu dimensiunea de 6 nm au prezentat citotoxicitate neglijabilă pe când cele cu dimensiunea de 9 nm au afectat disfuncția mitocondrială celulară și au indus necroza prin generarea de specii reactive de oxigen, iar NP Fe_3O_4 cu dimensiunea de 14 nm au afectat integritatea membranei plasmatică și au promovat scurgerea masivă a lactat dehidrogenazei [331]. Expunerea plantelor de tutun la acțiunea NP Fe_3O_4 cu dimensiunea de 5 nm în concentrații de 30 mg/L au exercitat efecte toxice asupra înălțimii și lungimii rădăcinii [57]. Pe când suplimentarea mediului cu NP Fe_3O_4 cu dimensiuni de 33-40 nm, în concentrații de la 20 la 150 $\mu\text{g/ml}$, posedă activitate antibacteriană puternică împotriva bacteriilor gram-pozitive și gram negative [239]. Rezultate similare au fost obținute și în cazul analizei altor tipuri de NP a oxizilor metalici conform studiului prezentat de către Hund-Rinke acțiunea nanoparticulelor TiO_2 cu dimensiunile de 25 nm și 100 nm acționează diferit asupra algei verzi *Desmodesmus subspicatus*. S-a demonstrat că nanoparticule cu dimensiunea de 25 nm au inhibat creșterea într-un grad mai mare decât nanoparticule cu dimensiunea de 100 nm [158]. De asemenea conform studiului influenței nanoparticulelor TiO_2 asupra probelor de sânge uman nanoparticule cu dimensiunea de 25 nm au provocat daune mai mari asupra celulelor prin activarea trombocitelor și granulocitelor care au condus la inflamarea și hemoliză [354].

Sunt expuse și rezultatele privind efectul pozitiv al nanoparticulelor oxizilor metalici asupra celulei din care concluzionăm că acestea, în dependență de dimensiune pot stimula creșterea compontelor biochimice în cadrul celulelor microorganismelor și plantelor. Astfel, tratamentul tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 cu nanoparticule ZnO cu dimensiunile 30 nm au evidențiat capacitatea de a stimula sinteza carbohidraților, β -glucanilor și proteinelor efecte care nu au fost înregistrate la aplicarea NP ZnO cu dimensiuni de 10 nm [29]. NP ZnO datorită dimensiunilor mici dețin și importante proprietăți antifungice împotriva agenților patogeni paraziți *Aspergillus flavus* și *Aspergillus niger* la plante [242]. Însă pentru elucidarea mecanismelor de acțiune a NP oxizilor metalici în dependență de dimensiune și evaluarea beneficiilor asupra organismelor vii sunt necesare studii detaliate suplimentare.

Un alt factor important care determină influența nanoparticulelor oxizilor metalici asupra modelelor biologice este concentrația. În lucrările mai multor autori sunt expuse rezultatele efectelor diferitor nanoparticule asupra celulei microbiene din care concluzionăm că influența depinde de concentrația utilizată [276, 331]. Studiile recente privind influența NP ZnO au demonstrat că au capacitatea de a induce formarea speciilor reactive de oxigen, care pot duce la moartea celulelor atunci când capacitatea antioxidantă a celulei este depășită [252, 328]. De asemenea, s-a dovedit că induc formarea radicalilor liberi la grâu, rezultând în creșterea malondialdehidei și reducerea de glutathion peroxidaza și conținutului de clorofilă [56]. Concentrațiile de 50 $\mu\text{g/ml}$ provoacă deteriorarea membranelor la celule pulmonare umane, acest efect a fost asociat cu eliberarea lactat dehidrogenazei, ceea ce indică faptul că expunerea la NP ZnO în concentrații 50 $\mu\text{g/ml}$ poate provoca moartea celulelor [91]. NP CeO₂ și ZnO aplicate în concentrații de 0.05–0.5 $\text{g kg}^{-1}/\text{sol}$ conduc la formarea speciilor reactive de oxigen și peroxidarea lipidică la plantele de soia [231]. Studiu prezentat de către Heinlaan a demonstrat impactul negativ a NP ZnO pentru microorganisme, de exemplu, la aplicarea concentrației de 10 mg/L inhibă activitatea cu peste 90% a culturii *B.Subtilis* [143].

Tulpinile de levuri *S. cerevisiae* înregistrează un prag ridicat de toxicitate la aplicarea nanoparticulelor ZnO care poate atinge 1000 mg/L , acest efect se explică prin prezența vacuolelor în celule levuriene, care asigură acumularea ionilor excesivi de ZnO fără a dăuna celulei [278]. Suplimentarea mediului în limitele concentrațiilor 50-300 mg/L asupra algei *C. vulgaris* au produs o scădere semnificativă a celulelor viabile și modificări morfologice semnificative [290]. Efect similar a fost înregistrat și asupra algei *H. pluvialis* la aplicarea concentrațiilor 10-200 pg/ml timp de 72 de ore care reduce semnificativ viabilitatea celulară, conținutul de biomasă și pigmenți fotosintetici [285].

Rezultatele studiilor obținute până în prezent au indicat atât impactul negativ, cât și cel pozitiv al nanoparticulelor metalice privind dezvoltarea microorganismelor și plantelor [182, 231]. Concentrațiile de 0-4 mg/L a nanoparticulelor Fe₃O₄ au un efect pozitiv asupra germinării semințelor, creșterii, clorofilei și expresiei miRNA la răsadurile cultivate în hidroponică [230]. Datele sunt în concordanță cu rezultatele influenței NP Fe₃O₄ în concentrații de 50 până la 200 mg/g în sol care au stimulat biomasă de salată la *Lactuca sativa L.* [361]. Mai mult, NP Fe₃O₄ au avut o influență pozitivă asupra alungirii rădăcinilor de soia [140]. În schimb, răsadurile de tomate tratate cu 50-500 mg/L NP Fe₃O₄ au arătat modificări ale caracterelor morfologice și au redus creșterea [128]. De asemenea aplicarea NP Fe₃O₄ în concentrația de 25 mg/kg a stimulat la maxim lungimea medie și totală a plantelor de mazărice cu 63,4% și respectiv, cu 52,0% față de martor+trifluralină [22]. Nanoparticule Fe₃O₄ (70 nm) în concentrații de 5 și 10 mg/L au

prezentat efect stimulator semnificativ asupra biosintezei lipazelor exocelulare la tulpina *Rhizopus arrhizus* CNMN-FD-03 care depășește de 3 ori nivelul probei control fiind de 95576-101068 u/ml comparativ cu 30000 u/ml în varianta control [39].

Tratamentul boabelor cu NP ZnO în concentrație de 10 mg/L au determinat o creștere semnificativă a conținutului de clorofilă cu 276,2%, proteine totale 27,1%, fosfatază acidă 73,5%, fosfatază alcalină 48,7% comparativ cu proba control [246]. Aplicarea NP de sulf și de oxid de zinc în diferite concentrații de 500-4,000 ppm conduc la creșterea semnificativă a conținutului de lipide, proteine, aminoacizi, și clorofilă pentru ambele nanoparticule, comparativ cu controlul netratat [357].

În ceea ce privește efectul nanoparticulelor ZnO asupra activității enzimatică datele din literatură indică că aplicarea concentrațiilor ridicate contribuie la activarea enzimei carboxi peptidaza și alcool dehidrogenaza care ajută la digestia carbohidraților și alcoolului. De asemenea aplicarea NP ZnO în concentrații de 200 mg/L și 300 mg/L au crescut semnificativ activitatea antioxidantă a superoxid dismutazei la alga *C. vulgaris* [290].

Pentru a îmbunătăți biocompatibilitatea nanoparticulelor ZnO și Fe₃O₄ și pentru a evita efectele toxice o soluție ar fi acoperirea cu polimeri naturali cum ar fi chitosanul. Conform datelor din literatură această metodă poate preveni oxidarea și aglomerarea NP, de asemenea poate îmbunătăți proprietățile fizico-chimice și funcționalitatea [291].

Acoperirea NP ZnO cu chitosan oferă activitate antimicrobiană, îmbunătățește proprietățile termice, rezistența mecanică și stabilizează [118, 314]. Astfel, studiul activității antimicrobiene a demonstrat o reducere a viabilității pentru bacteriile Gram-pozitive (*S. aureus*, *B. Subtilis*, *C. Albicans*) și Gram-negative (*E. coli*, *A. Niger*) [139, 213]. Activitatea antimicrobiană a nanocompozitelor chitosan ZnO este atribuit grupărilor amino încărcate pozitiv, care interacționează cu membranele microbiene încărcate negativ, care induce modificări ale permeabilității membranei celulare, scurgerii materialului intracelular și determină moartea microorganismelor [101]. De asemenea chitosanul are capacitatea de a interacționa cu fluxul de nutrienți esențiali din celulă, afectând metabolismul acestora [223].

Efect similar au fost înregistrate și în cazul nanocompozitelor chitosan-Fe₃O₄ care înregistrează activitate antimicrobiană mai mare comparativ cu NP Fe₃O₄. Astfel, aplicarea nanocompozitelor chitosan-Fe₃O₄ în concentrații de 50 μM au demonstrat inhibarea semnificativă a viabilității cu 70% la celule bacteriene *B. subtilis* și *E. coli* comparativ cu 30% la cultivarea în prezența NP Fe₃O₄ [58]. De asemenea nanocompozitele chitosan fier aplicate în concentrații de 20 mg/L prezintă proprietăți de îndepărtare și distrugerea oxidativă a doxiciclinei din mediu apos și poate servi ca adsorbant promițător pentru aplicații practice [73].

Studiul influenței NP chitosan-Fe₃O₄ cu dimensiunea de 5-10 nm au arătat că stimulează activitatea enzimei glutathion peroxidaza la șobolani reducând efectele toxice. Rezultatele indică că NP Fe₃O₄ acoperite cu chitosan dețin o activitate antioxidantă mai mare decât chitosanul care se manifestă prin creșterea enzimelor SOD, GPX și CAT [176].

Mecanismul de acțiune a nanoparticulelor oxizilor metalici

Astfel, conform datelor prezentate mecanismul toxicologic de acțiune a nanoparticulelor asupra organismelor biologice poate fi de origine fizică, chimică sau biologică. Mecanismele fizice de acțiune toxicologică depind de dimensiunile particulelor și proprietățile suprafeței, care conduc la perturbarea activității membranei [211], agregarea proteinelor [89], pliarea proteinelor, modificarea proceselor de transport [146].

Mecanismele chimice nanotoxicologice se caracterizează prin producția de oxigen reactiv [215, 328, 249] care se manifestă prin dizolvarea și eliberarea ionilor toxici [327], perturbarea activității de transport a membranei celulare electron/ion [234], deteriorarea oxidativă [96], distrugerea proteinelor, peroxidarea lipidelor [311, 312]. Producția oxigenului reactiv fiind principala cauză care poate provoca multiple leziuni și inițiază apoptoza celulară [349].

Mecanismele chimice și fizice de acțiune nanotoxicologică asupra celulelor inițiază mecanismul biologic care se manifestă prin răspuns celular de perturbare a fagocitozei, în care celula nu reușește să absoarbă particule datorită formei sau dimensiunilor [49]. Se cunoaște că unele componente intracelulare sunt mai sensibile și mai vulnerabile la acțiunea nanoparticulelor [300].

Stabilitatea membranei poate fi afectată de nanoparticulele fie direct prin acțiune fizică sau indirect prin cele de oxidare, care pot conduce la moarte celulară. Influența asupra membranelor celulare depinde de proprietățile și dimensiunile nanoparticulelor [116]. Conform literaturii de specialitate s-a stabilit că nanoparticule pot deteriora membranele prin diferite procese care contribuie la modificarea integrității celulare, stabilității și poate conduce la formarea găurilor în membrane [238]. Conform analizei genetice este evident că deteriorarea membranei de nanoparticule depinde de proprietățile și concentrația utilizată [130]. Nanoparticule fiind predominant responsabile pentru schimbările morfologice și stabilitatea membranei. În dependență de formă și dimensiune nanoparticule pot afecta și procesul de fagocitoză [49]. Membrana nucleară utilizează porii nucleari pentru transportul substanțelor în interiorul și din nucleu, însă unele particule de dimensiuni mici pot să fie difuzate prin acești pori [234].

Așadar, complexitatea metabolică a microorganismelor complică analiza și identificarea caracterului interacțiunii nanoparticule-celule. Compoziția chimică, dimensiunea și concentrațiile nanoparticulelor condiționează amploarea și specificitatea gradului de acțiune asupra caracterelor morfologice, fiziologice și biochimice ale microorganismelor. Astfel, aceste rezultate explică importanța necesității cercetării modului în care celulele din diferite grupuri taxonomice interacționează cu nanoparticule pentru evaluarea riscului și evitarea consecințelor grave asupra ecosistemului. De asemenea prezintă interes pentru elaborarea procedeele eficiente de producere a noi bioproduse destinate diferitor ramuri ale economiei naționale pentru dezvoltarea biotehnologiilor microbiene.

1.3. Perspective de utilizare a nanoparticulelor oxizilor metalici

Nanoparticule Fe_3O_4 și ZnO prezintă interes, pentru cercetările fundamentale cât și pentru cele aplicative, datorită proprietăților pe care le au și anume biocompatibilitate, stabilitate, proprietățile magnetice și prepararea simplă [74, 281]. Astfel, ele devin atractive pentru aplicații în diferite domenii precum biomedicină, alimentație, industrie, cosmetologie, farmaceutică, protecția mediului, biotehnologie. În continuare vor fi remarcate principalele aplicații ale nanoparticulelor Fe_3O_4 și ZnO care au fost raportate în literatura de specialitate.

Aplicații biomedicale

Publicațiile ce descriu utilizarea nanoparticulelor oxizilor metalici în biomedicină se întâlnesc într-un număr mare. Datorită proprietăților multifuncționale nanoparticulele pot fi aplicate cu succes în diagnostic, terapia medicamentoasă în calitate de biosenzori nanoelectronici și în nanotehnologia moleculară [77, 105, 318, 334].

Nanoparticule Fe_3O_4 joacă un rol crucial în diagnostic, pot fi utilizate ca agenți de contrast în imagistică prin rezonanța magnetică, în emisia de pozitroni în tomografie, fluorescență în infraroșu [52, 168, 330] și ca biosenzori pentru detectarea biomoleculelor cum ar fi glucoza, proteinele, ureea și acidul uric [345]. Un potențial de implementare vast al nanoparticulelor Fe_3O_4 este orientat și spre terapie, variind de la tratamentul cancerului, în calitate de agenți antibacterieni, biosenzori, în repararea țesuturilor și proliferarea celulelor [114, 159, 213, 236, 308]. De asemenea, conform evoluției cercetărilor recente în domeniul nanotehnologiei NP Fe_3O_4 au fost orientate spre construirea de nanoenzime care prezintă oxidază biologică, peroxidază, catalază și activități asemănătoare superoxid dismutazei [224, 272]. Nanozimele sunt nanomateriale cu proprietăți intrinseci proprietăți asemănătoare enzimelor biologice, care oferă mai multe avantaje față de enzimele naturale, cum ar fi stabilitatea ridicată condițiile de pH și eficiența costurilor [272].

O aplicabilitate înaltă în biomedicină o au și nanoparticulele ZnO care prezintă potențial înalt în tratamentul cancerului, diabetului zaharat, vindecarea rănilor, eliberarea de medicamente și în bio imagistică [174, 197]. Datorită toxicității inerente a NP ZnO, au un efect puternic împotriva a celulelor canceroase și a bacteriilor, prin inducerea generării ROS intracelulară și activarea semnalului apoptotic, ceea ce le face un potențial candidat ca agenți anticancer și antibacterieni. În plus, NP ZnO au fost, de asemenea, bine cunoscute pentru transportul de medicamente terapeutice sau biomolecule. Mai mult, au capacitatea de a scădea glucoza în sânge și crește nivelul de insulină, arătând un potențial promițător în tratarea diabetului și atenuarea complicațiile sale [338].

Aplicații în alimentație

Un alt sector important în care nanoparticule Fe₃O₄ și ZnO se aplică cu succes îl reprezintă industria alimentară. Nanoparticule Fe₃O₄ au capacitatea de a îmbunătăți calitatea produselor alimentare, de a crește termenul de valabilitate fiind eficiente în conservarea alimentelor, posedă activitate antimicrobiană, sunt efective ca material de ambalare oferind rezistență la gaze, vapori de apă și dețin capacitatea de a îmbunătăți rezistența mecanică a biopolimerilor [55, 260, 266].

Nanoparticulele ZnO pot fi de asemenea utilizate la ambalarea produselor alimentare ca agenți antimicrobieni pentru a preveni contaminarea alimentelor, a prelungi termenul de valabilitate, a îmbunătăți calitatea produselor alimentare sau ca absorbanti de lumină UV pentru a proteja alimentele sensibile de expunerea la lumină UV [63]. Conform autorității siguranței alimentare europene (EFSA) privind materialele care intră în contact cu alimentele, enzimele, aromele și auxiliarele de procesare, oxidul de zinc nu migrează în nanoformă și, prin urmare, evaluarea siguranței este concentrată pe migrarea zincului ionic solubil. Deși zincul este un element esențial pentru activitatea fiziologică a omului, în 2003 s-a stabilit pentru zinc un nivel negativ de 50 mg/ persoană pe zi și a fost recomandată o limită superioară de 25 mg/persoană pe zi [63].

Cercetările prezentate de Mizielinska și colab. argumentează impactul pozitiv al NP ZnO asupra texturii fileurilor de cod care contribuie la reducerea pierderii de apă și aderenței probelor de pește [199]. Li și colab. au constatat că utilizarea NP ZnO la ambalarea merelor proaspete tăiate au oferit menținerea fermității, culorii, calității senzoriale și conținutul fenolic total [184].

Astfel, grație utilizării nanoparticulelor, până în prezent au fost îmbunătățite proprietățile organoleptice a mai multor alimente cum ar fi dulciurile în special bomboanele, gumele de

mestecat, uleiurile, aromatizatorii [321]. Implicarea nanomaterialelor în industria și tehnologia alimentară poate satisface cererea populației în alimente cu calități superioare.

Aplicații industriale

Nanoparticule oxizilor metalici Fe_3O_4 și ZnO prezintă interes și la scară industrială, un domeniu foarte actual care necesită noi surse accesibile, ieftine și cu efect. Nanoparticule Fe_3O_4 pot fi utilizate ca catalizator de tip Feton pentru degradarea poluanților organici [264]. Datorită proprietăților feromagnetice și anti-feromagnetice pot fi utilizate în dispozitivele de înregistrare, îmbunătățind capacitatea și calitatea de înregistrare a dispozitivelor [185]. Prezintă interes și pentru aplicații industriale ca senzori de gaze, vopsele, conductoare, baterii reîncărcabile, obținerea stirenului, sinteza Fischer-Tropsch a hidrocarburilor, oxidarea alcoolilor și producerea la scară largă a butadienei [121].

Nanoparticule de ZnO pot fi utilizate în industria cosmetică ca component în loțiuni de protecție solară, pudre de față, paste de dinți etc. În loțiunile de protecție solară sunt utilizate datorită capacităților de blocare și absorbție a razelor UV, UVA și UVB, de asemenea datorită naturii sale transparente care nu lasă nici o nuanță pe pielea în timp ce se aplică [63, 191]. Datorită proprietăților optice și biochimice sunt utilizate în industria farmaceutică pentru fabricarea de unguente, paste de zinc, benzi adezive și bandaje pentru piele și tratamentul rănilor [179]. Cercetările au arătat că NP ZnO cu dimensiunile situate între 20 nm și 45 nm pot spori activitatea antibacteriană a ciprofloxacinii împotriva *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli* [60]. În industria textilă NP ZnO sunt utilizate ca component antibacterian și blocarea razelor UV, datorită proprietăților dezodorizante și antibacteriene sunt adăugate în materiale inclusiv țesăturile de bumbac [63, 115]. În industria electronică sunt utilizate în fabricarea bateriilor solare, emițătoarelor, diodelor foto, tranzitori, convertoarele piezo-electrice și senzori [163, 323].

Aplicații în protecția mediului

Un domeniu recent în care nanoparticulele oxizilor metalici și au găsit aplicabilitatea este protecția mediului. Tehnologiile bazate pe utilizarea nanoparticulelor au apărut ca alternative promițătoare la tehnicile actuale utilizate înregistrând o eficiență ridicată și sinecost redus.

Un interes deosebit este orientat spre utilizarea nanoparticulelor Fe_3O_4 care pot fi aplicate cu succes la tratarea apei contaminate și înlăturarea poluanților organici care continuă să fie probleme majore de mediu la nivel mondial. Dimensiunile mici oferă NP Fe_3O_4 proprietăți superparamagnetice care pot fi utilizate direct ca nanoadsorbenți sau ca componentă principală a

structurilor core-shell, unde NP funcționează ca separare magnetică și carcasa oferind funcționalitatea dorită pentru adsorbția poluanților [137, 262, 337].

O altă strategie este încorporarea NP Fe_3O_4 în materiale multifazice sau nanocompozite cum ar fi biopolimerii naturali [47]. Fiind un procedeu avantajos care nu generează deșeuri secundare sau dăunătoare și permite reutilizarea lor în remedierea mediului [154, 294]. Experiențele efectuate de către Patel și colab., au demonstrat că NP Fe_3O_4 acoperite cu chitosan și neacoperite au confirmat efect pozitiv la imobilizarea enzimei lacaza. S-a constatat că eficiența de imobilizare a lacazelor este de 100% la NP Fe_3O_4 acoperite și neacoperite cu chitosan și de 63% și respectiv, 82%, după cel de al zecelea ciclu de utilizare. Astfel rezultatele prezente au demonstrat aplicabilitatea acestor sisteme în industrie și reutilizarea lor în reciclarea deșeurilor [235]. Utilizarea NP Fe_3O_4 încorporate în chitosan pot reduce detergenții, produsele de îngrijire personală și farmaceutice din sol și apele contaminate [78, 157, 249].

Nanoparticulele ZnO pot fi utilizate pentru protecția mediului datorită eficienței, stabilității ridicate, selectivității și sinecostului redus [90]. Proprietățile semiconductoare a ZnO sunt un reprezentativ de tip n, cu un interval mare de bandă de 3,37 eV și o energie de legare la excitație de 60 meV [154] care produce perechi electron-gaură în lumina UV sau iradiere cu razele de lumină. Electronul și gaura pot interacționa cu O_2 adsorbit pe suprafața fotocatalizatorului și H_2O pentru a genera O_2 și respectiv OH, ceea ce poate conduce la reducerea și oxidarea poluanților organici, inclusiv coloranților (roșu Congo, Azo, Orange II) și acetaldehidele diferite, care sunt utilizate industrial și sunt eliberate în atmosferă [171, 315].

Aplicații în biotehnologie

Nanoparticulele oxizilor metalici sunt atractivi și pentru aplicațiile în biotehnologia microbiană. Conform studiilor recente nanoparticule pot îmbunătăți și spori calitatea produselor bioactive sintetizate de microorganisme. Mărimea particulelor utilizate în domeniul biotehnologiei variază între 5 și 100 nm. Astel, nanoionizarea acestor particule permite interacțiuni diferite cu biomoleculele pe suprafețele celulare și în interiorul celulelor [5, 201].

Nanoparticulele metalice pot exercita efecte stimulatorii, dar și inhibitorii asupra microorganismelor. În lucrările mai multor autori sunt expuse rezultatele efectelor nanoparticulelor Fe_3O_4 și ZnO asupra celulei microbiene din care concluzionăm că influența depinde de tipul, dimensiunea, compoziție și concentrație [59, 118, 241]. Despre efectele de stimulare a componentelor biochimice comunică și publicațiile autorului Kiran, care menționează că utilizarea nanoparticulelor Fe_3O_4 în concentrație de 10 mg/L sporește cu 80% producția glicolipidelor biosurfactante la cultura marină *Nocardiosis* MSA13A. Administrarea

NP ZnO în concentrație de 0,6 mM în mediu celulelor *E. coli* cultivate pe parcursul a 24 ore, au relevat creșterea activității enzimatică a β -glucozidazei [288]. Nanomaterialele ZnO pot juca un rol esențial în îmbunătățirea stabilității termice și a pH-ului enzimelor celulozelor [231]. Proprietățile importante ca raportului mare suprafață/ volum, eficiența catalitică și capacitatea de adsorbție pot îmbunătăți stabilitatea termică și alcalină a enzimelor celulozei [53, 324]. În plus, suprafața de contact a nanomaterialelor pot contribui ca matrice pentru imobilizarea enzimelor. Atașarea NP ZnO pe mai multe puncte a moleculelor enzimei poate reduce sinteza proteinei, ceea ce duce la îmbunătățirea stabilității enzimatică. Aplicarea NP ZnO în concentrații de 0,05% au îmbunătățit semnificativ conținutul de prolină, carbohidrați și activitățile enzimelor antioxidante peroxidaza și polifenol oxidaza la plantele *Moringa peregrina* în condiții de stres [120].

Conform celor expuse mai sus o importanță deosebită revine cercetării influenței nanoparticulelor oxizilor metalici asupra microorganismelor și de asemenea, utilizarea lor în biotehnologie în vederea obținerii bioproduselor cu calități valoroase.

1.4. Oportunitatea studierii levurilor din genul *Rhodotorula*

Proprietățile și diversitatea domeniilor de utilizare a nanoparticulelor oxizilor metalici, evidențiază necesitatea studierii acestor compuși, pentru evaluarea riscurilor și utilizarea în siguranță. Influența nanoparticulelor și interacțiunea acestora cu sistemele biologice este încă neclară. Astfel expunerea directă la acțiunea nanoparticulelor conduc la necesitatea urgentă de a înțelege influența și a evalua riscurile utilizării. Prin urmare, efectele adverse ale nanoparticulelor trebuie în mod evident să fie evaluate pe diferite organisme celulare [76, 147].

Ca model biologic atrăgător pentru studierea influenței nanoparticulelor asupra mecanismelor moleculare și celulare pot servi tulpinile de levuri *Rh. gracilis*. Utilizarea levurilor ca obiecte de studiu dispune de un număr mare de avantaje, dintre care menționăm dimensiunile reduse cu o suprafață mare de contact cu mediul, viteza sporită de creștere și reproducere, care permite a urmări într-o perioadă de timp scurtă influența unor substanțe pe mai multe generații oferind posibilitatea de a analiza efectul factorilor de studiu asupra proprietăților morfologice, fiziologice, biochimice și genetice etc. Astfel, cercetările asupra levurilor sunt importante pentru evaluarea răspunsurilor celulare la acțiunea nanoparticulelor dar și pentru aplicațiile lor practice în biotehnologie [4].

Revizuirea taxonomică a levurilor pigmentate din genul *Rhodotorula* sunt clasificate ca organisme celulare, Eucariote, regnul Fungi, subregnul Dikarya, încrengătura Basidiomycota, subîncrengătura Pucciniomycotina, clasa Microbotryomycetes, ordinul Sporidiobolales, familia

Sporidiobolaceae, genul *Rhodotorula* [144, 212, 258]. În publicațiile recente, sinonimul speciei *Rhodotorula*, conform taxonomiei, este utilizată denumirea științifică *Rhodosporidium*. Însă numele *Rhodotorula* este mai vechi decât *Rhodosporidium* și are o prioritate taxonomică față de cel din urmă [320].

Morfologia coloniilor levurilor din genul *Rhodotorula* sunt descrise ca fiind netede umede și uneori mucoide. Speciile sunt nutrițional nepretențioase, cresc pe mai multe medii și sunt caracterizate printr-o rată de creștere rapidă. Ele apar ca celule sferoidale, ovale sau alungite, uneori formează capsulă [44]. Reproducerea are loc prin înmugurire multilaterală sau polară. Bastoconidia nu se formează, iar unele tulpini sunt capabile de a sintetiza pigmenți carotenoizi roșii sau galbeni [277].

Din caracterele fiziologice a levurilor din genul *Rhodotorula* menționăm că tipul respirației este aerob facultativ. La limita de separare dintre suprafața mediului lichid și peretele vasului formează un inel. Este o cultură mezofilă, regimul termic optim de dezvoltare este cuprins între +25- 27°C. Cele mai multe, dar nu toate, speciile nu au capacitatea de asimilare a inozitolului, iar atunci când inozitolul este utilizat, D-glucoza nu este asimilată. Substanțele asemănătoare amidonului nu sunt sintetizate de niciuna dintre specii și lipsește capacitatea fermentativă [23, 277].

Compoziția biochimică a levurilor din genul *Rhodotorula* prezintă interes pentru biotehnologie datorită biosintezei unui conținut echilibrat de carotenoide, carbohidrați, lipide proteine și enzime antioxidante [95].

Carotenoizii sunt un grup omniprezent de pigmenți izoprenoizi, formați din 40 atomi de carbon derivați prin biosinteza a două generații de geranil-transferaza pirofosfat și reprezintă solvenți solubili nepolari [129]. Datorită structurii pigmenții carotenoizi acționează ca antioxidanți care protejează membrana, captează radicalii O₂ și peroxil, capacitatea lor antioxidantă este aparent atribuită structurii lor. Pigmenții carotenoizi apar în sistemele fotosintetice ale plantelor superioare, algelor, levurilor și bacteriilor fototrofe. Pe de altă parte, în organismele non-fotosintetice, carotenoizii sunt importanți în protejarea împotriva daunelor foto-oxidative. Astfel, multe microorganisme se bazează pe carotenoide pentru protecție atunci când cresc în condiții nocive [195]. De asemenea pigmenții carotenoizi sunt coloranți naturali, de culoare galbenă până la roșie, astfel încât au o mare influență asupra acceptabilității multor alimente. Mai mult, unii carotenoizi sunt precursori ai vitaminei A, din punct de vedere al sănătății umane, acestea se numără printre factorii biochimici creditați, care reduc riscurile pentru bolile degenerative, cum ar fi cancerul, bolile cardiovasculare, degenerescența maculară și cataracta [82, 192].

În cazul producției și comercializării pigmentilor carotenoizi obținuți din plante, există unele probleme în ceea ce privește variabilitatea sezonieră și geografică, care nu poate fi controlată. Iar obținerea carotenoizilor prin sinteza chimică generează deșeuri periculoase care pot afecta mediul înconjurător și pot iniția unele afecțiuni alergice sau de altă natură care pot afecta organismul uman și animal. Spre deosebire de metodele tradiționale avantajele producției microbiene includ capacitatea microorganismelor de a utiliza o mare varietate de substraturi cu costuri reduse, un control mai bun al procesului de cultivare și timpul minim de producție. O atenție deosebită este orientată spre utilizarea levurilor care sunt mai convenabile decât mucegaiurile sau algele pentru producția pe scară industrială. Avantajul utilizării levurilor în producția de carotenoizi constă în primul rând în adaptabilitatea rapidă, datorită naturii lor unicelulare cresc ușor, au o productivitate înaltă, mediile de cultură și condițiile de cultivare pentru optimizarea biosintezei pot fi dirijate, sunt rezistente la microflora străină, nu poluează aerul cu spori și pot fi utilizate medii nutritive care au un cost redus de producție [192, 204, 221].

În conformitate cu opiniile diferitor cercetători, levurile din genul *Rhodotorula* dețin un potențial înalt de producere a pigmentilor carotenoizi care variază în limitele 40-60% substanța uscată [33]. Peste 90% din carotenoidele produse de *Rh. gracilis* sunt compuse din β -caroten, torularhodină și torulenă [186].

Ponderea relativă a celor trei pigmenți carotenoizi majori din totalul carotenoidelor este foarte variabilă și depinde de diferențele dintre tulpinile din aceeași specie și este puternic influențată de condițiile de cultivare [123]. Sa arătat că cultivarea dirijată prin inducerea stresului osmotic și reducerea temperaturii intensifică biosinteza β -carotenului cu până la 73,9%. Stresul oxidativ mărește conținutul de torulina cu până la 82,2% fiind mai eficient decât în alte condiții. Iradierea cu lumină albă a stimulat producția de torularodină cu până la 20,0% [177].

Cationi divalenți Fe, Mg, Ca și Zn Co au demonstrat că acționează ca stimulatori pentru sinteza pigmentilor carotenoizi la tulpinile din genul *Rhodotorula* [190]. Ulterior rezultatele prezentate de Buzzini și colab. [85] indică că Al^{3+} și Zn^{2+} au dovedit a exercita o influență selectivă asupra sintezei pigmentilor exercitând efect stimulator asupra biosintezei β -carotenului în timp ce Zn^{2+} și Mn^{2+} au avut un efect inhibitor asupra sintezei torulinei și torularhodinei. Efect stimulator asupra producției și acumulării celulare de pigmenți carotenoizi la levurile *Rhodotorula glutinis* au exercitat sărurile de fier, calciu și zinc [79]. Datele privind influența nanoparticule oxidului de zinc au înregistrat că sinteza pigmentilor carotenoizi la plantele *Arabidopsis* nu este afectată la aplicarea concentrațiilor de 200-300 mg/L [332].

Pe lângă capacitatea levurilor din genul *Rhodotorula* de a produce o gamă largă de pigmenți carotenoizi intracelular levurile pot sintetiza și alte substanțe bioactive extracelular. O

componentă importantă al celulelor de levuri din genul *Rhodotorula* sunt carbohidrații care variază în limitele 15-40% substanța uscată [61]. Carbohidrații pe lângă funcția de substanțe de rezervă dețin un rol important și în dezvoltarea levurilor, acestea participă în reglarea mecanismelor celulare care controlează sinteza diferitor substanțe, creșterea și multiplicarea celulară. Conținutul de carbohidrați din biomasa levuriană caracterizează starea fiziologică fiind importante pentru funcționarea corectă a celulelor. Prin urmare carbohidrații pot fi un indiciu al viabilității levuriene. De asemenea polizaharidele microbiene sunt adăugate în produsele alimentare ca agenți de îngroșare, stabilizatori, emulsifianți de gelificare și agenți de legare [150].

Tulpinile de levuri oleaginoase *Rhodotorula glutinis* și *Rhodotorula gracilis* sunt capabile să producă cantități mari de grăsimi în condiții de limitare a conținutului de azot. Pot produce mai mult de 20% din biomasa lor lipide, iar în urma cultivării dirijate pot înregistra până la 70%. Randamentul acizilor grași sintetizați sunt de 47% acid oleic, 37 % acid palmitic și 8% acid linoleic [61]. Cultivarea dirijată a lipidelor microbiene produse de *Rh. gracilis* NRRL Y-1091 în condiții de limitare a azotului mărește conținutul cu 49,8% [92].

Un indicator important care caracterizează desfășurarea proceselor metabolice a culturilor de levuri supuse acțiunii diferitor factori de cultivare, este conținutul de proteină. Fiind formate exclusiv din aminoacizi, proteinele se găsesc în celule alături de alți componenți celulari importanți. Proteinele dețin un rol important în menținerea integrității celulare (proteinele peretelui celular), în răspunsul imun și autoimun al organismului în limbajul, structura și funcționarea celulară iar altele pot fi enzime care catalizează diferite reacții biochimice din organism [317]. Tulpinile de levuri din genul *Rhodotorula* pot produce cantități mari de proteine cu conținutul mai mare de 40% din biomasa lor uscată, iar în urma cultivării dirijate pot înregistra până la 50% [85].

Proteina din levuri este superioară celorlalte tipuri de proteine datorită conținutului valoros de aminoacizi esențiali, imunoactivi și proteinogeni. Tulpinile de levuri din genul *Rhodotorula* în urma cultivării dirijate cu utilizarea substratelor furajere pot înregistra până la 8,917% cu o stimulare semnificativă a conținutului de metionină, izoleucină și leucină [170]. Utilizarea mediului optimizat suplimentat cu compusul coordinativ [Zn(Gly)(DL-Ser)] în concentrație de 10 mg/L sporește conținutul de aminoacizi esențiali cu 8,90 mg/100mg la tulpina *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 cu stimularea reprezentativă a lizinei (1,27 mg/100 mg), leucinei (1,89 mg/100 mg) și teoninei 1,42 [34].

Un concept inovator în producerea biotehnologică a proteinelor și aminoacizilor este utilizarea nanoparticulelor oxidului de zinc ca factori stimulatori și regulatori ai proceselor de

biosinteză [104]. Nanoparticulele prezintă un instrument unic pentru manipularea activității biosintetice a microorganismelor, cu eficiență dovedită pe obiecte biotehnologice din diferite grupuri taxonomice. Impactul stimulator al nanoparticulelor oxidului de zinc se datorează proprietăților unice de a interacționa cu celule microbiene și de a induce modificări în procesele biochimice celulare, inclusiv a componentelor proteice [107, 108].

Pentru evaluarea influenței nanoparticulelor asupra celulelor levuriene un parametru importat este studiul activității enzimelor antioxidante. Conform datelor din literatura de specialitate nanoparticulele produc specii reactive de oxigen care în concentrații ridicate pot afecta activitatea fiziologică, provocând mai multe tipuri de daune, inclusiv afectarea ADN-ului, membranei celulare și componentelor bioactive din celulă [164, 172]. Totuși, celulele posedă sisteme antioxidante eficiente care pot împiedica sau permit recuperarea leziunilor oxidative. La tulpinile de levuri *Rh. gracilis* sistemul antioxidant de apărare constă în molecule cu greutate mică antioxidante cum ar fi enzimele catalaza și superoxid dismutaza [240].

Catalaza este o enzimă antioxidantă homotetramerică a patru subunități identice de 59,7 kDa. Fiecare subunitate conține 527 reziduri de aminoacizi, un grup hem, o moleculă strâns legată de NADPH și o grupare protetică din porfirină de fier (III) în structura căreia intră 4 nuclee pirolice și un ion Fe^{3+} . În decursul reacției enzimatice atomul central de fier din hem rămâne în stare trivalentă și nu suferă modificări de valență [175]. Catalaza are o greutate moleculară de 240 kDa este localizată în principal în peroxizomii din aproape toate celulele aerobe și servește la protejarea celulei de efectele toxice ale peroxidului de hidrogen prin catalizarea descompunerii H_2O_2 în apă și – oxigen. Mecanismul de cataliză nu este complet elucidat, dar reacția generală este după cum urmează: $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ [346].

Superoxid dismutaza este enzima antioxidantă care catalizează reducerea anionilor de superoxid a peroxidului de hidrogen și apără celulele de nivelurilor periculoase ale oxigenului reactiv. Peroxidul de hidrogen este transformat în oxigen și apă, mecanismul de reacție catalizat de SOD este conform formulei: $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ [117]. Superoxid dismutaza este indispensabilă în multe procese biochimice, incluzând semnalizarea intracelulară, apărarea și funcția celulară [180].

Astfel, pentru utilizarea în siguranță a nanoparticulelor este important menținerea echilibrului între cantitatea oxigenului reactiv și apărarea antioxidantă care este indispensabilă pentru funcționarea normală a celulelor. Acest fapt ne sugerează că utilizarea nanoparticulelor în biotehnologia cultivării microorganismelor, necesită studii detaliate și abordare specifică în fiecare caz concret.

Prin urmare, investigațiile efectuate asupra particularităților fiziologo-biochimice și biotehnologice a tulpinilor de levuri din genul *Rhodotorula* precizează trăsăturile fiziologice și oferă date semnificative taxonomice. Acumularea datelor privind biologia tulpinilor de levuri din genul *Rhodotorula* permite asigurarea proceselor fermentative, astfel îmbunătățind eficiența tehnologiilor de producere a compușilor bioactivi, cum ar fi producția de proteine, carbohidrați, lipide, carotenoide și enzime antioxidante. Datele prezintă valoare teoretică și practică pentru dirijarea activității biosintetice a tulpinii și ne conduc spre concluzia necesității continuării cercetărilor privind elucidarea căilor de stimulare a biosintezei componentelor bioactive.

1.5. Concluzii la capitolul 1

1. Proprietățile multifuncționale și diversitatea domeniilor de utilizare a nanoparticulelor oxizilor metalici evidențiază necesitatea studierii acestor compuși, pentru asigurarea utilizării lor în siguranță.

2. Clasificarea și proprietățile nanoparticulelor metalice sunt multiple, iar activitatea lor depinde de origine, compoziție chimică, dimensiune și concentrație.

3. Funcționalitatea și caracteristicile sunt influențate și de metodele de sinteză fizice, chimice sau biologice care pot fi adaptate în dependență de necesități.

4. Influența nanoparticulelor metalice poate fi evaluată cu ajutorul levurilor pigmentate din genul *Rhodotorula* care pot servi ca obiecte cu destinație biotehnologică dar și ca organism model de testare.

5. Analiza literaturii de specialitate la tema tezei a permis de a formula problema de cercetare propusă spre soluționare care constă în stabilirea influenței nanoparticulelor oxidului de zinc și fier asupra parametrilor microbiologici și biochimici, elaborarea procedurii de cultivare a levurilor *Rh. gracilis* și elaborarea unui procedeu de evaluare a impactului nanoparticulelor metalice.

Scopul lucrării constă în determinarea gradului de influență a nanoparticulelor oxizilor metalici ZnO și Fe₃O₄ asupra indicilor microbiologici și biochimici la levurile de interes biotehnologic din genul *Rhodotorula* și aprecierea perspectivelor de utilizare a lor în bionanotehnologii.

Obiectivele lucrării:

1. Validarea testelor microbiologice și biochimice în contextul calificării și asigurării calității metodelor utilizate pentru evaluarea efectelor nanoparticulelor oxizilor metalici;

2. Stabilirea particularităților acțiunii nanoparticulelor ZnO și Fe₃O₄ cu diferite dimensiuni asupra levurilor din genul *Rhodotorula*;
3. Elaborarea procedeeelor de utilizare a nanoparticulelor ZnO și Fe₃O₄ în biotehnologia cultivării levurilor;
4. Obținerea nanocompozitelor chitosan–zinc și chitosan-fier și aprecierea perspective utilizării lor în biotehnologia levurilor pigmentate.

Ipotezele cercetării:

1. Nanoparticulele ZnO pot fi utilizate în calitate de stimulatori ai biosntezei componentelor bioactive a levurilor pigmentate din genul *Rhodotorula*.
2. Levurile pigmentate din genul *Rhodotorula* pot servi ca organisme - model pentru testarea gradului de nocivitate a nanoparticulelor oxizilor metalici.

2. MATERIALE SI METODE DE CERCETARE

Rezultatele investigațiilor prezentate în această lucrare au fost obținute în perioada anilor 2015-2019 în cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie, laboratorul Biotehnologia levurilor.

2.1. Materiale de studiu

În calitate de obiecte de studiu au servit levurile *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 producător de pigmenți carotenoizi și *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, producător de proteine și pigmenți carotenoizi. Tulpinile sunt depozitate în colecția laboratorului Biotehnologia Levurilor și Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie.

Tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 a fost obținută de colaboratorii laboratorului Biotehnologia Levurilor prin selecția în mai multe etape pe medii lichide și agarizate, având ca material primar tulpina de levuri Tip a Institutului de Microbiologie al A.Ș. a U.R.S.S, care se caracteriza prin productivitate slabă.

Tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 (fig. 2.1) posedă următoarele caracteristici: gram-pozitiv, tipul respirației facultativ anaerob, celule ovale și alungite care înmuguresc, solitare, temperatura optimală de creștere +25...30°C, activ metabolizează glucoza, zaharoza, arabinoza, galactoza, maltoza, nu asimilează amidonul, fermentația lipsește.

Aspectul morfologic macroscopic al coloniilor tulpinii *Rh.gracilis* CNMN-Y-03 pe mediul YPD agarizat este exprimat prin colonii R-formă (slab inelată), profil neted, diametrul coloniilor 3 - 9 mm. Pigmentația - oranj sau roz, consistența păstoasă.

Aspectul morfologic al coloniilor gigant cultivate pe mediul solid YPD timp de 20 zile, este exprimat prin colonii cu forma alungită, ușor neregulată, marginea puțin festonată, suprafața coloniei pliată, mărimea coloniei 2,7x3,2 cm, culoarea oranj roz, consistența păstoasă.

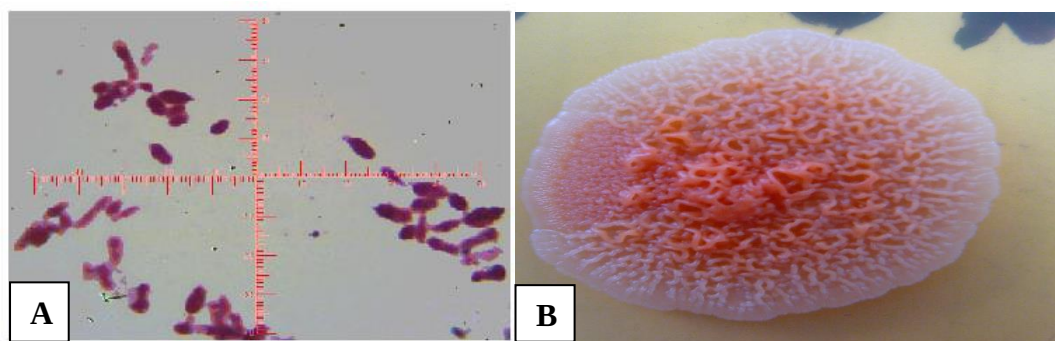


Fig. 2.1. Aspectul microscopic al celulelor (A) și morfologia macroscopică al coloniilor gigant (B) a tulpinii de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 cultivată în mediu YPD în condiții de laborator.

Microscopie fonică, obiectiv 100x15, (Autor foto Beșliu A)

Tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 a fost selectată în anul 1998 în rezultatul iradierii gamma a culturii *Rh. gracilis* CNMN-Y-02 de către colaboratorii laboratorului Biotehnologia levurilor.

Tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 (fig.2.2) posedă următoarele caracteristici: gram-pozitiv, tipul respirației facultativ anaerobă, celule ovale și alungite care înmuguresc, solitare cu dimensiuni de 8 și 20 μm, temperatura optimală de creștere 25...30°C, activ metabolizează glucoza, zaharoza, arabinoza, galactoza, xyloza, nu asimilează maltoza, lactoza, ramnoza, nitrații, fermentația lipsește.

Aspectul morfologic macroscopic al coloniilor tulpinii *Rh.gracilis* CNMN-Y-30 pe mediul YPD se exprimă prin colonii S-formă sau R-formă, cu profil neted sau reticulat, diametrul coloniilor 6 - 9 mm. Pigmentația - oranj sau coral, consistența păstoasă.

Aspectul morfologic al coloniilor gigant pe mediul solid YPD la cultivare timp de 20 zile se caracterizează prin forma alungită, ușor neregulată, marginea puțin festonată, suprafața coloniei pliată, mărimea coloniei 2,5x3,0 cm, culoarea coral, consistența păstoasă [23].

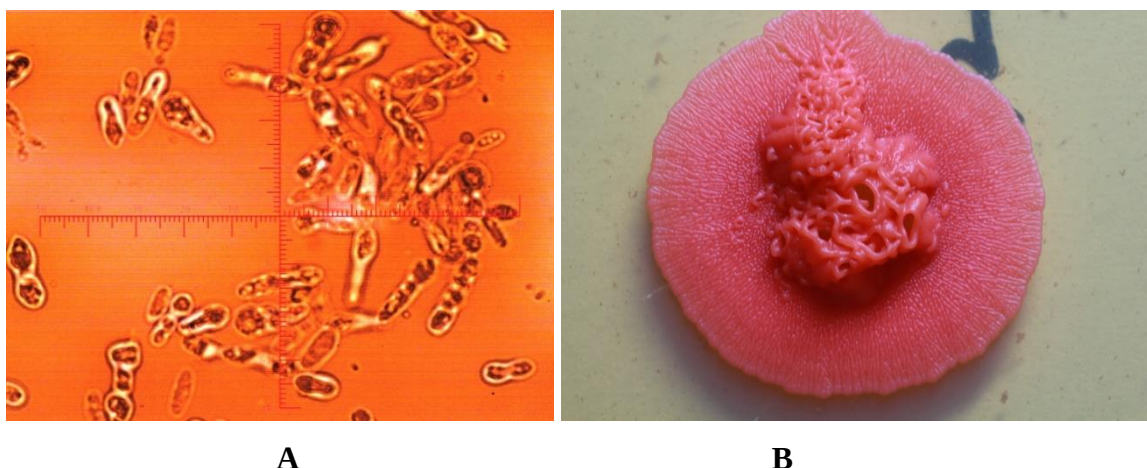


Fig. 2.2. Aspectul microscopic al celulelor (A) și morfologia macroscopică al coloniilor gigant (B) a tulpinii de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 cultivată în mediul YPD în condiții de laborator

Microscopie fonică, obiectiv 100x15 (Autor foto Beșliu A.)

Medii nutritive de cultivare:

YPD (yeast-peptone-dextroze), (w/v), (g/L): glucoză – 20, peptonă -20, extract de drojdie – 10, pH-5,5 s-a utilizat ca mediu de fermentare [46].

YPD agarizat-(w/v), (g/L): glucoză – 20, peptonă – 20, extract de drojdie – 10, agar - 2%, pH – ul 5,5 s-a utilizat pentru însămânțare și studiu caracterelor morfologice a tulpinilor.

Must de malț agarizat 6 Bl, agar - 2%, s-a utilizat pentru însămânțare.

NP oxizi metalici: În cercetări au fost utilizate nanoparticule:

- ZnO cu dimensiuni <50 nm, sub formă de pulbere, sinteză chimică, puritate >97%, aria suprafeței >10,8 m²/g (Aldrich).
- ZnO cu dimensiuni <100 nm, sub formă de pulbere, puritate 80%, aria suprafeței 15-25 m²/g (Aldrich).
- Fe₃O₄ cu dimensiuni de 10 nm, oferite de către cercetătorii Institutului de Inginerie Electronică și Nanotehnologii „D. Ghițu” [138].
- Fe₃O₄ cu dimensiuni de 30 nm, greutatea moleculară 231,53 g/mol, stabilizate în Poli-N-vinilpirolidona (PVP), (Aldrich);
- Fe₃O₄, cu dimensiuni 50-100 nm, sub formă de pulbere, se referă la categoria materialelor biomedicale, aria suprafeței >60 m²/g, densitatea 4,8-5,1 g/ml la +25⁰ C (Aldrich).

Concentrațiile nanoparticulelor utilizate la cultivarea levurilor au variat în funcție de scopul experiențelor. În varianta martor nu s-au aplicat nanoparticule. Influența NP oxizilor metalici asupra levurilor pigmentate *Rh. gracilis* a fost caracterizată conform standardelor și protocoalelor corespunzătoare, fiind aplicate metode fizico-chimice, microbiologice și biochimice de investigare.

2.2. Metode de investigație

Condiții și parametrii de cultivare a levurilor:

Pentru obținerea inoculatului în baloane se utilizează cultura de levuri din genul *Rhodotorula* cultivată pe mediul agarizat înclinat. Cultivarea materialului semincer are loc în baloane Erlenmayer cu capacitate de 500 ml care conține 100 ml mediu lichid YPD. Materialul semincer se cultivă pe parcursul a 48 ore, pe agitator rotativ (200 r.p.m.), la temperatura de +25...27°C, cu iluminare permanentă 2000 Lx. Calitatea materialului semincer se controlează prin microscopie.

Pentru obținerea biomasei celulare cultivarea submersă a levurilor se efectuează în baloane Erlenmeyer cu capacitate de 1,0 L, cultivare are loc pe agitator cu viteza de rotație 200 rot./min, la temperatura de +25⁰...27⁰C, iluminare permanentă 2000 Lx, gradul de aerație 80,0...83,0 mg/L, durata de cultivare submersă 120 ore. Mediul lichid de fermentare YPD se însămânțează în volum de 5% cu material semincer 2x10⁶ celule/ml.

Condiții și parametrii de preparare a soluției stoc de nanoparticule:

Soluția stoc de nanoparticule a fost preparată conform metodei expuse de Oterro-Gonzalez et. al. [228]. S-au preparat în membrană filtrată (0,45 g/L) apă deionizată. Soluția a fost asistată cu ultrasunet folosind un procesor cu ultrasunete de 50 W la o amplitudine de 50% timp de 10 minute (fig. 2. 3). pH-ul soluției a fost ajustat la 6-7 folosind NaOH diluat sau HCl, și soluția a fost depozitată la 4°C. Înainte de utilizare, stocurile au fost echilibrate la temperatura camerei 23±2°C și sonicată timp de 5 minute la amplitudinea 50% [228]. Nanoparticulele au fost adăugate sub formă de emulsie la etapa inoculării tulpinii. În calitate de proba control s-a cercetat varianta fără aplicarea nanoparticulelor.



Fig. 2.3. Prepararea soluției stoc de nanoparticule procesor cu ultrasunete de 50 W

(Autor foto Beșliu A)

Nanoparticulele Fe_3O_4 cu dimensiunile de 10 nm au fost preparate conform metodei de co-precipitare chimică folosind sulfat de fier (II) și clorură de fier (III) în prezența poli-N-vinilpirolidonei. Inițial s-a dizolvat 0,560 g sulfat de fier (II) în 35 ml de apă distilată. Apoi s-au adăugat prin picurare 3 mililitri soluție de PVP 0,01 mol/L și 3 ml de soluție saturată de clorură de fier (III) la soluția stoc. După 30 min de reacție, s-au adăugat 15 ml hidroxid de amoniu. Sinteza a fost realizată la temperatura de 75° C într-o atmosferă de argon sub agitare timp de 5 ore. Pulberea neagră de magnetită rezultată a fost separată de soluția inițială, spălată cu etanol și uscată la 100° C [138].

Condiții și parametrii de preparare a nanocompozitelor chitosan-fier și chitosan-zinc

Acoperirea NP Fe_3O_4 cu chitosan

Suspensile de NP au fost preparate prin metoda sonochimică, stabilizarea s-a realizat în polimer de chitosan. Acoperirea NP Fe_3O_4 cu chitosan s-a efectuat conform metodei

Mohammadi-Samani [203]. Inițial, 20 mg de chitosan s-a dizolvat în soluție de acid acetic 1 M cu un volum final de 100 ml. Nanoparticule Fe_3O_4 au fost adăugate la soluția anterioară cu agitare ulterioară timp de 18 ore la agitator rotativ 200 r.p.m. În timpul acestui proces, moleculele de chitosan s-au adsorbit pe suprafața nanoparticulelor și a fost obținută o suspensie maro închisă omogenă (fig 2.4). Emulsia de nanocompozit s-a adăugat la etapa inoculării culturii de levuri.

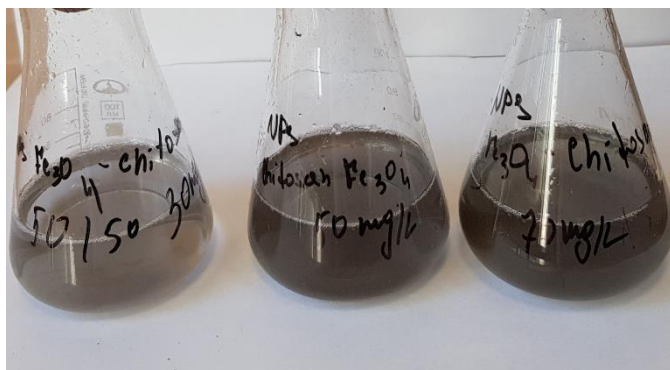


Fig. 2.4. Acoperirea NP Fe_3O_4 (50-100 nm) cu chitosan

(Autor foto Beșliu A)

Acoperirea NP ZnO cu chitosan

Nanocompozitul chitosan-zinc se prepară conform metodei Sudheesh Kumar [179]. Soluția de chitosan se obține prin dizolvarea a 2 g de chitosan în soluție de acid acetic 1% la temperatura camerei. Apoi, soluția se filtrează pentru a îndepărta particulele nedizolvate. La hidrogelul de chitosan se adaugă soluție de NaOH 1% până la pH neutru, urmată de centrifugarea hidrogelului pentru a elimina apa nelegată. Nanoparticulele ZnO se suspendă în apă și soluția se sonifică timp de 10 min. Suspensia de NP ZnO se adaugă prin picurare la chitosan și întregul amestec se supune agitării viguroase timp de 1 oră. Amestecul omogenizat de hidrogel de chitosan – nanoparticule ZnO se adaugă în mediul de cultură la etapa inoculării.

Metode de determinare a indicilor microbiologici și biochimici la levuri

Pentru aprecierea influenței NP asupra levurilor *Rh. gracilis* au fost utilizate metode de determinare a viabilității celulare, productivității, caracterelor morfologice celulare și coloniale. Analiza biochimică s-a efectuat prin determinarea conținutului de proteine, carbohidrați și pigmenți carotenoizi. Efectul influenței NP oxizilor metalici asupra activității antioxidante s-a evaluat prin investigarea enzimelor catalaza și superoxid dismutaza.

Viabilitatea celulelor a fost determinată prin metoda cuantificării numărului de colonii formate pe plăcile cu YPD agarizat. Pentru determinare au fost efectuate diluțiile succesive a 0,1 ml din proba cercetată, urmată de însămânțarea ulterioară a suspensiei în mediul YPD agarizat pe cutii Petri. Viabilitatea tulpinilor a fost testată după 0, 3, 6, 24 și 48 ore. Plăcile au fost notate și plasate în termostat cu capacul în jos la temperatura de +25°C cu examinarea zilnică până la apariția coloniilor. După termostatare au fost alese plăcile care conțin un număr cuprins între 25 și 300 colonii. S-a efectuat numărarea manuală și au fost făcute însemnările de rigoare [35, 255].

Dimensiunile și forma celulelor s-au examinat în culturi pe mediul nutritiv YPD suplimentat cu nanoparticule oxizilor metalici. După însămânțare, tulpinile s-au cultivat în condiții standart specifice tulpinilor de levuri din genul *Rhodotorula*. Din cultură, după 6, 24 și 120 ore de cultivare, s-au făcut preparate de levuri (celule fixate). Frotiurile cu celule fixate s-au colorat utilizând tehnica de colorare cu soluție de violet de gentiană [14].

Colorarea celulelor. Pe o lamă se plasează o picătură din proba de analizat, se întinde cu ajutorul ansei, se lasă să se usuce și se fixează frotiul sub flacăra. Apoi se colorează prin procedeul colorației după cum urmează: frotiul se acoperă cu soluție de violet de gentiană timp de 1-2 minute, excesul de colorant se îndalătură prin înclinarea lamei, se acoperă cu soluție Lugol timp de 1 minut, excesul de soluție se îndalătură prin înclinarea lamei și se decolorează cu soluție de alcool-acetonă până când soluția decolorată rămâne incoloră. Frotiul se spală cu apă apoi se acoperă cu soluție de fuxină fenolică diluată (1:10) menținându-se pe frotiu 15 secunde, apoi se spală cu apă distilată și se usucă [14]. Pe frotiul astfel colorat se aplică cu o baghetă de sticlă o picătură de ulei de cedru și se microscopază cu ajutorul microscopului XSZ-500, ocular 15/100 și camera video – MEM1300, utilizând programul special FutureWinJoe, se notează forma celulelor, modul de înmugurire și dimensiunile celulelor.

Caracterele morfologice coloniale au fost stabilite conform principiilor și tehnicilor de microbiologie generală [30]. Studiul caracterelor macromorfologice s-au efectuat prin însămânțarea culturilor de levuri pe mediul solid must de malț și YPD utilizand metoda în strii (ansei epuizate). Incubarea s-a efectuat la temperatura +25...27⁰C timp de 5 zile. Aprecierea morfologică a coloniilor s-a realizat prin notarea formei coloniilor, mărimea, profilul, luciul, transparența, culoarea, marginea coloniei și consistența.

Biomasa levurilor Rh. gracilis a fost obținută prin separarea de lichidul cultural, prin centrifugare la 3000 rot/min timp de 15 minute [152].

Substanța uscată a fost determinată prin cântărire. Proba de biomasă a fost introdusă într-o capsulă de porțelan și s-a încălzit în etuvă, la temperatura de +105°C. După răcire la

temperatura camerei capsula cu produs se cântărește. Operația a fost repetată până s-a ajuns la o masă constantă care nu depășește 0,0002.

Conținutul de substanță uscată se calculează conform formulei:

$$\text{substanța uscată în \%} = (m_2 - m_0)/(m_1 - m_0) \cdot 100$$

unde: m_1 = reprezintă masa fiolei și a probei analizate (g);

m_2 = masa fiolei și a probei analizate după uscare (g);

m_0 = masa fiolei (g) [152].

Carbohidrații totali în biomasa de levuri s-au determinat prin metoda colorimetrică cu utilizarea reactivului antron și D-glucozei în calitate de standard [100].

Metoda este bazată pe deshidratarea hexozelor în prezența acidului sulfuric concentrat, urmat de condensarea acestora cu antron, care rezultă cu obținerea unei colorații albastre-verzui. În scopul dat la 0,50 ml probă supusă cercetării s-au adăugat 5,0 ml soluție antron (50,0 mg antron recristalizat în 100,0 ml H_2SO_4 cu 66%).

Amestecul s-a agitat minuțios, apoi eprubetele s-au transferat pe baia de apă în fierbere și s-au lăsat în decurs de 30 min. Eprubetele cu probe s-au răcit sub apă curgătoare și s-au plasat la întuneric pentru expoziție timp de 30 min. Soluțiile colorate s-au determinat spectrofotometric la lungimea de undă de 620 nm în cuve de 0,5 cm.

Conținutul de carbohidrați s-a determinat după formula:

$$E_{620} \cdot 100 \cdot 1,25/m$$

Unde: E_{620} absorbția soluției la lungimea de undă de 620 nm;

1,25 coeficientul de recalculare a cantității de glucide în mg/ml;

m masa probei absolut uscate, mg.

Proteina s-a determinat spectrofotometric conform metodei Lowry [189].

Metoda este bazează pe extracția proteinelor cu NaOH 0,1N. La 0,1 ml probă se adăugă 0,9 ml NaOH 0,1N și timp de 30 min are loc extracția. După care din soluția dată s-a luat 0,1 ml și s-a adăugat 0,4 ml apă distilată și 2,0 ml amestec (reactiv A carbonat de sodiu 2 % în 0,1N hidroxid de sodiu și reactiv B sulfatul de cupru 0,5% de citrat de sodiu 1,0 % care s-a preparat prin amestecarea a 49,0 ml reactiv cu 1,0 ml reactiv B s-a lăsat în repaus la temperatura camerei. Apoi s-au adăugat 0,2 ml reagentul Folin și s-a agitat energic. Proba s-a lăsat timp de 30 min la temperatura camerei pentru dezvoltarea colorației și s-a măsurat absorbția soluției la spectrofotometru la lungimea de undă 750 nm în cuve cu grosimea stratului de 1,0 cm.

Conținutul de proteine în % din BAU s-a determinat după formula:

$$E_{750} \cdot 50 \cdot 0,32 \cdot 100\%/m,$$

Unde: E_{750} absorbția probei la lungimea de undă 750 nm;

0,32 coeficientul de recalcul a cantității de peptide în mg/ml;

50 diluția probei;

m masa probei absolut uscate (mg).

Componența aminoacizilor în biomasa levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 fost analizată prin hidroliza acidă cu utilizarea analizatorului “AAA-339” al Firmei “Microtehnă” (Cehia). Cercetările au fost efectuate în colaborare cu Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie.

Probele experimentale au fost pregătite în felul următor: biomasa levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 cultivată în prezența NP ZnO în concentrații 0, 20 și 70 mg/L în volum de 20 mg a fost centrifugată la 3000 r/min timp de 15 minute. După care supernatantul a fost transferat într-un alt tub de centrifugare și s-a efectuat deproteinizarea cu soluție de acid sulfosalicilic de 6%, apoi proba s-a plasat timp de o oră în frigider și s-a efectuat centrifugarea repetată la 3000 r/min timp de 30 de minute. Acidul din supernatant a fost distilat în evaporator rotativ vid Heidolph Laborota 4000 la 40°C până la obținerea pH bazic [131].

Conținutul de pigmenți carotenoizi a fost determinat prin metoda spectrofotometrică [292]. În scopul dat la 3,0 g de biomasă s-a acționat cu acid clorhidric (1N), apoi colbele s-au transferat la baie de aburi timp de 15 minute, la temperatura de 90°C. S-a efectuat filtrarea cu apă distilată a extractului, după care spălarea extractului cu amestec de acetonă și hexan în raport de 1:1, până la decolorarea definitivă a celulelor levuriene. Separarea hexanului și acetonei s-a efectuat cu ajutorul apei distilate, apoi extractul s-a trecut prin sulfatul de sodiu deshidratat cu măsurarea volumului obținut.

Măsurarea pigmenților carotenoizi s-a efectuat la spectrofotometru la următoarele lungimi de undă: beta-carotenul 453 nm, torulina 480 nm, torularodină 507 nm în cuve de 1.0 cm.

Calcularea cantității de pigmenți carotenoidici s-a efectuat conform formulei:

$$A = DO \cdot V \cdot 1000 / \sum_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot G \cdot 100$$

unde: A pigmentul cercetat (mg/g carotenoide, 100g țesut);

DO densitatea optică;

V volumul extractului, ml;

G cantitatea de substanță uscată, g.

$\sum_{1\text{cm}}^{1\%}$ coeficient de extracție specifică unui carotenoid;

Beta-carotenul $\sum_{1\text{cm}}^{1\%}$ 2592;

Torulina $\sum_{1\text{cm}}^{1\%}$ 3240;

Torularodină $\sum_{1\text{cm}}^{1\%}$ 2040;

Activitatea catalazei a fost determinată conform metodei spectrofotometrice [297]. Protocolul experimental începe cu distrugerea peretelui celular al biomasei levuriene prin înghețare dezghețare, 100 mg probă de biomasă este supusă congelării și decongelării în 3 repetări. După care peste probă se adaugă 10 ml H₂O₂ de 3% și 10 ml de amestec (caliu iodată și acetonă în proporție de 1:1), se agită și se lasă să se acumuleze sediment, după care se efectuează filtrarea. Apoi se centrifughează la 8000 rotații pe minut timp de 5 minute, se colectează supernatantul și se măsoară absorbanta soluției la spectrofotometru la lungimea de undă 440 nm în cuve cu grosimea stratului de 1,0 cm.

Activitatea catalazei se determină conform formulei:

$$A_c = d \cdot 0,02$$

Unde: d- absorbția probei la lungimea de undă 440 nm;

0,02- coeficientul de recalcul a activității catalazei;

Activitatea superoxid dismutazei a fost determinată prin metoda spectrofotometrică bazată pe capacitatea superoxid dismutazei de a inhiba reducerea tetrazolului nitro-albastru prin superoxid în prezența riboflavinei [37].

Procedeeul experimental include pregătirea a trei tuburi de amestecuri:

Primul tub: 3 ml mediu de reacție + 0,1 ml supernatant, acest test servește ca martor pentru măsurarea la spectrofotometru.

Al doilea tub: 3 ml de mediu de reacție + 0,1 ml de fosfat 0,1 M, pH 7,8 tampon, acest eșantion (fără supernatant) servește drept un control de lumină pentru probele experimentale.

Al treilea tub: 3 ml mediu de reacție + 0,1 ml supernatant proba experimentală.

Pentru a începe reacția enzimatică în toate cele 3 tuburi se adaugă 0,05 ml de riboflavină, al doilea și al treilea tub sunt plasate în condiții de iluminare timp de 10 - 20 de minute (timpul asimilat de experiență), primul - în întuneric la o temperatură de 30° C. Reacția este oprită prin plasare al doilea și al treilea tub în întuneric. Densitatea optică a conținutului din toate cele trei tuburi sunt determinate la spectrofotometru la lungimea de undă 560 nm. Cantitatea de proteină în supernatant a fost determinată conform metodei Lowry [189].

Determinarea activității SOD se efectuează în cel puțin trei repetări.

Activitatea SOD se calculează conform formulei:

$$\text{Activitatea SOD (unități/mg de proteină)} = \lg(D_{\text{contr.}} / D_{\text{exp.}}) / (\lg 2 \cdot C_{\text{prot.}});$$

unde: D_{contr.} - densitatea optică a controlului;

D_{exp.} - densitatea optică a probei experimentale;

Ig2 - volumul de supernatant adăugat la probe;

C_{prot.} - conținutul de proteine din probă, mg.

Pentru veridicitatea datelor, rezultatele obținute au fost supuse analizei statistice. 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 intervalului de încredere pentru o medie. Toate diferențele au fost considerate semnificative statistic pentru $P \leq 0,05$, comparativ cu varianta martor.

Echipament de laborator:

Microscopului XSZ-500, Camera video – MEM1300; Colorimetru KFK-2; Balanțe electronice AQT 250, WTB-200; Balanță analitică BJIP-200; pH-metru portabil WTW; oximetrul Oxi 315i/SET; Autoclav ГK/100/3; Centrifugă MPW-310; Agitator KB-357; Sterilizator ПИ-40МО; Evaporator rotativ vid Heidolph Laborota 4000; Analizatorului “AAA-339”, Microtehnă; Termostat Biobase; Spectrofotometru T60 UV VIS; Procesor cu ultrasunete Da-968.

2.3. Concluzii la capitolul 2

1. În calitate de obiecte de studiu în această lucrare au fost utilizate două tulpini de levuri pigmentate *Rh. gracilis*, producătoare de proteine și pigmenți carotenoizi din Colecția Națională de Microorganisme Neputogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie.
2. În cercetări au fost realizate și testate 6 tipuri de nanoparticule anorganice metalice: Fe_3O_4 , ZnO și nanocompozitele chitosan-fier și chitosan-zinc cu diferite dimensiuni și concentrații.
3. Influența nanoparticulelor Fe_3O_4 și ZnO , precum și nanocompozitelor chitosan-fier și chitosan-zinc asupra levurilor pigmentate *Rh. gracilis* au fost caracterizate conform standardelor și protocoalelor corespunzătoare, fiind aplicate metode fizico-chimice, microbiologice și biochimice de investigare.

3. EFECTELE NANOPARTICULELOR ZnO ASUPRA TULPINILOR DE LEVURI DIN GENUL *RHODOTORULA*

Analiza efectuată în capitolul 1 evidențiază relevanța cercetărilor privind aplicarea nanoparticulelor ZnO în diferite domenii dar și potențialele amenințări odată ce acestea intră în mediul înconjurător [351, 353]. Astfel, pentru determinarea efectelor nanoparticulelor asupra organismelor vii o importanță majoră revin cercetărilor cu aplicarea levurilor pigmentate *Rh. gracilis* care oferă posibilități enorme în modelarea efectelor și stabilirea mecanismelor de acțiune asupra proceselor vitale în celulă.

Pentru o caracterizare amplă a influenței NP asupra tulpinilor de levuri, relevante sunt studiile asupra viabilității, caracterelor morfologice, culturale, studiul compoziției biochimice și activității enzimelor antioxidante [178]. Analiza compoziției biochimice (conținutul de carbohidrați, proteine, pigmenți carotenoizi), caracterelor morfologice (abilitatea membranei de a transporta selectiv substanțele nutritive, deteriorarea membranei celulare, ionii sau alte ingrediente din mediul nutritiv) și activității enzimelor antioxidante (SOD și CAT) oferă posibilitatea restrângerii paletelor de cercetare și formării bazelor de referințe necesare pentru evaluarea acțiunii nanoparticulelor ZnO.

O altă direcție de interes major este aplicarea NP ZnO în biotehnologia microbiologică [135]. În vederea dezvoltării posibilităților tehnologice de producere a noi bioproduse destinate diferitor ramuri ale economiei naționale este important de a cerceta efectul nanoparticulelor asupra dezvoltării și producerii de metaboliți cu destinație biotehnologică. Este evident că pentru utilizarea în siguranță în biotehnologia cultivării levurilor și obținerii produselor bioactive de diversă natură, sunt necesare cercetări privitor la reacția celulelor la acțiunea nanoparticulelor. Cercetările din acest domeniu poartă un caracter atât teoretic, cât și practic.

Astfel, cele expuse mai sus indică importanța evaluării influenței nanoparticulelor ZnO asupra tulpinilor de levuri pigmentate din genul *Rhodotorula* și aprecierea potențialului de utilizare în biotehnologie pentru sporirea potențialului biosintetic.

Scopul cercetărilor expuse în acest capitol constă în elucidarea efectelor nanoparticulelor ZnO în funcție de dimensiuni și concentrație asupra tulpinilor de levuri de interes biotehnologic *Rh. gracilis* în vederea aprecierii perspectivelor de aplicare în biotehnologie.

3.1. Validarea testelor microbiologice și biochimice

Pentru atingerea scopului și asigurarea calificării și calității metodelor utilizate în cercetare s-a efectuat validarea testelor microbiologice și biochimice.

Validarea testelor microbiologice

Pentru determinarea repetabilității s-au analizat 5 variante experimentale în care au fost aplicate NP ZnO <50 nm în concentrații de 0-20 mg/L utilizând condiții similare (tab. 3.1). Repetabilitatea s-a realizat în 6 repetări cu concentrații diferite de microorganisme (10-30 CFU/pe cutie și 30-300 CFU/pe cutie). Eligibilitatea probelor a fost exprimată utilizând abaterea standard relativă, care trebuie să se situeze în limitele de 10%. Rezultatele obținute indică că abaterea standard relativă se situează pentru 10-30 CFU/cutie în limitele de 3,11-4,89%, și respectiv pentru 30-300 CFU/ 0,67-1,49%. Astfel, rezultatele obținute denotă că metoda este precisă în condițiile testării repetabilității.

Studiul preciziei intermediare a fost efectuată de 2 analitici care au analizat 5 variante experimentale (tab. 3.1). Cercetările au fost efectuate în trei repetări. Eligibilitatea probelor s-a stabilit utilizând RSD. Rezultatele obținute indică ca valorile RSD se situează în limitele 2,32-4,80% ce atestă că metoda este precisă.

Tabel 3.1. Precizia intermediară a metodei microbiologice de determinare a numărului total de colonii la tulpina de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-03

Analitic	Proba 1 - Martor CFU	Proba 2 -1,0 mg/L CFU	Proba 3-5,0 mg/L CFU	Proba 4- 10,0 mg/L CFU	Proba 5- 20,0 mg/L CFU
1	155	166	170	244	208
1	170	180	184	228	228
1	162	173	177	236	218
X	162	173	177	236	218
RSD, %	4,62	4,04	3,95	3,38	4,58
F _{tab}	9,11				
F _{cal}	1,62				
2	160	160	165	240	210
2	168	178	180	220	215
2	167	174	179	229	220
X	165	170	175	229	215
RSD, %	2,64	5,53	4,80	4,36	2,32
F _{tab}	9,11				
F _{cal}	1,45				

Acuratețea metodei s-a realizat prin recuperarea microbiologică cu analiza a 5 probe experimentale. Rezultatele au demonstrat că procentului recuperării se situează în limitele de 70% (tab.3.2). Datele conform protocolului USP 30 intră în limitele recuperării microbiologice.

Tabel 3.2. Acuratețea metodei de determinare a numărului total de colonii pentru tulpina de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-03

Concentrații NP ZnO (<50 nm), mg/L	10-30 CFU/cutie			30-300 CFU/cutie		
	% R	t _{tab}	t _{cal}	% R	t _{tab}	t _{cal}
martor	100	2,77	2,30	100	2,77	1,41
1,0	113		1,63	132		1,72
5,0	127		2,52	128		1,75
10,0	153		1,36	118		1,76
20,0	167		1,51	115		1,63

Liniaritatea metodei testate a fost determinată cu utilizarea a 5 probe experimentale și concentrațiile nanoparticulelor ZnO (<50 nm) de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 mg/L (tab. 3.3). Coeficientului de corelație (R^2) se situează în limitele 0,922-0,970, valorile coincid cu valorile stabilite de protocolul USP 30, $R^2 \geq 0.95$. Rezultatele obținute au fost confirmate și de criteriu Fisher.

Tabel 3.3. Liniaritatea metodei de determinare a numărului total de colonii pentru tulpina de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-03

Variante, NP ZnO (<50 nm), mg/L	CFU $\pm$ SD	R^2	F _{tab}	F _{cal}
Proba 1 -Martor	174 $\pm$ 8,62	0,945	9,117182	1,83
Proba 2 -1,0	184 $\pm$ 5,97	0,970	9,117182	1,09
Proba 3-5,0	204 $\pm$ 7,79	0,943	9,117182	2,04
Proba 4-10,0	247 $\pm$ 6,88	0,942	9,117182	2,32
Proba 5-20,0	262 $\pm$ 3,20	0,922	9,1171	0,56

Notă: SD abaterea relativă, R^2 coeficient de corelație

Robustețea metodei este proprietatea de a rămâne neafectată de modificarea intenționată a parametrilor. În cadrul cercetărilor robustețea s-a stabilit prin schimbarea temperaturii și mediului nutritiv de cultivare. Testele au fost efectuate în trei repetări (tab.3.4). Conform rezultatelor obținute s-a stabilit că modificările temperaturii și mediului de cultivare, nu se modifică statistic de datele obținute în condiții standard.

Tabel 3.4. Robuștețea metodei de determinare a numărului total de colonii pentru tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03

Parametrii	Variante NP ZnO (<50 nm), mg/L				
	Proba 1- Martor (X±SD)	Proba 2-1,0 (X±SD)	Proba 3- 5,0 (X±SD)	Proba 4- 10,0 (X±SD)	Proba 5 - 20,0 (X±SD)
Temperatura (°C)					
20±2	97,5±1,53	52±2,92	100±5	116,5±1,28	139±6,72
25±2	105±0,95	73,5±0,68	110±1,82	134,5±3,34	123±3,4
30±2	115±3,47	95±5,26	132±5,8	131±4,58	152±2,6
F _{tab}	9,01	9,01	9,01	9,01	9,01
F _{cal}	1,13	2,84	3,6	1,72	2,29
Mediu de cultivare					
YPD (1)	162,5±4,3	173±4,04	177±3,95	218±4,58	236±3,38
YPD (2)	158±6,0	172±6,97	171±3,50	207±3,38	218±1,60
Must de Malț	120±3,33	122±2,45	128±0,87	152±2,63	154,3±1,62
F _{tab}	9,01				
F _{cal}	1,6	2,1	1,74	0,88	2,56

Notă: X CFU medie , SD abatere standard

Rezultatele validării metodei microbiologice demonstrează că este exactă, precisă, robustă și validă în condițiile testate și poate fi utilizată pentru evaluarea influenței nanoparticulelor oxizilor metalici.

Validarea testelor biochimice

Pentru validarea metodelor biochimice au fost selectate metodele spectrofotometrice de determinare a conținutului de proteine și activității enzimei antioxidante catalaza în biomasa levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 cultivată în prezența NP ZnO (<50 nm). Pentru validarea metodelor biochimice au fost selectați parametrii de repetabilitate, precizia intermediară, liniaritate, acuratețea și robustețe.

Inițial a fost validată metoda de determinare a conținutului de proteine. Precizia metodei cercetate s-a determinat prin stabilirea preciziei intermediare și repetabilității. Repetabilitatea s-a studiat în 5 probe experimentale de NP ZnO <50 nm 0-20 mg/L în aceeași zi și în aceleași condiții. Precizia intermediară s-a analizat în 5 probe experimentale cu concentrații de NP ZnO <50 nm 0-20 mg/L 2 analitici în zile diferite în aceleași condiții.

Rezultatele obținute asupra preciziei intermediare și repetabilității denotă că metoda testată este precisă, valorile deviației standart relative fiind mai mici de 10% (tab. 3.5 și 3.6).

Tabel 3.5. Repetabilitatea metodei de determinare a conținutului de proteine la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 cu valorile F_{tab} și F_{cal} , intervalul de încredere 95%

Analitic	Proba 1 - Martor	Proba 2 -NP ZnO 1,0 mg/L	Proba 3 NP ZnO -5,0 mg/L	Proba 4- NP ZnO 10,0 mg/L	Proba 5- NP ZnO 20,0 mg/L
1	48,22	52,40	54,5	60,4	60,19
2	47,32	52,30	54,45	60,59	59,72
3	47,99	52,19	54,87	59,83	60,31
4	48,11	52,40	57,7	59,77	59,60
5	48,88	52,29	57,34	60,59	60,00
6	48,21	52,50	57,45	60,21	60,21
X	48,12±0,20	52,34±0,044	56,05±0,65	60,19±0,14	60,00±0,11
RSD, %	1,03	0,20	2,84	0,60	0,47
F_{tab}	9,01				
F_{cal}	0,056				

Tabel 3.6. Precizia intermediară metodei de determinare a conținutului de proteine la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 cu valorile F_{tab} și F_{cal} , intervalul de încredere 95%

Analitic	Proba 1 - Martor	Proba 2 -1,0	Proba 3-5,0	Proba 4-10,0	Proba 5 -20,0	F_{tab}	F_{cal}
1	47,77±0,25	52,35±0,028	55,97±0,85	55,97±0,054	59,95±0,13	9,11	0,045
2	47,84±0,15	52,34±0,031	57,52±0,10	60,13±0,34	59,95±0,20	9,11	0,045

Acuratețea metodei a fost stabilită prin îmbogățirea probelor cu calcurarea procentului recuperării. Pentru fiecare probă testată determinările au fost repetate de 3 ori. Conform rezultatelor obținute s-a stabilit că metoda testată este exactă, valorile medii ale recuperării sunt situate în limita de 100%, rezultatele au fost confirmate de testul Student.

Liniaritatea a fost stabilită prin absorbanta a 5 probe experimentale cu concentrațiile de 0, 1,5, 10 și 20 mg/L la lungimea de undă 750 nm. Variantele experimentale au fost repetate de 3 ori.

Metoda validată în limitele concentrațiilor 0-20 mg/L este liniară, valorile coeficientului de corelație (R^2) variază de la 0,9453 și ecuația regresiei liniare este $y=3,3x+44,7$. Datele sunt confirmate de criteriu Fisher (fig. 3.1).

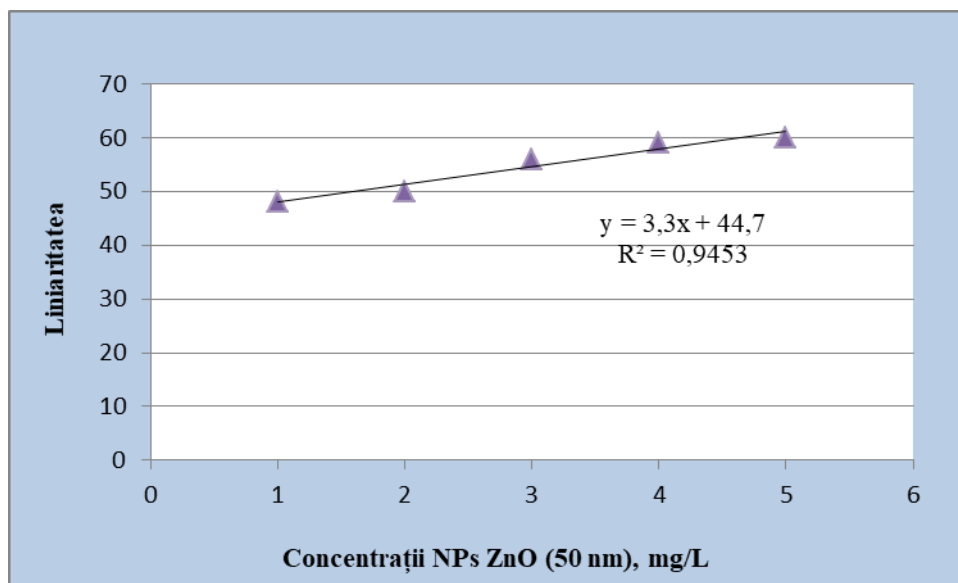


Figura 3.1. Liniaritatea de determinare a conținutului de proteine la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03

Robustețea metodei de a fost cercetată prin variația temperaturii în probele experimentale. Determinările au fost efectuate în 3 repetări pentru fiecare proba testată (tab. 3.7). Efectul temperaturii asupra conținutului de proteine a fost studiat în probele cu concentrații de nanoparticule ZnO <50 nm 0-20 mg/L, variantele au fost incubate timp de 5 minute la temperaturi cuprinse între 4-28°C. S-a determinat că modificările temperaturii nu influențează rezultatele obținute în condițiile standard, temperatura optimă pentru analiză a fost selectată +28°C.

Tabel 3.7. Robustețea metodei de determinare a conținutului de proteine la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03

Parametrii Robusteței Proteina	Proba 1- Martor (X±SD)	Proba 2- NP ZnO 1,0 mg/L (X±SD)	Proba 3- NP ZnO 5,0 mg/L (X±SD)	Proba 4- NP ZnO 10,0 mg/L (X±SD)	Proba 5 - NP ZnO 20,0 mg/L (X±SD)
Temperatura (°C)					
4±2	45,99±0,017	51,41±0,46	58,18±0,48	59,93±0,21	58,91±0,22
25±2	38,5±0,28	53,9±0,28	58,67±0,38	59,58±0,10	61,94±0,12
28±2	49,06±0,15	49,96±0,25	57,70±0,94	59,16±0,49	59,9±0,66
F _{tab}	9,01	9,01	9,01	9,01	9,01
F _{cal}	0,50	0,03	0,14	0,04	0,034

La etapa următoare pentru studiul de validare in vitro a fost selectată metoda spectrofotometrică de determinare a activității enzimei antioxidante catalaza în biomasa levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 cultivată în prezența NP ZnO (<50 nm).

Precizia metodei spectrofotometrice de determinare a activității enzimei antioxidante catalaza a fost determinat prin stabilirea preciziei intermediare și repetabilității în 5 probe experimentale de NP ZnO <50 nm 0-20 mg/L, rezultatele analitice sunt prezentate în tabelul 3.8. și 3.9. Conform rezultatelor obținute asupra preciziei intermediare și repetabilității s-a stabilit că metoda testată este precisă, valorile deviației standart relative sunt mai mici de 10% și procentual eroarea relativă indică, de asemenea, gradul înalt de precizie a metodei propuse.

Tabel 3.8. Repetabilitatea metodei de determinare a activității enzimei catalaza la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 cu valorile F_{tab} și F_{cal} , intervalul de încredere 95%

Analitic	Proba 1 - Martor	Proba 2 – NP ZnO 1,0 mg/L	Proba 3 NP ZnO -5,0 mg/L	Proba 4- NP ZnO 10,0 mg/L	Proba 5- NP ZnO 20,0 mg/L
1	53,35	53,6	56,75	60,75	78,05
2	53,25	53,5	56,9	60,65	78
3	53,02	53,9	56,7	60,65	78,4
4	53,25	53,75	56,9	60,5	78
5	52,95	53,25	56,75	60,75	78,3
6	53,35	53,6	56,5	60,85	78,45
X	53,19±0,16	53,6±0,22	56,75±0,60	60,69±0,12	78,2±0,20
RSD,%	0,31	0,41	0,26	0,19	0,26
F_{tab}	9,11				
F_{cal}	0,17				

Tabel 3.9. Precizia intermediară metodei de determinare a activității enzimei catalaza la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 cu valorile F_{tab} și F_{cal} , intervalul de încredere 95%

Analitic	Proba 1 - Martor	Proba 2 -1,0	Proba 3-5,0	Proba 4-10,0	Proba 5-20,0	F_{tab}	F_{cal}
1	53,2±0,2	53,6±0,20	56,78±0,10	60,68±0,5	78,15±0,05	9,11	0,17
2	53,18±0,20	53,53±0,25	56,71±0,20	60,7±0,18	78,25±0,22	9,11	0,17

Acuratețea metodei a fost stabilită prin îmbogățirea probelor cu calcurarea procentului recuperării. Pentru fiecare probă testată determinările au fost repetate de 3 ori. Conform rezultatelor obținute s-a stabilit că metoda testată este exactă, valorile medii ale recuperării sunt au variat în limitele de la 89 la 107%, cu o recuperare medie de 98,52%, rezultatele au fost confirmate de testul Student.

Liniaritatea metodei s-a determinat prin absorbanța a 5 probe experimentale cu concentrațiile de 0, 1,5,10 și 20 mg/L la lungimea de undă 440 nm. Probele experimentale au fost testate de 3 ori. Metoda validată în limitele concentrațiilor 0-20 mg/L este liniară, valorile coeficientului de corelație ce caracterizează dreapta de regresie (R^2) 0,913, eroarea standard SE = 0,0022, ecuația dreptei de regresie liniară este $y=5,9x+41,9$ (fig. 3.2). Rezultatele au fost confirmate de criteriu Fisher. Astfel, valoarea coeficienților regresiei demonstrează că în cazul concentrațiilor testate metoda este liniară.

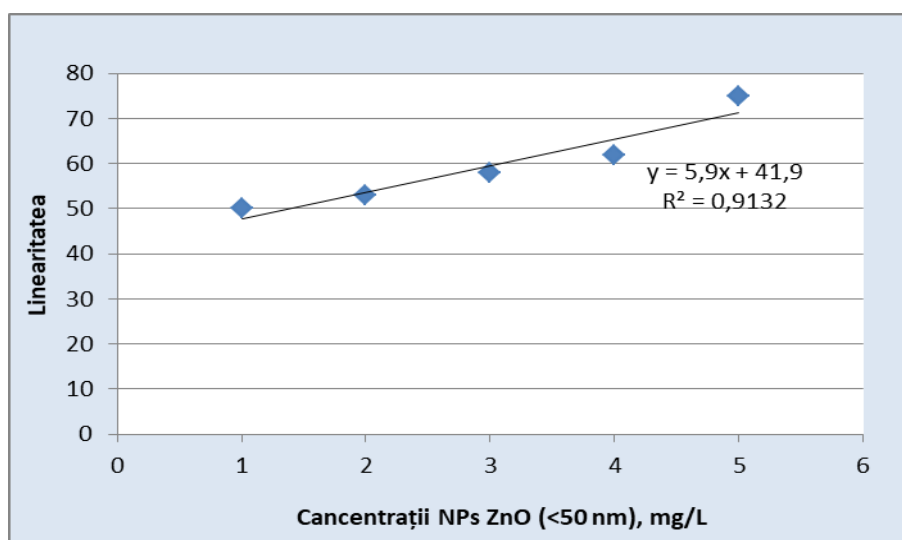


Figura 3.2. Liniaritatea de determinare a activității enzimei antioxidante catalaza la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03

Robustețea a fost cercetată prin optimizarea condițiilor experimentale prin variația temperaturii. Determinările au fost efectuate în 3 repetări pentru fiecare proba testată (Tabelul 3.10).

Tabel 3.10. Robustețea metodei de determinare a activității enzimei catalaza la tulpina *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03

Parametrii Robusteței	Proba 1- Martor (X±SD)	Proba 2- NP ZnO 1,0 mg/L (X±SD)	Proba 3- NP ZnO 5,0 mg/L (X±SD)	Proba 4- NP ZnO 10,0 mg/L (X±SD)	Proba 5 - NP ZnO 20,0 mg/L (X±SD)
Temperatura (°C)					
4±2	44,9±0,047	54,6±0,05	48,37±0,12	59,82±0,17	56,22±0,22
25±2	45,05±0,13	55,12±0,18	52±0,14	60,25±0,16	60,20±0,24
28±2	52,52±0,129	52±0,288	61,42±0,359	60,25±0,115	74,3±0,1,833
F _{tab}	9,11	9,11	9,11	9,11	9,11
F _{cal}	0, 03	0,004	0,07	0,04	0,14

Efectul temperaturii asupra activității enzimei antioxidante catalaza a fost cercetată în probele experimentale cu nanoparticule ZnO <50 nm în concentrații de 0-20 mg/L, variantele au fost incubate timp de 5 minute la temperaturi cuprinse între 4-28°C. S-a determinat că modificările temperaturii nu influențează semnificativ rezultatele obținute în condițiile standard, temperatura optimă pentru analiză a fost selectată +28°C.

Astfel, a fost demonstrat că metodele spectrofotometrice de determinare a conținutului de proteine și activității enzimei antioxidante catalaza în biomasa levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 cultivată în prezența NP ZnO (50 nm) în limitele concentrațiilor 0-20 mg/L sunt simple, acurate, precise, liniare, robuste, deci valide conform acestor criterii. Astfel, deci indicii menționați pot fi utilizați ca indicatori în testarea influenței nanoparticulelor metalice.

3.2. Viabilitatea, producția de biomasă celulară și caracterele morfologice a levurilor *Rh. gracilis* sub influența nanoparticulelor ZnO

Reieșind din premisele teoretice expuse anterior, ne-am propus să studiem acțiunea nanoparticulelor ZnO cu diferite dimensiuni și concentrații asupra viabilității, producției de biomasă celulară și caracterelor morfologice a două tulpini de levuri de interes biotehnologic *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 și *Rh. gracilis* CNMN-Y-30. În experiențe s-au folosit nanoparticule ZnO cu dimensiuni de <50 nm și <100 nm aplicate în mediul de cultivare YPD în concentrații de la 1 mg/L și 70 mg/L.

Un indiciu important pentru evaluarea acțiunii nanoparticulelor ZnO este determinarea viabilității celulare. Pentru analiza cito- sau genotoxicității sub acțiunea factorilor chimici sau fizici, care exercită efecte toxice printr-un număr de modificări celulare ce pot compromite capacitatea celulelor de a se diviza dar fără a duce neapărat la moarte, este determinarea viabilității, una dintre metodele cele mai frecvent utilizate [169]. Analiza parametrului de viabilitate este, de asemenea, foarte important pentru procesele industriale în care se utilizează microorganisme [217].

Studiul efectelor nanoparticulelor ZnO în funcție de dimensiuni și concentrație a evidențiat modificări semnificative ale viabilității celulelor a levurilor *Rh. gracilis*. Conform rezultatelor obținute s-a observat o creștere a viabilității celulare după 24 ore de cultivare comparativ cu primele 6 ore pentru ambele tulpini și nanoparticule cercetate.

Rezultatele pot fi explicate prin adaptarea celulelor levuriene la acțiunea NP ZnO care se majorează la 24 ore de cultivare. De asemenea, conform datelor din literatura de specialitate este cunoscută dependența citotoxicității NP metalice de durata de contact a microorganismelor. De

exemplu, în timpul a 6 ore de incubare, nanoparticulele oxizilor metalici înregistrează o toxicitate mai mare comparativ cu 24 ore [216].

Studiul efectelor NP ZnO <50 nm asupra levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 a evidențiat că utilizarea nanoparticulelor în concentrația 20 mg/L stimulează semnificativ viabilitatea celulelor levuriene după 6 și 24 ore de cultivare cu 45-100%. În cazul examinării tulpinii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 viabilitatea celulelor levuriene după 6 și 24 ore de cultivare crește cu 14-22% comparativ cu proba martor la aplicarea concentrației de 10 mg/L (fig. 3.3).

Analiza comparativă a rezultatelor acțiunii nanoparticulelor ZnO <50 nm în concentrațiile de 50-70 mg/L, arată efecte citotoxice asupra tulpinilor studiate atât după 6 ore de contact, cât și după 24 de ore, viabilitatea celulelor scade cu peste 40%. Astfel, cuantificarea numărului de colonii formate pe plăcile cu YPD agarizat a demonstrat că concentrația minim inhibitorie (IC50%) a nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni de <50 nm constituie 70 mg/L asupra tulpinilor de levuri studiate. Deci, în rezultatul cercetărilor putem afirma că efectul nanoparticulelor ZnO (<50 nm) asupra viabilității celulelor se manifestă în funcție de concentrațiile utilizate.

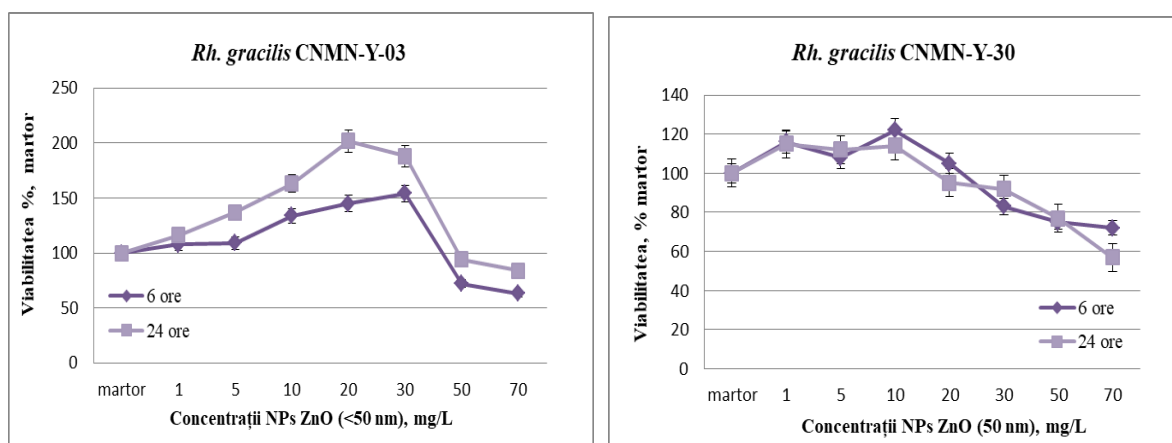


Fig. 3.3. Valorile procentuale față de martor ale viabilității celulare a *Rh. gracilis* la contact cu nanoparticulele ZnO <50 nm în funcție de concentrație și durata de contact

Analizând datele obținute privind acțiunea NP ZnO cu dimensiuni <100 asupra levurilor *Rh. gracilis* s-au constatat unele diferențe. În ceea ce privește efectul asupra *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 s-a stabilit că viabilitatea celulelor după 6 și 24 ore de cultivare crește la aplicarea concentrațiilor de 1...30 mg/L cu 16-41%, față de proba martor.

Analiza comparativă a rezultatelor obținute pentru tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 indică că atât după 6 ore de contact cu nanoparticule, cât și după 24 de ore, viabilitatea celulelor sub acțiunea concentrațiilor de 20-30 mg/L scade cu până la 24- 32% (fig. 3.4). S-a constatat că

gradul de viabilitate la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 este asociat cu concentrațiile utilizate în experiențe. Pentru concentrațiile nanoparticulelor utilizate în experiențe, pragul minim inhibitoriu de 50% (IC_{50%}) sau maximal eficient de 50% (EC_{50%}) nu s-a înregistrat.

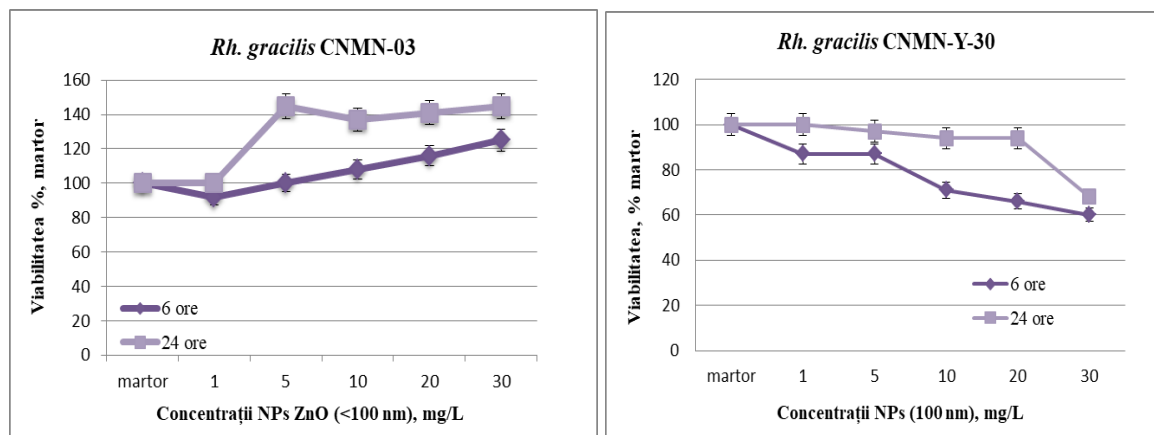


Fig. 3.4. Valorile procentuale față de martor ale viabilității celulare a *Rh. gracilis* la contact cu nanoparticulele ZnO <100 nm în funcție de concentrație și durata de contact

Valoarea obținută (R^2) în urma corelării valorilor viabilității celulare după 6 și 24 ore de contact cu cele ale concentrațiilor nanoparticulelor, evidențiază o corelație puternică între cei doi factori, $R^2 = 0,8858$ respectiv $R^2 = 0,9487$.

Așadar, experiențele efectuate au demonstrat că nanoparticulele ZnO <50 nm au un efect semnificativ asupra celulelor levuriene decât particulele cu dimensiuni mai mari ZnO <100 nm, efect confirmat și prin datele științifice conform cărora nanoparticule oxizilor metalici cu dimensiuni mai mici și în concentrații sporite interacționează cu, proteinele, ARN-ul sau ADN-ul lor, ceea ce contribuie la inhibarea diviziunii celulare [134].

Analizând datele obținute privind producția de biomasă după cultivarea levurilor în prezența nanoparticulelor timp de 120 ore, s-au constatat unele diferențe nesemnificative în efectele produse de către nanoparticule. Conform studiilor, nanoparticulele ZnO <50 nm în concentrațiile 1-70 mg/L și ZnO <100 nm în concentrații de 1-30 mg/L nu manifestă modificări substanțiale a producției de biomasă celulară la levurile pigmentate din genul *Rhodotorula*. Valorile cantității de biomasă obținută la 1 L mediu de cultură sunt situate în limita erorii admisibile (fig. 3.5.). Determinarea gradului de corelare între cantitatea de biomasă celulară acumulată și concentrațiile de nanoparticule a demonstrat o legătură puternică. Coeficientul de determinare este de $R^2 = 0,9161$. Rezultatele obținute conduc spre ideea că culturile de levuri studiate se adaptează la condițiile de cultivare în prezența nanoparticulelor oxidului de zinc.

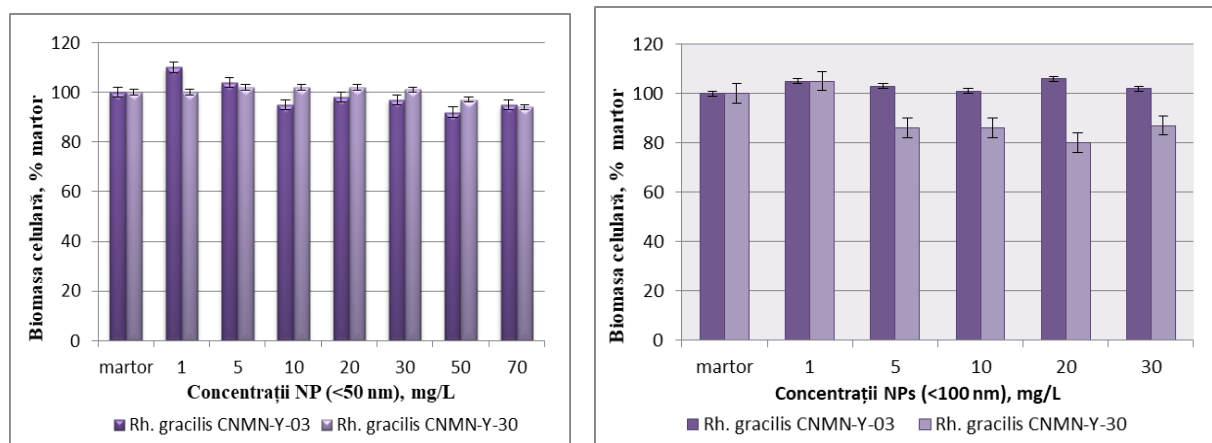
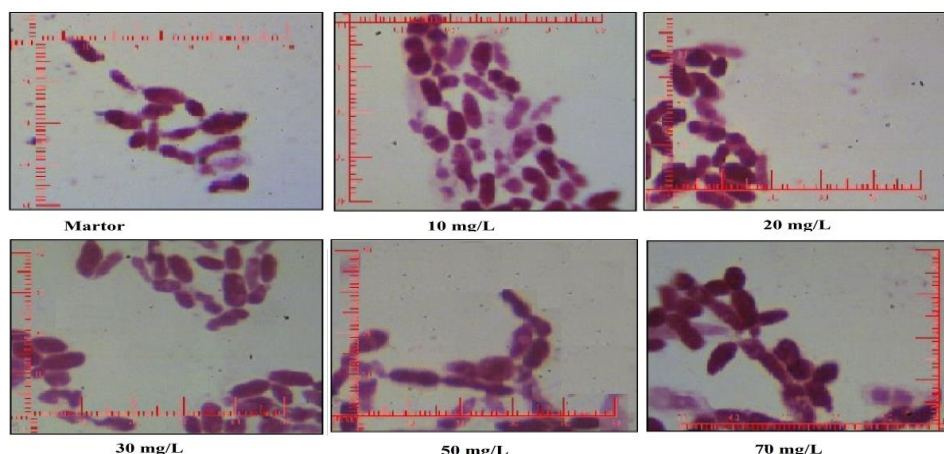


Fig.3.5. Valorile procentuale față de martor ale acumulării biomasei celulare a levurilor *Rh. gracilis* sub acțiunea nanoparticulelor ZnO în funcție de concentrație

Pentru a confirma efectul negativ al NP asupra viabilității am realizat studiul caracterelor morfologice a levurilor pigmentate din genul *Rhodotorula*, în dependență de concentrația nanoparticulelor. Morfologia celulelor și coloniilor a fost studiată pe probe experimentale obținute la cultivarea tulpinilor de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 și *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 în prezența nanoparticulelor ZnO <50 nm timp de 24 ore.

Examineate la microscop, celulele *Rh. gracilis* CNMN-Y-03, crescute pe mediul YPD, au prezentat forme alungite sau globulare, dispuse izolat sau perechi, cu dimensiuni variabile (fig. 3.6). Cultura martor prezintă celule tipice cu dimensiuni ale lungimii care variază între 4-7 (media 7.0) micrometri și lățimii de 2-3 (media 2,5) micrometri. Aria medie a celulei în varianta martor constituie 16.49 micrometri patrați. În variantele experimentale sub influența NP ZnO (<50 nm) în concentrațiile 10-70 mg/L, lungimea celulelor variază de la 3.5 până la 8.25 micrometri, iar lățimea medie de la 2 la 4.0 micrometri. Aria medie a celulelor se micșorează și se află în limitele 16.84- 25.91 micrometri patrați, ceea ce constituie 2-57%, față de martor.

Experiențele efectuate cu tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, la fel cultivată pe mediul YPD timp de 24 ore, de regulă prezintă celule alungite sau sferice, aranjate izolat sau perechi, cu dimensiuni variabile (fig. 3.7). Lungimea celulelor în varianta control este situată între 17,6 (media 8,07) micrometri și lățimii de 3-5 (media 3,4) micrometri. Aria medie a celulei în varianta martor constituie 21,53 micrometri patrați. În probele experimentale, lungimea celulelor este situată în limitele 5,1 - 6,01 micrometri, iar lățimea medie constituie 3,29-4,43 micrometri. Aria medie a celulelor se micșorează și se află în limitele 14,43- 18,68 micrometri patrați, ceea ce constituie 67-86 %, față de martor.



Concentrații NP ZnO <50 nm

Fig. 3.6. Aspectul morfologic al celulelor *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 după 24 ore de contact cu nanoparticulele ZnO <50 nm, (ocular 15/100)

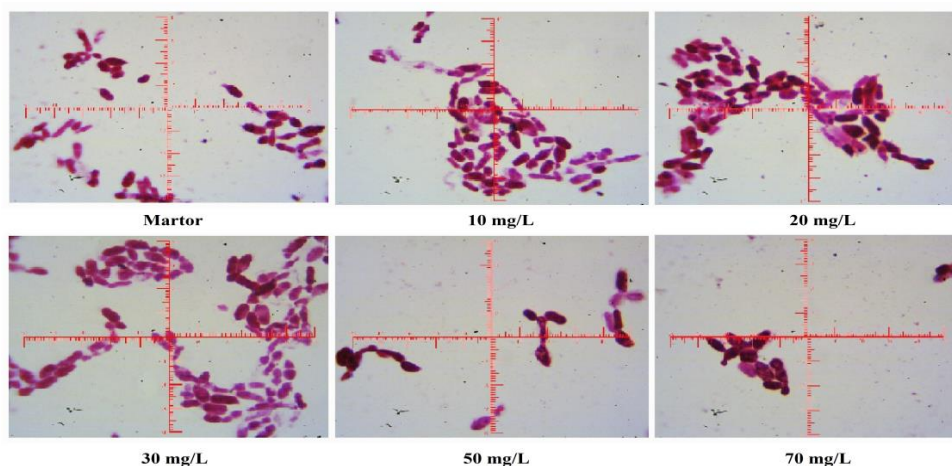


Fig. 3.7. Aspectul morfologic al celulelor *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 după 24 ore de contact cu nanoparticulele ZnO <50 nm, (ocular 15/100)

Așadar, acțiunea nanoparticulelor ZnO <50 nm asupra levurilor *Rh. gracilis* este confirmată de modificări asupra dimensiunilor celulelor, îndeosebi efectul este mai evident la contactul celulelor cu concentrația de 70 mg/L. O altă particularitate a acțiunii nanoparticulelor ZnO <50 constă în formarea unor aglomerări ale celulelor, efecte mai pronunțate sunt observate la contactul cu concentrațiile de 20 și 70 mg/L. Se poate presupune că concentrațiile mari de NP ZnO <50 introduse în mediul experimental induc acumularea lor în organite și vacuole celulare ceea ce crează daune în structura morfologică a culturilor studiate.

În scopul extinderii cercetărilor pentru asigurarea credibilității rezultatelor obținute privind influența nanoparticulelor asupra caracterelor morfologice ale levurilor studiate au fost

efectuate aprecieri morfologice ale coloniilor. Pentru obținerea coloniilor, mostrele suspensiei de levuri martor și experimentale, cu durata de contact cu nanoparticulelor de 120 ore, au fost însămânțate pe mediu solid YPD.

Tulpina de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 se caracterizează prin colonii cu dimensiuni situate între 2-6 mm, forma R, marginile coloniilor ondulate, suprafața reticulată, culoarea coral-oranj intens. Referitor la morfologia coloniilor culturii aflate în contact cu nanoparticule ZnO <50 nm, au fost înregistrate unele modificări asupra culorii, diametrului și marginii coloniilor. S-a observat că culoarea coloniilor din probe experimentale se schimbă de la oranj intens spre roz pal specifice pentru concentrațiile nanoparticulelor ZnO <50 nm de 30-70 mg/L. Determinarea diametrului coloniilor de asemenea a demonstrat diferențe între probele experimentale și varianta control. Prezența nanoparticulelor ZnO <50 nm în mediul de cultivare a modificat diametrul coloniilor în limitele 2-7 mm (fig. 3.8).

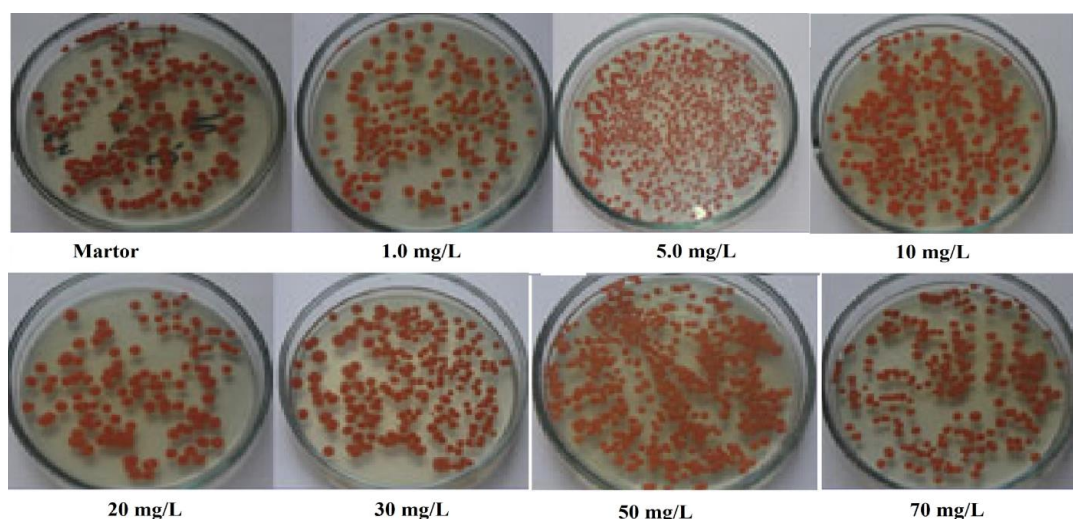


Fig. 3.8. Morfologia coloniilor *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 la contact cu diferite concentrații de nanoparticule ZnO <50 nm timp de 120 ore

Referitor la cultura martor *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 menționăm colonii cu dimensiuni 2-6 mm, forma coloniilor circulară, marginile coloniei ușor ondulate, suprafața coloniei încrețită cu centru mamelonat, culoarea coral-oranj intens. Examinând caracterele morfologice ale coloniilor culturii aflate în contact cu nanoparticule ZnO <50 nm, pot fi observate modificări ale formei și profilului coloniilor, culorii și mărimii. În urma analizelor aspectului și morfologiei coloniilor, s-au observat unele particularități care pot fi încadrate în două grupe: în prima grupă (specifice pentru concentrațiile de nanoparticule 1-10 mg/L) – colonii cu dimensiuni 1-4 mm, marginile coloniei ușor ondulate, suprafața coloniei netedă și reticulată, culoarea coral - oranj intens; din

grupa a doua (caractere specifice pentru concentrațiile 20 și 70 mg/L nanoparticule) menționăm colonii cu dimensiuni de 1-7 mm, rotunde, netede, cu suprafața lucioasă, culoare oranj pal (fig.3.9).

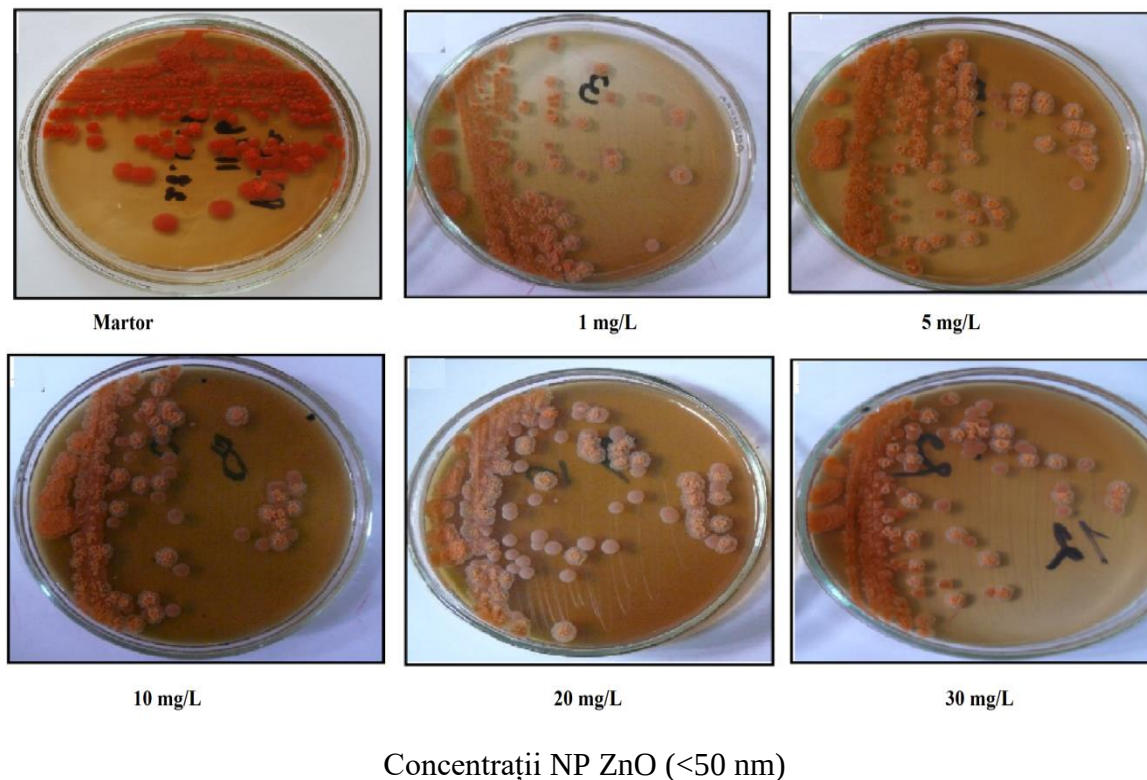


Fig. 3.9. Morfologia coloniilor *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 la contact cu diferite concentrații de nanoparticule ZnO <50 nm timp de 120 ore

Generalizând rezultatele obținute putem deduce că parametrii bioproductivi al levurilor studiate la cultivarea pe mediul YPD în prezența nanoparticulelor ZnO se modifică în funcție de dimensiune, concentrații, timpul de contact și obiectul biologic cercetat. Vulnerabilă la acțiunea nanoparticulelor ZnO este viabilitatea celulelor în primele 24 ore de contact pentru ambele tipuri de nanoparticule și tulpini cercetate. Datele obținute privind productivitatea și efectul asupra caracterelor morfologice celulare și coloniale a levurilor din genul *Rhodotorula*, la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO au evidențiat efecte diferite produse în funcție de obiectul biotehnologic cercetat.

3.3. Sinteza proteinelor la levurile *Rh. gracilis* sub influența nanoparticulelor ZnO

Un indicator important, care caracterizează desfășurarea proceselor metabolice a culturilor supuse acțiunii nanoparticulelor este conținutul de proteine. Stratul proteic mediază

interacțiunile sistemelor vii cu nanoparticulele și prezintă un element principal care reglează biodistribuția în organism [45].

Un rol important în distribuția nanoparticulelor și impactul biologic asupra complexului proteine - nanoparticule îl au mediile de cultură [193]. Autorii, în urma efectuării mai multor teste comparative de viabilitate a două linii celulare, au observat efecte citotoxice diferite, astfel menționează că pentru testele standardizate de nanotoxicologie este necesar de a caracteriza mai detaliat efectele provocate de mediile de cultură în relațiile celule – nanoparticule.

Identificarea caracterului de acțiune a nanoparticulelor ZnO (<50 nm) asupra procesului de biosinteză a proteinelor la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 cultivată pe mediul YPD a evidențiat că, conținutul acestora în biomasa celulară, sub influența concentrațiilor de la 5 la 30 mg/L, este în creștere cu până la 57%, comparativ cu proba martor (fig. 3.10).

În ceea ce privește efectul NP ZnO (<50 nm) asupra altei tulpini *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 s-a constatat că concentrațiile de la 5 la 20 mg/L de asemenea sporesc conținutul de proteine în biomasa levuriană cu până la 38% (fig. 3.10). În probele experimentale în care concentrația nanoparticulelor a constituit 50-70 mg/L, se observă o micșorare relativ moderată a cantității de proteine acumulată în biomasa ambelor levuri studiate. Reeșind din cele expuse, concentrațiile eficiente a nanoparticulelor ZnO <50 nm pentru stimularea procesului de biosinteză a proteinelor se situează la nivelul de 20 mg/L.

Determinarea gradului de corelare între cantitatea de proteine din biomasa levuriană și concentrațiile de nanoparticule ZnO <50 nm utilizate în experimente a demonstrat o asociere puternică, $R^2 = 0,8513$ pentru tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 și $R^2 = 0,8432$ pentru tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30.

La aplicarea nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni <100 nm în procesul de cultivare a levurilor s-au constatat valori sporite ale conținutului total de proteine. În particular, conținutul de proteine la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 a sporit la aplicarea concentrațiilor de 1,0-20,0 mg/L cu 44-47%, comparativ cu proba control (fig. 3.10). Analiza comparativă asupra procesului de biosinteză a proteinelor la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 a evidențiat că, conținutul acestora în biomasa celulară, sub influența concentrațiilor de nanoparticule de la 5 la 20 mg/L, este în creștere cu până la 28%. Totodată, concentrația de 30 mg/L a nanoparticulelor induce diminuarea nesemnificativă a cantității de proteine la ambele tulpini studiate. Astfel, s-a stabilit că concentrația eficientă a nanoparticulelor ZnO <100 nm pentru stimularea procesului de biosinteză a proteinelor se situează în diapazonul 10-20 mg/L.

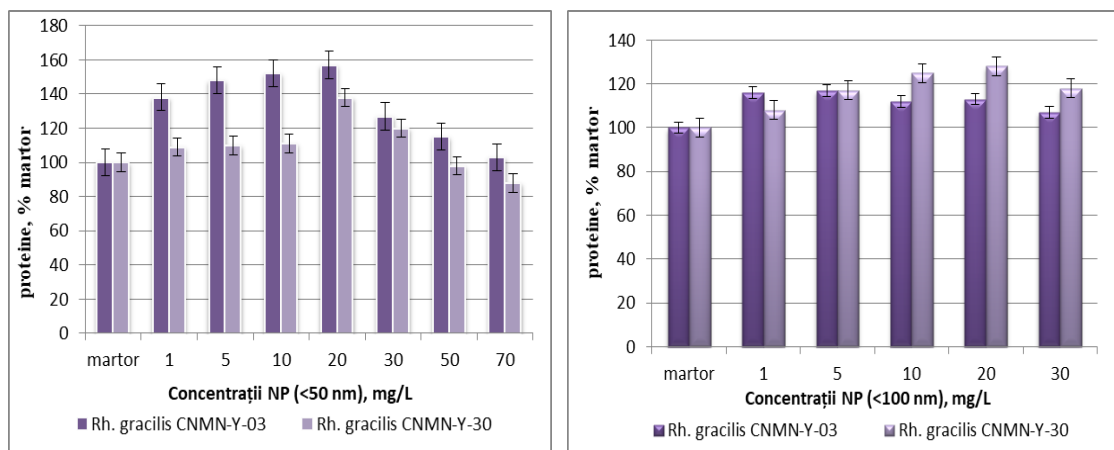


Fig. 3.10. Valorile procentuale față de martor ale acumulării proteinelor în biomasa levurilor *Rh. gracilis* sub acțiunea nanoparticulelor ZnO în funcție de concentrație și dimensiune

Prin urmare, rezultate obținute demonstrează că nanoparticule ZnO joacă un rol important în procesele de sinteză a proteinelor la levurile *Rh. gracilis*. Conform datelor din literatura de specialitate aproximativ 40% din toate proteinele cunoscute conțin cationi metalici, probabil că ionii de Zn^{2+} se leagă la proteine [108]. Legarea proteinelor de nanoparticule ZnO induce modificări îmbunătățind și diversificând funcția lor. Însă concentrațiile ridicate influențează negativ biosinteza posibil se produc modificări în locurile de legare a metalului care afectează structura și activitatea proteinelor [185].

În continuare, în vederea stabilirii influenței NP ZnO asupra calității proteinelor levurii a fost analizată componența aminoacizilor. Aminoacizii joacă un rol important în toate procesele biologice care apar în organismele vii: sunt elemente de bază în structura proteinelor, precursori ai hormonilor, bazelor azotate purinice și pirimidinice, porfirinelor, aminelor și vitaminelor [193, 280].

Examinarea componenței cantitative și calitative a proteinelor levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, la cultivare pe mediul nutritiv YPD, a arătat un conținut înalt de aminoacizi esențiali 6,0234 mg/100 mg, imunoactivi 5,64 mg/100 mg și proteinogeni 12,45 mg/100 mg (tab. 3.13). Din spectrul celor 10 aminoacizi esențiali în componența levurii au fost identificați 9: treonina, valina, metionina, izoleucina, leucina, fenilalanina, lizina, plus 2 aminoacizi semiesențiali histidina și arginina și 8 aminoacizi imunoactivi acidul aspartic, acidul glutamic, alanina, cisteina, glicina, serina, valina și arginina care fac parte din componența imunoglobulinelor și participă în procesele de protecție a organismului [166].

Tabelul 3.11. Conținutul de AA esențiali și imunoactivi în mg/100 mg proteine la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 sub influența NP ZnO

Aminoacizi	Martor YPD		Np ZnO 20 mg/L		Np ZnO 70 mg/L	
	mg/100 mg	% din sumă	mg/100 mg	% din sumă	mg/100 mg	% din sumă
Treonina*	0,6518	10,82	1,55	11,64	1,6353	9,71
Valina*	0,5495	9,12	1,40	9,54	1,5925	9,46
Metionina*	0,0237	0,39	0,0343	0,37	0,0576	0,34
Izoleucina*	0,5457	9,05	0,8626	9,25	1,4591	8,66
Leucina*	1,4308	23,75	1,6209	17,38	4,8164	28,62
Fenilalanina*	0,5590	9,28	1,057	9,19	1,4487	8,60
Lizina*	0,8709	14,45	1,1366	12,19	2,2718	13,49
Histidina*	0,3820	6,34	0,6633	7,11	0,9104	5,41
Arginina*	1,0101	16,77	2,2131	23,73	2,6389	15,67
Acid glutamic**	1,88	33,3	2,53	23,27	4,5	13,03
Acid aspartic**	0,795	14,0	1,189	10,85	4,510	23,76
Serina**	0,551	9,76	0,919	8,45	2,810	14,80
Glicina**	0,800	14,18	1,375	12,6	1,438	7,57
Alanina**	1,036	18,36	1,695	15,5	2,640	13,90
Cisteina**	0,043	0,76	0,064	0,58	3,261	17,17
Prolina***	0,800	12,44	1,230	13,01	0,093	0,48
Tirozina***	0,405	6,30	0,441	4,66	2,291	12,96
Ornitina***	0,0432	0,67	0,126	1,33	2,29	12,95
Amoniac***	0,119	1,85	0,245	2,59	0,113	0,63
Suma aminoacizilor esențiali *	6,023		13,31			16,83
Suma aminoacizilor imunoactivi **	5,517		8,345			15,341
Suma aminoacizilor neesențiali ***	6,426		9,455			16,830

La cultivarea levurii în prezența nanoparticulelor ZnO <50 nm în concentrații de 20 mg/L și 70 mg/L s-a constatat sporirea cantitativă a aminoacizilor comparativ cu proba martor. Suma aminoaciziilor esențiali în biomasa levurii la cultivarea în prezența NP ZnO <50 nm constituie 13,31 mg/100 mg, și respectiv, 16,8307 mg/100 mg fiind cu 120-179% superioară variantei de control. Valorile cantitative ale aminoacizilor imunoactivi au crescut semnificativ și constituie 10,87-18,98 mg/100 mg, depășind varianta control cu 92-236%. Aminoacizii proteinogeni, la cultivarea levurii în prezența concentrație de 20 mg/L constutue 18,77 mg/100

mg în biomasa produsă și 34,50 mg/100 mg la cultivarea tulpinii cu utilizarea concentrației de 70 mg/L, fiind cu 50-177% superioară variantei control (tab.3.13).

Generalizând rezultatele obținute putem afirma că NP ZnO <50 nm în concentrațiile studiate influențiază semnificativ căile de biosinteză intracelulară a proteinelor. Stimularea reprezentativă a ponderii aminoacizilor (în special, a acidului aspartic/glutamic, treoninei, leucinei, lizinei, argininei și histidinei) poate fi explicată prin răspunsul metabolic intracelular a levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 la stresul provocat la aplicarea concentrațiilor ridicate a NP ZnO (<50 nm), efect semnificativ se observă la aplicarea concentrației de 70 mg/L. Rezultatele obținute sunt în concordanță cu datele din literatura de specialitate conform cărora interacțiunea NP metalice cu plante și microorganisme induce stres și conduc la accelerarea diferiților metaboliți, inclusiv aminoacizi [344].

3.4. Sinteza carbohidraților la levurile *Rh. gracilis* sub influența nanoparticulelor ZnO

O altă componentă celulară importantă sunt carbohidrații, care reglează mecanismele celulare, în special controlează sinteza diferitor substanțe, creșterea și multiplicarea celulară. Conținutul de carbohidrați din biomasa levuriană caracterizează starea fiziologică fiind necesar pentru funcționarea corectă a celulelor.

Conform din rezultatelor obținute în experimentele noastre se poate observa că NP ZnO <50 nm aplicate în limitele concentrațiilor 5-20 mg/L contribuie la sporirea cu 17-19% a conținutului de carbohidrați la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03. Efect semnificativ poate fi observat și la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, la care cantitatea carbohidraților acumulați în biomasă crește cu până la 32% față de proba martor. În probele experimentale în care concentrația nanoparticulelor a constituit 50-70 mg/L, se observă o micșorare relativ moderată a cantității de carbohidrați acumulată în biomasa levurilor. Astfel putem deduce, că concentrația eficientă a nanoparticulelor ZnO (<50 nm) pentru stimularea procesului de biosinteză a carbohidraților se situează la nivelul de 20 mg/L (fig. 3.11).

Cercetările au pus în evidență trendul pozitiv al procesului de biosinteză al carbohidraților și în variantele în care s-au aplicat NP ZnO cu dimensiuni <100 nm în concentrațiile de la 1-10 mg/L. Cantitatea carbohidraților acumulați în biomasa levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 crește cu până la 18-20%, față de martor. Efect similar poate fi observat și asupra tulpinii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 la care conținutul de carbohidrați sporește cu până la 21,4% (fig. 3.11). În probele experimentale în care concentrația nanoparticulelor a constituit 30 mg/L, se observă o micșorare relativ moderată a cantității acestora acumulată în biomasa ambelor levuri studiate. Astfel putem

concluziona, că concentrația eficientă a nanoparticulelor ZnO (<100 nm) pentru stimularea procesului de biosinteză a carbohidraților este de 10 mg/L.

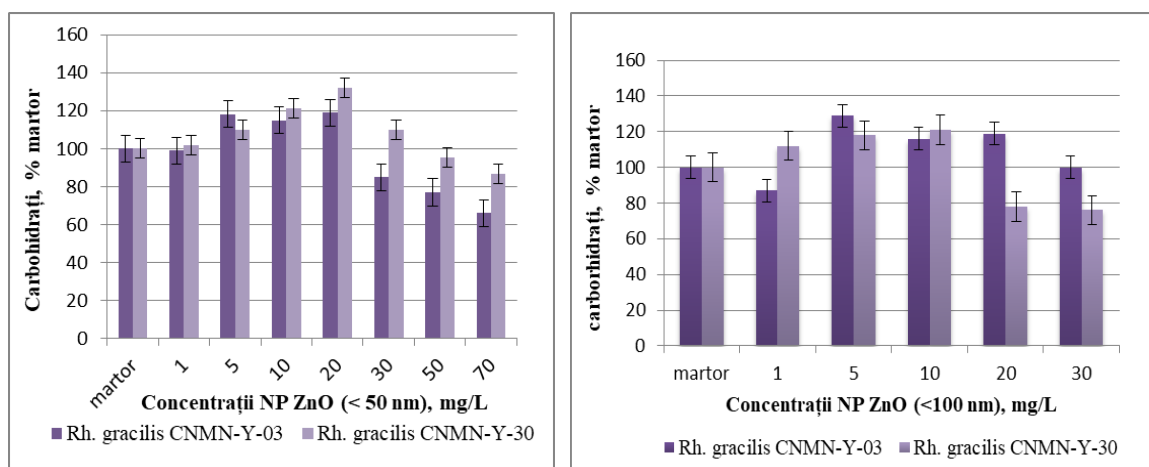


Fig. 3.11. Valorile procentuale față de martor ale acumulării carbohidraților în biomasa levurilor *Rh. gracilis* sub acțiunea nanoparticulelor ZnO în funcție de dimensiuni și concentrație

Probabil, la tulpinile de levuri din genul *Rhodotorula* activizarea proceselor de biosinteză a carbohidraților se produce pentru a evita stresul oxidativ produs de NP ZnO în concentrații mari. Rezultatele sunt confirmate și de datele din literatura de specialitate în care aplicarea NP ZnO în concentrații mici de 0,05% sunt mai eficiente asupra procesului de sinteză a carbohidraților la plantele *Moringa peregrina* [120].

3.5. Sinteza carotenoizilor la levurile *Rh. gracilis* sub influența nanoparticulelor ZnO

Un important rol protector a celulelor levurilor *Rh. gracilis* de acțiunea factorilor nocivi le revine pigmentilor carotenoizi, care datorită structurii lor acționează ca antioxidanți micromoleculari care protejează membrana, captează radicalii O₂ și peroxil [195]. 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 ZnO în funcție de dimensiuni și concentrație, în procesul de cultivare a levurilor *Rh. gracilis*, s-a cercetat formarea de pigmenți carotenoidici intracelulari, conținutul de β – caroten, torulină și torularodină.

Analiza acțiunii nanoparticulelor ZnO <50 nm asupra conținutului de pigmenți carotenoidici la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 a relevat că, concentrațiile de 1...30 mg/L nu modifică esențial desfășurarea procesului de biosinteză (fig.3.12). La tulpina *Rh. gracilis*

CNMN-Y-30, la cultivare pe mediul YPD în prezența nanoparticulelor ZnO (<50 nm), conținutul de pigmenți carotenoizi se modifică în funcție de concentrațiile utilizate. Cercetările au pus în evidență efect pozitiv al procesului de biosinteză al pigmenților carotenoizi în variantele în care s-au aplicat nanoparticule ZnO (<50 nm) în concentrațiile 5 mg/L - 10 mg/L. Cantitatea de pigmenți acumulați în biomasa levuriană crește cu până la 29%, față de proba control (fig. 3.12). Creșterea concentrațiilor nanoparticulelor ZnO până la 30-70 mg/L, condiționează inhibarea proceselor de biosinteză a pigmenților, asociate cu scăderea cantității de carotenoide cu până la 18% față de martor.

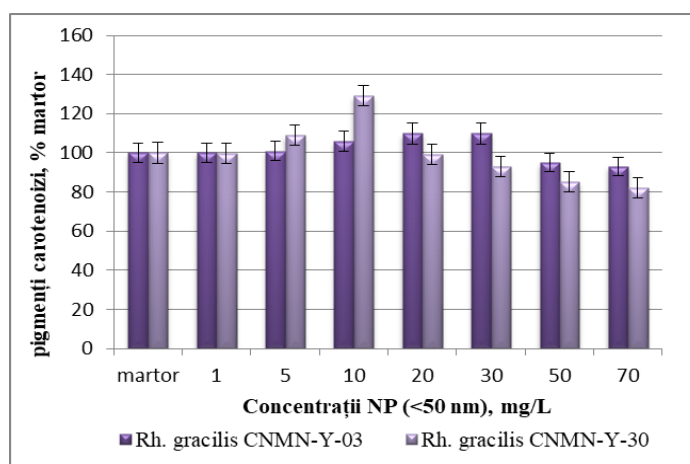


Fig. 3.12. Valorile procentuale față de martor ale acumulării carotenoidelor în biomasa levurilor *Rh. gracilis* sub acțiunea nanoparticulelor ZnO <50 nm în funcție concentrație

Analiza influenței NP ZnO <50 nm asupra conținutului de pigmenți carotenoizi la aplicarea concentrațiilor de 5.0-10 mg/L, indică o creștere a β -carotenului cu 12-39% (fig 3.13). Efect analogic a fost obținut și pentru ceilalți doi pigmenți analizați torulina și torularodina cantitatea cărora crește cu până la 38% și respectiv 36%, comparativ cu proba control. Astfel, rezultatele obținute indică că pentru stimularea procesului de biosinteză a pigmenților carotenoizi concentrația eficientă a NP ZnO (<50 nm) este de 10 mg/L.

În ceea ce privește efectul nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni <100 nm s-a stabilit că în cazul aplicării la mediul de cultivare a 5-20 mg/L de nanoparticule, cantitatea de carotenoide se modifică nesemnificativ, se observă o creștere cu 5-6% pentru tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 și respectiv cu 8-11% la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 (fig. 3.14). Însă, suplimentarea mediului de cultură cu concentrația de 30 mg/L de nanoparticule, inițiază o scădere esențială cu 29% și respectiv 36,3%.

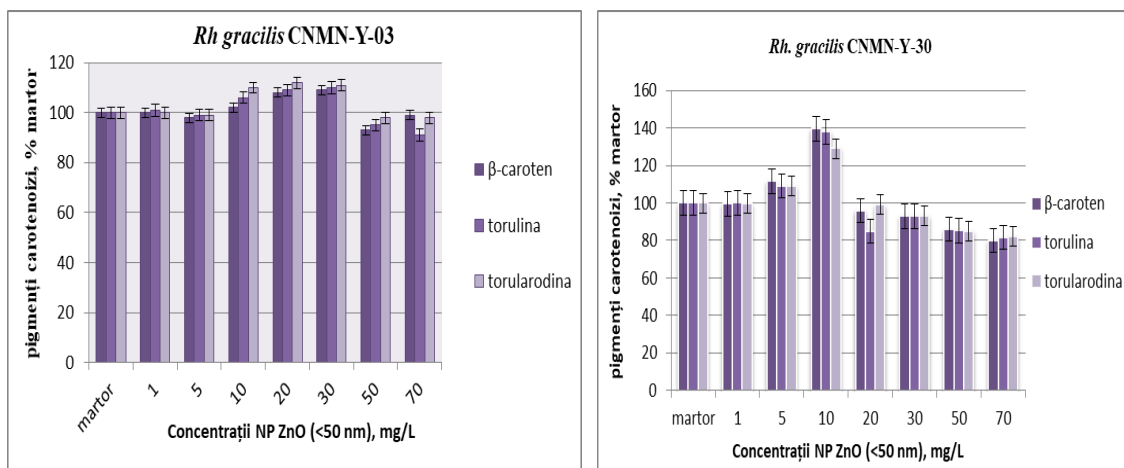


Fig. 3.13. Valorile procentuale față de martor ale β -carotenului, torulinei și torularodinei în biomasa levurilor *Rh. gracilis* sub acțiunea nanoparticulelor ZnO <50 nm în funcție concentrație

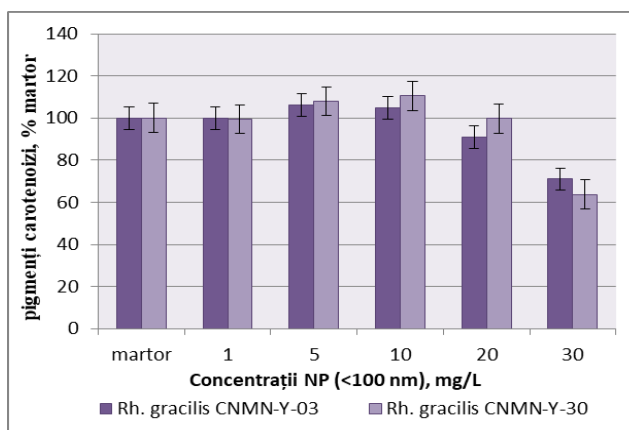


Fig. 3.14. Valorile procentuale față de martor ale acumulării carotenoidelor în biomasa levurilor *Rh. gracilis* sub acțiunea nanoparticulelor ZnO <100 nm în funcție concentrație

Conținutului componentelor de bază a pigmentilor carotenoidici, β -caroten, torulină și torularodină, a stabilit unele modificări sub influența nanoparticulelor în funcție de concentrațiile aplicate. β -carotenul, unul din indicii de bază a răspunsului celulei levurii, sub acțiunea concentrației de 30 mg/L, își reduce cantitatea la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 cu 29%, iar conținutul de torularodină se micșorează și mai mult cu 43%. Efect semnificativ poate fi observat și la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 la care cantitatea de β -caroten scade cu 33%, iar conținutul de torulină se micșorează cu 51 % (fig. 3.15).

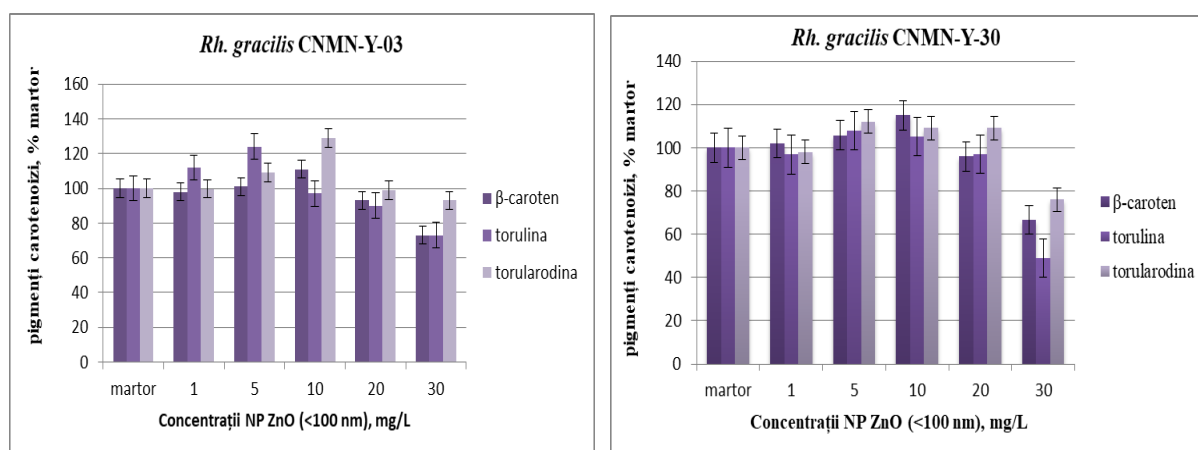


Fig. 3.15. Valorile procentuale față de martor ale β -carotenului, torulinei și torularodinei în biomasa levurilor *Rh. gracilis* sub acțiunea nanoparticulelor ZnO <100 nm în funcție concentrație

Astfel, din rezultatele experimentale concluzionăm că dimensiunile mari și concentrațiile ridicate de 30 -70 mg/L a nanoparticulelor examinate afectează căile de formare a pigmentilor carotenoizi. Probabil, că radicalii liberi induc modificări în mecanismul de formare a legăturilor duble conjugate ce răspund de sinteza carotenoidelor.

3.6. Activitatea enzimelor antioxidante catalaza și superoxid dismutaza la *Rh. gracilis* sub influența nanoparticulelor ZnO

Un indice important pentru evaluarea influenței nanoparticulelor ZnO este studiul asupra activității enzimelor antioxidante catalaza și superoxid dismutaza (SOD). Aceste enzime compun mecanismul de apărare împotriva excesului de oxigen/azot reactiv cauzat de stresul oxidativ [127, 205]. Există mai multe studii *in vitro* care au demonstrat efecte toxice și inducerea stresului oxidativ de către nanoparticulele oxizilor metalici [174, 244]. Stresul oxidativ provoacă modificări ca urmare a impactului nanoparticulelor și contribuie la dezechilibrul dintre formarea radicalilor liberi și mecanismele de apărare antioxidante ale celulelor [91, 316]. Pentru utilizarea în siguranță a nanoparticulelor este important menținerea echilibrului între cantitatea oxigenului reactiv și apărarea antioxidantă care este indispensabilă pentru funcționarea normală a celulelor.

Rezultatele studiului efectelor nanoparticulelor ZnO <50 nm și <100 nm asupra activității enzimelor antioxidante catalaza a demonstrat reacții diferite asupra levurilor din genul *Rhodotorula*. Din rezultatele obținute putem deduce că sub influența nanoparticulelor ZnO <50 nm, în concentrațiile de 10...50 mg/L activitatea catalazei la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 crește cu 10-50 % (fig. 3.16). Concentrația de 70 mg/L nanoparticule invocă o scădere bruscă a

activității catalazei, cu până la 36% sub valorile de control, ceea ce demonstrează că nanoparticulele în concentrații mari perturbază procesele metabolice în celulă.

Rezultate similare s-au înregistrat și pentru tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30. În cazul dat, la aplicarea concentrațiilor mici de nanoparticule 1-5 mg/L, nivelul activității catalazei în probele experimentale este similar matorului. Dar, în cazul creșterii concentrațiilor de nanoparticule 30...70 mg/L activitatea catalazei se reduce cu până la 33%, comparativ cu proba mator (fig. 3.16).

Analiza comparativă a rezultatelor influenței nanoparticulelor cu dimensiuni mai mari ZnO <100 nm, a demonstrat că la aplicarea concentrațiilor de 10...30 mg/L activitatea enzimei catalaza la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 crește moderat, cu 14-35% comparativ cu proba de control (fig. 3.16). Efect echivalent poate fi observat și la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 la aplicarea concentrațiilor de 10...20 mg/L, însă concentrația de 30 mg/L inițiază o scădere bruscă a enzimei cu 30%, ceea ce indică că mecanismele de apărare antioxidantă a levurii este la limită.

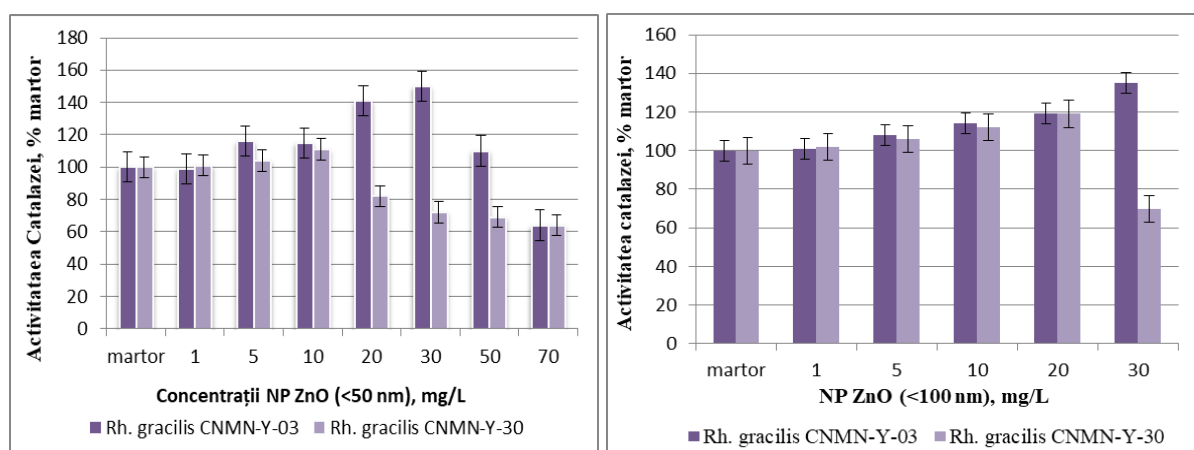


Fig. 3.16. Nivelul activității catalazei la *Rh. gracilis* la acțiunea NP ZnO în funcție de dimensiune și concentrație

Analiza rezultatelor cuantificării cantității de SOD sub influența nanoparticulelor ZnO <50 nm, au pus în evidență tendința de creștere în probele experimentale la aplicarea concentrațiilor de la 5 mg/L la 70 mg/L (fig. 3.17). Maximul de activitate a SOD a fost înregistrat la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 la aplicarea concentrațiilor de 20...30 mg/L care induc o creștere cu 81-96%, comparativ cu proba mator. Pentru tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 creșterea maximă a activității SOD cu 53% s-a observat în variantele în care s-a utilizat concentrația de 20 mg/L nanoparticule. Creșterea semnificativă a activității SOD indică că

nanoparticulele nu numai generează oxigen reactiv dar în concentrații ridicate blochează statutul antioxidant celular de apărare.

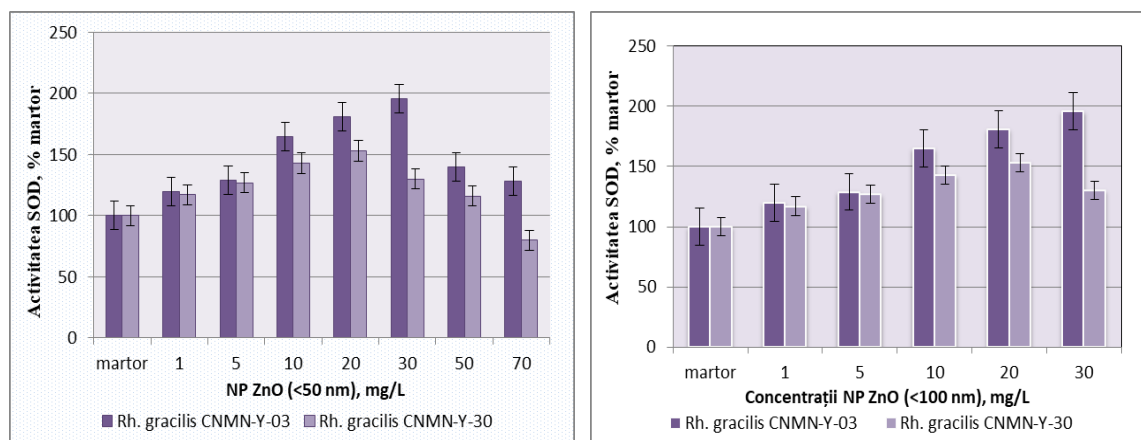


Fig. 3.17. Nivelul activității SOD la *Rh. gracilis* la acțiunea NP ZnO în funcție de dimensiuni și concentrație

În cazul aplicării NP ZnO <100 nm la fel a fost demonstrat că activitatea enzimei SOD la levuri crește sub influența concentrațiilor cercetate. Efect semnificativ a fost înregistrat pentru tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, care la suplimentarea mediului nutritiv cu 20 mg/L NP ZnO activitatea crește cu 85%. La tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 s-a stabilit că sub influența concentrațiilor de 10-20 mg/L NP ZnO activitatea SOD crește cu 68% comparativ cu martorul.

Rezultatele obținute demonstrează că nanoparticulele ZnO <50 nm și ZnO <100 nm afectează substanțial sistemul antioxidant al levurilor studiate comparativ cu martorul. Astfel se poate observa că nanoparticulele oxidului de zinc acționează diferit asupra activității enzimelor antioxidante catalaza și SOD în dependență de concentrații. Efect negativ semnificativ similar la ambele tulpini se poate observa în cazul concentrațiilor în creștere. În aceste cazuri, funcția de a neutraliza efectele negative ale nanoparticulelor asupra celulei se diminuează, în consecință pot apărea perturbări în procesele metabolice în celulă datorat faptului acumulării în cantități mari a peroxidului de hidrogen.

Astfel, se poate concluziona că mecanismul de răspuns adaptiv al levurilor depinde de dimensiunile și concentrația NP ZnO. Dimensiunile descrescătoare și concentrațiile mari ale nanoparticulelor ZnO conduc la creșterea reactivității nanoparticulelor față de celulă.

3.7. Procedeu de cultivare a levurilor *Rh. gracilis* cu utilizarea nanoparticulelor ZnO

Dobândirea de către levuri sub influența nanoparticulelor ZnO a unor capacități metabolice noi, permite modelarea proceselor biosintetice în celulă. În prezent o importanță deosebită au cercetările destinate dezvoltării biotehnologiilor de producere a proteinelor microbiene. Este deja bine cunoscut faptul că proteinele joacă un rol crucial în toate procesele biologice care apar în organismele vii, ceea ce conduce la necesitatea producerii și implementării lor în diverse domenii ale economiei. Piața utilizării finale a proteinelor este larg extinsă cu numeroase aplicații industriale și comerciale [107, 219]. Cererea industrială se află pe o creștere continuă condusă de necesitatea tot mai mare de a găsi soluții durabile pentru producere.

Rezultatele experiențelor efectuate anterior, în care s-a demonstrat că nanoparticule ZnO joacă un rol important în procesul de sinteză a proteinelor și a conținutului de aminoacizi esențiali, au permis de a propune două procedee de sporire având ca obiect biotehologic tulpinile de levuri *Rh. gracilis*.

Procedeu de sporire a conținutului de proteine la levurile Rh. gracilis

Se prepară mediul nutritiv YPD ce conține g/L: peptonă – 20,0; glucoză – 20,0; extract de drojdie - 10 ml; apă potabilă – 1.0 L, pH-ul 5.5. Mediul se inoculează cu celule a tulpinii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 crescute timp de 24 de ore pe mediul YPD cu densitatea 2×10^6 celule/ml în volum de 5%. Se adaugă în condiții sterile în calitate de factor stimulator nanoparticulele ZnO cu dimensiunea de <50 nm (Aldrich), suprafața specifică $10.8 \text{ m}^2/\text{g}$, în concentrație de 20.0 mg/L. Cultivarea tulpinii se realizează în baloane Erlenmeyer cu capacitate de 1.0 L în condiții de agitare continuă la 180...200 rot/min la temperatura de $+28...30^\circ \text{C}$, iluminare permanentă 2000 Lx în decurs de 72 ore. Biomasa se colectează prin centrifugare și se determină conținutul de proteine prin metoda Lowry [189].

În calitate de cea mai apropiată soluție servește procedeul de cultivare a tulpinii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 cu utilizarea mediului YPD suplementat cu 10-30 mg/L NP ZnO cu dimensiunea de 50 nm. Cultivarea submersă s-a realizat în baloane Erlenmayer, pe agitatoare rotative (200 rot/min) la temperatura $+25^\circ \text{C}$, cu nivelul de aerație 80.0...83.0 mg/L, în decurs de 120 ore [23]. Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că nu asigură realizarea pe deplin a potențialului de biosinteză a proteinei.

Procedeul propus asigură obținerea conținutului de proteine în biomasa levuriană *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 de 57.89%, fiind cu 23.1% superior variantei de control și pentru *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 de 61.95 cu 17%....32% superior variantei de control (tab. 3.12). Procedeul

de cultivare a levurilor *Rh. gracilis* cu utilizarea nanoparticulelor ZnO este confirmat de un brevet de invenție [17, 18].

Schema procedului de sporire a conținutului de proteine la levurile *Rh. gracilis* cu utilizarea NP ZnO <50 nm este redată în figura 3.18.

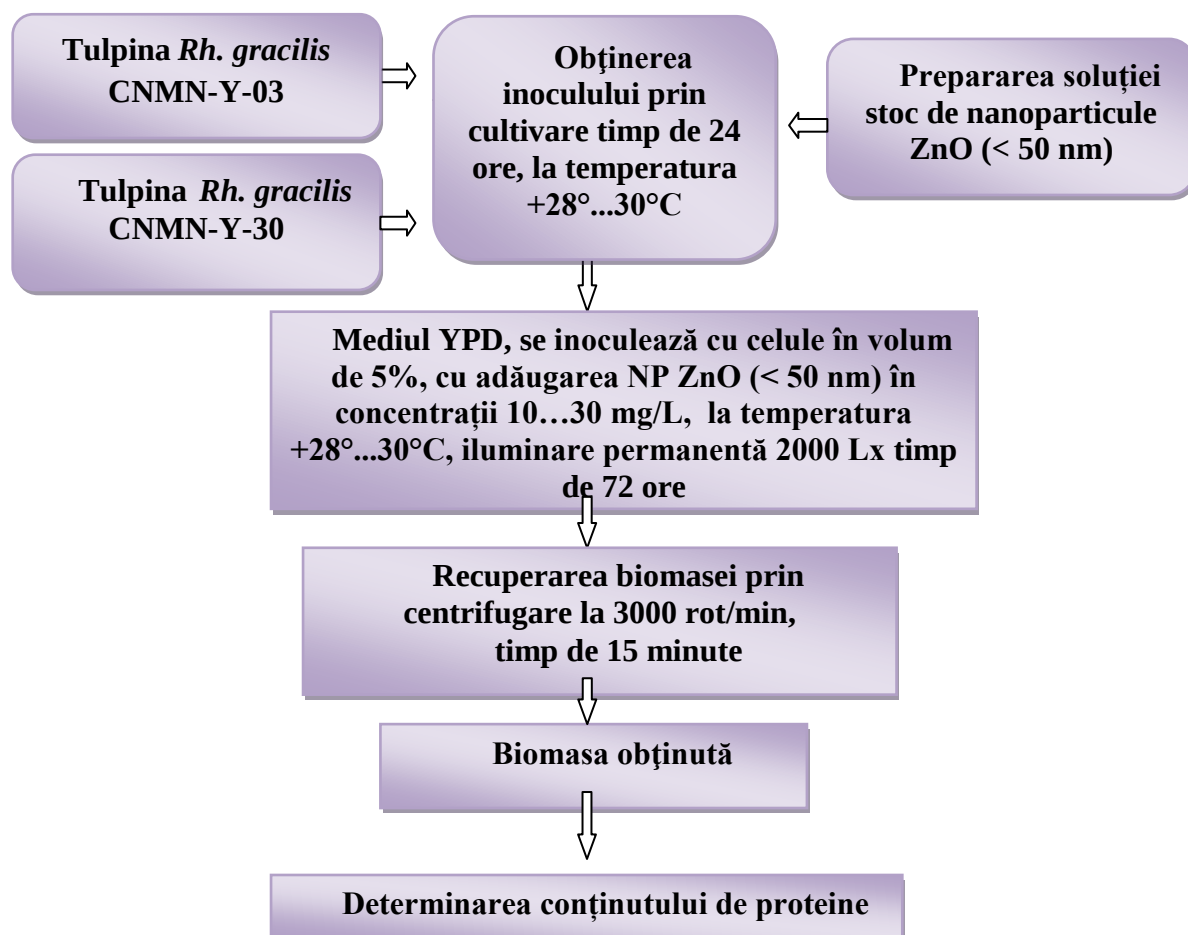


Fig. 3.18. Schema procedului de sporire a conținutului de proteine la levurile *Rh. gracilis* cu utilizarea NP ZnO <50 nm

Tabel 3.12. Efectele NP ZnO <50 nm asupra conținutului de proteine la tulpinile de levuri *Rhodotorula gracilis*

Variante	Concentrația, mg/l	<i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-30		<i>Rh. gracilis</i> CNMN-Y-03	
		Proteine, % în biomasa	%, control	Proteine, % în biomasă	%, control
NP ZnO <50 nm	10.0	49.43±0.48	105.1	59.58±0.50	126.7
	20.0	57.89±0.33	123.1	61.94±0.33	132
	30.0	51.36±0.42	109.2	54.78±0.42	117
Cea mai apropiată soluție	NP Fe ₃ O ₄ (30 nm) 0.5 mg/l	47.01±0.37	100	47.01±0.37	100

În continuare, a fost propus un procedeu de utilizarea NP ZnO în calitate de stimulator al biosintezei aminoacizilor esențiali la levurile *Rhodotorula gracilis*. Procedeu poate fi utilizat pentru obținerea aminoacizilor esențiali cu potențial înalt de aplicare în industria alimentară, farmaceutică, zootehnică și cosmetică etc.

Procedeu de sporire a conținutului de aminoacizi esențiali în biomasa levurilor *Rhodotorula gracilis*

Se obține suspensia de levuri a tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 crescută timp de 24 de ore pe mediul YPD. Ulterior, suspensia de levuri se inoculează în 200 ml mediu nutritiv YPD ce conține g/L: peptonă – 20,0; glucoză – 20,0; extract de drojdie - 10 ml; apă potabilă – 1.0 L, pH 5.5 în volum de 5%. Se adaugă în condiții sterile în calitate de factor stimulator nanoparticule ZnO cu dimensiunea de 50 nm în concentrație de 20.0 mg/L. Cultivarea tulpinii se realizează în baloane Erlenmeyer cu capacitate de 1.0 L în condiții de agitare continuă la 180...200 rot/min la temperatura de +28...30°C, în decurs de 72 ore. În calitate de control servește proba de biomasa levuriană din mediul nutritiv fără aplicarea nanoparticulelor.

Componența aminoacizilor în biomasa levurii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 fost analizată prin hidroliza acidă cu utilizarea analizatorului “AAA-339” al Firmei “Microtehnă” (Cehia). Cercetările au fost efectuate în colaborare cu Institutul de de Fiziologie și Sanocreatologie. Conținutul de aminoacizi a fost exprimată în mg/100 mg [131].

Conținutul aminoacizilor esențiali în biomasa levurii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 se caracterizează prin stimulare semnificativă la aplicarea concentrației de 20 mg/L de nanoparticule ZnO și constituie 13,310±0,18 mg/100 mg față de 8,90±0,21, fiind cu 32% superioară variantei de control.

Exemplul II

Se prepară mediul nutritiv steril YPD cu compoziția indicată în protocolul 1. În mediul preparat se adaugă nanoparticule de ZnO în concentrație de 70 mg/L. Inocularea și condițiile de cultivare sunt identice protocolului 1.

Conținutul maximal al aminoacizilor esențiali, a fost obținut la concentrația de 70 mg/L de nanoparticule ZnO și constituie 16,826±0,22 față de 8,90±0,21 fiind cu 89%, superioară variantei de control. Procedeu de sporire a conținutului de aminoacizi esențiali în biomasa levurilor *Rhodotorula gracilis* este confirmat de o cerere de brevet de invenție (5823 din 2020.02.18).

Așadar, problema pe care o rezolvă prezenta cercetare constă în elaborarea a 2 procedee de cultivare a levurilor pigmentate *Rh. gracilis*, aplicarea căruia asigură sporirea biosintezei proteinelor și aminoacizilor esențiali ce contribuie la lărgirea domeniilor de aplicare practică a

preparatelor proteice de origine levuriană. Impactul stimulator al nanoparticulelor oxidului de zinc se datorează proprietăților unice de a interacționa cu celule microbiene și de a induce modificări în procesele biochimice celulare, inclusiv componente proteice. Aplicarea nanoparticulelor oxidului de zinc la cultivarea tulpinii de levuri pigmentate oferă oportunități vaste pentru modelarea biosintezei proteinelor și utilizarea în diferite domenii ale biotehnologiei, industriei farmaceutice, alimentare și cosmetice.

Conform analizei comparative a rezultatelor obținute cu datele din literatura de specialitate [23, 85] putem afirma că procedeul nou elaborat de sporire a conținutului de proteine în biomasa tulpinilor de levuri *Rh. gracilis* asigură un nivel înalt al cantității acestui compus este rapid, simplu, cu sinecost redus de producție și potențial înalt de aplicare practică în diferite domenii ale biotehnologiei, industriei farmaceutice, alimentare și cosmetice.

3.8. Concluzii la capitolul 3

1. Rezultatele validării demonstrează că metodele testate de determinare a viabilității celulare, conținutului de proteine și activității enzimei antioxidante catalaza sunt exacte, precise, robuste și valide și pot fi utilizate pentru testarea influenței nanoparticulelor oxizilor metalici asupra levurilor.
2. Efectul nanoparticulelor ZnO cu dimensiunile <50 nm și <100 nm asupra tulpinilor de levuri pigmentate *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 și *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 se manifestă în funcție de dimensiuni și concentrațiile utilizate.
3. Vulnerabilă la acțiunea nanoparticulelor ZnO este viabilitatea celulelor în primele 24 ore de contact specifică ambelor dimensiuni de nanoparticule. Datele obținute privind productivitatea și efectul asupra caracterelor morfologice celulare și coloniale a levurilor din genul *Rhodotorula*, la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO au evidențiat unele diferențe în efectele produse în funcție de obiectul biotehnologic cercetat.
4. NP ZnO (<50 nm) și (<100 nm) stimulează procesele de biosinteză a unor componente celulare la tulpinile studiate. Concentrațiile de 10-20 mg/L prezintă oportunitate de aplicare în tehnologia de cultivare a levurilor, din punct de vedere al sporirii cantităților de proteine cu 38-57%, carbohidrați cu 17-32%, pigmenti carotenoizi cu până la 29%, comparativ cu martorul. Concentrațiile nanoparticulelor ZnO de 30-70 mg/L, inițiază inhibarea proceselor de biosinteză a componentelor menționate.
5. Estimarea gradului de influență a nanoparticulelor ZnO asupra activității enzimelor antioxidante a stabilit reacții diferite la tulpinile de levuri din genul *Rhodotorula*. Aplicarea NP ZnO (<50 nm) în concentrațiile de 10...50 mg/L induc creșterea activității

catalazei cu 20-50% la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 și o reducere cu până la 33% pentru tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30. În cazul aplicării NP ZnO (<100 nm) se înregistrează sporirea activității catalazei cu 14-35% și activității superoxid dismutazei cu 68% la *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 și respectiv cu 12-19% activitatea catalazei și cu 85% activitatea superoxid dismutazei la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30.

6. În premieră se propune 2 procedee de sporire a conținutului de proteine și aminoacizi la levurile de interes biotehnologic din genul *Rhodotorula* cu aplicarea în calitate de factor catalizator al nanoparticulelor ZnO <50 nm. Procedele elaborate se recomandă a fi utilizate și în tehnologii de producere din levuri a altor bioproduse.

4. EFECTELE NANOPARTICULELOR Fe_3O_4 ASUPRA TULPINII *RH.*

GRACILIS CNMN-Y-30

O categorie de nanoparticule de interes major reprezintă nanoparticulele oxidului de fier (Fe_3O_4). În acest sens, se poate aștepta ca nanoparticulele de Fe_3O_4 să poată avea proprietăți mai puternice optice, magnetice, termice, electrice și catalitice decât soluțiile obișnuite de ioni de fier [226, 281].

În ciuda faptului că proprietățile compușilor de Fe_3O_4 sunt bine cunoscute și sunt utilizate o perioadă îndelungată de oameni, mecanismele lor de acțiune biochimică au fost studiate doar parțial. NP Fe_3O_4 posedă un spectru de proprietăți antibacteriene, antiinflamatoare, de absorbție, anticancerigene, biosensori, participă în repararea țesuturilor și proliferarea celulelor și prezintă interes pentru aplicare în diverse domenii [84, 155, 236].

Însă acțiunea nanoparticulelor Fe_3O_4 și interacțiunea acestora cu sistemele biologice este încă neclară. Astfel, expunerea directă la acțiunea nanoparticulelor conduc la necesitatea urgentă de a înțelege mecanismul de influență și a evalua riscurile utilizării. O importanță majoră pentru determinarea potențialelor efecte ale nanoparticulelor asupra organismelor vii o au cercetările cu aplicarea modelelor experimentale biologice [76, 147].

De asemenea prezintă interes cercetările detaliate ale efectelor nanoparticulelor Fe_3O_4 asupra dezvoltării și producerii de metaboliți cu destinație biotehnologică.

În acest sens, sunt actuale cercetările de elucidare a sensibilității levurilor pigmentate din genul *Rhodotorula* la acțiunea nanoparticulelor Fe_3O_4 . În calitate de repere se propun diferiți indicatori cum ar fi cei microbiologici și biochimici.

Scopul capitolului constă în evaluarea efectelor nanoparticulelor Fe_3O_4 asupra tulpinii de interes pigmentate *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 și aprecierea perspectivelor de utilizare în biotehnologie.

4.1. Viabilitatea, producția de biomasă și caracterele morfologice a tulpinii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe_3O_4 cu diferite dimensiuni

În următoarele cercetări au fost studiate efectele nanoparticulelor Fe_3O_4 în funcție de concentrații și dimensiuni. Rezultatele obținute asupra viabilității celulare a levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 sunt prezentate în fig. 4.1.

Analiza datelor demonstrează că sub influența nanoparticulelor Fe_3O_4 (10 nm) în concentrații de 0,5-15 mg/L, după 6 și 24 de ore de cultivare submersă, viabilitatea a scăzut cu

15-19% și respectiv cu 23-40%, comparativ cu proba martor. Reducerea semnificativă a viabilității s-a înregistrat și la aplicarea concentrațiilor de 20-30 mg/L, care rețin multiplicarea celulelor pe parcursul perioadei cercetate. efect mai pronunțat se observă după 24 ore de cultivare când viabilitatea se reduce cu 83,6...86,9% (fig. 4.1).

În experiențele cu nanoparticulele Fe_3O_4 (30 nm), viabilitatea celulelor levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, nu s-a modificat esențial în comparație cu martorul, cu excepția concentrației de 15 mg/L care reține reproducerea celulelor în primele 6 ore de cultivare.

Rezultatele obținute la aplicarea nanoparticulelor Fe_3O_4 de 50-100 nm au evidențiat că concentrațiile de la 5 la 30 mg/L au capacitatea de a stimula substanțial viabilitatea celulelor (fig. 4.1.).

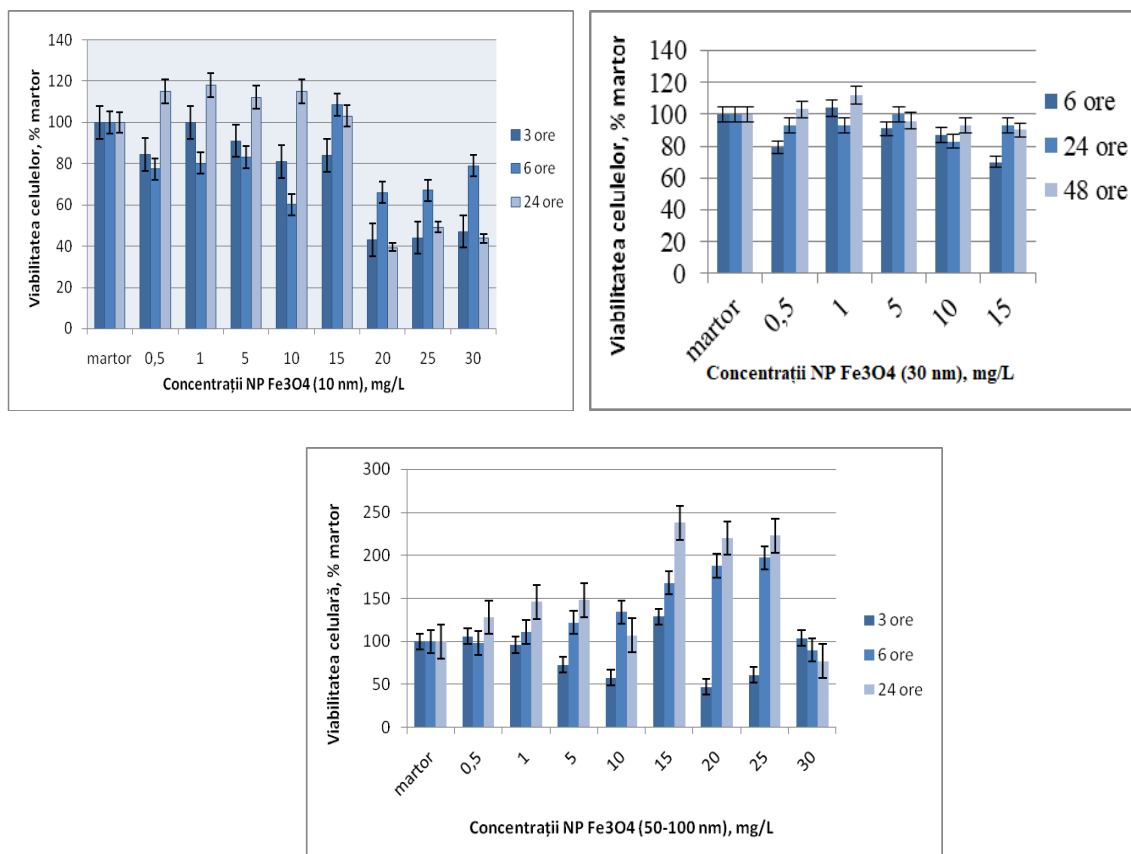


Fig. 4.1. Valorile procentuale față de martor a viabilității *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 la cultivare în prezența nanoparticulelor Fe_3O_4 cu diferite dimensiuni

Astfel, rezultatele obținute referitor la viabilitatea levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 au demonstrat că nivelul de acțiune a nanoparticulelor Fe_3O_4 este determinat de dimensiune, concentrație și durata de contact. Efect pronunțat asupra viabilității celulelor levurii studiate a fost înregistrat în experimentele în care au fost utilizate nanoparticule Fe_3O_4 (10 nm) în

concentrații ridicate. Un argument ar fi că nanoparticule Fe_3O_4 (10 nm) pătrund mult mai ușor în celulă exercitând efecte toxice printr-un număr de modificări celulare ce compromit capacitatea celulelor de a se diviza. Aceleași rezultate sunt descrise în alte studii din literatura de specialitate [54].

Studiul privind analiza producției de biomasă, obținută după 120 ore de cultivarea levurii în profunzime, a relevat unele diferențe în efectele produse de către nanoparticule Fe_3O_4 cu diferite dimensiuni. Conform rezultatelor, nanoparticulele Fe_3O_4 (10 nm) în concentrații mici manifestă acțiune stimulatorie asupra productivității levurii, sporul cel mai înalt de 13,3 -14,8 % față de martor s-a înregistrat pentru 0,5-1 mg/L (fig. 4.2). Odată cu mărirea concentrației de nanoparticule se observă o micșorare nesemnificativă a conținutului de biomasă levuriană, valorile sunt situate în limita erorii admisibile.

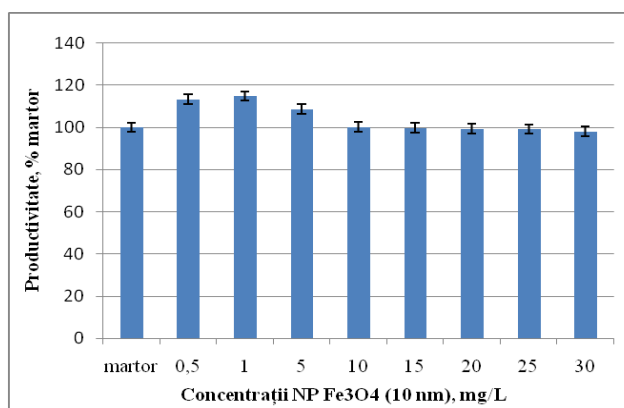


Fig. 4.2. Valorile procentuale față de martor a producției de biomasă *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 la cultivare în prezența nanoparticulelor Fe_3O_4 (10 nm)

Studiul influenței nanoparticulelor Fe_3O_4 cu dimensiunea de 30 nm a relevat că concentrațiile nanoparticulelor utilizate la cultivarea tulpinii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 nu inițiază careva dereglări esențiale ale productivității (fig. 4.3).

Analiza datelor privitor la influența nanoparticulelor Fe_3O_4 (50-100 nm) a evidențiat, că levura reacționează pozitiv la concentrațiile aplicate în experimente. Conform rezultatelor obținute, nanoparticulele Fe_3O_4 (50-100 nm) în concentrațiile 0,5-30 mg/L manifestă acțiune stimulatorie asupra productivității, sporul cel mai înalt de 24% față de martor s-a înregistrat pentru concentrația 20 mg/L (fig. 4.3).

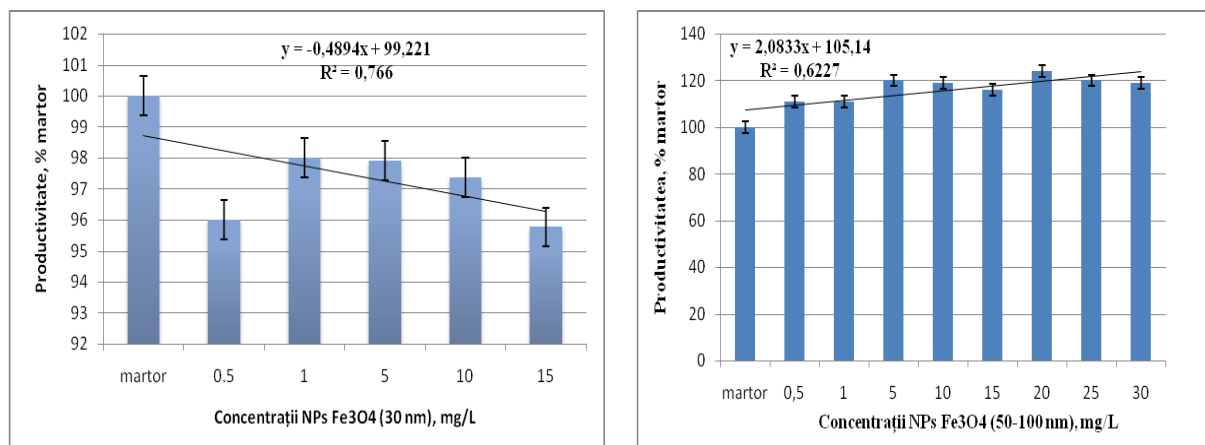


Fig. 4.3. Valorile procentuale față de martor a producției de biomasă *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 la cultivare în prezența nanoparticulelor Fe₃O₄ cu diferite dimensiuni

Pentru a stabili rolul concentrațiilor nanoparticulelor în procesul de acumulare a biomasei celulare a fost efectuată analiza corelațională. Raportul corelațional confirmă dependența valorilor productivității cu cele ale concentrațiilor nanoparticulelor Fe₃O₄ coeficientul de determinare fiind moderat $R^2 = 0,766$ respectiv $R^2 = 0,622$.

Pentru completarea rezultatelor obținute, în continuare, ne-am propus să studiem modificările induse de acțiunea nanoparticulelor Fe₃O₄ asupra caracterelor morfologice ale culturii. Examine la microscop, celulele *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, crescute submers pe mediul YPD, au prezentat forme alungite sau globulare, dispuse izolat sau perechi, cu dimensiuni variabile. Cultura martor prezintă celule tipice cu dimensiuni ale lungimii celulei care variază între 4 - 17,6 (media 8,07) micrometri și lățimii de 3-5 (media 3,4) micrometri. Aria medie a celulei în varianta martor constituie 21,53 micrometri pătrați (tab. 4.1.). Acțiunea nanoparticulelor Fe₃O₄ (10 nm) este confirmată prin modificarea dimensiunilor celulelor și modul de aglomerare, îndeosebi efectul este mai evident la contactul celulelor cu concentrația de 15 mg/L. În variantele experimentale, lungimea celulelor variază în medie de la 2,1 până la 19,5 micrometri, iar lățimea medie de la 1,3 la 6,4 micrometri. Aria medie a celulelor se micșorează și se află în limitele 14,13- 18,68 micrometri pătrați, ceea ce constituie 65,6-86 %, față de martor (tab. 4.1).

Tabel 4.1. Dimensiunile medii ale celulelor tulpinii de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, la cultivare timp de 120 ore în prezența nanoparticulelor Fe₃O₄ (10 nm)

Concentrația nanoparticulelor Fe ₃ O ₄	Celule examinat, (n)	Lungimea medie (D), μm	Lățimea medie (d), μm	Aria celulei, (A=π/4xDd)	
				μm ²	%, la martor
Martor	26	8,07±3,49	3,4±0,61	21,53	100
5 mg/L	33	6,01±2,74	3,96±0,87	18,68	86
10 mg/L	34	5,25±1,42	4,32±1,01	17,8	82,6
15 mg/L	36	5,44±2,37	3,31±0,9	14,13	65,6

În cazul examinării influenței NP Fe₃O₄ (50-100 nm) sunt observate modificări al dimensiunilor celulelor, lungimea celulelor se încadrează în limitele de la 7,85 până la 8,05 micrometri, iar lățimea medie variază de la 3,5 până la 4,05 micrometri. Aria medie a celulelor crește până la 24,9 micrometri patrați, comparativ cu varianta martor cu 22 micrometri patrați (tab. 4.2).

Tabel 4.2. Dimensiunile medii ale celulelor tulpinii de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, la cultivare timp de 120 ore în prezența nanoparticulelor Fe₃O₄ (50-100 nm)

Concentrația nanoparticulelor Fe ₃ O ₄ (50-100 nm), mg/L	Celule examinate, (n)	Lungimea medie (D), μm	Lățimea medie (d), μm	Aria celulei, (A=π/4xDd)	
				μm ²	% la martor
Martor	27	8,01±1,95	3,5±1,07	22,00	100
1.0	26	7,90±1,25	3,6±1,45	22,3	101
5.0	25	8,05±1,10	3,6±0,98	22,7	103
10.0	31	8,00±1,01	3,75±0,56	23,55	107
20.0	29	8,02±1,04	3,80±0,48	23,9	109
30.0	34	7,85±1,55	4,05±0,75	24,9	113

Rezultatele obținute prin metoda de microscopie au fost confirmate și completate cu imagini ale morfologiei celulelor, provocate de acțiunea nanoparticulelor Fe₃O₄, cu diferite dimensiuni. O categorie de modificări observate la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 cultivată în prezența nanoparticulelor Fe₃O₄ cu dimensiunea de 10 nm, este revărsarea parțială sau totală a conținutului celular ca urmare a deteriorării peretelui și membranei celulare. În imaginile din figura 4.4. concentrațiile 10 și 15 mg/L se observă fragmente de celule lipsite de conținut total sau parțial. O altă particularitate a acțiunii nanoparticulelor Fe₃O₄ constă în formarea unor aglomerări de celule, mai pronunțate fiind cele intervenite la contactul cu concentrațiile de 10 și 15 mg/L mediu de cultură. Rezultatele sunt confirmate și de datele din literatura de specialitate în care aplicarea nanoparticulelor oxizilor metalici formează aglomerări ale celulelor, degradarea și ruperea peretelui celular [88, 91].

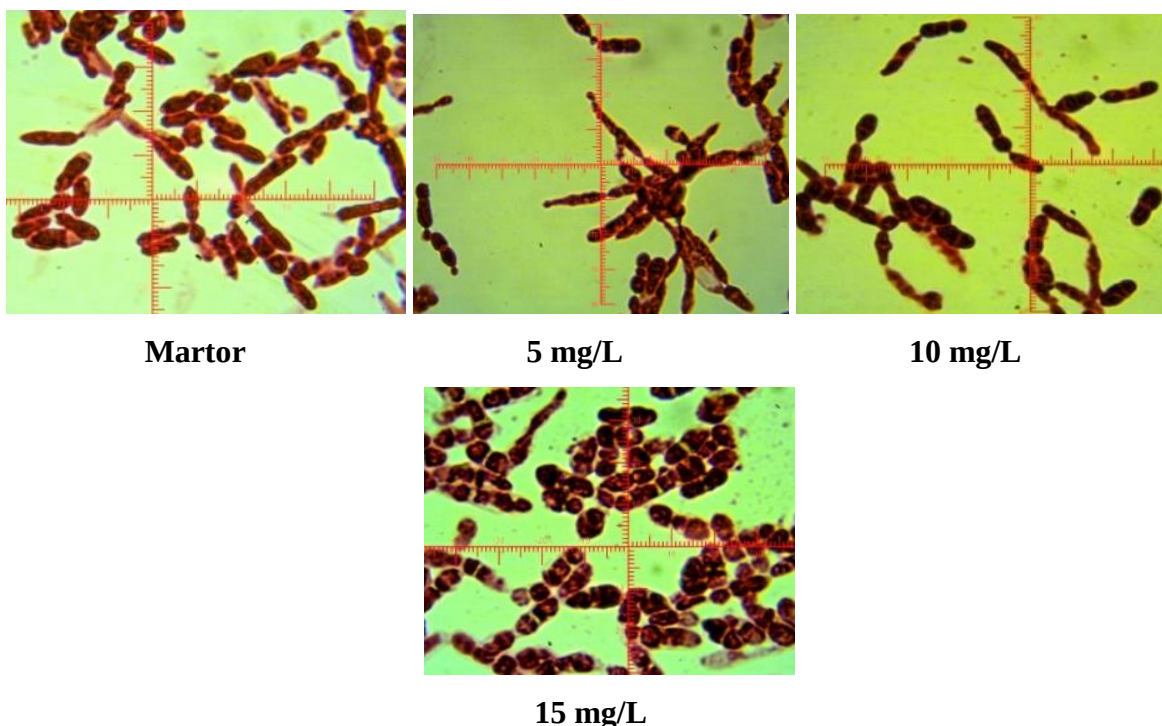


Fig. 4.4. Caractere morfologice ale celulelor *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, sub acțiunea nanoparticulelor Fe_3O_4 , (10 nm), durata de contact 120 ore, (ocular 15/100)

Studiul influenței nanoparticulelor Fe_3O_4 cu dimensiunea de 30 nm, în concentrații de 0,5-15 mg/L, în primele 24 ore de cultivare, nu modifică semnificativ morfologia celulelor. Ceea ce conduce spre ideea că tulpina nu reacționează la NP Fe_3O_4 (30 nm).

Analiza datelor privitor la influența nanoparticulelor Fe_3O_4 (50-100 nm) asupra *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 de asemenea nu evidențiază modificări semnificative asupra morfologiei celulelor. După 24 ore de contact sunt observate celule care se divizează, ceea ce înseamnă că nanoparticulele nu modifică densitatea învelișului celular care poate stopa procesul de înmugurire.

În scopul asigurării credibilității rezultatelor obținute privind influența nanoparticulelor asupra caracterelor morfologice ale culturii de levuri au fost efectuate aprecieri morfologice ale coloniilor. Pentru obținerea coloniilor, mostrele suspensiei de levuri martor și experimentale, cu durata de contact cu nanoparticule de 120 ore, au fost însămânțate pe mediu solidificat must de malț.

Referitor la cultura martor menționăm colonii cu dimensiuni 5-12 mm, formate pe mediul solidificat must de malț, forma coloniilor circulară, marginile coloniei ușor ondulate, suprafața coloniei încrețită cu centru mamelonat, culoarea coral-oranj intens (fig. 4.5).

Examinând caracterele morfologice ale coloniilor culturii aflate în contact cu nanoparticulele Fe_3O_4 , observăm unele modificări ale formei și profilului coloniilor, culorii și mărimii. În urma analizei influenței NP Fe_3O_4 (10 nm), s-au observat unele particularități care pot fi încadrate în două grupe: în prima grupă (specifice pentru toate concentrațiile de nanoparticule) – colonii cu dimensiuni 4-10 mm, marginile coloniei ușor ondulate, suprafața coloniei încrețită cu centru mamelonat, culoarea coral - oranj pal; din grupa a doua (caractere specifice pentru concentrațiile 10 și 15 mg/L nanoparticule) menționăm colonii cu dimensiuni de 2-5 mm, rotunde, netede, cu suprafața lucioasă, culoare coral-oranj pal (fig. 4.5). Modificări ale caracterelor morfologice ale coloniilor s-au observat și în cazul contactului levurii cu nanoparticule Fe_3O_4 (10 nm) în concentrații mai mari – 20, 25 și 30 mg/L. Modificările morfologiei coloniilor sunt similare celor intervenite la concentrații mai mici. Unele colonii de levuri, aflate în contact cu nanoparticule, au suprafața lucioasă, de culoare coral-oranj pal, cu diametru de 5-10 mm, caractere apropiate coloniilor din probele martor. Altele, au suprafața încrețită, marginile coloniei ondulate accentuate, diametrul de 2 -13 mm, culoarea roz sau coral-oranj pal (fig. 4.5).

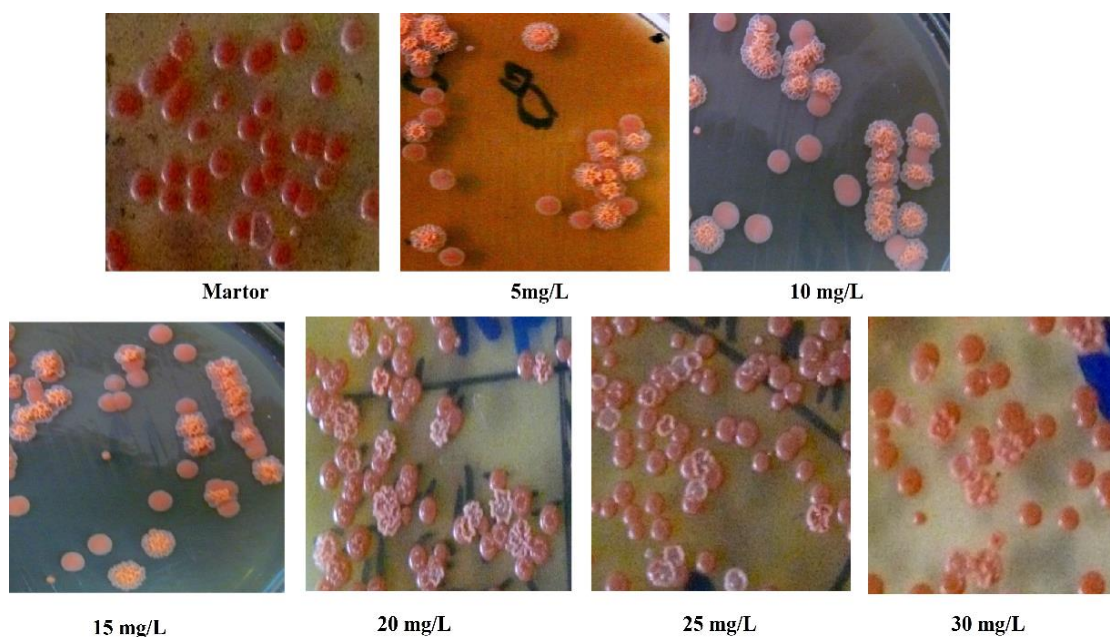


Fig. 4.5. Caractere morfologice ale coloniilor *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, la cultivare în prezența nanoparticulelor Fe_3O_4 (10 nm), durata de contact 120 ore

În cadrul experiențelor cu utilizarea NP Fe_3O_4 (30 nm), remarcăm modificări asupra profilului, dimensiunii și culorii coloniilor. Astfel, în variantele experimentale sunt observate

schimbări esențiale la aplicarea concentrațiilor 5-15 mg/L în care menționăm colonii cu dimensiuni de 6-14 mm, rotunde și netede, cu suprafața lucioasă, culoare roz pal (fig. 4.6) .

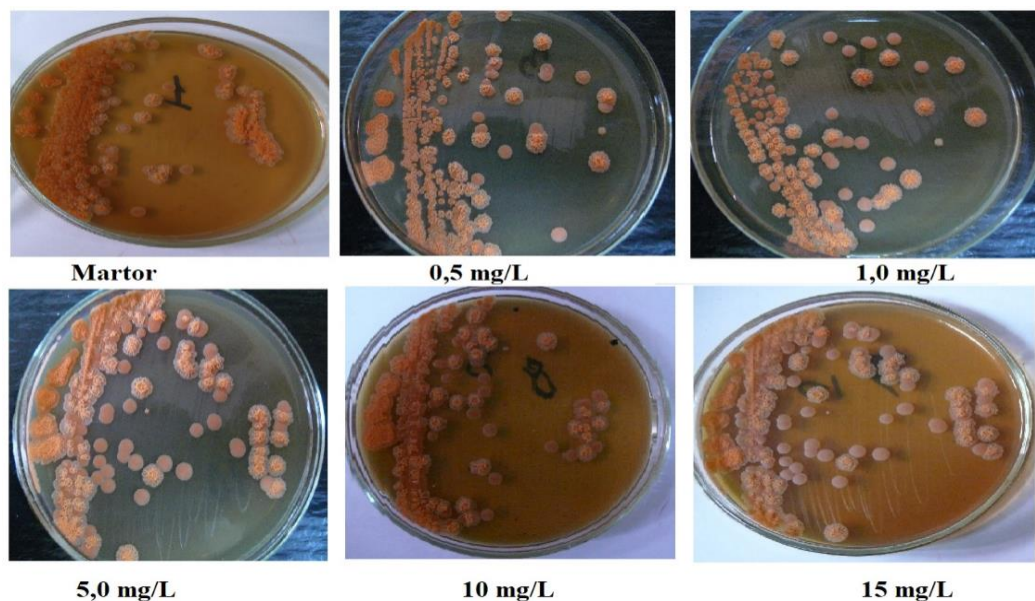


Fig. 4.6. Caractere morfologice ale coloniilor *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, la cultivare în prezența nanoparticulelor Fe_3O_4 , (30 nm), durata de contact 120 ore

În variantele experimentale de cultivare a tulpinii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, sub influența nanoparticulelor Fe_3O_4 50-100 nm, rezultatele au pus în evidență modificări în profilului coloniilor, culorii și mărimii la aplicarea concentrațiilor de 20-30 mg/L. Menționăm colonii cu dimensiuni de 1-9 mm, reticulate și netede, culoarea coral pal (fig. 4.7).

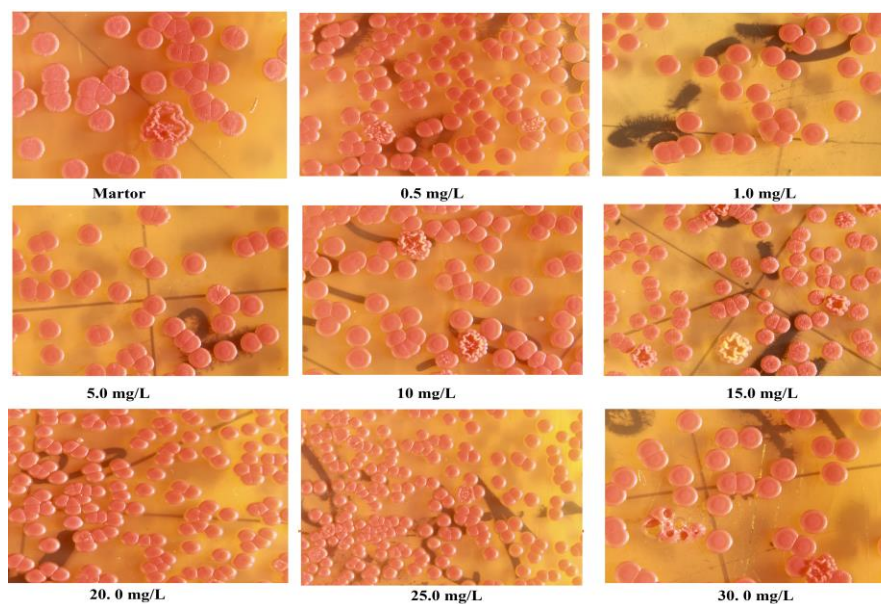


Fig. 4.7. Caractere morfologice ale coloniilor *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, la cultivare în prezența nanoparticulelor Fe_3O_4 , (50-100 nm), durata de contact 120 ore

Astfel, rezultatele obținute indică că NP Fe_3O_4 pot iniția schimbări în procesul de reproducere a levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, efectul acestora depinde de dimensiuni și concentrația utilizată. În variantele în care au fost testate NP Fe_3O_4 cu dimensiunea de 10 nm în concentrații ridicate poate fi observat efect citotoxic semnificativ.

În cazul aprecierii productivității în variantele experimentale în care au fost testate NP Fe_3O_4 10 nm și 30 nm nu s-au evidențiat modificări semnificative. În același timp, incubarea levurii cu NP Fe_3O_4 (50-100 nm) în concentrații cu diapazonul de la 5 la 30 mg/L, induc o creștere substanțială a productivității cu până la 24%, comparativ cu martorul.

Referitor la acțiunea NP Fe_3O_4 asupra caracterelor morfologice menționăm că efectul depinde de concentrația nanoparticulelor.

4.2. Sinteza proteinelor la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe_3O_4

Se cunoaște că fierul este un mineral esențial în respirația celulară și menține alcalinitatea corpului. Cel mai important rol al fierului în organism este legarea și transportul oxigenului atmosferic. Forma ionizată a fierului este toxică, motiv pentru care fierul este întotdeauna asociat cu hematii de proteine sau legat de proteine specifice de depozitare sau transport, cum ar fi transferin, feritină și hemoziderină. În acest context, cercetarea actuală privind rolul nanoparticulelor magnetice de oxid de fier în formarea de proteine la levuri este reală, rezultate ar permite unele predicții de aplicare în biomedicină a bioproduselor derivate din levuri.

Studiul influenței nanoparticulelor oxidului de fier în funcție de dimensiuni asupra tulpinii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 indică că, în prezența nanoparticulelor Fe_3O_4 (10 nm) conținutul de proteine s-a redus în variantele experimentale în care cantitatea nanoparticulelor a variat de la 15 la 30 mg/L. În aceste condiții s-a observat o micșorare relativ moderată a proteinei, cu 12,0...22,6%, comparativ cu martorul (fig. 4.8).

Nanoparticulele de Fe_3O_4 cu dimensiunea de 30 nm s-au manifestat ca stimulator al sintezei proteinelor în toate variantele de concentrații testate. Sporul de proteine în biomasa levurii la cultivare pe mediul YPD cu adaosul acestor nanoparticule a constituit 14,1-23,8%, față de martor (fig. 4.8)

În prezența nanoparticulelor Fe_3O_4 cu dimensiuni 50-100 nm, în concentrațiile 0,5-30 mg/L, conținutul de proteine practic nu se modifică în biomasa levuriană, ceea ce indică că cultura își menține echilibrul în desfășurarea proceselor metabolice (fig. 4.8).

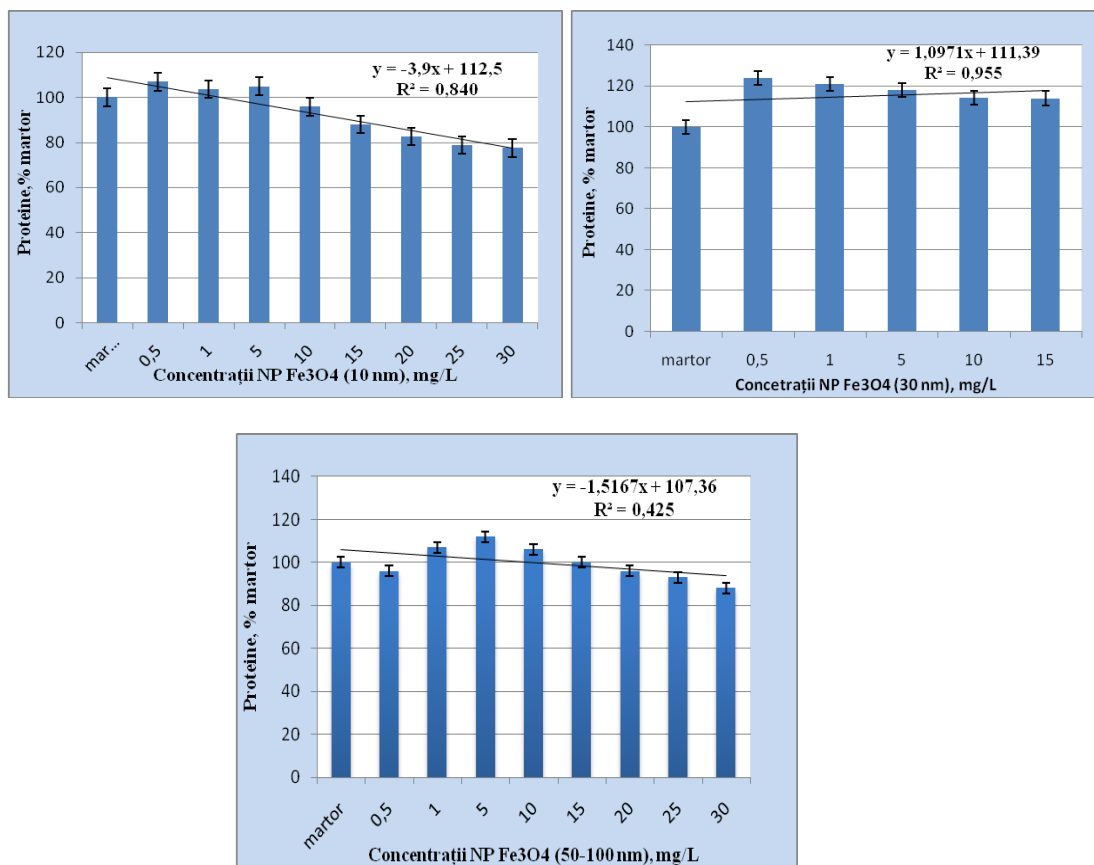


Fig. 4.8. Valorile procentuale față de martor a conținutului de proteine în biomasa *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe₃O₄, cu diferite dimensiuni

Analiza raportului corelațional confirmă dependența valorilor conținutului de proteine cu cele ale concentrațiilor nanoparticulelor Fe₃O₄ (10 nm) și Fe₃O₄ (30 nm), coeficientul de determinare fiind puternic ($R^2 = 0,840$ respectiv $R^2 = 0,955$). O dependență medie a valorilor conținutului de proteine cu cele ale concentrațiilor s-a observat la nanoparticulele Fe₃O₄ (50-100 nm), coeficientul de determinare constituie $R^2 = 0,425$, ceea ce confirmă că numai în 42% din cazuri concentrația NP influențiază biosinteza proteinelor.

Așadar, rezultatele obținute au demonstrat că NP Fe₃O₄ cu dimensiuni mici (10 nm) în concentrații ridicate conduc la inactivarea biosintezei proteinelor levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 una din explicații ar fi că NP interacționează cu organele oxidative cum sunt mitocondriile, proteinele active redox care stimulează producția de oxigen reactiv în celule și produc ioni Fe₃⁺. Totuși, efectul benefic asupra biosintezei proteinelor stabilit pentru NP Fe₃O₄ (30 nm) se poate explica prin rezistența sporită a culturii levuriene și reducerea toxicității nanoparticulelor datorită ariei suprafeței mari.

4.3. Sinteza carbohidraților la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe₃O₄

Carbohidrații celulelor levurilor din genul *Rhodotorula* sunt componente celulare care dețin și un rol important în dezvoltarea levurilor, acestea participă la reglarea mecanismelor care controlează biosinteza componentelor biologic active, creșterea, multiplicarea celulară, reacționează la influența factorilor nocivi și protejează celule în cazul stresului biotic/abiotic pentru a putea supraviețui în condiții extreme [261].

Cercetările au pus în evidență că nanoparticulele Fe₃O₄ (10 nm) utilizate în mediul de cultură în concentrații de la 0,5 până la 30 mg/L reduc conținutul de carbohidrați în biomasa levuriană cu 35,3...48,9% față de martor (fig. 4.10).

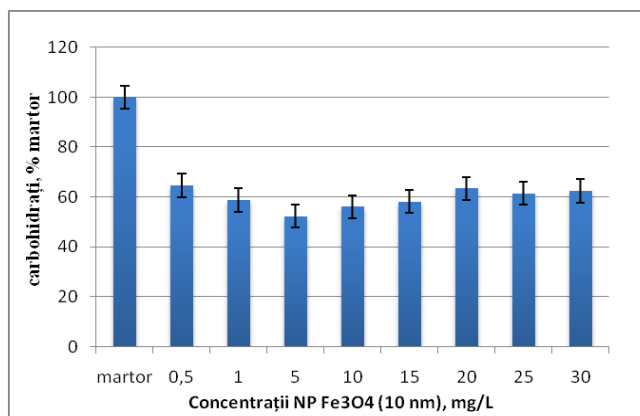


Fig. 4.9. Valorile procentuale față de martor a conținutului de carbohidrați în biomasa *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe₃O₄ (10 nm)

Corelarea dintre conținutul de carbohidrați și concentrațiile de nanoparticule utilizate la cultivarea levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 a determinat o dependență slabă dintre valorile acestor parametri. Posibil, procesele de biosinteză a carbohidraților sunt afectate de alți factori de cultivare, care în comun cu nanoparticulele provoacă afectarea membranei celulare.

În variantele experimentale cu utilizarea nanoparticulelor Fe₃O₄ cu dimensiunea de 30 nm reacția de răspuns a tulpinii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 se manifestă prin modificări favorabile ale conținutului de carbohidrați. Rezultatele indică că la aplicare în mediul de cultivare a concentrațiilor 0,5-1 5,0 mg/L, conținutul de carbohidrați sporește cu 13-21,3%, față de martor (Fig. 4.9). Acest efect poate fi datorat stabilizării în Poli-N-vinilpirolidona a NP Fe₃O₄ care are capacitatea de detoxifiere [356]. Determinarea gradului de corelare între cantitatea de carbohidrați și concentrația de NP Fe₃O₄ cu dimensiuni de 30 nm a demonstrat o legătură

puternică. Coeficientul de determinare este de 0,7206 sau 72% confirmă existența unei dependențe veridice dintre acești doi parametri.

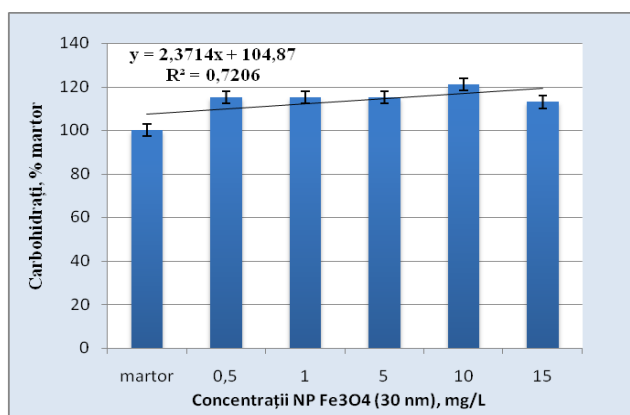


Fig. 4.10. Valorile procentuale față de martor a conținutului de carbohidrați în biomasa *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe₃O₄ (30 nm)

Astfel, datorită proprietăților fizico-chimice unice NP Fe₃O₄ (30 nm) își manifestă capacitatea de a stimula biosinteza de carbohidrați. Datele sunt confirmate și cu rezultate din literatură în care proprietățile nanoparticulelor stimulează biosinteza metabolismul plantelor [127] și biosinteza conținutului de carbohidrați [43].

Este evidentă influența a nanoparticulelor Fe₃O₄ cu dimensiuni 50-100 nm prezente în mediul de cultivare asupra proceselor de biosinteză a carbohidraților. Conținutul carbohidraților în biomasa levuriană depinde parțial de concentrațiile aplicate nanoparticulelor (fig. 4.11). Cercetările au pus în evidență că nanoparticulele utilizate în mediul de cultură în concentrații de 25 și 30 mg/L reduc conținutul de carbohidrați în biomasa levuriană cu 35,2...37,2%, față de martor. Corelarea dintre conținutul de carbohidrați și concentrațiile de nanoparticule utilizate la cultivarea levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 constituie $R^2 = 0,8302$.

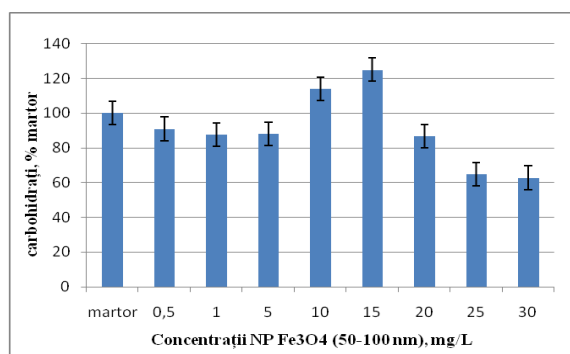


Fig. 4.11. Valorile procentuale față de martor a conținutului de carbohidrați în biomasa *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe₃O₄ (50-100 nm)

Rezumând datele experimentale putem menționa că reacția de răspuns a tulpinii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 la cultivarea în prezența nanoparticulelor Fe_3O_4 se dezvoltă în funcție de dimensiunile și concentrațiile nanoparticulelor. Rezultatele sunt confirmate și cu datele din literatura de specialitate în care nanoparticule Fe_3O_4 la aplicarea concentrațiilor ridicate reduc conținutul de carbohidrați în răsadurile de grâu [256].

4.4. Sinteza carotenoizilor la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe_3O_4

Un indiciu important în vederea evaluării efectului nanoparticulelor asupra levurilor pigmentate este conținutul de pigmenți carotenoidici. În continuare, a fost studiată influența nanoparticulelor Fe_3O_4 cu diferite dimensiuni, asupra conținutului de pigmenți carotenoidici și componentelor de bază – β -caroten, torulina, torularodina la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30.

Analiza statistică a rezultatelor a pus în evidență că în cazul aplicării la mediul de cultivare a nanoparticulelor Fe_3O_4 cu dimensiunea de 10 nm toxicitatea asupra biosintezei pigmenților este înaltă. Odată cu majorarea concentrațiilor de nanoparticule Fe_3O_4 de la 0,5 la 30 mg/L se observă o scădere semnificativă, cu 32-73% comparativ cu proba martor, a conținutului total de pigmenți în toate probele experimentale. Efect toxic pronunțat au exprimat nanoparticulele în concentrațiile 20, 25 și 30 mg/L, conținutul de carotenoide constituie doar 14,4%, respectiv 12,9% și 12,3% față de martor (fig. 4.12).

În variantele experimentale de cultivare a tulpinii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe_3O_4 cu dimensiunea de 30 nm, rezultatele indică o scădere direct proporțională a carotenoizilor cu concentrația nanoparticulelor. Reducerea semnificativă a pigmenților se observă în toate variantele în care au fost aplicate NP Fe_3O_4 (30 nm) în concentrații 0,5-15,0 mg/L conținutul de pigmenți scade cu 40...82,8%, față de martor (fig. 4.9).

În continuare, în mod identic, a fost evaluată influența nanoparticulelor Fe_3O_4 cu dimensiunile de 50-100 nm. Rezultatele obținute indică de asemenea efect înalt de toxicitate a nanoparticulelor asupra biosintezei pigmenților, care induce o reducere semnificativă a cantității de carotenoide în toate probele cercetate cu până la 79%, comparativ cu martorul. Concentrația NP Fe_3O_4 (50-100 nm), care provoacă inhibarea conținutului de carotenoizi cu 50% față de martor constituie 15 mg/L (fig. 4.12).

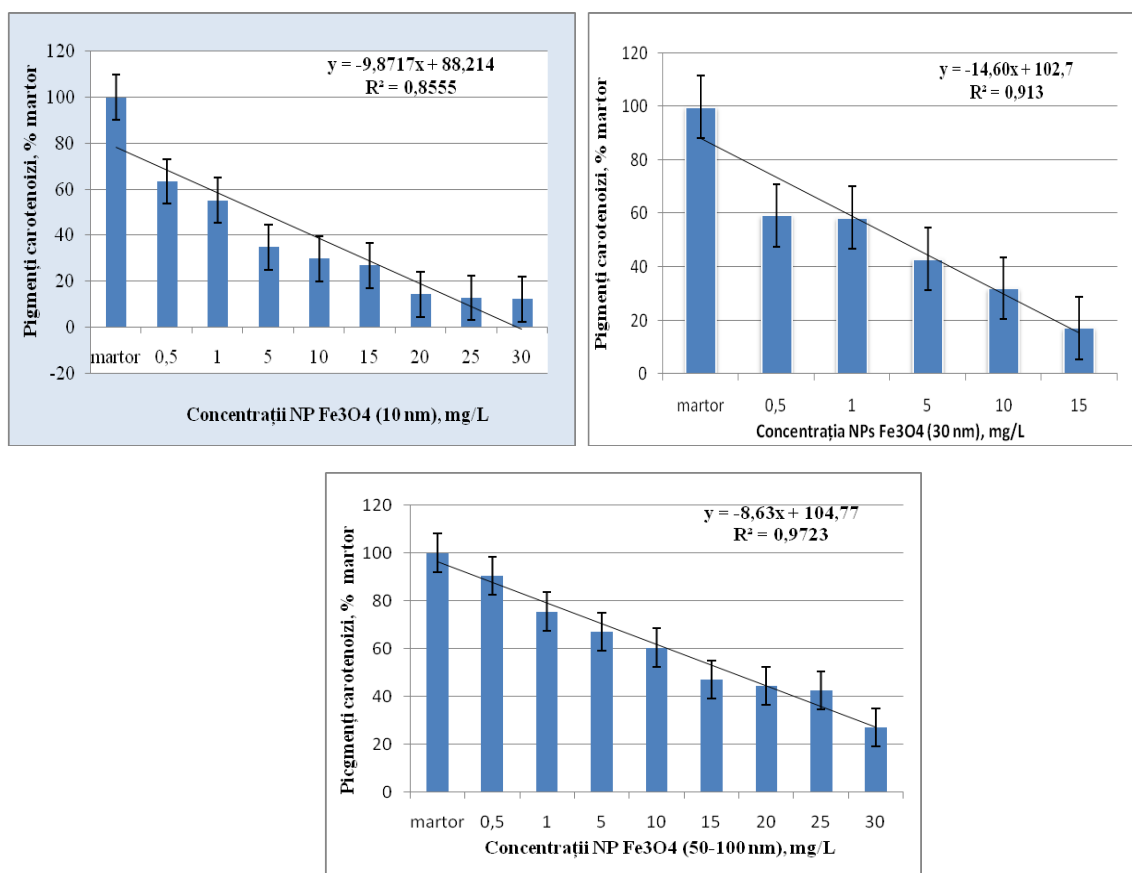


Fig. 4.12. Valorile procentuale față de martor a conținutului de carotenoide în biomasa *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe₃O₄, cu diferite dimensiuni

Determinarea gradului de corelare între cantitatea de pigmenți carotenoidici din biomasa levuriană și concentrațiile de nanoparticule Fe₃O₄ utilizate în experimente a demonstrat o asociere puternică. Coeficientul de determinare constituie pentru Fe₃O₄ (10 nm) $R^2 = 0,8555$, Fe₃O₄ (30 nm) $R^2 = 0,913$, Fe₃O₄ (50-100 nm) $R^2 = 0,9723$ (fig. 4.13). Prin urmare, în 85 respectiv 91 și 97% de cazuri concentrația de nanoparticule determină acumularea de pigmenți carotenoidici.

Generalizând rezultatele expuse privind efectele nanoparticulelor oxidului de fier asupra biosintezei carotenoizilor putem afirma că indicele toxicității (IC 50%) a nanoparticulelor Fe₃O₄ cu diferite dimensiuni variază de la 10 mg/L (Fe₃O₄ 10 nm și Fe₃O₄ 30 nm) la 20-30 mg/L (Fe₃O₄ 50-100 nm).

În continuare au fost studiate modificările intervenite în conținutul de pigmenți carotenoidici, β - caroten, torulenă și torularhodină, care prezintă compuși cu proprietăți antioxidante. Conform rezultatelor obținute, pe durata cultivării levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, s-a constatat că conținutul pigmenților este în scădere direct proporțională cu concentrația

nanoparticulelor Fe_3O_4 . Această afirmație este valabilă pentru toate dimensiunile (10 nm, 30 nm, 50-100 nm) ale nanoparticulelor, dar mai evidentă se arată a fi influența nanoparticulelor cu dimensiuni de 10 și 30 nm (fig. 4.13).

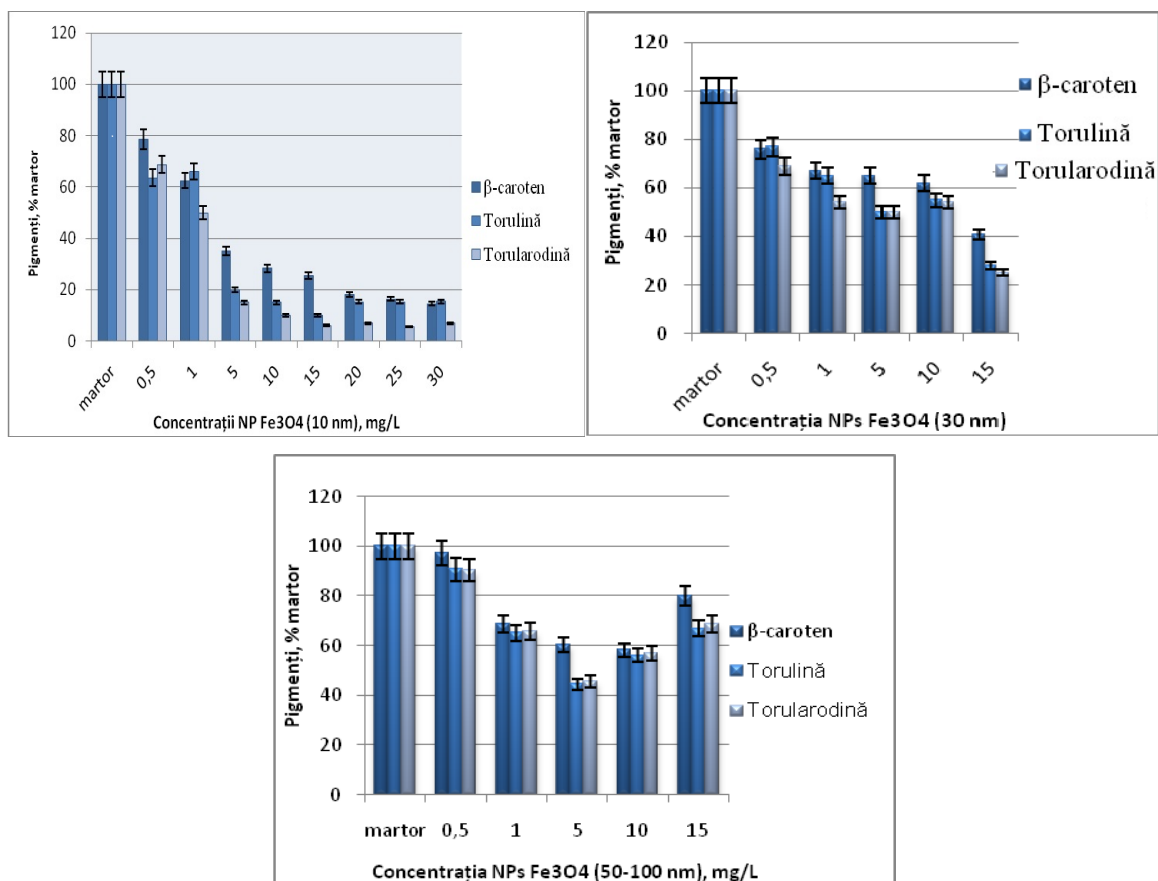


Fig. 4.13. Valorile procentuale față de martor a conținutului de β - caroten, torulină și torularhodină în biomasa tulpinii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, la cultivare în prezența nanoparticulelor Fe_3O_4 cu diferite dimensiuni

Fenomenul observat ne indică că nanoparticulele Fe_3O_4 cu dimensiunile cercetate afectează căile de formare a carotenoidelor pigmentate conform cărora β-carotenul este predecesorul torulenei, iar torulina - predecesorul torularhodinei. Presupunem că nanoparticulele influențează procesul de biosinteză a altor componente, cum ar fi formarea compușilor incolori cu lanțul de carbon C_{40} care stau la baza fazelor următoare de ciclizare și formare a lanțurilor de atomi ai carbonului mai mari de C_{40} .

Astfel, în baza datelor obținute privind influența nanoparticulelor Fe_3O_4 cu diferite dimensiuni asupra cantităților de pigmenți carotenoizi în biomasa tulpinii *Rh. gracilis* CNMN-Y-

30, putem enunța influența negativă asupra biosintezei pigmentilor carotenoidici manifestată de toate dimensiunile nanoparticulelor Fe_3O_4 aplicate în diapazonul de concentrații 0,5-30 mg/L.

4.5. Activitatea enzimelor antioxidante catalazei și superoxid dismutazei la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe_3O_4

Catalaza este enzima principală implicată în protecția celulară și detoxifierea efectelor toxice ale peroxidului de hidrogen și modificările induse de producția oxigenului reactiv în celule [166]. Scăderea treptată a activității catalazei, în dependență de concenconcentrațiile utilizate, pot fi corelate cu capacitatea fierului de a intra în centrul activ a catalazei și a produce radicalul hidroxil în reacția Fenton. Producerea radicalilor hidroxil duce la formarea de cantități mari a peroxidului de hidrogen [141], care conduce la inactivarea rapidă a enzimei catalaza [44].

Deoarece enzimele antioxidante catalaza și superoxid dismutaza sunt primele care reacționează la factorii toxici din mediu având funcția de a stabiliza și neutraliza efectele negative asupra celulei, a devenit necesară elucidarea influenței nanoparticulelor Fe_3O_4 în funcție de dimensiuni și concentrații asupra activității enzimelor la tulpinile levuriene.

Conform rezultatelor obținute se poate observa că activitatea catalazei, la cultivarea tulpinii în prezența nanoparticulelor Fe_3O_4 cu diferite dimensiuni, este grav afectată. Reacția de răspuns a tulpinii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 la introducerea nanoparticulelor Fe_3O_4 cu dimensiuni de 10 nm în concentrații de la 1.0 la 30 mg/L se exprimă prin micșorarea semnificativă a activității catalazei, cu 16,7-64,4% comparativ cu proba martor. Efect toxic pronunțat au exprimat nanoparticulele în concentrațiile 20, 25 și 30 mg/L, în care activitatea enzimei constituie doar 44,4%, respectiv 33,9% și 32,2%, față de martor (fig. 4.13).

În variantele experimentale de cultivare a levurii sub influența nanoparticulelor Fe_3O_4 cu dimensiunea de 30 nm valorile activității catalazei se exprimă prin micșorarea conținutului la aplicarea concentrațiilor 0,5-15 mg/L cu 16,9-77%, comparativ cu proba martor. Efect de inhibare semnificativ s-a observat la utilizarea concentrațiilor de 5,0, 10,0 și 15,0 mg/L a nanoparticulelor, în care activitatea catalazei constituie doar 46%, respectiv 31,5% și 23%, față de martor (fig.4.14).

Studiul influenței nanoparticulele de Fe_3O_4 cu dimensiunea de 50-100 nm se exprimă prin modificări semnificative ale activității catalazei în funcție de concentrație. Din figura 4.15 se poate observa că reacția de răspuns a tulpinii de levuri la introducerea nanoparticulelor în concentrații de 0.5...5.0 mg/L scade cu 25-35%. O micșorarea activității catalazei cu 25%, respectiv 45% și 50%, comparativ cu proba martor s-a observat în cazul aplicării NP 50-100 nm în concentrațiile de 20, 25 și 30 mg/L.

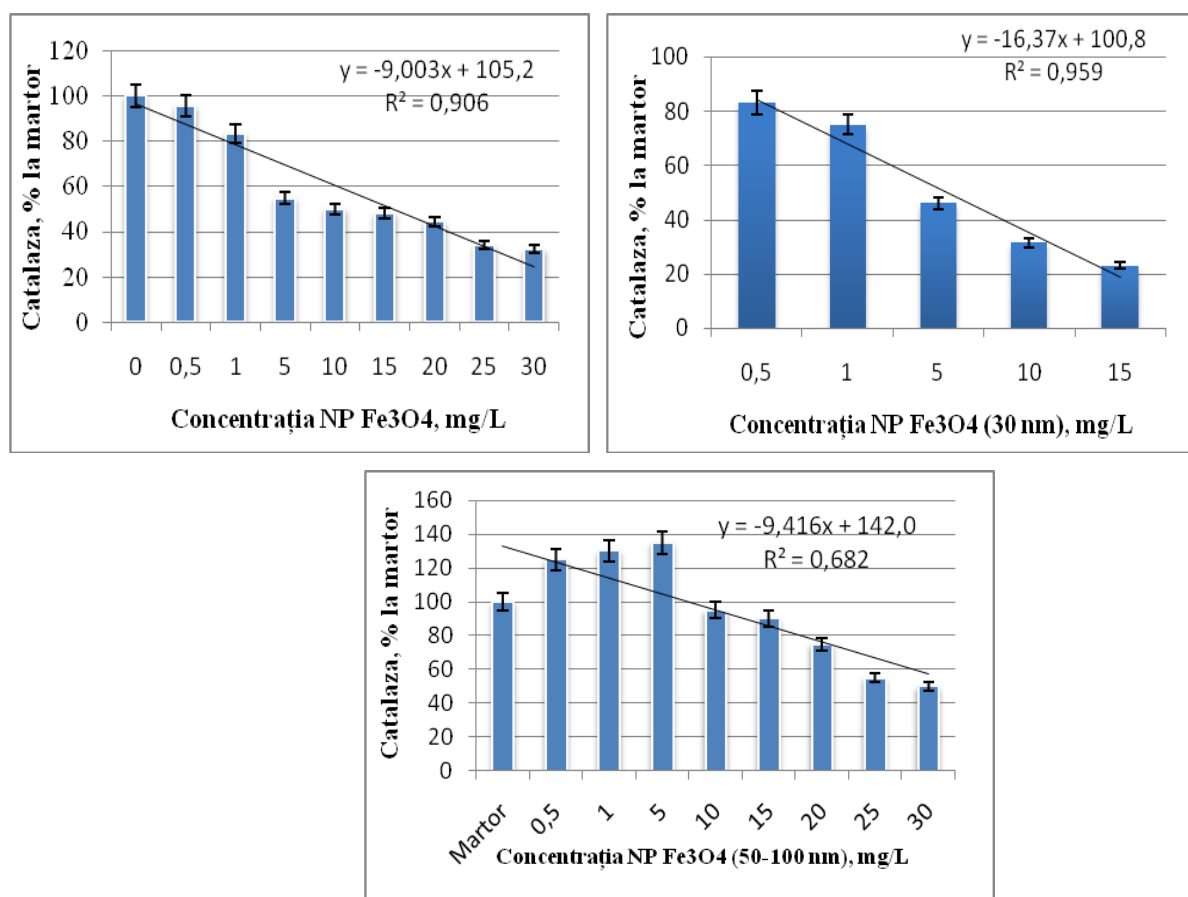


Fig. 4.14. Valorile procentuale față de martor a activitatea catalazei la tulpina de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, la cultivare în prezența nanoparticulelor Fe₃O₄ cu diferite dimensiuni

Analiza regresională care are valoare predictivă și prezintă relația matematică a dependenței a doi factori a demonstrat că, valorile activității catalazei în biomasa levurii cu cele ale concentrațiilor nanoparticulelor în cazul aplicării Fe₃O₄ cu diferite dimensiuni sunt invers proporționale. Raportul corelațional confirmă o dependență puternică a valorilor activității catalazei cu cele ale concentrațiilor nanoparticulelor Fe₃O₄ cu dimensiunile de 10 nm, 30 nm și 50-100 nm. Coeficientul de determinare fiind $R^2 = 0,906$, respectiv $R^2 = 0,959$ și $R^2 = 0,682$.

Astfel, în rezultatul cercetărilor s-a demonstrat că efectul de diminuare semnificativă a activității catalazei la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 se exprimă în funcție de dimensiunile și concentrațiile nanoparticulelor Fe₃O₄. Mai agresive sunt nanoparticulele cu dimensiuni mici. Probabil, nanoparticule Fe₃O₄ provoacă specii reactive de oxigen, cum ar fi anionul superoxid și radicalul hidroxil care induc un stres oxidativ puternic.

Pentru a investiga în continuare rezistența celulară a levurii la acțiunea nanoparticulelor s-a efectuat analiza activității enzimei antioxidante cheie superoxid dismutaza (SOD), care se

formează în timpul unor procese fiziologice celulare. O comparație a datelor activității SOD la tulpina *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, sub influența nanoparticulelor Fe_3O_4 cu dimensiunile 50-100 nm, relevă o serie de modificări, în majoritatea cazurilor s-a constatat o activizare a activității enzimei, ca răspuns la procesele degenerative cu formarea radicalilor liberi sub influența nanoparticulelor magnetitei. Maximul cantitativ de formare a SOD s-a observat în variantele în care levura a fost cultivată în prezența a 10 mg/L nanoparticule. Ulterior, odată cu aplicarea concentrațiilor mai mari – 15-30 mg/L activitatea SOD descrește, însă rămâne în continuare mai înaltă față de martor (fig. 4.15).

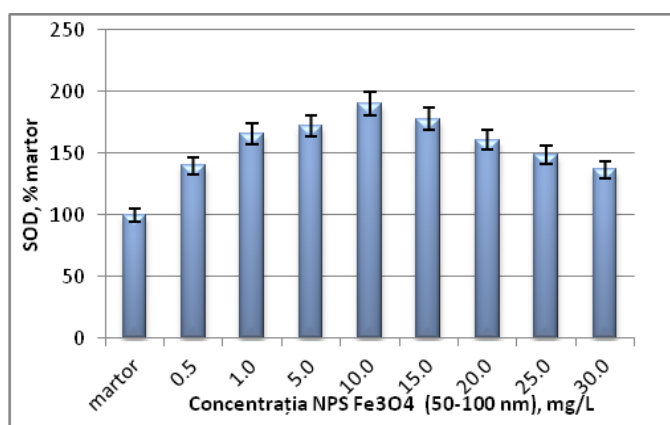


Fig. 4.15. Valorile procentuale a activității SOD la tulpina de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, la cultivare în prezența nanoparticulelor Fe_3O_4 cu dimensiunea de 50-100 nm

Sporirea activității SOD la administrarea nanoparticulelor Fe_3O_4 poate fi o reacție adaptivă la formarea oxigenului reactiv cauzată de nanoparticule. Probabil, nanoparticule cercetate pot induce generarea radicalul hidroxil ($\text{OH}\cdot$), anionul superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) și peroxidul de hidrogen (H_2O_2) care interacționează cu proteinele celulare și conduc la degradarea lor. Măjorarea semnificativă a conținutului de SOD se manifestă ca răspuns de apărare al stresului oxidativ. Rezultatele obținute sunt în concordanță cu alte cercetări, conform cărora nanoparticule pot influența metabolismului celular la aplicarea concentrațiilor sporite interacționând cu enzimele și proteinele [134]. Conform altor date, sub influența nanoparticulelor se activează sinteza altor tipuri de proteine, care, nu sunt caracteristice pentru celule cultivate fără adăugarea nanoparticulelor metalice [38].

Rezumând rezultatele experimentale putem menționa că nanoparticulele Fe_3O_4 , în concentrațiile și dimensiunile utilizate la tulpina de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, modifică

activitatea enzimelor antioxidante catalaza și SOD, ceea ce confirmă prezența potențialului toxic al nanoparticulelor.

Mecanismul de acțiune a NP Fe₃O₄

Analiza derulării proceselor biosintetice, a caracterelor morfologice și activității enzimelor antioxidante demonstrează acțiunea neunivocă a NP Fe₃O₄ asupra levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30. După cum a fost menționat, efectul nanoparticulelor depinde de dimensiunile și concentrațiile NP oxidului de fier. Rezultatele sunt susținute și de datele din literatura de specialitate care au arătat că dimensiunile descrescătoare duc la creșterea suprafeței specifice a NP, care inițiază creșterea reactivității și îmbunătățirea interacțiunilor dintre NP și biomolecule [352]. De asemenea, dimensiunea mică a nanoparticulelor conduce la o fagocitare slabă de macrofage astfel nanoparticule fiind slab purificate *in vivo* induc citotoxicitate [172, 259]. În lucrările mai multor autori sunt expuse rezultatele efectelor diferitor nanoparticule ale oxizilor metalici (Ti, Fe₃O₄, Zn) asupra celulei microbiene din care concluzionăm că influența depinde de concentrațiile utilizate [81, 289, 333].

Conform rezultatelor noastre s-a demonstrat că NP Fe₃O₄ cu dimensiuni de 50-100 nm sunt mai puțin toxice, comparativ cu nanoparticulele Fe₃O₄ cu dimensiuni de 30 și 10 nm care induc modificări semnificative a indicilor analizați la tulpina de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30. Teoretic, mecanismul acțiunii nanoparticulelor poate fi explicat prin faptul că ionii ar putea trece membranele și zonele de acoperire, cum ar fi nucleul celular și mitocondriile, care reacționează cu radicalul hidroxil în reacția Fenton. Producerea radicalilor hidroxil duce la formarea de cantități mari a peroxidului de hidrogen [140], generând producerea de oxigen reactiv care provoacă stresul oxidativ. Comparativ cu celulele cultivate în mediu normal, celulele expuse la acțiunea nanoparticulelor oxidului de fier cu dimensiunea de 10 nm, 30 și 50-100 nm, în concentrații ridicate, au prezentat efecte pronunțate asupra viabilității celulelor levuriene după 3, 6 și 24 ore de cultivare afectând semnificativ procesul de reproducere. Rezultatele sunt confirmate și cu datele din literatura de specialitate în care concentrațiile ridicate au demonstrat inhibarea semnificativă a viabilității cu până la 70% la celule bacteriene *B. subtilis* și *E. coli* [58]. O categorie importantă de modificări a fost observată și asupra caracterelor morfologice celulare a levurii cultivată în prezența nanoparticulelor Fe₃O₄, care se manifestă prin revărsarea parțială sau totală a conținutului celular ca urmare a deteriorării peretelui și membranei celulare.

Stresul oxidativ excesiv produs de NP Fe₃O₄ induce modificări semnificative și în biosinteza proteinelor și ale sistemului de apărare antioxidantă care se manifestă prin creșterea activității SOD și inhibarea veridică din punct de vedere statistic (IC50%) a activității catalazei, proteinei și a conținutului de pigmenți carotenoizi în biomasa levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30.

Creșterea observată a activității SOD afectează oxidarea și sugerează că nanoparticulele nu numai generează oxigen reactiv dar și blochează statutul antioxidant celular de apărare.

Schema ipotetică a mecanismului de acțiune a NP Fe_3O_4 asupra tulpinii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 este redată în figura 4.16.

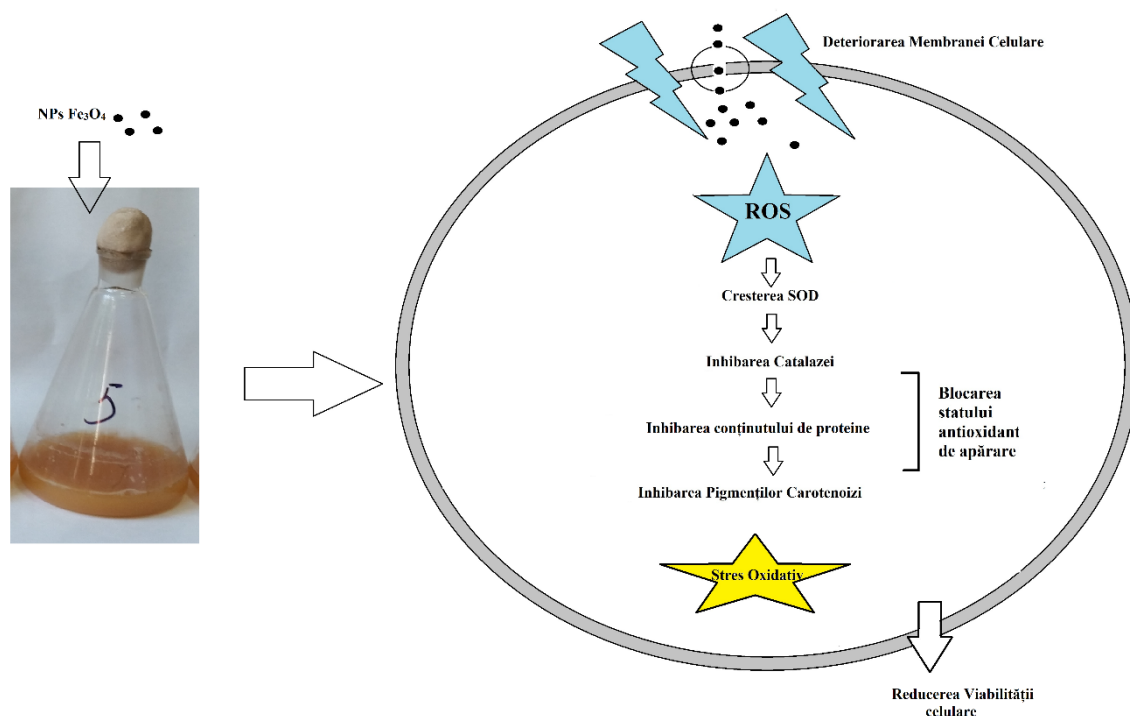


Fig. 4.16. Schema ipotetică a mecanismului de acțiune a NP Fe_3O_4 asupra tulpinii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30

4.6. Procedeu de evaluare a impactului nanoparticulelor Fe_3O_4 cu utilizarea în calitate de model a levurii *Rhodotorula gracilis*

Variația de răspuns individual la administrarea de doze letale a substanței cu efect toxic necesită determinarea gradului toxicității. Stabilirea relațiilor cantitative concentrație-efect furnizează informații necesare pentru caracterizarea securității compusului chimic. Pentru stabilirea toxicității, în funcție de cantitatea substanței testate, sunt acceptate anumite criterii convenționale scara toxicității L(E)C50, CL50 și CMT [14, 36].

Conform Regulamentului (CE) nr.1272/2008 al Parlamentului UE, pentru evaluarea toxicității substanțelor chimice se utilizează LC50 (96 ore) pentru pești, EC50 (48 ore) pentru crustacee și EC50 (72 sau 96 ore) pentru alge, specii reprezentative pentru mediul acvatic [119]. În biotehnologia microbiană, în calitate de teste funcționale de stabilire a gradului de inhibare sau stimulare a diferitor compusi chimici, se propune utilizarea termenilor "concentrație

eficientă" (EC50%) sau "concentrație a inhibării" (IC50%) a compusului [265]. Acești parametri oferă posibilitatea de a efectua un studiu complet al estimării gradului de influență a substanțelor chimice asupra obiectelor vii.

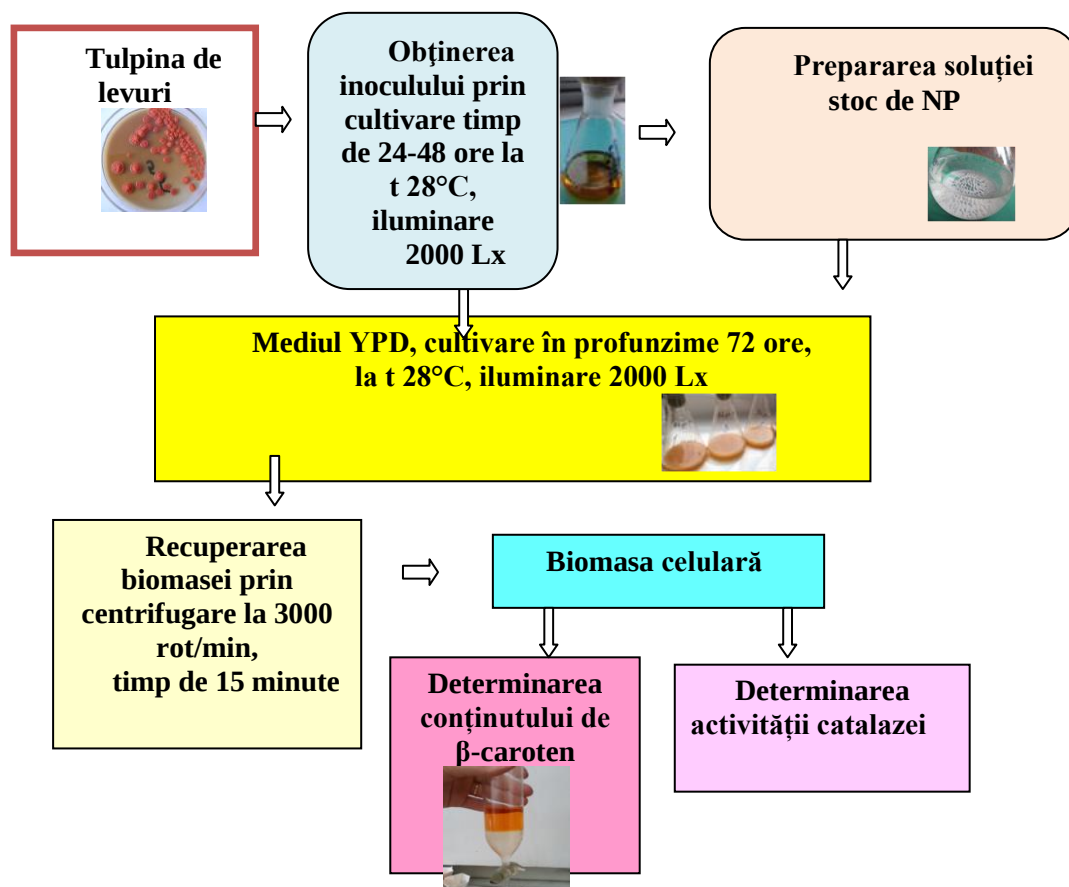
Astfel, în conformitate cu rezultatele obținute, în care au fost experimentate diferite concentrații și dimensiuni ale nanoparticulelor Fe_3O_4 se propune un procedeu de evaluare a impactului cu utilizarea levurilor pigmentate din genul *Rhodotorula*.

Protocolul procedurii de stabilire a toxicității nanoparticulelor Fe_3O_4

Se prepară mediul nutritiv steril YPD cu următoarea compoziție, g L⁻¹: peptonă – 20,0; glucoză – 20,0; extract de drojdie - 10 ml; apă potabilă – 1000 ml. În mediul preparat se adaugă nanoparticule în diferite concentrații. În 200 ml mediu nutritiv suplimentat cu nanoparticule se adaugă inoculum de *Rh. gracilis* (2×10^6 celule ml⁻¹), în cantitate de 5% în bază volumetrică. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmeyer cu capacitate de 1,0 L, în condiții de agitare continuă (200 r.p.m), nivel de iluminare 2000 lx, la temperatura de 26 ± 1 °C, durata cultivării – 72 ore. În calitate de martor servește varianta mediului nutritiv fără aplicarea nanoparticulelor.

După 72 ore de cultivare, biomasa levuriană este separată de mediul nutritiv prin centrifugare 3000 g timp de 15 min. În biomasa obținută se determină cantitatea de β -caroten și activitatea catalazei.

Valorile calculate pentru probele experimentale sunt raportate la valorile probei martor (în care nu s-au introdus nanoparticule) și se exprimă în % la martor. Nivelul de inhibare se stabilește reieșind din concentrațiile de nanoparticule care provoacă micșorarea veridică din punct de vedere statistic (IC50%) a conținutului de β -caroten în biomasă sau activității catalazei. Schema procedurii de evaluare a impactului nano-oxizilor metalici cu utilizarea levurii pigmentate *Rh. gracilis* este prezentată în figura 4.17.



Evaluarea impactului nanoparticulelor Fe_3O_4 cu dimensiunea de 10 nm

Se prepară mediul nutritiv steril YPD cu compoziția indicată în protocolul 1. În mediul preparat se adaugă nanoparticule de Fe_3O_4 (10 nm), în cantități de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 mg/L. Inocularea și condițiile de cultivare sunt indicate în protocolul 1. Rezultatele nivelului activității catalazei și cantității de β -caroten la *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 sunt prezentate în tabelul 4.3.

Evaluarea impactului nanoparticulelor Fe_3O_4 cu dimensiunea de 50 -100 nm

Se prepară mediul nutritiv steril YPD cu compoziția indicată în protocolul 1. În mediul preparat se adaugă nanoparticule de Fe_3O_4 (50-100 nm), în cantități de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 mg L⁻¹. Inocularea și condițiile de cultivare sunt identice protocolului 1.

Rezultatele nivelului activității catalazei și cantității de β -caroten la *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 sunt prezentate în tabelul 4.4.

Tabelul 4.3. Nivelul activității catalazei și cantității de β -caroten la *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, la acțiunea diferitor concentrații de nanoparticule Fe_3O_4 (10 nm)

Indicatorul monitorizat		Concentrația nanoparticulelor Fe_3O_4 (10 nm), mg L ⁻¹					
		0,0	0,5	1,0	5,0	10,0	15,0
Catalaza	$\mu\text{mol/mg}$ proteină/min	22±1,0	21±1,0	18,2±0,7	12±0,5	11,2±0,7	10,5±0,1
	% M	100	95,4	82,9	54,5	50,9	47,7
β -caroten	$\mu\text{g/g}$ s.a.u.	90±3,0	59±1,0	55±3,0	49±3,0	30±1,0	25±1,0
	%	100	65,5	61,1	57,4	33,3	26,6

▪ - $p \leq 0,01$

Datele din tabelul 4.3 demonstrează că concentrația de inhibare ($\text{IC}_{50\%}$) a nanoparticulelor Fe_3O_4 (10 nm) conform testelor activitatea catalazei și conținutul de β -caroten constituie 10 mg L⁻¹.

Tabelul 4.4. Nivelul activității catalazei și cantității de β -caroten la *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, la acțiunea diferitor concentrații de nanoparticule Fe_3O_4 (50-100 nm)

Indicatorul monitorizat		Concentrația nanoparticulelor Fe_3O_4 (50-100 nm), mg L ⁻¹								
		0,0	0,5	1,0	5,0	10,0	15,0	20,0	25,0	30,0
Catalaza	mkmol/mg prot./min	20±1,5	25±1,5	26±0,57	27±0,52	19±1,5	18±1,0	15±1,7	11±0,55	10±0,45
	%	100	125	130	135	95	90	75	55	50
β -caroten	mkg/g s.a.u.	309±1,1	301±1,0	212±1,1	187±1,0	180±1,15	185±1,1	165±0,57	159±0,56	63±0,65
	%	100	97,4	68,6	60,5	58,2	59,8	53,3	51,4	20,4

▪ - $p \leq 0,01$

Datele din tabelul 4.4 demonstrează că concentrația de inhibare ($\text{IC}_{50\%}$) a nanoparticulelor Fe_3O_4 (50 -100 nm) conform testelor activitatea catalazei și conținutul de β -caroten constituie 25 -30 mg L⁻¹.

Prin urmare, rezultatele prezentate confirmă posibilitatea aprecierii nivelului de influență al nanoparticulelor oxizilor de metal în baza testelor de determinare a activității catalazei și conținutului de β -caroten la levuri pigmentate *Rh. gracilis*. Procedeu de evaluare a toxicității nanoparticulelor Fe_3O_4 cu utilizarea levurii pigmentate *Rh. gracilis* este brevetat [2, 9, 26].

Rezultatele obținute sunt confirmate și cu datele din literatura de specialitate care indică că nanoparticulelor Fe_3O_4 cu dimensiuni mici de 10-30 nm prezintă o toxicitate mai mare în comparație cu dimensiunile mai mari dimensiunea fiind unul dintre factorii cheie care

influențează efectul toxic [331, 332]. Mărimea descrescătoare conduce la creșterea suprafeței specifice, reactivității și îmbunătățirea interacțiunilor dintre nanoparticule și biomolecule [350]. În cazul studiului prezentat este posibil că nanoparticulele Fe_3O_4 10 nm și 30 nm să interacționeze cu celulele levuriene mult mai ușor decât particulele mai mari Fe_3O_4 de 50-100 nm. Astfel, provoacă modificări semnificative în componența biochimică și a sistemului antioxidant de apărare. Conform altor date, nanoparticulele de fier conduc la sporirea a activității SOD și reducerea semnificativă a lactat dehidrogenazei [341, 331]. De asemenea expunerea plantelor de tutun la acțiunea NP Fe_3O_4 în concentrații de 30 mg/L au exercitat efecte negative asupra morfologiei și conținutului de pigmenți [57].

Așadar, prezentul studiu referitor la efectele nanoparticulelor Fe_3O_4 aduce noi informații direcționate pentru rezolvarea obiectivului de evidențiere și evaluare a gradului de pericol al nanoparticulelor pentru mediul înconjurător.

4.7. Concluzii la capitolul 4

1. Nivelul de acțiune a nanoparticulelor Fe_3O_4 cu dimensiuni 10 nm, 30 nm, 50-100 nm în concentrații de la 0,5 la 30 mg/L asupra viabilității celulelor, productivității, caracterelor morfologice, biosintezei proteinelor, carbohidraților, carotenoidelor și activității enzimelor antioxidante la tulpina de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 este determinat de dimensiunea, concentrația și durata de contact.
2. Viabilitatea celulelor levuriene este afectată de NP Fe_3O_4 cu dimensiunea de 10 nm și 30 nm, iar nanoparticulele cu dimensiuni de 50-100 nm inițiază o stimulare semnificativă a viabilității. Producția de biomasă crește cu până la 24%, comparativ cu martorul la cultivarea levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 în prezența Fe_3O_4 (50-100 nm) în concentrații cu diapazonul de la 5 la 30 mg/L.
3. Nanoparticulele Fe_3O_4 , acționează la nivelul sistemelor biochimice de sinteză a componentelor celulare a levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30. Reacția de răspuns a tulpinii se exprimă prin sporirea moderată a cantităților de proteine și carbohidrați în biomasa la aplicarea NP Fe_3O_4 cu dimensiunea de 30 nm și 50-100 nm și micșorarea evidentă la cultivare în prezența NP cu dimensiunea de 10 nm. Procesul de biosinteză a pigmentilor carotenoizi este afectat de toate concentrațiile și dimensiunile cercetate.
4. Impactul nanoparticulelor Fe_3O_4 în concentrațiile și dimensiunile cercetate se exprimă prin micșorarea semnificativă în biomasa levuriană a activității enzimei antioxidante catalaza cu până la 70%.

5. Rezultatele confirmă posibilitatea aprecierii nivelului de evaluare al nanoparticulelor Fe_3O_4 în baza testelor de determinare a activității catalazei și conținutului de pigmenți carotenoidici la levura pigmentată *Rh. gracilis*. Concentrația de inhibare ($\text{IC}_{50\%}$) a nanoparticulelor Fe_3O_4 (10 nm) conform testelor activitatea catalazei și conținutul de β -caroten constituie 10 mg L⁻¹, a nanoparticulelor Fe_3O_4 (50 -100 nm) este de 25-30 mg/L.
6. Procedul elaborat de evaluare a impactului nanoparticulelor oxizilor de fier cu utilizarea în calitate de obiect test a levurii pigmentate *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 este rapid, eficient, ușor de realizat și sigur pentru stabilirea toxicității NP.

5. REALIZAREA NANOCOMPOZITELOR CHITOSAN-ZINC ȘI CHITOSAN-FIER CU PERSPECTIVE BIOTEHNOLOGICE

Rezultatele experiențelor efectuate, au demonstrat că nanoparticulele oxizilor metalici datorită toxicității înalte și stabilității scăzute prezintă impedimente pentru utilizare în domeniul biotehnologiei levurilor [307]. Datorită dimensiunilor mici și raportul suprafață/volum mare nanoparticulele tind să formeze aglomerații, de asemenea au capacitatea de a se oxida cu ușurință în aer. Prin urmare, este necesară modificarea suprafeței pentru stabilizarea nanoparticulelor oxizilor metalici și evitarea proceselor de oxidare.

Aceste neajunsuri pot fi reduse sau diminuate prin combinarea nanoparticulelor cu diferiți polimeri, în particular polizaharide [273, 274]. Polizaharidele sunt non-toxice, biodegradabile, biocompatibile cu mediul înconjurător. Utilizarea nanoparticulelor de chitosan au devenit de mare interes pentru nanomedicină, inginerie biomedicală și dezvoltarea de noi sisteme de eliberare a medicamentelor terapeutice cu biodisponibilitate îmbunătățită, specificitate, sensibilitate crescută și toxicitate farmacologică redusă pentru aplicații industriale și biomedicale [126].

O nouă abordare pentru lărgirea spectrului de utilizare a nanoparticulelor oxidului de fier și oxidului de zinc prezintă acoperirea lor cu chitosan. Chitosanul prezintă interes ca biopolimer pentru a stabili eficient nanoparticulelor oxizilor metalici oferind o biocompatibilitate crescută și funcționalitatea chimică [103, 218].

Metodele de preparare ale nanocompozitelor sunt diverse, cum ar fi micro emulsie, electropulverizare, difuzia solventului de emulsificare și gelarea ionică [98, 187]. Metodele de preparare diferă în funcție de domeniul utilizării acestora [102, 203, 347].

Proprietățile fizice și caracteristicile nanocompozitelor chitosan fier, chitosan zinc pot fi influențate de mai mulți factori, cum ar fi compoziția materialelor, raportul de compoziție, pH-ul, temperatură și durata de reacție [270, 299]. Conform rezultatelor prezentate de către Wulandari și coaut., raportul diferit dintre compoziție și timpul de reticulare asigură diferite caracteristici fizice și magnetice ale nanocompozitelor Chitosan- Fe_3O_4 . Astfel, creșterea raportului dintre chitosan Fe_3O_4 crește dimensiunea particulelor dar scade dimensiunea cristalitului pe când durata timpului de reticulare, asigură o dimensiune mai mare a cristalitului de chitosan- Fe_3O_4 [161].

Suprafața modificată a nanoparticulelor aflate în combinație cu polizaharide, poate iniția diferite efecte ale nanocompozitului. În linii generale, nanocompozitele de tipul chitosan-fier,

chitosan–zinc, chitosan-titan sau chitosan-argint sunt solicitate în domeniile biomedicină, biotehnologie, cosmetologie, protecția mediului [83, 94, 257].

Nanocompozitele chitosan fier posedă aplicații în transportul de medicamente anticancerogene (doxorubicina, 5-fluorouracil și leucovorină [293]. De asemenea participă la eliberarea și administrarea de ADNc împotriva hepatitei B prin mucoasa nazală [173] livrare de proteine [279], administrarea insulinei [122], eliberarea de antioxidanți polifenolici reduce efectul citotoxic asupra celulelor vii și dețin efect antimicrobian [355]. În biotehnologie nanocompozitul chitosan fier poate fi aplicat la imobilizarea enzimei acilaza din penicilium G [329]. De asemenea în remedierea mediului la curățarea apelor și solului de poluanți organici persistenți [156, 294, 335].

Nanocompozitele chitosan zinc datorită grupărilor sale amine și hidroxil au atras atenția pentru utilizarea ca protector UV, transportul de medicamente [41], de asemenea au demonstrat capacitate sporită de vindecare a rănilor fără a provoca toxicitate în celule [179].

Deși încapsularea nanoparticulelor în chitosan sunt atractive datorită citotoxicității scăzute comparativ cu oxizii metalici [331], diferite studii au demonstrat un efect semnificativ asupra viabilității celulelor macrofage [159], de asemenea, nanocompozitele nu au înregistrat efect neurotoxic și potențial fito-toxic [80, 162]. Totuși progresele recente în investigarea toxicității nanocompozitelor au propus atât siguranța, cât și riscuri în același timp. Cu toate acestea, a fost încă esențial să se ia în considerare posibilul pericol aduse de nanocompozite cu diferite dimensiuni și concentrații asupra obiectelor biologice [83]. Prin urmare, evaluarea toxicității mai acute și sub-acute a nanocompozitelor in vivo ar trebui să fie efectuate pentru a evita potențialele pericole în viitor [319].

În prezent, astfel de cercetări experimentale sunt foarte actuale datorită necesității optimizării metodelor de obținere a nanocompozitelor chitosan zinc și chitosan fier, importanței evaluării influenței asupra obiectelor biologice și aprecierea potențialului de utilizare în biotehnologie.

Luând în considerație cele expuse, scopul capitolului constă în estimarea efectelor nanocompozitelor chitosan-zinc și chitosan-fier, elaborate prin diferite procedee, asupra levurilor din genul *Rhodotorula*, în contextul stabilirii potențialului de utilizare în bionanotehnologii.

5.1. Evaluarea acțiunii nanocompozitului chitosan-zinc asupra activității biosintetice *Rh. gracilis*

Inițial au fost determinați parametrii optimi pentru prepararea nanocompozitelor chitosan–zinc și chitosan-fier în care a variat raportul dintre cantitatea de chitosan și

nanoparticulele oxidului de zinc sau oxidului de fier. Ulterior a fost evaluată acțiunea nanocompozitului chitosan-zinc și chitosan-fier, aplicate în mediul de cultivare în volume de 2% și 5%, asupra viabilității celulare și producției de biomasă la tulpina de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30. Au fost realizate 4 tipuri de nanocompozite noi. În calitate de martor au servit Kumar et. al., 2012 și Mohammadi-Samani et. al., 2013 [179, 203].

Mai jos sunt trecute în revistă câteva metode folosite în cadrul acestui studiu pentru obținerea unor materiale cu proprietăți speciale pentru eficientizarea proceselor de utilizare în procesele de cultivare a levurilor.

Procedeu experimental I. La 25 mg chitosan s-au adăugat 25 ml acid acetic 1% și s-a agitat timp de 10 minute la 200 r.p.m. Ulterior, se stabilește pH-ul neutru cu NaOH, se adaugă 1% de alcool etilic de 96%. Se agită 10 minute la 200 r.p.m. În soluția de chitosan se adaugă nanoparticulele ZnO (<50 nm) sau Fe₃O₄ (50-100 nm) în concentrație de 50 și 70 mg/L și se sonifică 10 minute. În timpul acestui proces moleculele de chitosan sunt absorbite pe suprafața nanoparticulelor metalice.

Procedeu experimental II. La 50 mg chitosan s-au adăugat 25 ml acid acetic 1% și s-a agitat timp de 10 minute la 200 r.p.m. Ulterior, se stabilește pH-ul neutru cu NaOH, se adaugă 1% de alcool etilic de 96%. Se agită 10 minute la 200 r.p.m. În soluția de chitosan se adaugă nanoparticulele ZnO (<50 nm) sau Fe₃O₄ (50-100 nm) în concentrație de 50 și 70 mg/L și se sonifică 10 minute. În timpul acestui proces moleculele de chitosan sunt absorbite pe suprafața nanoparticulelor metalice.

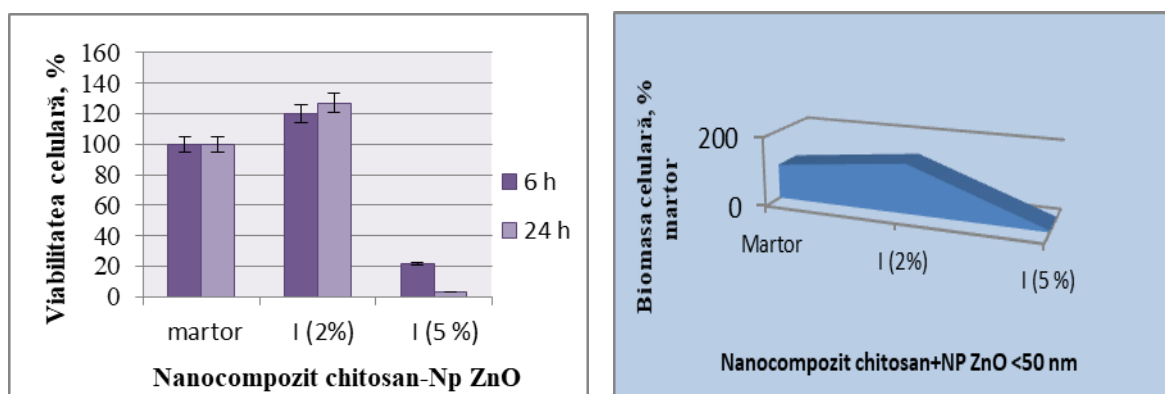
Procedeu martor I. Nanocompozitul chitosan-fier se prepară conform metodei propuse de Mohammadi-Samani [203]. 20 mg chitosan se dizolvă în soluție de acid acetic 1M cu un volum final de 100 ml. Apoi, la soluția anterioară se adaugă 70 mg nanoparticule Fe₃O₄. Amestecul se agită timp de 18 ore. Se obține o soluție omogenă maro-închisă.

Procedeu martor II. Nanocompozitul chitosan-zinc se prepară conform metodei Sudheesh Kumar [179]. Soluția de chitosan se obține prin dizolvarea a 2 g de chitosan în soluție de acid acetic 1% la temperatura camerei. Apoi, soluția se filtrează pentru a îndepărta particulele nedizolvate. La hidrogelul de chitosan se adaugă soluție de NaOH 1% până la pH neutru, urmată de centrifugarea hidrogelului pentru a elimina apa nelegată. Nanoparticulele ZnO se suspendă în apă și soluția se sonifică timp de 10 min. Soluția de NP ZnO se adaugă prin picurare la chitosan și întregul amestec se supune agitării viguroase timp de 1 oră. Amestecul omogenizat de hidrogel de chitosan - nanoparticule ZnO se adaugă în mediul de cultură.

Procedeu martor III. Tulpina de levuri se cultivă pe mediul de cultură YPD, fără introducerea nanocompozitelor chitosan-zinc sau chitosan-fier.

În cadrul experiențelor prezentate în acest compartiment s-a evaluat acțiunea nanocompozitului chitosan-zinc și chitosan-fier, aplicate în mediul de cultivare în volume de 2% și 5%, asupra viabilității celulare și producției de biomasă la tulpina de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30.

Rezultatele cercetărilor orientate spre stabilirea gradului de influență a nanocompozitului chitosan-zinc indică că valorile maxime ale viabilității celulare după 6 și 24 ore de contact a nanocompozitului cu levura cultivată în profunzime se observă în cazul aplicării nanocompozitului preparat conform procedeu I experimental aplicat în volum de 2% (fig. 5.1).



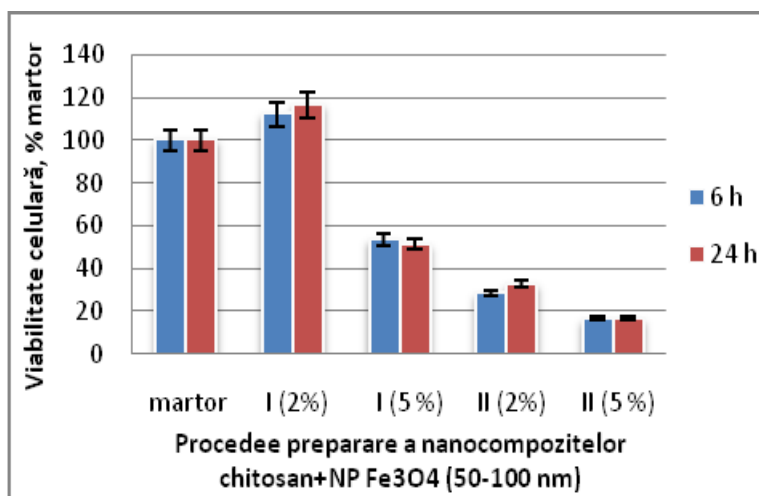
Legenda: Martor - procedeu [179]; I(2%)- procedeu experimental I, nanocompozit aplicat în volum de 2%; I (5%)- procedeu experimental I, nanocompozit aplicat în volum de 5%.

Fig. 5.1. Efectele nanocompozitului chitosan-zinc asupra viabilității celulare și producției de biomasă la tulpina de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30

În varianta experimentală I (2%) viabilitatea celulară crește cu 20-27% față de procedeul martor [179]. Totodată, nanocompozitul aplicat în volum de 5% manifestă efect de inhibiție profundă a dezvoltării culturii. Cele mai mici valori (0,300 g/L) s-au observat în cazul producției de biomasă celulară din variant experimentală I (5%), ceea ce este cu până la 90% comparativ cu martorul, în care producția de biomasă constituie 5,8 g/L. Pornind de la rezultatele că volumul de nanocompozit chitosan-zinc, în cazul acțiunii asupra viabilității celulare și producției de biomasă sunt diferite, este important să cunoaștem situația referitor la efectele altor nanocompozite, în particular a nanocompozitului chitosan-fier.

În rezultatul cercetărilor s-a constatat că nanocompozitele chitosan-fier preparate conform procedeele experimentale I și II, reacționează diferit comparativ cu procedeul martor [203]. Cuantificarea viabilității celulare *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 a demonstrat tendința de creștere a numărului de celule numai în varianta în care s-a adăugat nanocompozitul preparat conform

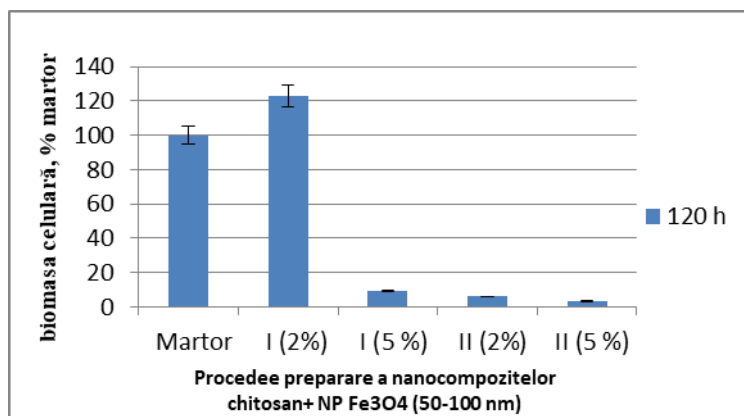
procedeului experimental I în volum de 2% (fig. 5.2). Viabilitatea celulară crește cu până la 16,5% comparativ cu nanocompozitul chitosan-fier preparat conform procedeului martor [203]. În același timp, nanocompozitul preparat conform procedeului experimental I, dar introdus în mediul de cultură pentru levuri în volum de 5%, duce la scăderea statistic veridică (cu până la 50% față de procedeul martor) a viabilității celulelor timp de 24 ore. Efect toxic pronunțat asupra viabilității celulelor levuriene, a arătat și nanocompozitul preparat conform procedeului experimental II utilizat atât în volum de 2% cât și 5%. După 6 și 24 ore de contact cu nanocompozitul, se observă reducerea esențială a numărului de celule viabile (cu 84-85% comparativ cu procedeul martor) (fig.5.2).



Legenda: Martor [203]; I(2%)- procedeu experimental I, nanocompozit aplicat în volum de 2%; I(5%)- procedeu experimental I, nanocompozit aplicat în volum de 5%; II(2%)- procedeu experimental II, nanocompozit aplicat în volum de 2%; II(5%)- procedeu experimental I, nanocompozit aplicat în volum de 5%.

Fig. 5.2. Viabilitatea celulară a tulpinii de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 sub acțiunea nanocompozitelor chitosan-fier, obținute prin diferite procedee

Rezultatele evaluării influenței nanocompozitelor chitosan-fier obținute prin diferite procedee, asupra producției de biomasă *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 au evidențiat modificări similare celor expuse pentru viabilitatea celulelor. Studiul rezultat relevă faptul că în cazul aplicării nanocompozitelor preparat conform procedeului experimental I, introdus în mediul de cultură pentru levuri în volum de 2%, după 120 ore de cultivare, inițiază sporirea cantității de biomasă celulară (fig. 5.3.).



Legenda: Martor [203]; I(2%)- procedeu experimental I, nanocompozit aplicat în volum de 2%; I(5%)- procedeu experimental I, nanocompozit aplicat în volum de 5%; II(2%)- procedeu experimental II, nanocompozit aplicat în volum de 2%; II(5%)- procedeu experimental I, nanocompozit aplicat în volum de 5%.

Fig. 5.3. Producția de biomasă la tulpina de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 sub acțiunea nanocompozitelor chitosan-fier, obținute prin diferite procedee

Efect toxic pronunțat asupra acumulării biomasei levuriene a exercitat nanocompozitul preparat conform procedurii experimentale II, care aplicat în volum de 2% și 5%, provoacă reducerea esențială a cantității de biomasă comparativ cu procedeul martor.

Așa dar, rezultatele testărilor au demonstrat că cel mai eficient procedeu de formare a nanocompozitelor este procedeul experimental I, care constă din următoarele faze: la 25 mg chitosan se adăugă 25 ml acid acetic 1% și se agită timp de 10 minute la 200 r.p.m. Ulterior, se stabilește pH-ul neutru cu NaOH, se adaugă 1% de alcool etilic de 96%, se agită 10 minute la 200 r.p.m. În soluția de chitosan se adaugă nanoparticulele ZnO (<50 nm) sau Fe₃O₄ (50-100 nm) în concentrație de 50 și 70 mg/L și se sonifică 10 minute. În timpul acestui proces moleculele de chitosan sunt absorbite pe suprafața nanoparticulelor metalice.

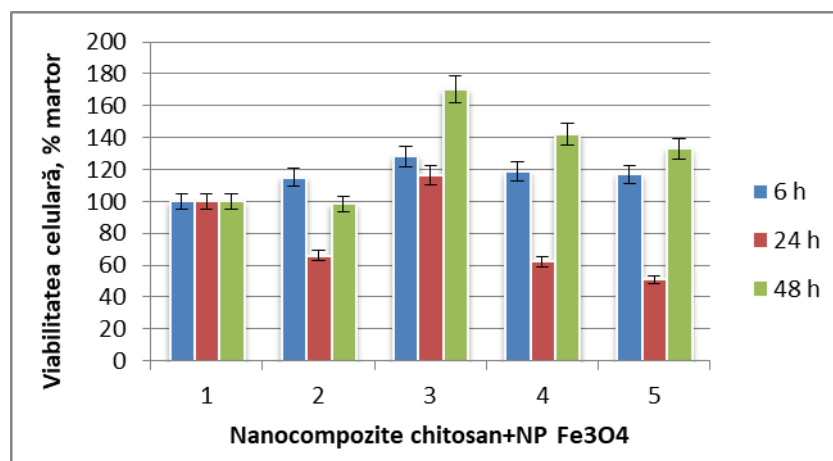
Nanocompozitele elaborate conform procedurii propuse se recomandă pentru cercetările ulterioare de stabilire a efectelor biologice pentru asigurarea utilizării lor în siguranță.

5.2. Evaluarea acțiunii nanocompozitului chitosan-fier asupra activității biosintetice *Rhodotorula gracilis*

În continuare, a fost studiată activitatea biologică a nanocompozitului chitosan-fier, elaborat conform procedurii noi, în care conținutul de nanoparticule Fe₃O₄ a constituit 30, 50 și 70 mg/L. În calitate de martor a servit mediul de cultură YPD fără introducerea

nanocompozitului chitosan-fier și procedeul Mohammadi-Samani, et al. (2013) [203]. Nanocompozitele au fost aplicate în volum de 2%.

În prezentarea grafică a viabilității celulare a tulpinii de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 sub acțiunea nanocompozitului chitosan-fier cu diferite concentrații ale nanoparticulelor Fe_3O_4 pot fi evidențiate fluctuații în funcție de durata de contact cu nanocompozitul cercetat (fig. 5.4.).



Legenda: 1 – martor (YPD); 2 - procedeu [203]; 3,4,5 - procedeu experimental I, cu conținutul de nanoparticule Fe_3O_4 în concentrație de 30, 50 și 70 mg/L, respectiv.

Fig. 5.4. Viabilitatea celulară a tulpinii de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 la acțiunea nanocompozitului chitosan-fier cu diferite concentrații a nanoparticulelor Fe_3O_4 (50-100 nm)

În condiții de laborator, faza-lag din primele 6 ore, practic este similară pentru toate trei concentrații ale nanoparticulelor Fe_3O_4 și a nanocompozitului chitosan-fier preparat conform procedurii martor [203]. Altfel stau lucrurile după 24 ore de contact cu nanocompozitul chitosan-fier. Ca rezultat, viabilitatea celulară este în scădere cu până la 40-50% față de martor, cu excepția nanocompozitului în care concentrația nanoparticulelor este de 30 mg/L. Ciclul vital al culturii levuriene revine la normal după 48 ore de contact cu nanocompozitul. Un nivel mai ridicat al viabilității (cu 70%) se atestă pentru concentrația nanoparticulelor Fe_3O_4 de 30 mg/L.

Rezultatele sunt confirmate și prin datele din literatura de specialitate care au arătat viabilitate satisfăcătoare la celulele osteoblastice la aplicarea concentrațiilor mici de nanocompozit chitosan - Fe_3O_4 . S-a constatat că creșterea concentrațiilor induce citotoxicitate atât în ceea ce privește proliferarea, cât și diferențierea celulară [54, 269]. Acest lucru se poate datora toxicității atomilor de ioni grei care pot pătrunde în macromolecule, organele și alte părți ale celulelor viabile [327].

În vederea stabilirii modificărilor caracterelor morfologice ale coloniilor sub influența nanocompozitului, cultura de levuri din variantele martor și cele cu diferite concentrații ale nanoparticulelor a fost însămânțată pe mediul solid YPD. Cercetările au demonstrat, că nanocompozitele, pe perioada de contact de 48 ore, nu produc modificări semnificative a caracterelor morfologice coloniale. Comun pentru toate variantele experimentale sunt formarea coloniilor cu marginile ușor ondulate de culoare oranj, suprafața încrețită, centrul mamelonat, diametrul coloniilor de 4 - 6 mm. Rezultatele au fost confirmate cu imagini, care sunt prezentate în fig. 5.5. Rezultatele sunt confirmate și cu studiile din literatura de specialitate în care NP Fe_3O_4 acoperite cu chitosan nu induc modificări morfologice ale celulelor epiteliale după 72 ore de contact [93].

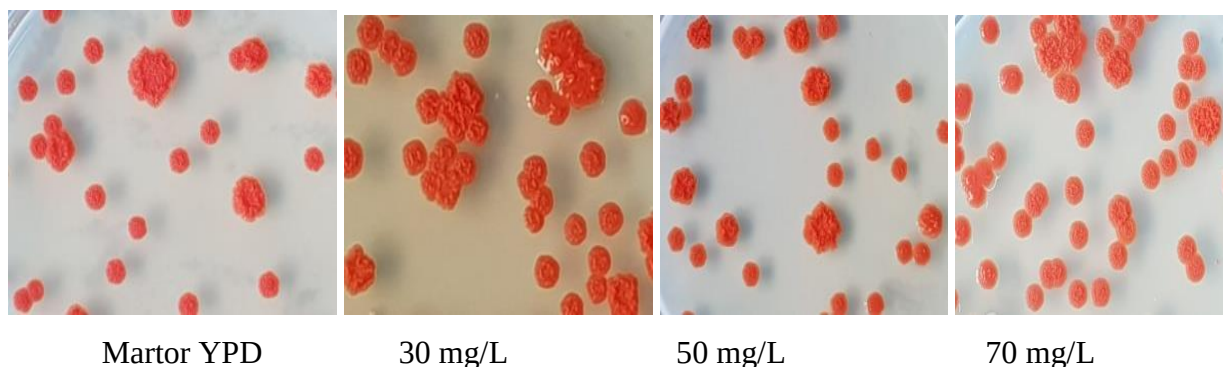
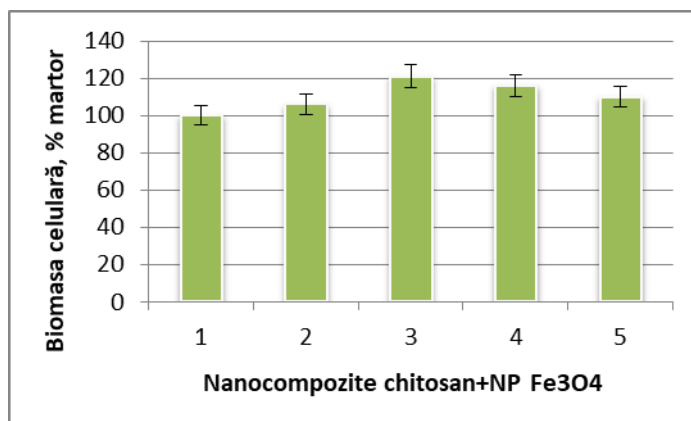


Fig. 5.5. Caractere morfologice coloniale a tulpinii de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 la acțiunea nanocompozitului chitosan-fier cu diferite concentrații a nanoparticulelor Fe_3O_4 (50-100 nm), durata de contact 48 h.

Rezultate valoroase s-au obținut în cazul producției de biomasă. Cantitatea de biomasă celulară acumulată după 120 ore de cultivare a levurii în profunzime este maximă (cu 21 % mai mult față de martor) în varianta experimentală în care s-a aplicat nanocompozitul cu 30 mg/L Fe_3O_4 (fig. 5.6). Modificările observate, cel mai probabil, sunt determinate de creșterea intensității proceselor metabolice de bază și adaptare la condițiile de cultivare în prezența nanocompozitului. Pentru nanoparticulele de fier neacoperite cu chitosan valorile producției de biomasă sunt mai mici sau similare cu cele relatate anterior în literatură [12].



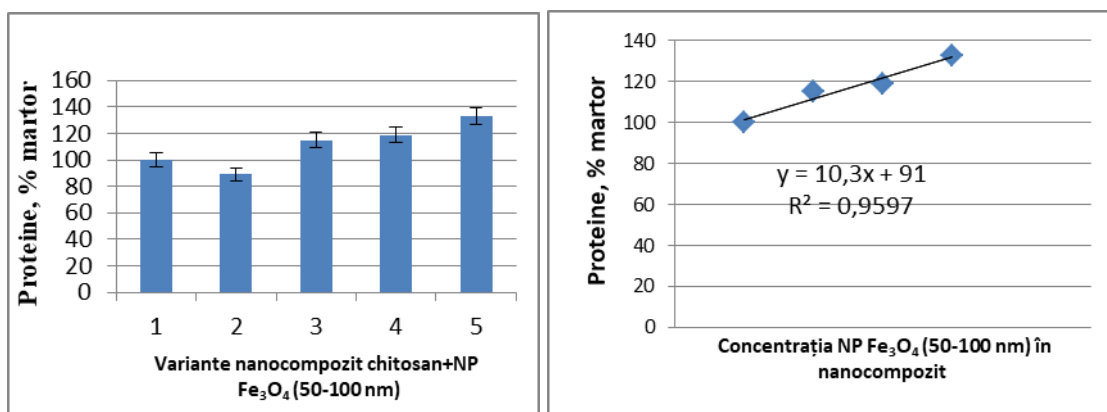
Legenda: 1 – martor (YPD); 2 - procedeu [203]; 3,4,5 – procedeu experimental I, cu conținutul de nanoparticule Fe₃O₄ în concentrație de 30, 50 și 70 mg/L, respectiv.

Fig. 5.6. Producția de biomasă a tulpinii de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 sub acțiunea nanocompozitului chitosan-fier cu diferite concentrații ale nanoparticulelor Fe₃O₄ (50-100 nm)

În continuare, la tulpina de levuri pigmentate *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, sub acțiunea nanocompozitului chitosan-fier cu conținut variabil al concentrației de nanoparticule au fost stabilite modificările care au loc în conținutul de proteine, carbohidrați, carotenoide, activității enzimelor antioxidante - catalaza și SOD. În rezultatul cercetărilor s-a constatat că nanocompozitele chitosan-fier, preparate conform procedeeleor martor și experimental, acționează diferit asupra componentelor biomasei levuriene.

Rezultatele obținute la cuantificarea valorilor conținutului de proteine în biomasa levurii sunt prezentate în fig. 5.7. Răspunsul levurii la acțiunea nanocompozitului elaborat conform procedeeului martor [203] constă în reducerea cantității de proteine în biomasa microbiană și constituie 89% raportat la procedeul martor (YPD) în care nu s-a introdus nanocompozit (fig. 5.7).

Sub acțiunea nanocompozitului chitosan-fier, preparat conform procedeeului experimental propus de noi, pot fi evidențiate fluctuații în funcție de cantitatea de nanoparticule din nanocompozitul cercetat. În prezentarea grafică a cantității de proteine în biomasa tulpinii de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 sub acțiunea nanocompozitului chitosan-fier cu diferite concentrații ale nanoparticulelor Fe₃O₄ se observă creșterea cantității de proteine comparativ cu martorul, indicii determinați au înscris valori de 15-33% (fig. 5.7) maximul de proteine s-a observat la concentrația de 70 mg/L.



Legenda: 1 – martor (YPD); 2 - procedeu [203]; 3,4,5 - procedeu experimental I, cu conținutul de nanoparticule Fe₃O₄ în concentrație de 30, 50 și 70 mg/L, respectiv.

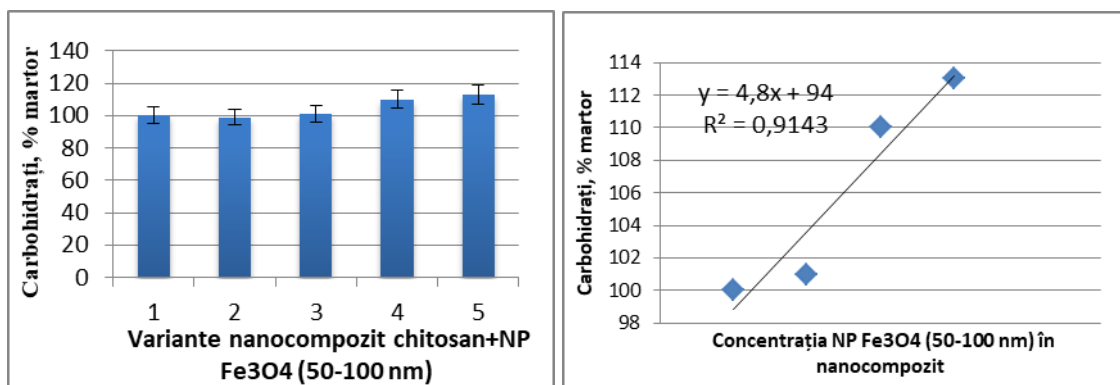
Fig. 5.7. Cantitatea de proteine în biomasa tulpinii de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 la cultivare în prezența nanocompozitului chitosan-fier cu diferite concentrații a nanoparticulelor Fe₃O₄ (50-100 nm)

Analiza statistică a rezultatelor obținute pentru domeniul de concentrații de 30-70 mg/L denotă o dependență directă între conținutul de nanoparticule din nanocompozit și cantitatea de proteine sintetizată, coeficientul de determinare fiind $R^2 = 0,959$.

Prin urmare, rezultatele obținute demonstrează că modificarea concentrației nanoparticulelor Fe₃O₄ induce efecte de stimulare a proceselor de sinteză a proteinelor la tulpina de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30. Rezultatele sunt confirmate și prin date din literatura de specialitate în care nanoparticule Fe₃O₄ acoperite cu chitosan îmbunătățesc biosinteza proteinelor [176].

Rezultate promițătoare s-au obținut în cazul evaluării conținutului de carbohidrați în biomasa levuriană. Experiențele de aplicare a nanocompozitului preparat conform procedurii Mohammadi-Samani et al. (2013) la cultivarea levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 au demonstrat o cantitate de carbohidrați apropiată procedurii martor YPD (fig. 5.8). În varianta de mediu în care s-a aplicat nanocompozitul în concentrație de 70 mg/L Fe₃O₄ cantitatea de carbohidrați în biomasă celulară acumulată după 120 ore de cultivare a levurii în profunzime este cu 13% mai mult față de martor.

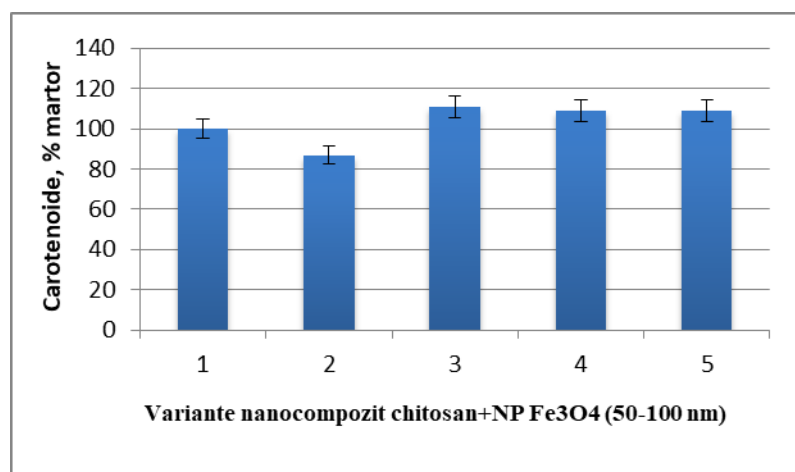
Calcularea coeficientului de determinare pentru domeniul de concentrații de 30-70 mg/L denotă o dependență directă între conținutul de nanoparticule din nanocompozit și cantitatea de carbohidrați acumulată, coeficientul de determinare fiind $R^2 = 0,9143$ (fig. 5.8).



Legenda: 1 – martor (YPD); 2 - procedeu [203]; 3,4,5 – procedeu experimental I, cu conținutul de nanoparticule Fe_3O_4 în concentrație de 30, 50 și 70 mg/L, respectiv.

Fig. 5.8. Cantitatea de carbohidrați în biomasa tulpinii de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 sub acțiunea nanocompozitului chitosan-fier cu diferite concentrații ale nanoparticulelor Fe_3O_4 (50-100 nm)

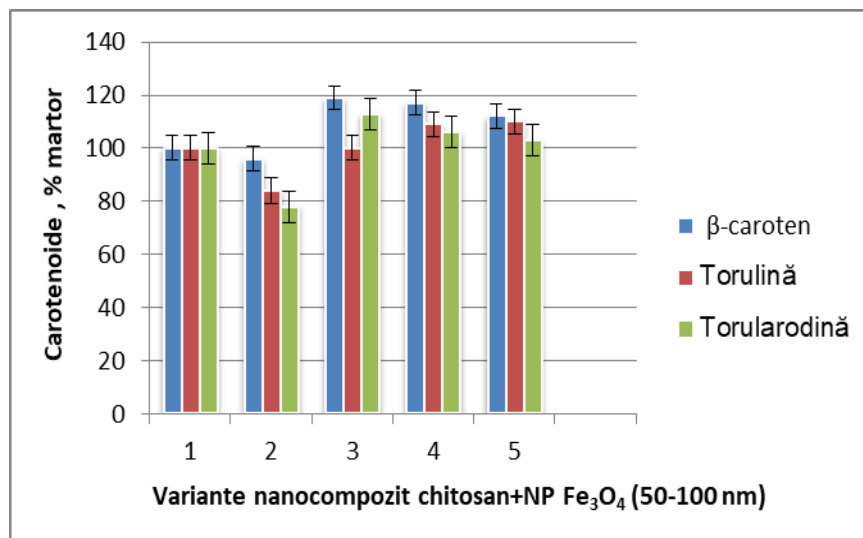
În continuare a fost determinată cantitatea de carotenoizi în biomasa levurii obținută pe mediile suplimentate cu nanocompozite chitosan-fier preparate prin procedee și concentrații de nanoparticule diferite. În cazul nanocompozitului preparat conform procedurii [203], conținutul de carotenoizi este mai mic comparativ cu varianta martor-YPD și procedeul nou experimental. Concentrațiile nanoparticulelor Fe_3O_4 (50-100 nm) de 30, 50 și 70 mg/L, utilizate în nanocompozitul chitosan-fier, măresc aproximativ în aceeași măsură (în medie cu 9-11%) cantitatea de carotenoide (fig. 5.9).



Legenda: 1 – martor (YPD); 2 - procedeu [203]; 3,4,5 - procedeu experimental I, cu conținutul de nanoparticule Fe_3O_4 în concentrație de 30, 50 și 70 mg/L, respectiv.

Fig. 5.9. Cantitatea de carotenoide în biomasa tulpinii de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 la cultivare în prezența nanocompozitului chitosan-fier cu diferite concentrații a nanoparticulelor Fe_3O_4 (50-100 nm)

Atrage atenție faptul că, sub influența nanocompozitelor chitosan-fier proporția dintre cantitatea de β -caroten, torulină, torularhodină nu se modifică esențial, în majoritate fiind β -carotenul (figura 5.10).



Legenda: 1 – martor (YPD); 2 - procedeu [203]; 3,4,5 - procedeu experimental I, cu conținutul de nanoparticule Fe₃O₄ în concentrație de 30, 50 și 70 mg/L, respectiv.

Fig. 5.10. Efectul nanocompozitului chitosan-fier asupra conținutului de β -caroten, torulină, torularhodină în biomasa tulpinii de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30

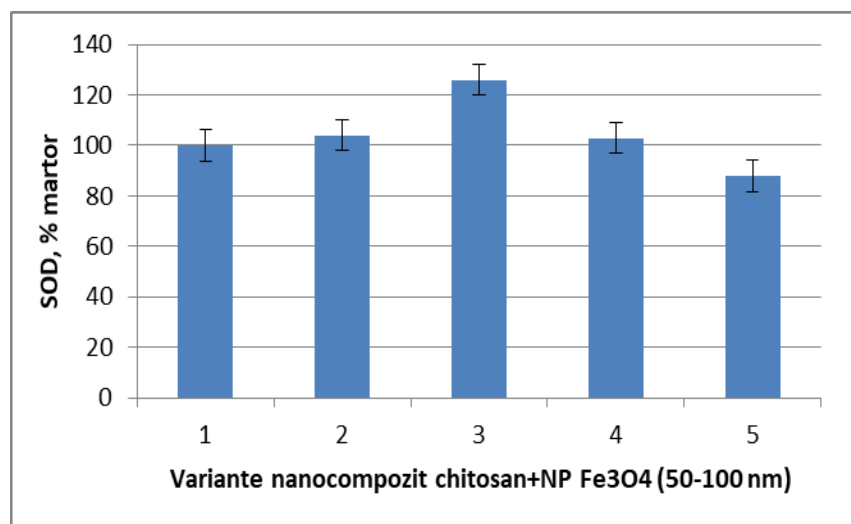
Acest fenomen ne indică că nanocompozitul nu afectează căile de formare a carotenoidelor pigmentate, conform cărora β -carotenul este predecesorul torulinei, iar torulina - predecesorul torularhodinei, dar presupunem că se modifică procesul de biosinteză a altor componente, cum ar fi formarea compușilor incolori cu lanțul de carbon C₄₀ care stau la baza fazelor următoare de ciclizare și formare a lanțurilor de atomi ai carbonului mai mari de C₄₀.

Cercetările ulterioare s-au axat pe studiul activității anzimelor antioxidante – superoxid dismutaza și catalaza. Printre enzimele antioxidante superoxid dismutaza este prima barieră de protecție contra stresului oxidativ în celulele microorganismelor aerobe. SOD realizează reacția de dismutație, transformând radicalii superoxod în dioxidigen și peroxid de hidrogen, care este mai puțin activ. Este demonstrat, că celulele reacționează rapid la stresul oxidativ prin sporirea activității SOD.

Peroxidul de hidrogen, care se formează în rezultatul reacției de dismutație este precursorul celui mai periculos radical liber – radicalul hidroxil. Enzima catalaza blochează acest proces prin scindarea H₂O₂ cu formarea oxigenului. Pentru realizarea acestei reacții este necesară prezența a două molecule de peroxid de hidrogen, una din ele acționând ca donor, iar alta ca

acceptor de electroni. Catalaza este enzimă bicomponentă fiero-porfirinică, ce constă din apoproteină și grupa activă, care conține hematină.

În rezultatul cercetărilor s-a constatat că prin expunerea la diferite concentrații de nanoparticule ale oxizilor metalici, în biomasa *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 se produc modificări ale activității enzimelor SOD și CAT (fig. 5.11).

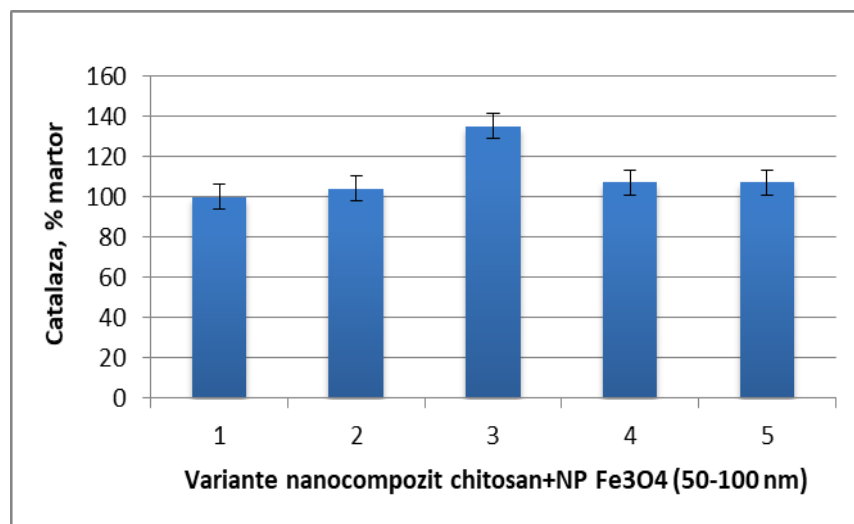


Legenda: 1 – martor (YPD); 2 - procedeu [203]; 3,4,5 - procedeu experimental I, cu conținutul de nanoparticule Fe₃O₄ în concentrație de 30, 50 și 70 mg/L, respectiv.

Fig. 5. 11. Activitatea superoxid dismutazei în biomasa *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, cultivată în prezența nanocompozitului chitosan-fier cu diferite concentrații a nanoparticulelor Fe₃O₄ (50-100 nm)

Din rezultatele determinării activității superoxid dismutazei în biomasa levurii cultivată în prezența nanocompozitului chitosan-fier, desprindem o creștere semnificativă (cu 26%) a capacității de formare a enzimei în varianta experimentală cu conținutul de nanoparticule Fe₃O₄ (50-100 nm) în concentrație de 30 mg/L. Pentru variantele de nanocompozit cu concentrațiile de nanoparticule 50 și 70 mg/L, activitatea SOD este în scădere comparativ cu martorul.

În cazul determinării catalazei, s-a stabilit activitate mai înaltă decât valorile SOD. Pentru biomasa levurii cultivată în prezența nanocompozitului cu 30 mg/L nanoparticule Fe₃O₄ (50-100 nm) au fost înregistrate valori cu 35% mai mari comparativ cu varianta martor (fig. 5.12).



Legenda: 1 – martor (YPD); 2 - procedeu [203]; 3,4,5 - procedeu experimental I, cu conținutul de nanoparticule Fe₃O₄ în concentrație de 30, 50 și 70 mg/L, respectiv.

Fig. 5.12. Activitatea catalazei în biomasa *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, cultivată în prezența nanocompozitului chitosan-fier cu diferite concentrații a nanoparticulelor Fe₃O₄ (50-100 nm)

Prin urmare, rezultate obținute demonstrează că nanocompozitul chitosan-fier joacă un rol important în activitatea enzimelor antioxidante – superoxid dismutaza și catalaza la tulpina de levuri *Rh. gracilis* CNMN-Y-30. Conform datelor din literatura de specialitate NP Fe₃O₄ acoperite cu chitosan provoacă o activitate antioxidantă mai ridicată decât NP Fe₃O₄ neacoperite și induce creșterea activităților enzimelor antioxidante precum SOD și CAT [176].

Așa dar, studiul a permis stabilirea rolului nanocompozitelor chitosan-fier și chitosan zinc în inițierea și reglarea proceselor biosintetice la levura *Rh. gracilis* CNMN-Y-30. Rezultatele au evidențiat aspecte noi privind viabilitatea și dezvoltarea diferențiată a levurii sub acțiunea nanocompozitelor comparativ cu cultivarea în condiții obișnuite. Rezultatele obținute sunt confirmate și de datele din literatura de specialitate care au demonstrat că NP Fe₃O₄ și ZnO acoperite cu chitosan manifestă efect toxic pronunțat asupra viabilității celulare la microorganisme în dependență de procedeu experimental utilizat, deci prezintă interes pentru biomedicină și cosmetologie [58, 139, 213]. De asemenea cercetările demonstrează și o activitate antioxidantă mai mare a nanocompozitelor chitosan Fe₃O₄ asupra enzimelor lacaza, SOD, GPX și CAT [176]. Aceste enzime prezintă interes pentru industrie și în reciclarea deșeurilor [235].

Astfel, utilizarea NP Fe₃O₄ încorporate în chitosan pot reduce detergenții, produsele de îngrijire personală și farmaceutice din sol și apele contaminate [73, 249]. Rezultatele studiului

prezentat contribuie la eficientizarea cercetărilor de elucidare a proceselor sau mecanismelor de acțiune a nanocompozitului asupra obiectelor biologice.

5.3. Concluzii la capitolul 5

1. Cantitatea inițială de chitosan, concentrația de nanoparticule metalice și volumul de nanocompozit utilizat pentru cultivarea levurilor sunt factorii principali care influențează eficiența nanocompozitelor chitosan-zinc și chitosan-fier pentru aplicații biotehnologice.
2. Varianta optimă de preparare a nanocompozitelor chitosan – fier și chitosan –zinc este: la 50 mg chitosan se adăugă 50 ml acid acetic 1% și se agită timp de 10 minute la 200 r.p.m. Ulterior, se stabilește pH-ul neutru cu NaOH, se adaugă 1% de alcool etilic de 96%. Se agită 10 minute la 200 r.p.m. În soluția de chitosan se adaugă nanoparticulele Fe_3O_4 (50-100 nm) în concentrație de 30-70 mg/L sau nanoparticulele ZnO (<50 nm) în concentrație de 50 mg/L și se sonifică 10 minute. În timpul acestui proces moleculele de chitosan sunt absorbite pe suprafața nanoparticulelor metalice. Pentru cultivarea submersă a levurilor, nanocompozitul se adaugă în mediul de cultură YPD în volum de 2%.
3. Indicii microbiologici reflectă adecvat efectele nanocompozitelor chitosan-zinc și chitosan-fier în procesul de evaluare a acțiunii nanocompozitelor obținute prin diferite procedee asupra levurii reprezentative *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 și se recomandă pentru testarea gradului de influență a nanocompozitelor asupra levurilor.
4. Nanocompozitul chitosan-fier interacționează ușor cu celulele tulpinii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, nu este toxic. La concentrația de 30 mg/L a nanoparticulelor Fe_3O_4 (50-100 nm) levura reacționează prin activizarea biosintezei pigmentilor carotenoizi și enzimelor antioxidante catalaza și superoxid dismutaza. La concentrațiile de 50-70 mg/L nanoparticule în celule se amplifică procesele de biosinteză a proteinelor și carbohidraților.
5. Identificarea proprietăților biologice valoroase a nanocompozitului chitosan-fier, elaborat conform procedului nou permite recomandarea utilizării lui în bionanotehnologii.

CONCLUZII GENERALE

1. Efectele nanoparticulelor ZnO <50 nm, ZnO <100 nm, Fe₃O₄ 10 nm, Fe₃O₄ 30 nm, Fe₃O₄ 50-100 nm, stabilite la tulpinile de levuri pigmentate din genul *Rhodotorula*, care se manifestă în funcție de dimensiuni și concentrație, contribuie la elucidarea căilor de acțiune și identificarea grupărilor funcționale celulare implicate în răspunsul la acțiunea nanoparticulelor [70, 71, 72, 110, 111, 112, 301, 302, 305].
2. Testele microbiologice și biochimice, aplicate pentru stabilirea viabilității, conținutului de proteine și activitatea enzimei antioxidante catalaza sunt exacte, robuste și pot fi utilizate pentru determinarea gradului de influență a nanoparticulelor oxizilor metalici la levuri, fapt demonstrat în cadrul validării metodelor respective [15].
3. Nanoparticulele ZnO cu dimensiuni de <50 nm și <100 nm, în concentrații 1-70 mg/L intensifică procesele de biosinteză a proteinelor, carbohidraților, carotenoizilor, măresc activitatea superoxid dismutazei și catalazei la *Rh. gracilis* CNMN-Y-03 și *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, prezentând oportunitate de aplicare în calitate de stimulatori în biotehnologia levurilor [8, 11, 13, 16, 26, 27, 29, 31, 67, 113].
4. Procedul elaborat de cultivare a levurilor *Rh. gracilis* cu aplicarea nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni de <50 nm, în concentrație de 20 mg/l, permite majorarea conținutului de proteine în biomasa levuriană cu 23-34% și contribuie la ameliorarea conținutului aminoacizilor valoroși [17, 18].
5. Nanoparticulele Fe₃O₄ cu dimensiunile 10 nm, 30 nm, 50 -100 nm, în limitele de concentrații de la 0,5 la 30,5 mg/L, acționează la nivelul sistemelor biochimice de sinteză a componentelor celulare a levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30, provocând micșorarea conținutului de proteine, carotenoizi, și a activității catalazei. Corelarea inversă negativă între parametrii biochimici și concentrația NP este demonstrată de valorile coeficienților de corelare: 0,840 (proteine), 0,849 (carotenoizi), 0,722 (catalaza) [6, 7, 10, 12, 24, 25, 28, 32, 64, 68, 69, 70, 303, 304, 306].
6. Procedul de evaluare a nivelului de siguranță a nanoparticulelor Fe₃O₄ cu utilizarea levurii pigmentate *Rhodotorula gracilis*, care prevede determinarea concentrațiilor ce provoacă diminuarea cu 50% a conținutului de β-caroten și a activității catalazei, permite stabilirea relațiilor doză-efect și furnizează informații necesare pentru caracterizarea toxicității nanoparticulelor. Concentrațiile de inhibiție IC50%, pentru NP Fe₃O₄ de 10 nm constituie 10 mg/l, iar pentru NP Fe₃O₄ de 50 - 100 nm - 25-30 mg/l [2, 28, 65, 66, 307].

7. Nanocompozitele chitosan-zinc și chitosan-fier, obținute conform procedurii experimental nou, reprezintă produse de perspectivă pentru bionanotehnologii, caracterizate prin capacitate sporită de a iniția biosinteza principiilor bioactive celulare la levurile din genurile *Rhodotorula*. Nanocompozitul chitosan-fier manifestă activitate biologică, exprimată prin sporirea la *Rh. gracilis* CNMN-Y-30 a conținutului de proteine cu 15-35%, carbohidrați cu 13%, pigmentii carotenoizi cu 9-11%, activității CAT cu până la 35, SOD - cu până la 26%, comparativ cu martorul.

Aportul personal: Materiale prezentate în brevetele de invenție MD 4522 „Procedeu de evaluare a toxicității nanoparticulelor oxizilor de metale cu utilizarea levurilor” (anexa 1), MD-4690 „Procedeu de cultivare a levurilor din genul *Rhodotorula*” (anexa 2) și de invenție (nr. 5823 din 2020.02.18) autoarei îi revine cotă parte conform listei autorilor. Rezultatele obținute în cadrul elaborării tezei de doctor, analiza, generalizările și concluziile aparțin autoarei.

Rezultatele științifice principale. În premieră sunt validate teste microbiologice și biochimice și identificate grupările funcționale celulare a levurilor pigmentate din genul *Rhodotorula*, implicate în răspunsul la acțiunea nanoparticulelor. În premieră este elucidat caracterul de acțiune a nanoparticulelor ZnO și Fe₃O₄ asupra viabilității, producției de biomasă, caracterelor morfologice celulare și coloniale, conținutului de proteine, carbohidrați, carotenoide, enzimelor antioxidante la levurile din genul *Rhodotorula* în dependență de dimensiuni și concentrație. S-a demonstrat că nanoparticulele ZnO, utilizate în concentrații 1-20 mg/L la cultivarea *Rhodotorula gracilis*, influențează pozitiv procesele de multiplicare și biosinteză a proteinelor, carbohidraților și pigmentilor carotenoidici. S-a demonstrat că nanoparticulele Fe₃O₄ induc la *Rh. gracilis* modificări semnificative în procesele biosintetice și sistemul de apărare antioxidant, care se manifestă prin scăderea conținutului de carotenoide și enzimei catalaza. În premieră este elucidat caracterul de acțiune a nanocompozitelor chitosan-zinc și chitosan-fier asupra levurilor din genul *Rhodotorula*. Au fost elaborate două procedee noi de sporire a cantității și calității proteinelor cu utilizarea nanoparticulelor ZnO și de evaluare a toxicității nanoparticulelor Fe₃O₄ cu utilizarea în calitate de model a levurii *Rhodotorula gracilis*. Procedeele sunt confirmate de 2 brevete de invenție și o cerere de brevet de invenție (nr. 5823 din 2020.02.18).

Problema științifică importantă soluționată în lucrare. Au fost stabilite efectele nanoparticulelor oxizilor de metale ZnO și Fe₃O₄ asupra levurilor de interes biotehnologic din genul *Rhodotorula*, ceea ce a contribuit la elucidarea unor mecanisme de acțiune, fapt ce a permis aprecierea perspectivelor de utilizare în bionanotehnologii.

Publicații la tema tezei. Rezultatele cercetărilor la tema tezei de doctor au fost publicate în 46 de lucrări științifice: 15 articole în reviste recenzate (7 în reviste internaționale, 3 cotate ISI și SCOPUS; 8 în reviste naționale categoria B, 3 în monoautorat), 7 articole în culegeri (3 în monoautorat), 1 lucrare științifico-metodică, 14 teze la conferințe internaționale și naționale (3 în monoautorat), 2 brevete de invenție și 1 cerere de brevet de invenție, 7 materiale la saloane de invenții (5 medalii de aur, 1 medalie de bronz), 2 acte de implementare.

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatele cercetării „Stabilirea efectului nanomaterialelor asupra dezvoltării și productivității levurilor” sunt aplicate în cadrul Institutului de Inginerie Electronică și Nanotehnologii “D. Ghițu” Act nr. 121 din 29.11.2018 (Anexa 3). „Metoda spectrofotometrică validată de determinare a activității enzimei catalaza” este utilizată în lucrul practic în laboratorul Microbiologia solului, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie Act nr. 96 din 07.11.2019 (Anexa 4).

RECOMANDĂRI PRACTICE

Se recomandă:

1. Metodele de determinare a viabilității celulelor, conținutului de proteine și activității enzimei antioxidante catalaza pentru determinarea gradului de influență a nanoparticulelor oxizilor metalici la microorganisme.
2. Procedul de cultivare a levurilor *Rh. gracilis* cu aplicarea nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni de <50 nm, pentru majorarea conținutului de proteine și ameliorarea calității aminoacizilor în biomasa celulară.
3. Procedul de evaluare a pericolului nanoparticulelor oxizilor metalici cu utilizarea levurii pigmentate *Rh. gracilis*.
4. Două procedee de obținere a nanocompozitelor chitosan-zinc și chitosan-fier pentru utilizare în bionanotehnologii.

BIBLIOGRAFIE

În limba română

1. ANGHEL, L. Aspecte fizico-chimice ale procesului de sinteză microbiologică a nanoparticulelor de fier, teză de doctor în științe chimice. Chișinău, 2016, pp. 140.
2. BEȘLIU, A., USATII, A., CHISELIȚĂ, N., RUSU, E., GUȚUL, T. Procedeu de evaluare a toxicității nanoparticulelor oxizilor de metale cu utilizarea levurilor. In: *Expoziția Internațională Specializată Infoinvent*, 15-18 Noembrie, 2017, Chișinău, Republica, pp. 200.
3. BEȘLIU, A. Evaluarea influenței nanoparticulelor oxidului de fier asupra caracterilor morfologice a tulpinii de levuri *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30. In: *Conferința științifică a doctoranzilor cu participare internațională, ediția VI-a Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători*. 15 iunie 2017, Chișinău, Republica Moldova, pp. 161-165.
4. BEȘLIU, A. Implicarea levurilor din genul *Rhodotorula* în biotehnologii (Reviul literarurii). Conferința științifică a doctoranzilor In: *Conferința științifică a doctoranzilor cu participare internațională, ediția VI-a Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători*, 10 iunie 2019, Chișinău, Republica Moldova, pp. 50-53. ISBN 978-9975-108-66-9.
5. BEȘLIU, A. Nanoparticule în baza metalelor: proprietăți, perspective și riscuri legate de utilizarea lor în diverse domenii. In: *Buletinul AȘM, Seria Științele vieții*. 2017, vol. 333, nr. 3, pp.150-156. ISSN 1857-064X.
6. BEȘLIU, A., CHIRIȚĂ, E., USATÎI, A. Influența nanoparticulelor TiO_2 și Fe_3O_4 asupra creșterii și compoziției biochimice la tulpina de levuri *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30. In: *Studia Universitatis Moldaviae*. 2016, vol. 91, nr.1, pp. 72-75. ISSN 1814-3237.
7. BEȘLIU, A., EFREMOVA, N., USATII, A. Activitatea enzimelor antioxidante la levura pigmentată *Rhodospiridium toruloides* CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe_3O_4 . In: *Conferința științifică cu participare internațională „Biodiversitatea în contextul schimbărilor climatice”*, ediția a II-a, 23 noiembrie, 2018, Chișinău, Republica Moldova, pp. 131-134. ISBN 978-9975-3178-9-4.
8. BEȘLIU, A., EFREMOVA, N., USATÎI, A., BATÎR, L. Evaluarea impactului nanoparticulelor de oxid de zinc asupra tulpinii de levuri pigmentate *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03. In: *Studia Universitatis. Seria Științe Reale și ale Naturii*. 2019, vol. 121, nr. 1, pp. 95-99. ISSN 1814-3237.

9. **BEȘLIU, A.,** USATÎL, A., CHISĂLIȚĂ, N., RUSU, E., GUȚUL, T. Assessment method of the effects of nano- oxides with use of yeasts. In: *Euroinvent*, Iași , România, 25 may, 2017, pp. 193. ISBN 978-606-775-212-0.
10. **BEȘLIU, A.,** USATÎL, A., EFREMOVA, N. Efectul nanoparticulelor Fe₃O₄ asupra conținutului de proteine și carbohidrați la *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30. In: *Conferința științifică națională cu participare internațională Integrare prin cercetare și inovare*, 8-9 noiembrie 2018, Chișinău, Republica Moldova, pp 39-43. ISBN 978-9975-142-4 -6.
11. **BEȘLIU, A.,** USATII, A., EFREMOVA, N. Efectul nanoparticulelor ZnO asupra conținutului de pigmenți carotenoizi la tulpina de levuri *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30. In: *Simpozionului Științific Internațional "Biotehnologii avansate – realizări și perspective"*, ediția a V-ea, 21-22 octombrie 2019, Chișinău, Republica Moldova.
12. **BEȘLIU, A.,** USATÎL, A., EFREMOVA, N. Elucidarea efectelor nanoparticulelor Fe₃O₄ asupra viabilității și productivității levurii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 în funcție de dimensiuni și concentrație. In: *Conferința științifică a doctoranzilor cu participare internațională, ediția VII-a Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători*. 15 iunie 2018, Chișinău, Republica Moldova, pp.119-124. ISBN 978-9975-108-45-4.
13. **BEȘLIU, A.,** USATÎL., EFREMOVA, N. Influența nanoparticulelor ZnO asupra activității enzimelor antioxidante catalaza și superoxid dismutaza la levurile *Rhodotorula gracilis*. In: *Conferința științifică cu participare internațională „Biodiversitatea în contextul schimbărilor climatice”, ediția a III-a*, 22 noiembrie 2019, Chișinău, Republica Moldova, pp. 232-237.
14. DĂNILĂ, G., COTRAU, M., NECHIFOR, M.M. Ghid de date toxicologice. București: ed. Medicală, 1984, 500 p.
15. EFREMOVA, N., **BEȘLIU, A.,** BATÎR, L., BÎRSA, M. Validarea testelor microbiologice și biochimice pentru studii de nanotehnologie. In: *Expoziția Internațională Specializată Infoinvent*, 20-23 Noiembrie, 2019 p. 179-180.
16. EFREMOVA, N., **BEȘLIU, A.,** USATÎL, A. Influence of zinc oxide nanoparticles on productivity and viability of pigmented yeast strain. In: *Conferința științifică națională cu participare internațională Integrare prin cercetare și inovare*. 8-9 noiembrie 2018, Chișinău, Republica Moldova, pp 14-16. ISBN 978-9975-142-49-6.

17. EFREMOVA, N., **BEȘLIU, A.**, USATÎL, A. Procedeu de cultivare a levurilor *Rhodotorula gracilis*. In: *Expoziția Internațională Specializată Infoinvent*, 20-23 noiembrie, 2019, Chișinău, Republica, pp. 216.
18. EFREMOVA, N., **BEȘLIU, A.**, USATÎL, A. Procedeu de cultivare a levurilor *Rhodotorula gracilis*. Data depozit 2018. 07. 31, Publicat 04.2020. In: *BOPI*. 2020, nr.4, pp 44.
19. IACOB, M. Sinteza nanoparticulelor oxizilor metalici din precursori clusteri ai fierului și caracterizarea lor, teză de doctor în științe chimice. Chișinău, 2016, pp.176.
20. RUDIC, V., CEPOI, L., RUDI, L., MISCU, V., CHIRIAC, T., SADOVNIC, D. *Procedeu de apreciere a toxicității nanoparticulelor cu ajutorul microalgei roșii Porphyridium cruentum*. Brevet de invenție 4200. Institutul de Microbiologie și Biotehnologie. Data depozit 2012.07.05, Publicat 28.02.2013. In: *BOPI*. 2013, nr.2, pp. 22-23.
21. TIGHINEANU, I. Nanotehnologiile schimbă lumea. In: *Revista de Știință, Inovare, Cultură și Artă „Akademos”*. 2016, vol. 41, nr. 2, pp. 40-44. ISSN 1857-0461.
22. PRISACARI, S., TODIRAȘ, V., GUȚU, T., CORCIMARU, S. Influența nanoparticulelor in baza fierului asupra creșterii plantelor de mazărice in solul poluat cu trifluralină. In: *Conferința Științele vieții în dialogul generațiilor: conexiuni dintre mediul academic, universitar și de afaceri*. 2019, pp. 163-164.
23. USATÎL, A., **BEȘLIU, A.**, CHIRIȚA, E. Caractere fenotipice și compoziția biochimică a tulpinii de levuri pigmentate *Rh. gracilis* CNMN-Y-30. In: *Conferința Tehnico-Științifică a Colaboratorilor, Doctoranzilor și Studenților*, 26-28 noiembrie, 2015. Chișinău, pp. 31-35. ISBN 978-9975-45-440-7.
24. USATÎL, A., **BEȘLIU, A.**, CHIRIȚA, E., BORISOVA, T. Efectele nanoparticulelor Fe₃O₄ asupra parametrilor bioproductivi a levurii *Rh. gracilis* CNMN-Y-30. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2017, vol. 331, nr. 1, pp. 111-117. ISBN 1857-064X
25. USATÎL, A., **BEȘLIU, A.**, CHISELIȚĂ, N., EFREMOVA, N., BEJENARU, L., TOFAN, E., BORISOVA, T. Efectul nanooxizilor metalici asupra unor levuri de interes biotehnologic. In: *Buletinul AȘM, Seria Științele vieții*. 2017, vol. 333, nr 3, pp. 144-150. ISBN 1857-064X.
26. USATÎL, A., **BEȘLIU, A.**, CHISELIȚĂ, N., RUSU, E., GUȚUL, T. Procedeu de evaluare a toxicității nanoparticulelor oxizilor de metale cu utilizarea levurilor.

- Institutul de Microbiologie și Biotehnologie. Data depozit 2016. 12. 22, Publicat 10.2017. In: *BOPI*. 2017, nr.2, pp.
27. USATÎI, A., **BEȘLIU, A.**, EFREMOVA, N. Rolul nanoparticulelor ZnO (<50 nm) în procesul de cultivare a levurii *Rhodosporidium toruloides* CNMN-Y-30. In: *Buletinul AȘM, Seria Științele vieții*. 2018, vol. 335, nr. 2, pp.121-126. ISBN 1857-064X.
 28. USATÎI, A., **BEȘLIU, A.**, EFREMOVA, N., CHISELIȚĂ, N. Recomandări de evaluare a nanoparticulelor oxizilor de metale cu utilizarea levurilor. Chișinău:, 2017, 18 p.
 29. USATÎI, A., CHISELIȚA, N., **BEȘLIU, A.**, EFREMOVA, N., BEJENARU, L., BATÎR, L., DADU, C., TANASE, A. Perspectiva biotehnologică privind aplicarea nano-oxizilor metalici la cultivarea levurilor de interes biotehnologic, In: *Studia Universitatis Moldaviae*. 2019, vol. 121, nr. 1, pp.103-111. ISBN 1814-3237.
 30. ZARNEA, G. *Tratat de Microbiologie generală*. București: Editura Academiei Romane. 1994, 170 p.

În limba rusă

31. **БЕШЛИУ, А.** Влияние наночастиц окисда цинка на содержание каротиноидных пигментов дрожжей *Rhodotorula gracilis*. *Всероссийская конференция с международным участием Микробиология: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии*, 23-24 декабря 2019, Москва, Россия, 17 с.
32. **БЕШЛИУ, А.** Влияние наночастиц Fe₃O₄ на рост дрожжей *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 и содержание полисахаридов. *Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных Ломоносов*, 9- 13 апреля 2018, Москва, Россия. ISBN 978-5-317-05800-5.
33. КИРИЦА, Е. Влияние растительных экстрактов на процесс биосинтеза каротиноидов дрожжами. В: *Вестник АПК Верхневолжья*. 2017, том. 39, № 3, с. 54-58. ISBN 978-5-98914-176-0.
34. КИРИЦА, Е. Направленный синтез каротиноидов у дрожжей и перспектива их использования. Автореферат. 2005, 30 с.
35. КОНЦЕВАЯ, И.И. *Микробиология. Практическое пособие для студентов специальности Биология (научнопедагогическая деятельность)*. Гомель: УО ГГУ им. Ф. Скорины, 2011, 126 с.
36. КРУПЕЙ, К.С., РЫЛЬСКИЙ, А.Ф. Биоиндикация загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами с помощью каротинсинтезирующих дрожжей рода

Rhodotorula. В: *Актуальні питання біології, екології та хімії*. 2015, том. 9, № 1, pp. 64-75.

37. НЕКРАСОВА, Г.Ф., КИСЕЛЕВА, И.С. Руководство к лабораторным и практическим занятиям. *УМКД Экологическая физиология растений*. 2008, 157 с.
38. КОВЗУНОВА О. В., ЭРСТ А. А., АЗИЗБЕКЯН С. Г. Влияние наночастиц металлов на протеомный статус представителей рода *Silene L*. В: *Материалы Международной научной конференции, посвященной 85-летию Центрального ботанического сада НАН Беларуси*. 2017, 528 с. ISBN 978-985-7136-55-1.
39. ЧИЛОЧИ, Александра; ТЮРИНА, Жанета; ЛАБЛЮК, Светлана; ДВОРНИНА, Елена; КЛАПКО, Светлана; БИВОЛ, Чезара; ГУЦУЛ, Татiana; РУСУ, Емил. Особенности биосинтеза липаз микромицетом *Rhizopus arrhizus* CNMN- FD- 03 под влиянием наночастиц окислов некоторых металлов. В: *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*. 2017, nr. 2(332), 116-125 с. ISBN 1857-064X.

În limba engleză

40. ABBASI, A., FEKRI , S., AKBARZADEH., MILANI, M., NASRABADI, H.T., JOO, S.W., HANIFEHPOUR, Y., NEJATI-KOSHKI, K., PASHAEI-ASL, D. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. In: *Nanoscale Res Lett*. 2014, vol. 9, nr. 247, pp. 2-10. ISBN 1556-276X-9-247.
41. ABDELHADY, M. M. Preparation and Characterization of Chitosan/Zinc Oxide Nanoparticles for Imparting Antimicrobial and UV Protection to Cotton Fabric. In: *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. 2012, vol. 1, pp. 1- 6. ISSN: 0732-8303.
42. ABOU EL-YAZIED, A., SHALABY, O. A., EL-GIZAWY, A.M., KHALF AND, S.M., EL-SATAR A. Effect of Magnetic Field on Seed Germination and Transplant Growth of Tomato. In: *Journal of American Science*. 2011, vol. 12, nr. 7, pp. 306-312. ISSN 1545-1003.
43. ABOU EL-YAZIED, A., EL-GIZAWY, A.M., KHALF, S.M., EL-SATAR A., SHALABY, O.A. Effect of Magnetic Field Treatments for Seeds and Irrigation Water as Well as N, P and K Levels on Productivity of Tomato Plants. In: *Journal of Applied Sciences Research*. 2012, vol. 4, nr. 8, pp. 2088-2099. ISSN: 2383-2215.
44. AEBI, H. Catalase in Vitro. In: *Methods in Enzymology*. 1984, nr 105, pp. 121-126. ISSN 0076-6879.

45. AFAF, E. A., ARJUMAND, S. W., SOHAIR, A. H. On the biological phenomenon of nanoparticle-cellular protein interactions. In: *International Journal of Pharma and Bio Sciences Biochemistry*. 2012, vol. 3, nr. 1, pp. 645-657. ISSN 0975-6299.
46. 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. In: *Lett. Appl. Microbiol.*, 2003, vol. 37, nr. 3, pp. 268-274. ISBN 1472-765X.
47. AJAYAN, P.S., SCHADLER, L., BRAUN, P.V. Nanocomposite Science and Technology. Weinheim: Wiley-VCH, 2003. pp. 239. ISBN 3-527-30569-6.
48. ALNARABJI, M.S., HAMED, Y. H.Y., ARDAKANI, S.E.M., AZIZI, K., KLEMEŠ, J.J., ABDULLAH, B., TASFY, S. F. H., HAMID, S.B. A., NASHED, O. Scalable bio-friendly method for production of homogeneous metal oxide nanoparticles using green bovine skin gelatin. In: *Journal of Cleaner Production*. 2017, vol. 162, pp. 186-194. ISBN 0959-6526.
49. AL-RAWI, M., DIABATE, S., WEISS, C. Uptake and intracellular localization of submicron and nano-sized SiO₂ particles in HeLa cells. In *Arch. Toxicol.* 2011, vol. 7, nr. 85, pp. 813–826. ISBN 0171-9750.
50. ALVI, N. H., HASAN, K., NUR, O., WILLANDER, M. The origin of the red emission in n-ZnO nanotubes/p-GaN white light emitting diodes. In: *Nanoscale Research Letters*. 2011, vol. 6, nr. 130, pp. 1-7. ISBN 1556276X.
51. ANCIFEROVA, I.V. SOURCES OF NANOPARTICLES INFLOW TO THE ENVIRONMENT. In: *Perm National Research Polytechnic University*. 2012, pp. 62. ISBN 22249893.
52. ANSARI, S. A. M. K., FICIARÀ, E., RUFFINATTI F. A., STURA, I., ARGENZIANO, M., ABOLLINO, O., CAVALLI, R., GUIOT, G., D'AGATA, F. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Functionalization for Biomedical Applications in the Central Nervous System. In: *Materials*. 2019, vol. 3, nr. 12, pp 465. ISSN 1996-1944.
53. ANSARI, S. A., HUSAIN, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review. In: *Biotechnol Adv.* 2011, vol. 3, nr. 30, pp. 512–523. ISSN: 0734-9750.
54. ARIAS, L. S. Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications: A Perspective on Synthesis, Drugs, Antimicrobial Activity, and Toxicity. In: *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 2018, vol. 7, pp. 2-46. ISSN 2079-6382.

55. ATTARAN, S.A., HASSAN, A., WAHIT, M.U. Materials for food packaging applications based on bio-based polymer nanocomposites: A review. In: *Thermoplast. Compos. Mater.* 2017, vol. 30, nr. 2, pp. 143–173. ISSN 08927057.
56. AARTI, P.D., TANAKA, R., TANAKA, A. Effects of oxidative stress on chlorophyll -biosynthesis in cucumber (*Cucumis sativus*) cotyledons. In: *Physiologia Plantarum.* 2006, vol. 128, pp.186-197. ISSN:1399-3054.
57. ALKHATIB, R., ALKHATIB, B., ABDO, N., AL-EITAN, L., CREAMER, R. Physio-biochemical and ultrastructural impact of (Fe₃O₄) nanoparticles on tobacco. In: *BMC Plant Biol.* 2019, vol. 1, nr.19, pp. 253. ISSN 2049-3630.
58. ARAKHA, M., SWETA, P., DEVYANI, S., TAPAN, K., BAIRAGI, C., MALLICK, K., BIBEKANAND, M., SUMAN, J. Antimicrobial activity of iron oxide nanoparticle upon modulation of nanoparticle-bacteria interface. In: *Sci. Rep.* 2015, nr. 5, pp. 1-12. ISSN 2045-2322.
59. BAN, D., SUBHANKAR, P. Zinc Oxide Nanoparticles Modulates the Production of β -Glucosidase and Protects its Functional State Under Alcoholic Condition in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Biochem Biotechnology.* 2014, vol. 1, nr. 173, pp. 155–166.
60. BANOEE, M., SEIF, S., NAZARI, Z.E., FESHARAKI, P., SHAHVERDI, H.R., MOBALLEGH, A., SHAHVERDI, A.R. ZnO nanoparticles enhanced antibacterial activity of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. In: *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials.* 2010, vol.2, nr. 93, pp. 557-561. ISSN: 2576-6422.
61. BATT, C., TORTORELLO, M. *Encyclopedia of Food Microbiology.* New York: Academic Press. 2014, pp. 294. ISBN 978-0-12384730-0.
62. BELAÏD, S., STANICKI, D., VANDER ELST, L., MULLER, R.N., LAURENT, S. Influence of experimental parameters on iron oxide nanoparticle properties synthesized by thermal decomposition: Size and nuclear magnetic resonance studies. In: *Nanotechnology.* 2018, vol. 16, nr. 29. ISSN 0957-4484.
63. BOLOGNESI, C., CASTLE, L., CRAVEDI, J., ENGEL, K., FRANZ, R., FOWLER, P., GROB, K., GÜRTLER, R., HUSØY, T., SIRPA, K. European Food Safety Authority (EFSA) Safety assessment of the substance zinc oxide, nanoparticles, for use in food contact materials. In: *EFSA J.* 2016, nr. 14, pp. 4408. ISSN: 1831-4732.
64. BESHLIU, A., USATII, A., EFREMOVA, N., CHISELITSA, N. The effect of metallic nanoparticles on morphological features of *Rhodotorula* and *Saccharomyces*

- yeasts. In: *International scientific conference for students and phd students youth and progress of biology dedicated to the 185th anniversary from the birthday of B. Dybowski*, 10-12 april, 2018, Lviv, Ukraine, pp. 207. ISBN 978-617-642-1.
65. **BESHLIU, A.**, USATII, A., CHISELIȚĂ, N., RUSU, E., GUȚUL, T. Assessment method of the effects of nano-oxides with use of yeasts. In: *Inventica*, 27 - 29 June, 2018, Iași, România, pp. 332.
 66. **BESHLIU, A.**, USATII, A., CHISELIȚĂ, N., RUSU, E., GUȚUL, T. Assessment method of the effects of nano-oxides with use of yeasts. In: *Târgul internațional de invenții și idei practice Invent-Invest*, 9-11 noiembrie, 2018, Chișinău, Republica Moldova.
 67. **BESHLIU, A.**, USATII, A., EFREMOVA, N. The effect of ZnO nanoparticle on carbohydrates content at yeast strain *Rhodospiridium toruloides* CNMN-Y-30. In: *XV International scientific conference for students and Phd students dedicated to the 135th anniversary of J. Parnas*, 9 april, 2019, Lviv, Ukraine, pp. 9-11. ISBN 978-617-10-0512-9.
 68. **BEȘLIU, A.** Carotenoid biosynthesis potential and morphological characters of *Rhodotorula gracilis* yeast under the action of Fe₃O₄ nanoparticles. In: *Studia Universitatis Moldaviae, Series Real Sciences and Nature*. 2018, vol. 111, nr.1, pp. 66-70. ISSN 1814-3237.
 69. **BEȘLIU, A.**, EFREMOVA, N., USATII, A. The effects of iron oxid nanoparticles on carotenoid pigments content of yeasts *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology 4th edition*, 11-12 october, 2018, Chisinau, Republic of Moldova, pp. 154. ISBN 978-9975-3178-8-7.
 70. **BEȘLIU, A.**, USATÎL, A., CHIRIȚA, E. The evaluation of changes of productivity and of chemical composition of yeast *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 to cultivation in the presence of Fe₃O₄ nanoparticles. In: *International Conference on Microbial Biotechnology dedicated to the 70th anniversary of first research institutions of the ASM, the 55th anniversary of the inauguration of the Academy of Sciences of Moldova*, 12-13 october, 2016, Chisinau, Republic of Moldova, pp. 162.
 71. **BEȘLIU, A.**, USATÎL, A., EFREMOVA, N. Biosynthesis of proteins at *Rhodospiridium toruloides* yeast strain under influence of metal oxide nanostructures. *International congress on oil and protein crops*. In: *The congress dedicated to the 50th anniversary of Scientific Association of Geneyicists and Breeders of the Republic of*

- Moldova, May 20-24, 2018, Chisinau, Republic of Moldova, p.102. ISBN 978-9975-3178-5-6.
72. BEȘLIU, A., USATÎL, A., EFREMOVA, N., CHISELIȚĂ, N. The effect of ZnO nanoparticles on the activity of antioxidant enzymes and carotenoid content at *Rhodospiridium toruloides* CNMN-Y-30 Yeast. In: *Experimental and Molecular Biology*. 2018, vol. 19, nr. 4, pp. 91 – 98. ISSN 2601-6974.
 73. BO, B., XIAOHUI, X., CHANGCHUAN, L., JIANYU, X., HONGLUN, W., YOURUI, S. Synthesis, Properties, and Applications of Multifunctional Magnetic Nanostructures. In: *Journal of Nanomaterials*. 2018, pp. 1-14. ISSN 16874129.
 74. BHANDARI, R., GUPTA, P., DZIUBLA, T., HILT, J.Z. Single step synthesis, characterization and applications of curcumin functionalized iron oxide magnetic nanoparticles. In: *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2016, vol. 67, nr. 1, pp. 59–64. ISSN 0928–4931.
 75. BHUSHAN, B. Introduction to Nanotechnology: History, Status, and Importance of Nanoscience and Nanotechnology Education. In: *Global Perspectives of Nanoscience and Engineering Education*. Switzerland: Springer International. 2016, pp. 1-31. ISBN 978-3-319-31832-5.
 76. BHUVANESHWARI, M., ISWARYA, V., ARCHANAA, S., MADHU, G. Cytotoxicity of ZnO NPs towards fresh water algae *Scenedesmus obliquus* at low exposure concentrations in UV-C, visible and dark conditions. In: *Aquatic Toxicology*. 2015, nr. 162, pp. 29–38. ISSN 0166-445X.
 77. BIEHL, P., VON DER LÜHE, M., DUTZ, S., SCHACHER, F. Synthesis Characterization, and Applications of Magnetic Nanoparticles Featuring Polyzwitterionic Coatings. In: *Polymers*. 2018, nr. 10, pp. 91. ISSN 2073-4360.
 78. BRAYNER, R., FERRARI-ILIOU, R., BRIVOIS, N., DJEDIAT, S., BENEDETTI, M., FIEVET, F. Toxicological Impact Studies Based on *Escherichia coli* Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium. In: *Nano Lett.* 2006, vol. 6, nr. 4, pp. 866–870. ISSN 1530-6984.
 79. BHOSALE, P., GADRE, R.V. Production of β -carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*. In: *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001, nr. 55, pp. 423– 427. (citat 14.04.2020). Disponibil. doi:10.1007/s002530000570
 80. BORYSOV, A., KRISANOVA, N., CHUNIHIN, O., OSTAPCHENKO, L., POZDNYAKOVA, N., BORISOVA, T. A comparative study of neurotoxic potential

- of synthesized polysaccharide-coated and native ferritin-based magnetic nanoparticles. In: *Croat. Med.* 2014, nr. 55, pp. 195–205. ISSN 0353-9504.
81. BRAIN, J., CURRAN, M., DONAGHEY, T., MOLINA, R. Biologic responses to nanomaterials depend on exposure, clearance, and material characteristics. In *Nanotoxicology*. 2009, vol.3, nr. 3, pp. 174-180. ISSN 1743-5390.
 82. BRITTON, G, HORNERO-MÉNDEZ, D. Carotenoids and colour in fruit and vegetables. Oxford : Clarendon Press. 1997, 11-27 p.
 83. BUI, V.K.H., PARK, D., LEE, Y. C. Chitosan Combined with ZnO, TiO₂ and Ag Nanoparticles for Antimicrobial Wound Healing Applications: A Mini Review of the Research Trends. In: *Polymers*. 2017, vol. 9,nr. 21, pp. 1-24. ISSN 2073-4360.
 84. BUSCHOW, K. H. J., BOER, F. R. Physics of Magnetism and Magnetic Materials. Boston: Springer. 2003. 179 p. ISBN 978-0-306-48408-7.
 85. BUZZINI, P., RUBINSTEIN, L., MARTINI, A. Production of yeast carotenoids by using agromindustrial by products. In: *Agro Food Ind Hi Tech*. 2001, 12, pp. 7–10.
 86. CASCONE, M.G., BARBANI, N., CRISTALLINI, C., GIUSTI, P., CIARDELLI, G., LAZZERI, L. Bioartificial polymeric materials based on polysaccarides. In: *Biomater. Sci., Polym Ed*. 2001, vol.3, nr. 12, pp. 267-281. ISSN 1722-6996.
 87. CEPOI, L., RUDI, L., CHIRIAC, T., VALUTA, A., ZINICOVSCAIA, I., MITINA, T., DUCA, G., KIRKESALI, E., FRONTASYEVA, M.V., PAVLOV, S.S. Microalgae as possible silver “nanofactories”. In: *The 2nd International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering (ICBNME)*. Book of Abstracts, April 18-20, 2013, Chişinău, Republic of Moldova, p. 433-434. ISBN 978-3-030-31865-9.
 88. CHANG, Y.N., ZHANG, M., XIA, L., ZHANG, J., XING, G. The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. In: *Materials*. 2012, vol. 12, nr. 5, pp. 2850–2871. ISSN 1996-1944.
 89. CHEN, A. Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. In: *Exp. CellRes*. 2005, vol. 305, pp. 51–62. ISSN: 0014-4827.
 90. CHEN, X., WU, Z., LIU, D., GAO, Z. Preparation of ZnO Photocatalyst for the Efficient and Rapid Photocatalytic Degradation of Azo Dyes. In: *Nanoscale Research Letters*. 2017, vol,1, nr.12, pp. 143. ISSN 1556-276X.
 91. CHENG, T., LIANG, Q., MANOOR, P., CHOON, N. Zinc oxide nanoparticles exhibit cytotoxicity and genotoxicity through oxidative stress responses in human lung

- fibroblasts and *Drosophila melanogaster*. In: *International Journal of Nanomedicine*. 2017, nr. 12, pp. 1621-1637. ISSN 1176-9114.
92. CHOI, S., RYU, D., RHEE, J. Production of microbial lipid effects of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*. In *Biotechnology and Bioengineering*. 1982, vol. 24, nr. 5, pp. 1165–1172. ISSN:1097-0290.
 93. CATALANO, E. In vitro biological validation and cytocompatibility evaluation of hydrogel iron-oxide nanoparticles. In: AIP Conference Proceedings. 2017, nr. 1873, pp. 020011.
 94. CONG, W., XUDONG, G., ZHONGQIN, C., YUE, C., HAIXIA, C. Preparation, Characterization and Application of Polysaccharide-Based Metallic Nanoparticles: A Review. In: *Polymers*. 2017, vol. 12, nr. 9, pp. 689. ISSN 2073-4360.
 95. CORADETTI, S.T., PINEL, D., GEISELMAN, G.M., ITO, M., MONDO, S.J., MORGANN, C. R., YA-FANG, C., BAUER, S., GRIGORIEV, I., GLADDEN J. M., SIMMONS B. A., BREM, R.B., ARKIN, A. P., SKERKER, J. M. Functional genomics of lipid metabolism in the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. In: *Elife*. 2018, vol. 7, pp. 1-55. ISSN 2050-084X.
 96. COTTINGHAM, M., HOLLINSHEAD, D., VAUX, J. Amyloid fibril formation by a synthetic peptide from a region of human acetylcholinesterase that is homologous to the Alzheimer's amyloid-beta peptide. In *Biochemistry*. 2002, nr. 41, pp. 13539–13547. ISSN 0006-2960.
 97. COUVREUR, P. Polyalkylcyanoacrylates as colloidal drug carriers. In: *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 1988, vol. 1, nr. 5, pp. 1–20. ISSN 0743-4863.
 98. DAMASCENO, B.P.G.L.S., OLIVEIRA, J.A., SILVEIRA, E.E., ARAÚJO, W.L.L., OLIVEIRA, I.B., EGITO, A.G. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. In: *Rev. Ciênc. Farm.* 2011, nr. 32, pp. 9-18. ISSN 0014–6722.
 99. DEPLANCHE, K., CALDELARI I., MIKHEENKO, I. P., SARGENT, F. MACASKIE, E. Involvement of hydrogenases in the formation of highly catalytic Pd (0) nanoparticles by bioreduction of Pd (II) using *Escherichia coli* mutant strains. In: *Microbiology*. 2010, vol.1, nr. 156, pp. 2630-2640. ISSN 0026-2617.
 100. DEY, P., HARBORNE, J. Methods in Plant Biochemistry. In: *Carbohydr. Academic Press*. 1993, vol. 2, pp. 529. ISSN Carbohydr. Academic Press.

101. DUTTA, P.K., TRIPATHI, S., MEHROTRA, G.K., DUTTA, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. In: *Food Chem.* 2009, nr. 114, pp. 1173–1182. ISSN 0308-8146.
102. DHILLON, G. S., KAUR SURINDER, Brar Satinder Kaur. Facile fabrication and characterization of chitosan-based zinc oxide nanoparticles and evaluation of their antimicrobial and antibiofilm activity. In: *Int Nano Lett.* 2014, vol. 4, nr. 107, pp. 1-11. ISSN: 2008-9295.
103. DIAS, A. M. G. C., HUSSAIN, A., MARCOS, A. S., ROQUE, A. C. A. A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides. In: *Biotechnology Advances.* 2011, vol. 1, nr. 29, pp. 142–155. ISSN 0734-9750.
104. DEEPENDRA, K. B., SUBHANKAR, P. Zinc oxide nanoparticles modulates the production of β -glucosidase and protects its functional state under alcoholic condition in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Appl. Biochem. Biotechnology.* 2014, nr. 173, pp. 155–166. ISSN 02732289.
105. DONG, Y., LOVE, K., DORKIN, J., SIRIRUNGRUANG, S., ZHANG, Y., CHEN, D., ANDERSON, D. Lipopeptide nanoparticles for potent and selective siRNA delivery in rodents and nonhuman primates. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2014, vol. 11, nr. 111, pp. 3955–3960. ISSN 0027-8424.
106. DIMITROV, K., UNRUH, G. C. HADJIPANAYIS, V., PAPAETHYMIOU, A., SIMOPOULOS, A. In: *Phys Rev.* 1999, vol. 59, nr.14, pp.499-504. ISSN 0031-899X.
107. DRIOUCH, H., SOMMER, B., WITTMANN, C. Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. In *Biotechnol Bioeng.* 2010, vol. 105, nr. 10, pp. 58-68. ISSN: 1097-0290.
108. DUDEV, T., LIM, C. Metal binding affinity and selectivity in metalloproteins: Insights from computational studies. *Ann. Rev.* In: *Biophys.* 2008, nr. 37, pp. 97–116. ISSN 1542-0086.
109. DGHOUGH, B., ELIDRISSI, C., BERNEDE, M., ADDOU, M. A. LAMRANI, M., REGRAGUI, H., ERGUIG. In: *Applied Surface Science.* 2006, vol. 253, pp. 1823-1829. ISSN 0169-4332.
110. EFREMOVA, N., BEŞLIU, A., BATAR, L., USATII, A. The effects of ZnO nanoparticles on yeasts cell colonies: dimension and morphological properties. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology 4th edition*, 11-12 october, 2018, Chisinau, Republic of Moldova, pp 152. ISBN 978-9975-3178-8-7.

111. EFREMOVA, N., **BEŞLIU, A.**, USATII, A. Effects of iron oxide nanoparticles on antioxidant enzymes activities of pigmented yeasts. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology 4th edition*, 11-12 october, 2018, Chisinau, Republic of Moldova, pp 153. ISBN 978-9975-3178-8-7.
112. EFREMOVA, N., **BEŞLIU, A.**, USATÎL, A. BATÎR, L., ROŞCA, M. Modulation activity of superoxide dismutase enzyme ar *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 yeast strain by the metal oxide nanostructures. In: *The congress dedicated to the 50th anniversary of Scientific Association of Geneyicists and Breeders of the Republic of Moldova*, May 20-24, 2018, Chisinau, Republic of Moldova, p.106. ISBN 978-9975-3178-5-6.
113. EFREMOVA, N., **BEŞLIU, A.**, USATÎL, A. The impact of zinc oxide nanoparticles on protein content and activity of some antioxidant enzymes at pigmented yeasts. In: *Analele Universităţii din Oradea, Fascicula Biologie*. 2019, vol. 26, nr. 1, pp. 34-37. ISSN 1224-5119.
114. EL-BOUBBOU, K. Magnetic iron oxide nanoparticles as drug carriers: clinical relevance. In: *Nanomedicine*. 2018, vol. 13, nr. 9, pp. 953-971. ISBN 1743-5889.
115. EL-NAGGAR, T., SHAHEEN, S., ZAGHLOU, L M., EL RAFIE, M., HEBEISH, A. Antibacterial Activities and UV Protection of the in Situ Synthesized Titanium Oxide Nanoparticles on Cotton Fabrics. In: *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2016, vol. 55, nr. 10, pp. 2661-2668. ISSN 0888-5885.
116. ELSAESSER, A., TAYLOR, G., YANES, G., MCKERR, E., KIM, E., O'HARE, C. HOWARD V. Quantification of nanoparticle uptake by cells using microscopical and analytical techniques, In: *Nanomedicine*. 2010, nr. 5, pp. 1447–1457. ISBN 1743-5889.
117. ERZURUM, S.C., DANIEL, C., GILLISSEN, A., CHU, C.S., TRAPNELL, B.C., CRYSTAL, R.G. In vivo antioxidant gene expression in human airway epithelium of normal individuals exposed to 100% O₂. In *Appl Physiol*. 1993, vol. 75, pp.1256–1262. ISSN 11603017.
118. ESPITA, P., NILDA, F., JANE, S., NÉLIO, J., RENATO, S., EBER, A. Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications. In *Food Bioprocess Technol*. 2012, vol. 5, pp.1447–1464. ISSN: 19355149.
119. *EU-Directive 93/67/EEC (CEC)*. Technical guidance document in support of commission directive 93/67/eec on risk assessment for new notified substances and

commission regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances. 1996, vol. 2, 337 p.

120. FOROUTAN, L., SOLOUKI, M., ABDOSI, A., FAKHERI, B.A. The effects of zinc oxide nanoparticles on enzymatic and osmoprotectant alternations in different *Moringa peregrina* populations under drought stress. In: *Int J Basic Sci Med*. 2018, vol. 4, nr. 3, pp. 178- 187. ISSN: 2476-664X.
121. FARAJI, Y., YAMINI, Y., REZAEI, M. Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization, and applications. In: *Journal of the Iranian Chemical Society*. 2010, vol. 1, nr. 7, pp. 1-37. ISSN 1735-207X.
122. FINOTELLI, P.V., DA SILVA, D., SOLA-PENNA, M., ROSSI, A.M., FARINA, M., ANDRADE L.R., TAKEUCHI, A.Y., ROCHA-LEÃO, M. H. Microcapsules of alginate/chitosan containing magnetic nanoparticles for controlled release of insulin. In: *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010, vol. 1, nr. 8, 206-211. ISSN 0927-7765.
123. FRENGOVA, G.I., BESHKOVA, D.M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. In: *Journal Ind Microbiology Biotechnology*. 2009, vol. 36, pp. 163. (citat 18.04.2019). Disponibil <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0492-9>.
124. FLORESCU, D., MOUROK, L. G., POLLACK, F. H. LOOK D. C., CANTWELL G., LI. X. In: *Journal of Applied Physics*. 2002, nr. 91, pp. 890. ISSN 0021-8979.
125. GHADI, A., MAHJUB, S., TABANDEH, F., FARID, T. Synthesis and optimization of chitosan nanoparticles: Potential applications in nanomedicine and biomedical engineering. In: *Caspian Intern Med*. 2014, vol. 5, nr.3, pp. 156-161. ISSN: 200-8617.
126. GIL, D., RODRIGUEZ, WARD, B., VERTEGEL, A., IVANOV, V., REUKOV, V. Antioxidant Activity of SOD and Catalase Conjugated with Nanocrystalline Ceria. In: *Bioengineering*. 2017, vol. 18, nr. 4, pp. 1-9. ISSN 2306-5354.
127. GIRALDO, J.P., LANDRY, M.P., FALTERMEIER, S. M., NICHOLAS, T.P., IVERSON, N.M., BOGHOSSIAN, A. A., REUEL, N. F., HILMER, A.J., SEN, F., BREW, J.A STRAN, M.S. Plant nanobionics approach to augment photosynthesis and biochemical sensing. In: *Nat Mater*. 2014, vol.4, nr.13, pp. 400–408. ISSN: 1476-1122.
128. GIORDANI, T., FABRIZI, A., GUIDI, L. Response of tomato plants exposed to treatment with nanoparticles. In: *EQA-International Journal of Environmental Quality*. 2012.vol. 8, pp. 27–38. ISSN 2281-4485.

129. GOODWIN, T. Biosynthesis of carotenoids. In: *Methods in Enzymology*. 1993, Vol. 214, 330-340 p. ISSN 0076-6879.
130. GOU, A., ONNIS-HAYDEN, A., GU, Z. Mechanistic toxicity assessment of nanomaterials by whole-cell-array stress genes expression analysis. In: *Environ. Sci. Technol.* 2010, nr 44, pp. 5964–5970. ISSN: 0013-936X.
131. GARAEVA, S.N., REDKOZUBOVA, G.V., POSTOLATI, G.V. Amino acids in a living organism. In: *Academy of Sciences of Moldova*. 2009, pp. 550.
132. GRUSKIENE, R., KRIVOROTOVA, T., STANEVICIENE, R., RATAUTAS, D., SERVIENE, E., SEREIKAITI, J. Preparation and characterization of iron oxide magnetic nanoparticles functionalized by nisin. In: *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*. 2018, vol.169, nr.1 pp. 126–134. ISSN 0927-7765.
133. GRÜTTNER, C., MÜLLER, K., TELLER, J., WESTPHAL, F. Synthesis and functionalisation of magnetic nanoparticles for hyperthermia applications. In: *Int. J. Hyperthermia*. 2013, nr. 29, 777–789. ISSN 1464-5157.
134. 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, vol. 85, nr. 7, pp. 799-812. ISBN 0171-9750.
135. GUNABALAN, M., GANESH, E., SELVARAJ, M. R. Biotechnological aspects of ZnO nanoparticles: overview on synthesis and its applications. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, vol. 100, nr. 2, pp. 571–581. ISSN 14320614.
136. GUO, H.B., BARNARD, A.S. Naturally occurring iron oxide nanoparticles: Morphology, surface chemistry and environmental stability. In: *Mater. Chem.* 2013, nr. 1, pp. 27. ISSN 0254-0584.
137. GUTIERREZ, A.M., DZIUBLA, T.D., HILT, J.Z. Recent advances on iron oxide magnetic nanoparticles as sorbents of organic pollutants in water and wastewater treatment. In: *Environ Health*. 2017, vol. 1, nr. 32, pp. 111–117. ISSN 1743-4955.
138. GUTUL, T., RASTEMISINA, I., POSTOLACHI, O., NICORICI, A., DVORNIKOV, D., PETRENCO, P. Synthesis and biological application of magnetite nanoparticles. In *Moldavian Journal of the Physical Sciences*. 2015, vol. 14, nr 3-4, pp. 177-188. ISSN 1810-648X.

139. GOMES, V., RODRIGUES, C., VALENTE, S., PIMENTA, C., PIRES, J. A.R., ALVES, M.M., SANTOS, C. F., COELHO, I. M., FERNANDO, A. L. Eco-Friendly ZnO/Chitosan Bionanocomposites Films for Packaging of Fresh Poultry Meat. In: *Coatings*. 2020, vol. 110, nr. 10, pp. 2-20. ISSN 2079-6412.
140. GHAFARIYAN, M. H., MALAKOUTI, M. J., DADPOUR, M. R., STROEVE, P., MAHMOUDI, M. Effects of magnetite nanoparticles on soybean chlorophyll. In: *Environmental Science & Technology*. 2013, vol. 47, nr. 18, pp. 10645–10652.
141. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. New York: Oxford University Press. 1999, 1-25 p.
142. HAN, J., ZHAO, D., LI, D., WANG, W., JIN, Z., ZHAO, K. Polymer-Based Nanomaterials and Applications for Vaccines and Drugs. In: *Polymers*. 2018, vol. 10, nr. 31, pp.1-14. ISSN 2073-4360.
143. HEINLAAN, H., IVASK, A., BLINOVA, I., DUBOURGUIER, H.C., KAHRU, A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus paltryurus*. In: *Chemosphere*. 2008, nr. 71, pp. 1308–1316. ISSN 0045-6535.
144. HARRISON, F.C., KURTZMAN, C. P., FELL, J. W. *The Yeasts a Taxonomic Study*. Amsterdam: Elsevier, 1998, 102 p.
145. HASANY, S.F., AHMED, I., RAJAN, J., REHMAN, A. Systematic Review of the Preparation Techniques of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles. In: *Nanosci. Nanotechnol.* 2013, vol. 6, nr. 2, pp. 148–158. ISSN: 1533-4880.
146. HAUCK, A., GHAZANI, W., CHAN, W. Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells. In: *Small*. 2008, nr. 4, pp. 153–159. ISSN 16136829.
147. HAZEEM, L., BOUOUDINA, M., RASHDAN, S., BRUNET, L. Cumulative effect of zinc oxide and titanium oxide nanoparticles on growth and chlorophyll a content of *Picochlorum* sp. In: *Environmental Science and Pollution Research*. 2016, vol. 3, nr. 23, pp. 2821-2830. ISSN: 0944-1344.
148. HIRA, F., KYO-SEON, K. Iron-based magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging. In: *Adv. Powder Technol.* 2018, vol. 11, nr. 29, pp. 2678–2685. ISSN: 0921-8831.
149. HO, Y.S., XIONG, Y., MA, W., SPECTOR, A., HO, D. Mice Lacking Catalase Develop Normally but Show Differential Sensitivity to Oxidant Tissue Injury. In: *Biological Chemistry*. 2004, vol. 279, nr. 31, pp. 32804–32812. ISSN: 1431-6730.

150. HOANG-TUONG, N. H., OBULISAMY, P. K., KIRSTEN, H. Bio-Refining of Carbohydrate-Rich Food Waste for Biofuels. In: *Energies*. 2015, vol. 7, nr. 8, pp. 6350-6364. ISSN 1996-1073.
151. HOCELLA, M. F., SPENCER, M. G., JONES, K. L. Environ. In: *Sci. Nano*. 2015, nr. 2, pp. 114–119.
152. HONG-ZHI, L., WANG, Q., YUAN-YUAN, L., FANG, F. Statistical optimization of culture media and conditions for production of mannan by *S. cerevisiae*. In: *Biotech. and Bioprocess Engineering*. 2009, vol. 14, nr. 5, pp. 577-583. ISSN 1226-8372.
153. HOUGH, R.M., NOBLE, R.R.P., REICH, M. Natural gold nanoparticles. In: *Ore Geol. Rev.* 2011, nr. 42, pp. 55–61. ISSN 0169-1368.
154. HUANG, Y.K., KELLER, A.A. EDTA functionalized magnetic nanoparticle sorbents for cadmium and lead contaminated water treatment. In: *Water Res.* 2015, vol. 80, nr. 1, pp. 159–168. ISSN 0043-1354.
155. HUANG, D.M., HSIAO, J.K., CHEN, Y.C., CHIEN, L.Y., YAO, M., CHEN, Y.K., KO, B.S., HSU, S.C., TAI, L.A., CHENG, H.Y., WANG, S.W., YANG, C.S., CHEN, Y.C. The promotion of human mesenchymal stem cell proliferation by superparamagnetic iron oxide nanoparticles. In: *Biomaterials*. 2009, vol. 22, nr.30, pp. 3645–3651. ISSN 0142-9612.
156. HUANG, N., SHU, J.X., WANG, Z., CHEN. M., REN, C.G., ZHANG, W. One-step pyrolytic synthesis of ZnO nanorods with enhanced photocatalytic activity and high photostability under visible light and UV light irradiation. In: *Alloys and Compounds*. 2015, vol. 648, pp. 919–929. ISSN 0925-8388.
157. HUANG, Y., KELLER, A.A. Magnetic nanoparticle adsorbents for emerging organic contaminants. In: *Sustainable Chemistry Engineering*. 2013, vol. 7, nr. 1, pp. 731–736. ISSN: 2168-0485.
158. HUND-RINKE, K., SIMON, M. Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO₂) on algae and Daphnids. In: *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2006, 13, pp. 225–232. ISSN: 0944-1344.
159. HWANG, P.A., LIN, X.Z., KUO, K.L., HSU, F.Y. Fabrication and cytotoxicity of fucoidan-cisplatin nanoparticles for macrophage and tumor cells. In: *Materials*. 2017, nr. 10, pp. 291-234. ISSN 1996-1944.
160. IGA, A., ROBERTSON, J., WINSLET, M., SEIFALIAN, A. Clinical potential of quantum dots. In: *Biomed Biotechnol.* 2007, vol. 760, pp. 87–97. ISSN 1614-7499.

161. IKA, O. W., MARDILA, V. T. SANTJOJO, D. J., SABARUDIN, A. Preparation and Characterization of Chitosan-coated Fe₃O₄ Nanoparticles using Ex-Situ Co-Precipitation Method and Tripolyphosphate/Sulphate as Dual Crosslinkers. In: *Materials Science and Engineering*. 2018, pp. 299. ISSN: 0921-5093.
162. IRAM, F., IQBAL, M.S., ATHAR, M.M., SAEED, M.Z., YASMEEN, A., AHMAD, R. Glucoxytan-mediated green synthesis of gold and silver nanoparticles and their phyto-toxicity study. In: *Carbohydrate Polymers*. 2014, nr. 104, 29–33. ISSN 0144-8617.
163. JAIN, R., SINHA, A. Graphene-zinc oxide nanorods nanocomposite based sensor for voltammetric quantification of tizanidine in solubilized system. In: *Applied Surface Science*. 2016, nr. 369, pp. 151-158. ISSN 0169-4332.
164. JALEEL, C.A., JAYAKUMAR, K., CHANG-XING, Z., AZOOZ, M.M. Effect of soil applied cobalt on activities of antioxidant enzymes in *Arachis hypogaea*. In: *International Journal of Molecular Sciences*. 2008, vol. 2, nr.3, pp. 42-45. ISSN 1422-0067.
165. JANARDHANANAN, S.K., NARAYAN, S., ABBINENI, G., HAYHURST, A., MAO, C. Architectonics of phage-liposome nanoweb as optimized photosensitizer vehicals for photodynamic cancer. In: *Therapeutic Discovery*. 2010, vol. 9, nr.10, pp. 2524-2536. ISSN 1474-1776.
166. JEGAN, G., MUKUND, S., RAMA RAJA VALLI NAYAGAM, S. Amino acid content and biochemical analysis of the methanolic extract of *Oscillatoria terebriformis*. In: *Int. J. Pharm. Res. and Develop.* 2013, vol. 7, nr. 5, pp. 22-27. ISSN 0974-9446.
167. JOSÉ-YACAMÁN, M., MARÍN-ALMAZO, M., ASCENCIO, J.A. High resolution TEM studies on palladium nanoparticles. In: *Molecular Catalysis A: Chemical*. 2001, vol. 173, nr. 1-2, pp. 61–74.
168. JU, Y., ZHANG, H., YU, J., TONG, S., TIAN, N., WANG, Z., WANG, X., SU, X., CHU, X., LIN, J., DING, Y., LI, G., SHENG, F., HOU, Y. Monodisperse Au–Fe₂C Janus nanoparticles: an attractive multifunctional material for triple-modal imaging-guided tumor photothermal therapy. In: *ACS Nano*. 2017, vol. 9, nr. 11, pp. 9239–9248. ISSN 1936-0851.
169. KWOLEK, M., TAZADRAG, M. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. In: *FEMS Yeast Research*. 2014, vol. 14, nr. 7, pp. 1068–1079. ISSN 15671364.

170. KHUDYI, O., KUSHNIRYK, O., KHUDA, L., MARCHENKO, M. Differences in Nutritional Value and Amino Acid Composition of *Moina macrocopa* (Straus) Using Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhodotorula glutinis* as Fodder Substrates. In: *International Letters of Natural Sciences*. 2018, nr. 68, pp. 27-34. (citat 14.04.2020). Disponibil. 10.18052/www.scipress.com/ILNS.68.27.
171. KHAN, M.M., LEE, J., CHO, M.H. Au@TiO₂ nanocomposites for the catalytic degradation of methyl orange and methylene blue: an electron relay effect. In: *Ind Eng Chem*. 2014, vol. 4, nr. 20, pp. 1584–1590. ISSN 0888-5885.
172. KHANNA, P., CYNTHIA, ONG, B. H. B., BAEG, G.H. Nanotoxicity: An Interplay of Oxidative Stress, Inflammation and Cell Death. In: *Nanomaterials*. 2015, nr. 5, pp. 1163-1180. ISSN 2079-4991.
173. KHATRI, K., GOYAL, A.K., GUPTA, P.N., MISHRA, N., VYAS, S.P. Plasmid DNA loaded chitosan nanoparticles for nasal mucosal immunization against hepatitis. In: *International Journal of Pharmacy*. 2008, vol.1-2, nr. 354, pp. 235-41. ISSN 0975766X.
174. KIM, S., LEE, S., LEE, I. Alteration of phytotoxicity and oxidant stress potential by metal oxide nanoparticles in *Cucumis sativus*. In: *Water Air and Soil Pollution*. 2012, vol. 5, nr. 223, pp. 2799-280. ISSN 0049-6979.
175. KIRKMAN, H. N., GAETANI, G. F. Mammalian catalase: venerable enzyme with new mysteries. In: *Trends Biochem*. 2007, vol. 32, pp. 44-50.
176. KHEDRI, B., SHAHANIPOUR, K., FATAHIAN, S., JAFARY, F. Preparation of chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles and assessment of their effects on enzymatic antioxidant system as well as high-density lipoprotein/low-density lipoprotein lipoproteins on wistar rat. In: *Biomed Biotechnology*. 2018, vol. 2, nr. 1, pp. 68-73.
177. KOT, A. MBLAZEJAK, S., KIELISZEK, M., GIENTKA, I., BRYNS, J., RECZEK, L., POBIEGA, K. Effect of exogenous stress factors on the biosynthesis of carotenoids and lipids by *Rhodotorula* yeast strains in media containing agro-industrial waste. In: *World J Microbiol Biotechnology*. 2019, vol. 10, nr. 35, pp. 157. ISSN: 0959-3993.
178. KOSYAN, D., RUSAKOVA, E., MIROSHNIKOV, S., SIZOVA, E., NOTOVA, S., YAUSSHEVA, E., KOROTKOVA A. Comparative evaluation of the toxicity of iron and its oxides nanoparticles using *Stylonchia mytilus*. In: *AACL Bioflux*. 2015, vol. 8, nr. 3, pp. 453-460. ISSN 1844-8143.

179. KUMAR, S.P. T., VINOTH-KUMAR, L., ANILKUMAR, T.V., RAMYA, C. Flexible and Microporous Chitosan Hydrogel/Nano ZnO Composite Bandages for Wound Dressing: In Vitro and In Vivo Evaluation. In: *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2012, vol. 5, nr. 4, 2618–2629. ISSN 1944-8244.
180. LASSEGUE, B., GRIENDLING, K.K. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010, nr. 30, pp. 653–661. ISSN 1079-5642.
181. LASSOUED, A., DKHIL, B., GADRI, A., AMMAR, S. Control of the shape and size of iron oxide (α -Fe₂O₃) nanoparticles synthesized through the chemical precipitation method. In: *Results Phys*. 2017, nr. 7, pp. 3007–3015. ISSN 2211-3797.
182. LEE, W.M., KWAK, J.I., AN, Y.J. Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: media effect on phytotoxicity. In: *Chemosphere*. 2012, vol. 86, pp. 491- 499. ISSN 0045-6535.
183. LARONE, D.H. Medically important fungi. 4th ed. Washington, D.C. ASM Press, 2002.
184. LI, Y., ZHI, X., LIN, J., YOU, X., YUAN, J. Preparation and characterization of DOX loaded keratin nanoparticles for pH/GSH dual responsive release. In: *Mater. Sci. Eng.* 2017, vol. 73, nr. 1, pp. 189–197. ISSN 0921-5093.
185. LU, A. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. In: *Angewandte Chemie*. 2007, vol. 46, pp. 1222-1244. ISSN:1521-3757.
186. LEE, J.J., CHEN, L., SHI, J. Metabolomic profiling of *Rhodospiridium toruloides* grown on glycerol for carotenoid production during different growth phases. In: *Agric Food Chem*. 2014, vol. 62, nr. 1, pp. 10203–10209. ISSN: 0021-8561.
187. LODHIA, J., MANDARANO, G., FERRIS NJ, E.U.P. , COWELL, S. Development and use of iron oxide nanoparticles (Part 1): Synthesis of iron oxide nanoparticles for MRI. In: *Biomed Imaging Interv*. 2010, vol. 2, nr. 6, pp. 12. 27.
188. LÓPEZ, R.G., PINEDA, M.G., HURTADO, G., DE LEÓN, R.D., FERNÁNDEZ, S., SAADE, H., BUENO, D. Chitosan-coated magnetic nanoparticles prepared in one step by reverse microemulsion precipitation. In: *Int. J. Mol. Sci*. 2013, nr. 14, pp. 19636–19650. ISSN 1422-0067.
189. LOWRY, O., LIU, C., YANG, D., ZHANG, H., XI, Z. Protein measurment with the folin phenol reagent. In: *Biological Chemistry*. 1951, vol. 193, p. 265-275. ISSN: 1431-6730.

190. KOMEMUSHI, S., SAKAKI, H., YOKOYAMA, H., FUJITA, T. Effect of barium and other metals on the growth of D-lactic acid assimilating yeast *Rhodotorula glutinis* No. 21. In: *Antibacter. Antifung. Agents*. 1994, vol. 22, pp. 583. ISSN 03855201.
191. MALHOTRA, S.P.K., MANDAL, T.K. Zinc oxide nanostructure and its application as agricultural and industrial material. In: *Contaminants in Agriculture and Environment: Health Risks and Remediation*. 2019, pp.217-220.
192. MANIMALA, M.R.A., MURUGESAN, R. Carotenoid pigment production from Yeast: Health benefits and their industrial applications. In: *International Journal of Chemical Studies*. 2017, vol. 5, nr. 6, pp. 392-395. ISSN 2321–4902.
193. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, S., MARTÍNEZ-GÓMEZ, A.I., RODRÍGUEZ VICO, F., CLEMENTE-JIMÉNEZ, J.M., LAS HERAS-VÁZQUEZ, F.J. Natural occurrence and industrial applications of D-amino acids: an overview. In: *Chemistry & Biodiversity*. 2010, vol. 6, nr. 7, pp. 1531–1548. ISSN 1612-1880.
194. MAHMUD, S., ADULAH, M. J. Nanotripods of zinc oxide. In: *IEEE Conf. Emerging Technology Nanoelectron*. 2006, pp. 442-446.
195. MERHAN, O., Biochemistry and Antioxidant Properties of Carotenoids. In *Carotenoids*. In *Intech*. 2017, pp. 51–66. ISSN 0192303X.
196. MIRANDA, S. C. C. C., SILVA, G.A.B., HELL RCR MARTINS, M. D., ALVES, J.B., GOES, A.M. Three-dimensional culture of rat BMMSCs in a porous chitosan-gelatin scaffold: A promising association for bone tissue engineering in oral reconstruction. In: *Archives of Oral Biology*. 2011, vol. 1, nr. 56, pp. 1-15. ISSN 0003-9969.
197. MISHRA, S., SINGH, B.R., NAQVI, A.H., SINGH, H.B. Potential of biosynthesized silver nanoparticles using *Stenotrophomonas* sp. BHU-S7 (MTCC 5978) for management of soil-borne and foliar phytopathogens. In: *Scientific Reports*. 2017, vol. 7, pp. 23. ISSN, 20452322.
198. MISHRA, S., SINGH, B.R., SINGH, A., KESWANI, C., NAQVI, A.H., SINGH, H.B. Biofabricated silver nanoparticles act as a strong fungicide against *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch disease in wheat. In: *Plos one*. 2014, vol. 9, nr. 5, pp. 1-10. ISSN 1932-6203.
199. MIZIELINSKA, M., KOWALSKA, U., JAROSZ, M., SUMINSKA, P. A comparison of the effects of packaging containing nano ZnO or polylysine on the

- microbial purity and texture of Cod (*gadus morhua*) fillets. In: *Nanomaterials*. 2018, vol.8, nr.3, pp.158. ISSN 2079-4991.
200. MOHAMMADI, M., HOSEINI, N.M., CHAICHI, M.R., ALIPOUR, H., DASHTAKI, M. SAFIKHANI, S. Influence of nano-iron oxide and zinc sulfate on physiological characteristics of peppermint. In: *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 2018.vol. 49, nr. 18, pp. 2315–2326. (citat 04.04.2020). Disponibil DOI: 10.1080/00103624.2018.1499766.
201. MODY, V., NOUNOU, M., BIKRAM, M. Novel nanomedicine-based MRI contrast agents for gynecological malignancies. In: *Adv Drug Deliv Rev*. 2009, vol.10, nr. 61, pp. 795–807. ISSN 0169-409X.
202. MOHAMMAD, R., KASHEFI, M. SHAMS., FATEMEH, S. J. Perspective of Fe₃O₄ Nanoparticles Role in Biomedical Applications. In: *Biochemistry Research International*. 2016, vol. 2016, nr.1, pp. 1-32. ISSN 20902247.
203. MOHAMMADI-SAMAN, I.S., MIRI, R., SALMANPOUR, M., KHALIGHIAN, N., SOTOUDEH, S., ERFANI, N. Preparation and assessment of chitosan-coated superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for controlled delivery of methotrexate. In: *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2013, vol. 8, nr. 1, pp. 25-33. ISSN 17355362.
204. MONIKA, E., VITAMINS, E. C. Retinol and b-carotene and lung cancer risks. A review of the epidemiological evidence. In: *Curr. Opin. Oncol. Endocr. Metab. Invest.Drugs*. 1999, pp. 488-494. ISSN 0951-7375.
205. MORANO, K., GRANT, C., MOYE-ROWLEY, W.S. The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Genetics*. 2012, vol. 4, nr. 190, pp. 1157-1195. ISSN: 1943-2631.
206. MRVČIĆ, J., STANZER, D., ŠOLIĆ, E., STEHLIK-TOMAS, V. Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: Opportunities for improving food safety and quality. In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012, vol.9, nr. 28, pp. 2771-2782. ISSN 09593993.
207. MUTHANA, M., KENNERLEY, A. J., HUGHES, R., FAGNANO, E., RICHARDSON, J., PAUL, M., MURDOCH, C., WRIGHT, F., PAYNE, C., LYTTHGOE, M.F., FARROW, N., DOBSON, J., CONNER, J., WILD, J.M., LEWIS, K. Directing cell therapy to anatomic target sites in vivo with magnetic resonance targeting. In: *Nature Communications*. 2015, vol. 6, pp. 8009. ISSN 2041-1723.

208. MUZZARELLI, R. A. A., ILARI, P., TARSI, R., DUBINI, B. AND XIA, W. Chitosan from *Absidiacoerulea*. In: *Carbohydr.Polymer*. 1994, nr. 25, pp. 45-50. ISSN 0144-8617.
209. NADARAJAH, K., PRINYAWIWATKUL, W., HONG, K. N., SATHIVEL, S., XU, Z. Sorption behaviour of crawfish chitosan films as affected by chitosan extraction processes and solvent types. In: *Journal of Food Science*. 2006, vol. 71, nr. 2, pp. 33-39. ISSN 1750-3841.
210. NARENDHRAN, S., RESHMA, K. Nanoparticles and Their Toxicology Studies: A Green Chemistry Approach. In: *Res Dev Material Sci*. 2017, vol. 2, nr. 3. pp. 2.
211. NAVARRO, A., BAUN, R., BEHRA, N., HARTMANN, J., FILSER, A. J., MIAO, A., QUIGG, P., SANTACHI, L., SIGG, L. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. In *Ecotoxicology*. 2008, nr. 17, pp. 372–386. ISSN 09639292.
212. NCBI: National Center for Biotechnology Information, ©2019, [citat 10.05.2019]. Disponibil: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5286>
213. NEHRA, P., CHAUHAN, R. P., GARG, N., VERMA, K. Antibacterial and antifungal activity of chitosan coated iron oxide nanoparticles. In: *British Journal of Biomedical Science*. 2018, vol. 1, nr. 1, pp. 13-18. ISSN 0967-4845.
214. NEJATI, K., ZABIHI, R. Preparation of nano size nickel ferrite particles using hydrothermal method. In: *Chemistry Central Journal*. 2012, vol. 6, nr. 23, pp. 394. ISSN 1752-153X.
215. NEL, L., MADLER, D., VELEGOL, T., XIA, E.M., HOEK, P., SOMASUNDARAN, F., KLAESSIG, V., CASTRANOVA, M., THOMPSON, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. In *Nat. Mater*. 2009, nr. 8, pp. 543–557. ISSN 1476-1122.
216. NICHIK, M.N. Nanoscale particles of a number of noble metals and compositions based on them: production and properties. Abstract of dissertation for the degree of candidate of chemical sciences. 2012, pp. 30.
217. NIKOLOVA, M., SAVOVA, I., MARINOV, M. An optimised method for investigation of the yeast viability by means of fluorescent microscopy. In: *Cult Collect*. 2002, vol. 3, pp. 66-71.
218. NICOLÁS, P., SALETA, M., TROIANI, H., ZYSLER, R., LASSALLE,V., FERREIRA, M. L. Preparation of iron oxide nanoparticles stabilized with

- biomolecules: Experimental and mechanistic issues. In: *Acta Biomaterialia*. 2013, vol. 1, nr. 9, pp. 4754–4762. ISSN: 1742-7061.
219. NIGAM, P. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. In: *Biomolecules*. 2013, vol. 3, nr. 3, pp. 597–611. ISSN 2218-273X.
220. NISHINARI, K., TAKAHASHI, R. Interaction in polysaccharide solutions and gels. In: *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2003, nr. 8, pp. 5983-5992. ISSN 1359-0294.
221. NOBUHIKO, S., YAMASHITA, R., AMAN, Y. Skin cell aging inhibiting compositions containing endogenous antioxidants for cosmetics. In: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP*. 2000, pp.85- 73.
222. NUMATA, K., KAPLAN, D.L. Silk-based delivery systems of bioactive molecules. In: *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010, vol. 15, nr. 62, pp. 1497–1508. ISSN 0169-409X.
223. NOURI, A., YARAKI, M.T., GHORBANPOUR, M., AGARWAL, S., GUPTA, V.K. Enhanced Antibacterial effect of chitosan film using Montmorillonite/CuO nanocomposite. In: *Int. J. Biol. Macromol.* 2017, nr. 109, pp. 1219–1231. ISSN 0141-8130.
224. NURUL, K., SINGH, M., WEERATHUNGE, P., BIAN, P., ZHENG, R., DEKIWADIA, C., AHMED, T., WALIA, S., GASPERA, D.E., SINGH, S., RAMANATHAN, R., BANSAL, V. Visible-Light-Triggered Reactive-Oxygen-Species-Mediated Antibacterial Activity of Peroxidase-Mimic CuO Nanorods. In: *Applied Nano Materials*. 2018; nr. 4, pp. 1694-1704. ISSN 2574-0970.
225. ORSINI, J. N., BABIĆ-STOJIĆ, B., SPASOJEVIĆ, V., CALATAYUD, M.P., CVJETIĆANIN, N., GOYA, G.F. Magnetic and power absorption measurements on iron oxide nanoparticles synthesized by thermal decomposition of Fe (acac)₃. In: *Journal of Magnetism and Magnetic Material*. 2018, vol. 449, nr. 1, pp. 286–296. ISSN 0304-8853.
226. OSMOND, M., MCCALL, M. Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: an analysis of potential exposure and hazard. In: *Nanotoxicology*. 2010, nr. 4, pp. 15-41. ISSN 1743-5390.
227. OSTIGUY, C., ROBERGE, B., MÉNARD, L., ENDO, C. Best Practices Guide to Synthetic Nanoparticle Risk Management. In: *Chemical Substances and Biological Agents*. 2009, pp. 16. ISBN: 978-2-89631-345-7.
228. OTERO-GONZALEZ, L., GARCIA-SAUCEDO, C., FIELD, J. A., SIERRA-ALVAREZ, R. Toxicity of TiO₂, ZrO₂, Fe₀, Fe₂O₃, and Mn₂O₃ nanoparticles to the

- yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. In *Chemosphere*. 2013, vol. 93, pp. 1201–1206. ISSN: 0045-6535.
229. OTUNOLA, G.A., AFOLAYAN, A.J., AJAYI, E.O., ODEYEMI, S.W. Characterization, antibacterial and antioxidant properties of silver nanoparticles synthesized from aqueous extracts of *Allium sativum*, *Zingiber officinale*, and *Capsicum frutescens*. In: *Pharmacogn. Mag.* 2017, vol 2, nr. 13, pp. 201–208. ISSN 0973-1296.
230. PLAKSENKOVA, I., JERMAŁONOKA, M., BANKOVSKA, L., GAVARĀNE, I., SLEDEVSKIS, E., SNIKERIS, J., KOKINA, I. Effects of Fe₃O₄ Nanoparticle Stress on the Growth and Development of Rocket *Eruca sativa*. In: *Journal of Nanomaterials*. vol.2019, pp. 10. ISSN 16874129.
231. PRIESTER, J.H., MORITZ, S.C., ESPINOSA, K., GE, Y., WANG, Y., NISBET, R.M., HOLDEN, P.A. Damage assessment for soybean cultivated in soil with either CeO₂ or ZnO manufactured nanomaterials. In: *Science of the Total Environment*. 2017, vol. 579, pp. 1756-1768. ISSN: 0048-9697.
232. PANDURANGAN, M., KIM, D. H. ZnO nanoparticles augment ALT, AST, ALP and LDH expressions in C2C12 cells. In: *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2015, vol. 6, nr. 22, pp. 679–684. ISSN 1319-562X.
233. PANTIDOS, N., HORSFALL, L. E. Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles by Bacteria, Fungi and Plants. In: *Nanomed Nanotechnol.* 2014, vol. 5, nr. 5, pp. 2-10. ISSN 2157-7439.
234. PARFENOV, V., SALNIKOV, W.J., LEDERER, V., LUKYANENKO, V. Aqueous diffusion pathways as a part of the ventricular cell ultrastructure. In: *Biophysical journal*. 2006, vol. 90, nr. 3, pp. 1107–1119. ISSN 1542-0086.
235. PATEL, J. P., PATEL, D. H., DESAI, R. Application of an industrial waste magnetic iron dust as a solid phase support for immobilizing enzyme of industrial applications. In: *Adsorption Science & Technology*. 2016, vol. 34, nr. 7–8, pp. 439–454. ISSN 0263-6174.
236. PARK, J., AN, K., HWANG, Y., PARK, J.G., NOH, H.J., KIM, J.Y. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. In: *Nat Mater*. 2004, vol. 3, pp. 891. ISSN 1476-1122.
237. POSTOLACHI, O., RASTIMESINA, I., JOSAN, V., MAMALIGA, V., STREAPAN, N., GUTUL, T. Impact of magnetite and zero-valent iron nanoparticles

- on growth of *Streptomyces*. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology 4th edition*. 2018, pp. 154. ISBN 978-9975-3178-8-7.
238. PEETLA, V., LABHASETWAR, V. Biophysical characterization of nanoparticle–endothelial model cell membrane interactions, In: *Molecular Pharmaceutics*. 2008, vol. 5, nr. 3, pp. 418–429. ISSN 1543-8384.
239. PRABHU, Y. T., VENKATESWARA, RA, K., SIVA KUMARI, B., VEMULA, S.S. K., TAMBUR, P. Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles and its antibacterial application. In: *Int. Nano. Lett.*, 2015, nr. 5, 85–92. ISSN 22285326.
240. RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. In: *Clin Interv Aging*. 2007, vol. 2, nr. 2, pp. 219–236. ISSN 1176-9092.
241. RAI, M., DURAN, N. Metal Nanoparticles in Microbiology. Berlin: Springer-Verlag Heidelberg. 2011, 305 p. ISBN 978-3-642-18311-9.
242. RAMESH, R., PRATIM, B., TARAFDAR, J.C. TiO₂ nanoparticle biosynthesis and its physiological effect on mung bean (*Vigna radiata* L). In: *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*. 2014, nr. 5, pp. 22–26. ISSN 2215-017X.
243. RALIYA, R., BISWAS, P., TARAFDAR, J.C. TiO₂ nanoparticle biosynthesis and its physiological effect on mung bean (*Vigna radiata* L.). In: *Biotechnol Rep*. 2015, vol. 5, pp. 22–26. ISSN 1863-5474.
244. RAO, S., SHEKHAWAT, G. Phytotoxicity and oxidative stress perspective of two selected nanoparticles in Brassica juncea. In: *Biotechnology*. 2016, vol. 2, nr. 6, pp. 244.
245. RAVIKUMAR, S., SREEKANTH, T.V.M., EOM, I.Y. Interaction studies of greenly synthesized gold nanoparticles with bovine serum albumin (BSA) using fluorescence spectroscopy. In: *Nanosci. Nanotechnol*. 2015, vol. 12, nr.15, pp. 9617–9623. ISSN 1533-4880.
246. RALIYA, R., TARAFDAR, J.C. ZnO nanoparticle biosynthesis and its effect on phosphorous-mobilizing enzyme secretion and gum contents in Clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* L). In: *Agricultural Research*. 2013, vol. 2, pp. 48-57. ISSN 22497218.
247. RIAZ, M., FULATI, A., YANG, L.L., WILLANDER, M., KLASON, P. Bending flexibility, kinking, and buckling characterization of ZnO nanorods/nanowires grown on different substrates by high and low temperature methods. In: *Advanced Functional Materials*. 2011, vol. 4, nr. 21, pp. 628. ISSN 1616-301X.

248. RIAZ, S., SHAH, S.Z.H., KAYANI, Z.N., NASEEM, S. Magnetic and Structural Phase Transition in Iron Oxide Nanostructures. In: *Elsevier*. 2015, vol. 2, pp. 1-9. ISSN 0346-251X.
249. RICHARDSON, S, T. TERNES, T.A. Water analysis: Emerging contaminants and current issues. In: *Analytical Chemistry*. 2014, vol. 6, nr. 86, pp. 2813-2848. ISSN 0003-2700.
250. ROUSE, J.G., VAN DYKE, M.E. A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications. In: *Materials*. 2010, vol. 2, nr. 3, pp. 999–1014. ISSN 1996-1944.
251. ROUT, G.R., SAHOO, S. Role of iron in plant growth and metabolism. In: *Reviews in Agricultural Science*. 2015. vol. 3, pp.1–24. ISSN : 2187-090X.
252. RYTER, S.W., KIM, H.P., HOETZEL, A., PARK, J.W., NAKAHIRA, K. Mechanisms of cell death in oxidative stress. In: *Antioxidants redox signaling*. 2007, vol. 9, pp. 49-89. ISSN 1523-0864.
253. HERNANDO, A., GARCIA, M.A. Metallic Magnetic Nanoparticles. In: *The Scientific World Journal*. 2005, vol. 5, pp. 972–1001. ISSN 1537-744X.
254. SAKURAI, M., WANG, Y.G., UEMURA, T. M., AONO, M. Electrical properties of individual ZnO nanowires. In: *Nanotechnology*. 2009, vol. 15, nr. 20, pp. 155203. ISSN 0957-4484.
255. SAHAYARAJ, K., RAJESH, S. Bionanoparticles: synthesis and antimicrobial applications. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Spain: A. Méndez Vilas, 2011. 244 p.
256. SALA, F., BOLDEA, M., BOTĂU, D., PÎRVULESCU, A., GERGEN, I. Fe₃O₄ – water based magnetic nanofluid influence on weight loss of wheat seedlings under controlled conditions. In: *Rom Biotechnol Lett*. 2019, vol. 24, nr. 2, pp. 308-316. ISSN 1224 - 5984.
257. SALEHIZADEH, H., HEKMATIAN, E., MEISAM, SADEGHI, M., KENNEDY, K. Synthesis and characterization of core-shell Fe₃O₄-gold-chitosan nanostructure. In: *Journal of Nanobiotechnology*. 2012, vol. 10, nr. 3. ISSN 14773155.
258. SAMPAIO, J.P., GADANHO, M., BAUER, R., WEIß, M. Taxonomic studies in the Microbotryomycetidae: *Leucosporidium golubevii* sp. nov., *Leucosporidiella* gen. nov. and the new orders Leucosporidiales and Sporidiobolales. In: *Mycological Progress*. 2003, vol. 2, pp. 53–68. ISSN 1617-416X.

259. SARLO, K., BLACKBURN, K.L., CLARK, E.D., GROTHAUS, J., CHANEY, J., NEU, S., FLOOD, J., ABBOTT, D., BOHNE, C., CASEY, K. Tissue distribution of 20 nm, 100 nm and 1000 nm fluorescent polystyrene latex nanospheres following acute systemic or acute and repeat airway exposure in the rat. In: *Toxicology*. 2009, vol. 263, 117–26. ISSN 0300-483X.
260. SASTRY, R., RASHMI, H., RAO, N. Nanotechnology for enhancing food security in India. In: *Food Policy*. 2011, vol. 36, pp. 391-400. ISSN 0306-9192.
261. SATHIYANARAYANAN, G., DINESHKUMAR, K., YUNG-HUN, Y. Microbial exopolysaccharide-mediated synthesis and stabilization of metal nanoparticles. In: *Critical Reviews in Microbiology*. 2017, vol. 43, nr. 6, pp. 731-752. ISSN 1040-841X.
262. SHEKOFTEH-GOHARI, M., HABIBI-YANGJEH, A. Fe₃O₄/ZnO/CoWO₄ nanocomposites: Novel magnetically separable visible-light-driven photocatalysts with enhanced activity in degradation of different dye pollutants. In: *Ceram. Int.* 2017, vol. 43, pp. 3063–3071. ISSN 0272-8842.
263. SIDDIQI, K. S., RAHMAN, A., HUSEN, A. Properties of zinc oxide nanoparticle and their activity against microbes. In: *Nanoscale Research Letters*. 2018, vol. 13, nr. 1, pp. 1-13. ISSN 1556-276X.
264. SHAHWAN, T., ABU SIRRIAH, S., NAIRAT, M., BOYACI, E., EROĞLU, A.E., SCOTT, T.B., HALLAM, K.R. Green synthesis of iron nanoparticles and their application as a Fenton-like catalyst for the degradation of aqueous cationic and anionic dyes. In: *Chemical Engineering Journal*. 2011, vol. 172, pp. 258 - 266. ISSN 1385-8947.
265. SHAHZEID, I Z.S., AMIRI, G. Antibacterial activity of Fe₃O₄ nanoparticles. In: *Bio-Inorg. Hybrid Nanomaterials*. 2015, vol. 4, nr. 3, pp. 135-140. ISBN 9783527317189.
266. SHARMA, C., DHIMAN, R., ROKANA, N., PANWAR, H. Nanotechnology: An untapped resource for food packaging. In: *Frontiers in Microbiology*. 2017, vol. 8, pp. 1-22. ISSN: 1664-302X.
267. SHEN, L., ZHANG, H., GUO, S. Control on the morphologies of tetrapod ZnO nanocrystals. In: *Materials Chemistry and Physics*. 2009, vol. 114, pp. 580-583.
268. SHARMA, V. K., FILIP, J., ZBORIL, R., VARMA, R. S. Natural inorganic nanoparticles – formation, fate, and toxicity in the environment. In: *Chemical Society Reviews*. 2015, nr. 23, pp. 8410-8423. ISSN 0306-0012.

269. SHI, S.F., JIA, J.F., GUO, X.K. Biocompatibility of chitosan-coated iron oxide nanoparticles with osteoblast cells. In: *Int Nanomedicine*. 2012, vol. 7, pp. 5593–5602. (citat 20.07.2019). Disponibil doi:10.2147/IJN.S34348
270. SHU, X., ZHU, K. J. Controlled Drug Release Properties of Ionically Cross-Linked Chitosan Beads. *The Influence of Anion Structure International*. In: *Journal of Pharmaceutics*. 2002, vol. 1, nr. 233, pp. 217–225. ISSN 0378-5173.
271. SHUBAYEV, V.I., PISANIC, T.R., JIN, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. In: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009, vol.6, nr. 61, pp. 467–477. (citat 26.07.2019). disponibil:doi:10.1016/j.addr.2009.03.007. ISSN 0169-409X.
272. SHU-SHAN, G., NATHCHAR, N., RONGHAI, C., CHENG, R., XUETING, L., PINGHUA, L. Recent examples of α -ketoglutarate-dependent mononuclear non-haem iron enzymes in natural product *biosynthesis*. In: *Natural Product Reports*. 2018, vol. 8, pp. 792–837. ISSN 0265-0568.
273. SILVA, A., SILVA-FREITAS, E. Magnetic particles in biotechnology: from drug targeting to tissue engineering. In: *Advances in Applied Biotechnology*. 2012, pp. 237–258. ISSN 0175-7598.
274. SILVA, V., ANDRADE, M. P. C., SILVA, A. BUSTAMANTE, D., VALLADARES, L. L. S., AGUIAR, A.J. Synthesis and characterization of Fe₃O₄ nanoparticles coated with fucan polysaccharides. In: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2013, 343, pp. 138–143. ISSN 0304-8853.
275. SINGH, A. K., SINGH, A. K. Chapter 1 – Introduction to Nanoparticles and Nanotoxicology. In: *Engineered Nanoparticles*. 2016, pp. 1–18. ISBN 978-0-12-801406-6.
276. SINGH, N., MANSHIAN, B., JENKINS, G.J.S., GRIFFITHS, S.M., WILLIAMS, P.M., MAFFEIS, T.G.G., WRIGHT, C.J., DOAK, S.H. Nano Genotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. In: *Biomaterials*. 2009, vol. 30, pp. 3891–3914. ISSN 0142-9612.
277. STATZELL-TALLMAN, A., FELL, J. W. The Yeasts (Fourth Edition). Amsterdam: Elsevier. 1998, pp. 800–827.
278. SCHMITT, M., GELLERT, G., LUDWIG, J., LICHTENBERG-FRATE, H. Phenotypic yeast growth analysis for chronic toxicity testing. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2004, nr. 59, pp. 142–150. ISSN: 0147-6513.
279. SONAJE, K., KUN, J. L., TSENG, M.T., SHIAW, P.W., FANG, Y., YUAN, C., CHIA, W. Effects of chitosan-nanoparticle-mediated tight junction opening on the

- oral absorption of endotoxins. In: *Biomaterials*. 2011, vol.33, nr. 32, pp. 8712-21. ISSN 0142-9612.
280. SOROKINA, O.N., SUMINA, E.G., SHYKOV, S.N., ATAYAN, V.Z., BARYSHEVA, S.V. TLC separation of D-, L -of amino acids in the 2-hydroxypropyl- β - cyclodextrin aqueous mobile phase. In: *Sorption and Chromatographic Processes*. 2010, vol. 10, nr. 1, pp.135–141. ISSN 1680-0613.
281. SPARRENBURGER, K., FRIEDRICH, R., SCHIFFNER, M., SCHUCH, I., & WAGNER, M. Ultra-processed food consumption in children from a Basic Health Unit. In: *Jornal de Pediatria*. 2015, vol. 6, nr. 91, pp. 535-542. ISSN 0021-7557.
282. SREEKANTH, T.V., RAVIKUMAR, S., EOM, I.Y. Green synthesized silver nanoparticles using nelumbonucifera root extract for efficient protein binding, antioxidant and cytotoxicity activities. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 2014, vol. 141, pp. 100–105. ISSN 1010-6030.
283. STAN, M., LUNG, I., SORAN, M. L., LEOSTEAN, C., POPA, A., STEFAN, M., LAZAR, M.D., OPRIS, O., SILIPAS, T.D., PORAV, A.S. Removal of antibiotics from aqueous solutions by green synthesized magnetite nanoparticles with selected agro-waste extracts. In: *Process Saf. Environ.* 2017, nr. 107, pp. 357–372. ISSN 0957-5820.
284. STAN, M., POPA, A., TOLOMAN, D., SILIPAS, T.D., VODNAR, D.C. Antibacterial and antioxidant activities of ZnO nanoparticles synthesized using extracts of *Allium Sativum*, *Rosmarinus officinalis* and *Ocimum basilicum*. In: *Acta Metall Sin. Engl.* 2016, vol. 3, nr. 29, pp. 228–236. ISSN 1006-7191.
285. SINOUVASSANE, D., YANG, M. L., LING, S. W., POH, F, L. Cellular accumulation and cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles in microalga *Haematococcus pluvialis*. In: *Peer Journal*. 2019, pp.1-19. ISSN 2167-8359.
286. STAWSKI, T.M., VAN DRIESCHE, A.E.S., OSSORIO, M., RODRIGUEZ-BLANCO, J.D., BESSELINK, R., BENNING, L.G. Formation of calcium sulfate through the aggregation of sub-3 nanometre primary species. In: *Nature Communications*. 2016, nr. 7, pp. 1-9. ISSN 2041-1723.
287. STRAMBEANU, N., DEMETROVICI, L., DRAGOS, D. Natural sources of nanoparticles. In Nanoparticles' Promises and Risks: Characterization, Manipulation, and Potential Hazards to Humanity and the Environment. New York. In: *Springer International Publishing: Cham*. 2015, pp. 9–19.

288. SUBHANKAR, P., KUMAR, D. B. Synthesis, Characterization and the Application of ZnO Nanoparticles in Biotechnology. In: *Journal of Advances in Chemical Engineering Biological Sciences (IJACEBS)*. 2014, vol. 1, nr. 1, pp. 1-5. ISSN 2349-1507.
289. SUKHANOVA, A., BOZROVA, S., SOKOLOV, P., BERESTOVOY, M., KARAULOV, A., NABIE, I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. In: *Nanoscale Research Letters*. 2018, vol. 13, nr. 1, pp. 1-21. ISSN 1556-276X.
290. SUMAN, T.Y., RADHIKA, R., KIRUBAGARAN, R. Toxicity assessment of zinc oxide nanoparticles for *Chlorella vulgaris* algae using flow cytometry, cytotoxicity and oxidative stress. In: *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015, nr. 113, pp. 23-30. ISSN 0147-6513.
291. SUN, S.N., WEI, C., ZHU, Z.Z., HOU, Y.L., VENKATRAMAN, S.S.; XU, Z.C. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface coating techniques for biomedical applications. In: *Chin. Phys.* 2014, vol. 23. ISSN 1009-1963.
292. TAMAȘ, V., NEAMȚU, G. *Pigmenți carotenoidici și metaboliți*. București: Ceres. București. 1986, vol. 1, 269 p.
293. TAN, M.L., CHOONG, P.F., DASS, C.R. Review: doxorubicin delivery systems based on chitosan for cancer therapy. In: *Pharm Pharmacology*. 2009, nr. 2, nr. 61, pp. 131-42. ISSN 2157-9423.
294. TANG, S.C., LO, I.M. Magnetic nanoparticles: Essential factors for sustainable environmental applications. In: *Water Research*. 2013, vol. 8, nr. 47, pp. 2613–2632. ISSN: 0043-1354.
295. TAVERA-DAVILA, L.; LIU, H.B., HERRERA-BECERRA, R., CANIZAL, G., BALCAZAR, M., ASCENCIO, J.A. Analysis of Ag nanoparticles synthesized by bioreduction. In: *Nanosci Nanotechnol.* 2009 vol. 3, nr. 9, pp. 14-21. ISSN 2163-257X.
296. TIWARI, J. N., TIWARI, R. N., KIM, K. S. Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. In: *Prog Mater Sci.* 2012, vol. 57, nr. 4, pp. 724–803. ISSN 0079-6425.
297. TITOVA, N.M., SUBBOTINA, T.N. *Enzymology: Laboratory Workshopp*. Krasnoyarsk: Siberian Federal University, 2012. 60 p.

298. TRAN, C.D., MAKUVAZA, J., MUNSON, E., BENNETT, B. Biocompatible Copper Oxide Nanoparticle Composites from Cellulose and Chitosan: Facile Synthesis, Unique Structure, and Antimicrobial Activity. In: *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017, vol. 49, nr. 9, pp. 42503-42515. ISSN 1944-8244.
299. TRESILWISED, N., PITHAYANUKUL, P., PLANK, C. Factors Affecting Sizes of Magnetic Particles formed by Chemical Co-precipitation Mahidol. In: *University Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005, nr. 32, pp. 71-76. ISSN 1816-1839.
300. UNFRIED, C., ALBRECHT, L.O. KLOTZ, A., VON MIKECZ, S., GRETHER-BECK, R.P.F. Schins, Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms. In: *Nanotoxicology*. 2007, vol. 1, pp. 52–71. ISSN 1743-5390.
301. USATII, A., **BESLIU, A.**, EFREMOVA, N., CHISELITA, N., BATAR, L., DADU, C., TANASE, A. Biosynthesis of polysaccharides in *Rhodospiridium toruloides*, cultivated in the presence of Fe₃O₄ (50–100 nm) nanoparticles. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology 4th edition*, 11-12 october, 2018, Chisinau, Republic of Moldova, pp 155. ISBN 978-9975-3178-8-7.
302. USATII, A., EFREMOVA, N., CHISELITA, N., **BESLIU, A.**, BATAR, L., DADU, C., TANASE, A. Estimation of cell viability at the contact of yeasts with ZnO and Fe₃O₄ nanoparticles. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology 4th edition*, 11-12 october, 2018, Chisinau, Republic of Moldova, pp 156. ISBN 978-9975-3178-8-7.
303. USATII, A., KIRITSA, E., **BESHLIU, A.** The effect of Fe₃O₄ nanoparticles on bioproduction parameters of *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 yeast strain with high biotechnological potential. In: *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*. 2016, nr. 2, pp. 67-71. ISSN 1224-5119.
304. USATÎI, A., **BEȘLIU, A.** EFREMOVA, N. Effect of Fe₃O₄ and TiO₂ nanoparticles on catalase activity and β-carotene content at pigmented yeast strain *Rhodotorula gracilis*. In: *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology*. 2017, vol. 21, nr. 1, pp. 35-40. ISSN 2344-1496.
305. USATÎI, A., **BEȘLIU, A.**, CHIRIȚA, E., GUȚU, T. Impact of TiO₂ and Fe₃O₄ nanoparticles on the protein contents in the yeasts *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30. In: *Symposium Nano-2016 Ethical, Ecological and Social Problems of Nanoscience and Nanotechnologies*, 11-14 mai, 2016, Chisinau, Republic of Moldova, pp. 57-58.
306. USATÎI, A., CHISELIȚA, N., BEJENARU, L., **BEȘLIU, A.**, EFREMOVA, N., TOFAN E. The action of TiO₂, ZnO, Fe₃O₄ nanoparticles on *Saccharomyces* and

- Rhodotorula* yeast strains in function of the concentration and dimensions. In: *Analele Științifice ale Universității „Alexandru Ioan Cuza”, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară*. 2017,. vol. 18, nr. 2, pp. 65- 71. ISSN 1224-5119.
307. USATÎI, A., BEȘLIU, A., EFREMOVA, N., CHISELIȚĂ, N. The process of assessment of the toxicity of metals oxides nanoparticles with the use of the yeast *Rhodospiridium toruloides*. In: *Scientific Study & Research Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*. 2020, vol. 21, nr. 1, pp. 17-26. ISSN 1582-540X.
308. VALLABANI, N. V., SINGH, S. Recent advances and future prospects of iron oxide nanoparticles in biomedicine and diagnostics. In: *Biotech*. 2018, 8, pp. 279. ISSN: 2190-5738.
309. VALSESIA, A., DESMET, C., OJEA-JIMÉNEZ, I., ODDO, A., CAPOMACCIO, R., ROSSI, F., COLPO. P. Direct quantification of nanoparticle surface hydrophobicity. In: *Communications chemistry*. 2018, vol 1, nr. 53, pp. 53. ISSN 2399-3669
310. VASILEVA, P. Synthesis and characterization of ZnO nanocrystals in starch matrix. Scientific Proceedings II International Scientific Conference Material Science. Nonequilibrium Phase Transformations. 2016, 33-36 p. ISSN 2535-0226.
311. VASIR, J.K., LABHASETWAR, V. Quantification of the force of nanoparticle–cell membrane interactions and its influence on intracellular trafficking of nanoparticles. In: *Biomaterials*. 2008, vol. 31, nr. 29, pp. 4244–4252. ISSN 0142-9612.
312. VASIR, J.K., LABHASETWAR, V. Targeted drug delivery in cancer therapy. In: *Technol Cancer Res Treat*. 2005, vol. 4, nr. 4, pp. 363–374. ISSN 1533-0346.
313. VIKELE, L., LAKA, M., SABLE, I., ROZENBERGA, L., GRINFELDS, U., ZOLDNERS, J., PASSAS, R., MAURET, E. Effect of chitosan on properties of paper for packaging. In: *Cellulose Chemistry and Technology*. 2017, vol. 1-2, nr. 51, pp. 67-73. ISSN 0576-9787.
314. VU KHAC, H. B., DUCKSHIN, P., YOUNG-CHUL, L.. Chitosan Combined with ZnO, TiO₂ and Ag Nanoparticles for Antimicrobial Wound Healing Applications: A Mini Review of the Research Trends. In: *Polymers*. 2017, vol. 1, nr. 9, pp. 21. ISSN 2073-4360.
315. 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. In: *Chemistry*. 2017, nr.47, pp. 536-542. ISSN 1521-3765.
316. WAHAB, R., SIDDIQUI, M., SAQUIB, Q. ZnO nanoparticles induced oxidative stress and apoptosis in HepG2 and MCF-7 cancer cells and their antibacterial activity. In: *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014, nr. 117, pp. 267–276. ISSN 09277765.
317. WALSH, G. Proteins and Proteomics. In: *Proteins*. New York: Wileyand. 2015, pp. 1–23. ISBN 9780470669853.
318. WANG, C., CHENG, L., LIU, Z. Drug delivery with upconversion nanoparticles for multi-functional targeted cancer cell imaging and therapy. In: *Biomaterials*. 2011, vol. 4, nr. 32, pp. 1110–1120. ISSN 0142-9612.
319. WANG, C., GAO, X., ZHONGQ, C., YUE, C., HAIXIA, C. Preparation, Characterization and Application of Polysaccharide-Based Metallic Nanoparticles: A Review. In: *Polymers*. 2017, vol. 12, nr. 9, pp. 2-33. ISSN 2073-4360.
320. WANG, Q.M., YURKOV, A.M., GÖKER, M., LUMBSCH, H.T., LEAVITT, S.D., GROENEWALD, M., THEELEN, B., LIU, X.Z., BOEKHOUT, T., BAI, F.Y. Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within Pucciniomycotina. In: *Studies in mycology*. 2016, nr. 81, pp. 149–189. ISSN 0166-0616.
321. WEIR, A., WESTERHOTT, P., LARS, F., HRISTOVSKI, K., VON GOETZ, N. Titanium dioxide in food and personal Care products. In: *Environmental Science and Technology*. 2012, vol 4, nr. 46, pp. 2242-2250. ISSN 0013936X.
322. WANG, X., YANG, X., SIYU, C., LI, Q., WANG, W., HOU, C., GAO, X., WANG, L., WANG, S. Zinc Oxide Nanoparticles Affect Biomass Accumulation and Photosynthesis in Arabidopsis. In: *Frontiers in Plant Science*. 2016, nr. 6. ISSN 1664-462X.
323. WILLANDER, M., NUR, O., SADAF, J.R., QADIR, M.I., ZAMAN, S., ZAINELABDIN, A. HUSSAIN, I. Luminescence from zinc oxide nanostructures and polymers and their hybrid devices. In: *Materials*. 2010, vol. 4, nr. 3, pp. 2643-2667. ISSN 1996-1944.
324. WILLNER, I., BARON, R., AND WILLER, B. Growing metal nanoparticles by enzymes. In: *Adv. Mater.* 2006, nr. 18, pp. 1109–1120. ISSN 1521-4095.
325. WU, C.Y., MARTEL, J., WONG, T.Y., YOUNG, D., LIU, C.C., LIN, C.W., YOUNG, J.D. Formation and characteristics of biomimetic mineralo-organic particles in natural surface water. In: *Sci. Rep.* 2016, nr. 6, p. 1-11. ISSN 2045-2322.

326. WU, Q., WANG, X., LIAO, C., WEI, Q., WANG, Q. Microgel coating of magnetic nanoparticles via bienzyme-mediated free-radical polymerization for colorimetric detection of glucose. In: *Nanoscale*. 2015. vol. 40, nr. 7, pp 16578–16582. ISSN 2040-3372.
327. XIA, T., KOVOCHICH, M., LIONG, M., MÄDLER, L., GILBERT, B., SHI, H., NEL, A. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. In: *ACS Nano*. 2008, vol.10, nr. 2, nr 2121–2134. ISSN 1936086X.
328. XIA, T., KOVOCHICH, M., BRANT, J., HOTZE, M., SEMPFF, J. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. In: *Nano letters*. 2006, vol. 6, pp. 1794-1807. ISSN 1530-6984.
329. XIAO-MIN, L., XIANG-YU, W., PING MA, Y. Y., JIE-MEI, Q., XUE-JUN, Z., YE-WANG, Z. Covalent Immobilization of Penicillin G Acylase onto Fe₃O₄@Chitosan Magnetic Nanoparticles. In: *Microbiol. Biotechnoogyl*. 2016, vol. 5, nr. 26, pp. 829-836. ISSN 1751-7915.
330. XIE, J., CHEN, K., HUANG, J., LEE, S., WANG, J., GAO, J., LI, X., CHEN, X. PET/NIRF/MRI triple functional iron oxide nanoparticles. In: *Biomaterials*. 2010, vol. 11, nr. 31, pp. 3016–3022. ISSN 0142-9612.
331. XIE, J.-H., JIN, M.-L., MORRIS, G.A., ZHA, X.Q., CHEN, H.Q., YI, Y., LI, J.-E., WANG, Z.J., GAO, J., NIE, S.mP. Advances on Bioactive Polysaccharides from Medicinal Plants. In: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 2016, nr. 56, pp. 60–84. ISSN 1040-8398.
332. XIE, W., GUO, F., GAO, Q., WANG, D., LIAW, B., CAI, O., SUN, X., WANG, X., ZHAO, L. Shape, size, and structure-controlled synthesis and biocompatibility of iron oxide nanoparticles for magnetic theranostics. In: *Thernostics*. 2018, vol. 12, nr. 8, pp. 3284-3307. ISSN 1838-7640.
333. XIE, Y., LIU, D., CAI, C., CHEN, X., ZHOU, Y ., WU, L., WU, L., SUN, Y., DAI, H., HONG, X., LIU, P. Size-dependent cytotoxicity of Fe₃O₄ nanoparticles induced by biphasic regulation of oxidative stress in different human hepatoma cells. In: *International Journal of Nanomedicine*. 2016, pp. 3557-3570. ISSN 1176-9114.
334. XING, R., XU, Z., HOU, Y., GAO, S., SUN, S. Synthesis, functionalization, and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles. In: *Adv Mater*. 2010, vol. 25, nr. 22, pp. 2729–2742. ISSN 0935-9648.

335. XU, H., SHI, Z., REDDY, N., YANG, Y. Intrinsically water-stable keratin nanoparticles and their in vivo biodistribution for targeted delivery. In: *Agric. Food Chem.* 2014, vol. 62, pp. 9145–9150. ISSN 0021-8561.
336. XU, H., ZEIGER, B.W., SUSLICK, K.S. SONOCHEMICAL SYNTHESIS OF NANOMATERIALS. In: *Chemical Society Reviews*. 2013, vol.7, nr. 42, pp. 2555-2567. ISSN 0306-0012.
337. XU, J.S., ZHU, Y.J. γ -Fe₂O₃ and Fe₃O₄ magnetic hierarchically nanostructured hollow microspheres: Preparation, formation mechanism, magnetic property, and application in water treatment. In: *Colloid Interface Sci.* 2012, vol. 1, nr. 385, pp. 58–65. ISSN 00219797.
338. YAN, H. B., ZHANG, Y. Q., MA, Y. L., ZHOU, L. X. Biosynthesis of insulin-silk fibroin nanoparticles conjugates and in vitro evaluation of a drug delivery system. In: *Journal of Nanoparticle Research*. 2009, nr. 11, 1937–1946. ISBN 1388-0764.
339. YANG, Z. Review of nanoparticles functionality and toxicity on the central nervous system. In: *Journal of the Royal Society Interface*. 2010, vol. 4, nr. 7, pp. 411-422. ISBN 1742-5662.
340. YAO, T., SUN, Z., LI, Y., PAN, Z., WEI, H., XIE, Y., NOMURA, M., NIWA, Y., YAN, W., WU, Z., JIANG, Y., LIU, Q., WEI, S. Insights into initial kinetic nucleation of gold nanocrystals. In: *Journal of the American Chemical Society*. 2010, vol. 22, nr. 132, pp.7696-7701. ISSN 0002-7863.
341. YASMEEN, F., RAZZAQ, A., RAJA, N. I., KOMATSU, S. Proteomic and physiological analyses of wheat seeds exposed to copper and iron nanoparticles. In: *Biochimica et Biophysica Acta*. 2017, 1865, pp. 28-42. ISSN 0304-4165.
342. YONG, P., ROWSON, A.N, FARR, J.P.G., HARRIS, I.R., MCASKIE, L.E. Bioaccumulation of palladium by *Desulfovibrio desulfuricans*. In: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2002, vol.55, pp. 593-601. ISSN:1097-4660.
343. YOOJIN,C., TAE, J. P., DOH, C. LEE, S.Y. L. Recombinant *Escherichia coli* as a biofactory for various single and multi-element nanomaterials. In: *National Academy of Sciences*. 2018, vol. 23, nr. 115, pp. 5944 5949. ISSN: 0027-8424.
344. YOUNG-MI, GO., DEAN, P.J. Cysteine/cystine redox signaling in cardiovascular disease. In: *Free Radic Biol Med*. 2011, vol. 50, nr. 4. ISSN 0891-5849.

345. YU, F., HUANG, Y., COLE, A.J., YANG, V.C. The artificial peroxidase activity of magnetic iron oxide nanoparticles and its application to glucose detection. In: *Biomaterials*. 2009, vol. 30, nr. 27, pp. 4716–4722. ISSN 0142-9612.
346. ZAMOCKY, M, KOLLER, F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. In: *Progress in Biophysics Molecular Biology*. 1999, vol. 72, pp. 19-66. ISSN 0079-6107.
347. ZAMORA-MORA, V., Gutierrez, M. F., Romn, J. S., Goya, G., Hernandez, R., Mijangos, C. Magnetic core-shell chitosan nanoparticles: Rheological characterization and hyperthermia application. In: *Carbohydrate Polymers*. 2014, 102, pp. 691– 698. ISSN 0144-8617.
348. ZANNATUL, Y., ALEXIS, C., SAHER, M., KELLY, L., NASH, R., GLICKMAN, D. Fabrication and Self-Assembly of Nanobiomaterials. In: *Applications of Nanobiomaterials*. 2016, vol. 1, pp. 117-147.
349. ZHANG, D.X., GUTTERMAN, D.D. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. In: *Am. J. P. Hear.* 2007, vol. 292, nr. 5, pp. 23–31.
350. ZHANG, L. ZHU, Y.J. ZnO micro-and nano-structures: microwave-assisted solvothermal synthesis, morphology control and photocatalytic properties. In: *Applied Physics A*. 2009, vol. 4, nr. 97, pp. 847. ISSN 0021-8979.
351. ZHANG, W., BAO, S., FANG, T. The neglected nano-specific toxicity of ZnO nanoparticles in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Sci Rep*. 2016 6, pp. 24839. ISSN 2045-2322.
352. ZHANG, S., LI, J., LYKOTRAFITIS, G., BAO, G., SURESH, S. Size-dependent endocytosis of nanoparticles. In: *Adv. Mater.* 2009, vol. 21, pp. 419–424. ISSN 1521-4095.
353. ZHANG, W., BAO, S., FANG, T. The neglected nano-specific toxicity of ZnO nanoparticles in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Scientific Reports*. 2016, nr. 6, pp. 1-11. ISSN 2045-2322.
354. ZHAO, Y., MENG, H., CHEN, Z., FENG, Z., CHAI, Z. Dependence of nanotoxicity on nanoscale characteristics and strategies for reducing and eliminating nanotoxicity. In: *Nanotoxicology American Scientific Publisher: Valencia*. 2007, pp. 265–280.

355. ZHENG, A., HUI-XUE, L., LAN, Y., MENG, M. Comprehensive studies on the interactions between chitosan nanoparticles and some live cells. In: *Journal of Nanoparticle Research*. 2011, vol. 10, nr. 13, p. 4765-4776. ISBN 1388-0764.
356. ZHENG, J., WANG, L., ZENG, X., ZHENG, X., ZHANG, Y., LIU, S., SHI, X., WANG, Y., HUANG, X., REN, L. Controlling the Integration of Polyvinylpyrrolidone onto Substrate by Quartz Crystal Microbalance with Dissipation To Achieve Excellent Protein Resistance and Detoxification. In: *CS Appl. Mater. Interfaces*. 2016, vol. 8, nr. 29, pp. 11. ISSN 1944-8244.
357. ZHI, X., WANG, Y., LI, P., YUAN, J., SHEN, J. Preparation of keratin/chlorhexidine complex nanoparticles for long-term and dual stimuli-responsive release. In: *RSC Adv*. 2015, vol. 5, nr. 100, 82334–82341. ISSN 2046-2069.
358. ZHONG, T., JIANG, Z., WANG, P., BIE, S., ZHANG, F., ZUO, B. Silk fibroin/copolymer composite hydrogels for the controlled and sustained release of hydrophobic/hydrophilic drugs. In: *Int. J. Pharm.* 2015, vol. 1, nr. 494, pp. 264–270. ISSN 0378-5173.
359. ZHOU, Z., ZHU, X., WU, D., CHEN, Q., HUANG, D., SUN, C., XIN, J., NI, K., GAO, J. Anisotropic shaped iron oxide nanostructure: Controlled synthesis and proton relaxation shortening effects. In: *Chemistry of Material*. 2015, nr. 27, pp. 3505-3515. ISSN 0897-4756.
360. ZLOTSKI, S.V., UGLOV, V.V. Facile Sol-gel Synthesis of Metaloxide Nanoparticles in a Cellulose Paper Template. In: *Nanomed Nanotechnol*. 2017, vol. 8, pp. 1-3. ISSN 2157-7439.
361. ZAHRA, M. Z., ARSHAD, R. RAFIQUE, R., ARSHAD, M., HABIB, A., ISHTIANQ, A, QAZI, A. Metallic nanoparticle (TiO₂ and Fe₃O₄) application modifies rhizosphere phosphorus availability and uptake by *Lactuca sativa*. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 63, nr. 31, pp. 6876–6882. ISSN 0021-8561.

ANEXE

Brevet de invenție MD 4522 „Procedeu de evaluare a toxicității nanoparticulelor oxizilor de metale cu utilizarea levurilor”.



REPUBLICA MOLDOVA
Agenția de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

BREVET
DE INVENȚIE
Nr. 4522

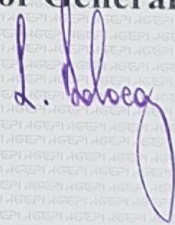
Eliberat în temeiul Legii nr. 50/2008 privind protecția invențiilor

Titlul: **Procedeu de evaluare a toxicității nanoparticulelor oxizilor de metale cu utilizarea levurilor**

Titulari: **INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD;**
INSTITUTUL DE INGINERIE ELECTRONICĂ ȘI NANOTEHNOLOGII "D. Ghițu", MD

Data depozit: **2016.12.22**

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte integrantă a prezentului brevet de invenție

Director General



CHIȘINĂU

Procedeu de cultivare a levurilor *Rhodotorula gracilis*

- (11) 4690 (13) B1
- (51) Int. Cl.: C12N 1/14 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C01G 9/02 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
C12P 21/00 (2006.01)
- (21) a 2018 0059
- (22) 2018.07.31
- (71)(73) INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD
- (72) EFREMOVA Nadejda, MD; BEȘLIU Alina, MD; USATÎ Agafia, MD
- (54) **Procedeu de cultivare a levurilor *Rhodotorula gracilis***
- (57) Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de cultivare a levurilor *Rhodotorula gracilis*, care poate fi aplicat pentru obținerea proteinelor utilizate în industria microbiologică, alimentară, farmaceutică și cosmetică.
Procedeu, conform invenției, constă în obținerea suspensiei de levuri *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 sau *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 prin cultivare timp de 24 de ore

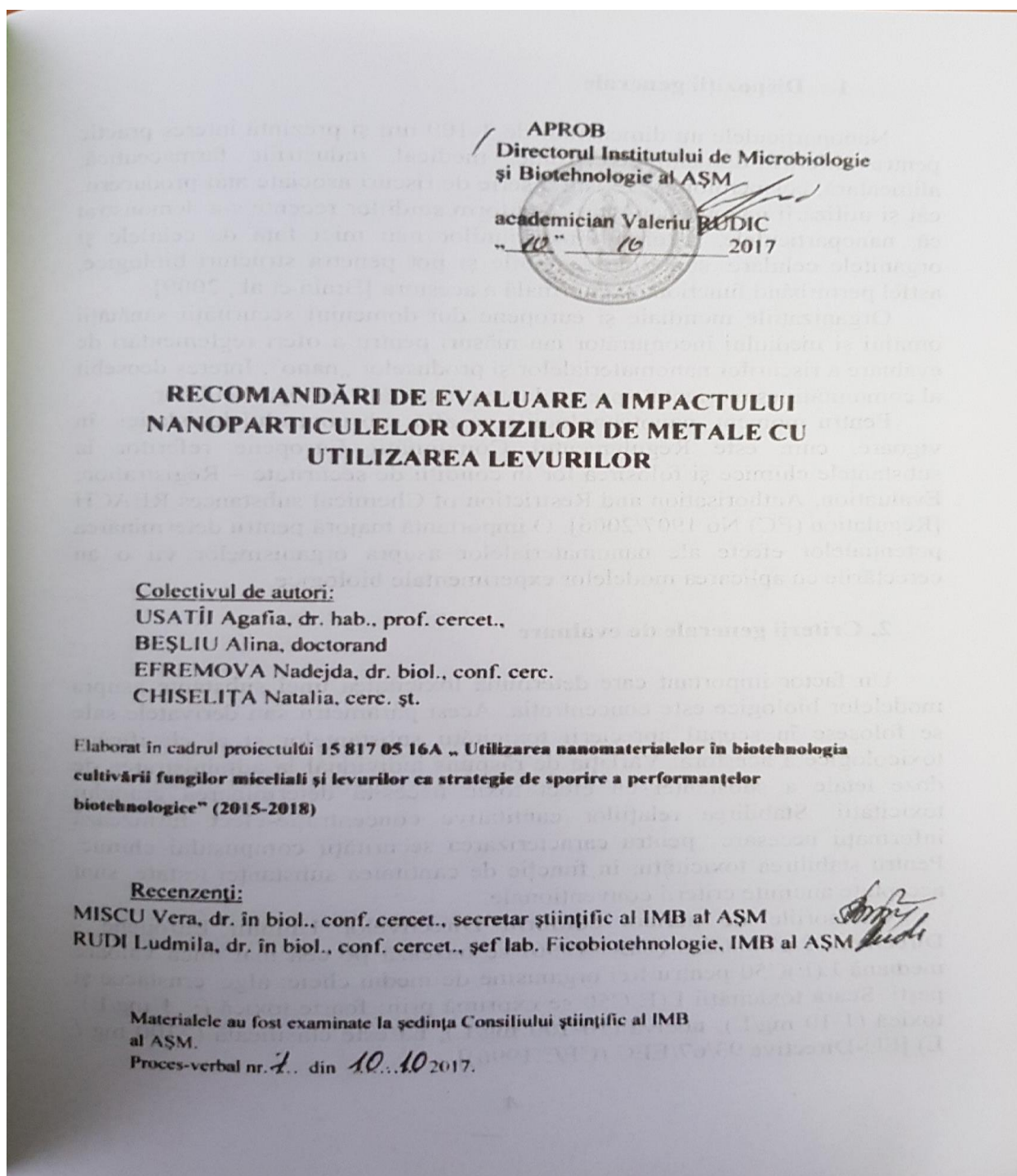
pe mediul YPD, inocularea suspensiei în concentrație de 5% vol. pe mediul YPD cu adăugarea nanoparticulelor de ZnO cu dimensiunea de 50 nm în concentrație de 20,0 mg/L și cultivarea la temperatura de 25...28°C cu agitare continuă la 180...200 rot./min în decurs de 72 de ore.
Rezultatul invenției constă în sporirea conținutului de proteine în biomasa de levuri.

Revendicări: 1

- *
* *
- (54) **Process for cultivation of *Rhodotorula gracilis* yeasts**
- (57) The invention relates to biotechnology, in particular to a process for cultivation of *Rhodotorula gracilis* yeasts, which can be applied to produce proteins used in the microbiological, food, pharmaceutical and cosmetic industries.
The process, according to the invention, consists in preparing a *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 or *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 yeast suspension by cultivating for 24 hours on YPD medium, inoculating the suspension in a concentration of 5% vol. on YPD medium with the addition of 50 nm ZnO nanoparticles in a concentration of 20.0 mg/L and cultivating at 25...28°C with continuous stirring at 180...200 rpm for 72 hours.
The result of the invention consists in increasing the protein content in the yeast biomass.

Claims: 1

Recomandări de evaluare a impactului nanoparticulelor oxizilor de metale cu utilizarea levurilor.



Act nr. 121 din 29.11.2018 de implementare a elaborării „Stabilirea efectului nanomaterialelor asupra dezvoltării și productivității levurilor”.

nr 01/124 din 29.11.2018

APROB Directorul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie academician, prof. univ. Valeriu RUDIC 11 2018 Str. Academiei, 1, MD 2028, mun. Chișinău, Republica Moldova, Tel: (+373) 022 73 98 78 e-mail: microbiotech@imb.asm.md	I.P. "INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE" leșire Nr. 121 "29" "11" 2018 APROB Directorul Institutului de Inginerie Electronică și Nanotehnologii "D. Ghițu" Membrii corespondenți Anatolie SIDORENCO 11 2018 str. Academiei 3/3, MD 2028, mun. Chișinău, Republica Moldova Tel: (+373) 022 73 70 92 e-mail: directia@nano.asm.md
--	--

ACT

de implementare a elaborării

Prin prezentul Act se confirmă, că pe parcursul anilor 2015-2018 au fost efectuate prevederile Acordului de colaborare științifică la proiectul în domeniul de cercetare Nanobiotehnologii, p.2.3 "Stabilirea efectului nanomaterialelor asupra dezvoltării și productivității levurilor"

- 1. Denumirea elaborării:** Recomandări de evaluare a impactului nanoparticulelor oxizilor de metale cu utilizarea levurilor (în baza brevetului de invenție MD 4522, BOPI 10/2017).
- 2. Autorii elaborării:** USATII Agafia, dr. hab., prof. cercet., BEȘLIU Alina, cercet. șt. stag., Efremova Nadejda, dr. în biol., conf. cercet., Chiselița Natalia, dr. în biol.
- 3. Organizația executor:** Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, laboratorul Biotehnologia Levurilor
- 4. Beneficiar:** Institutul de Inginerie Electronică și Nanotehnologii "D. Ghițu"
- 5. Esența elaborării:** Evaluarea toxicității nano-oxizilor metalici cu aplicarea modelelor experimentale biologice.
- 6. Rezultate:** În Regulamentul propus sunt descrise metodele de efectuare a analizelor și concluziile în baza rezultatelor obținute. Metodologia de evaluare a impactului nano-oxizilor metalici TiO_2 , Fe_3O_4 prevede cercetarea indicatorilor biologici, în special, activitatea catalazei și conținutului de β -caroten la levuri pigmentate, și poate fi utilizată la completarea testelor de estimare a nivelului nocivității și monitorizarea inofensivității proceselor de utilizare a nanoparticulelor. Metoda de evaluare prevede inocularea levurii pigmentate *Rhodotorula gracilis* pe un mediu nutritiv, adăugarea nano-oxizilor metalici în concentrații diferite, cultivarea submersă în decurs de 72 ore, separarea biomasei, determinarea în biomasă a activității catalazei și a conținutului de β -caroten. Sunt considerate toxice concentrațiile de nanoparticule care provoacă diminuarea activității catalazei sau a conținutului de β -caroten cu 50%.
- 7. Propuneri:** Sistema propusă de evaluare a toxicității potențiale a nanoparticulelor oxizilor de metale cu utilizarea levurilor este direcționată pentru rezolvarea a două obiective:

- Evidențierea și evaluarea gradului de pericol al nanoparticulelor pentru mediul înconjurător;
- Informația obținută poate fi utilizată de către specialiștii în domeniul nanobiotehnologiei, microbiologiei, medicinei, cosmetologiei, industriei textile, industriei alimentare etc., în care nanomaterialele au aplicații.

8. Responsabili de implementarea elaborării:

Din partea Institutul de Microbiologie și Biotehnologie:

Usatii Agafia, dr. hab., prof. cercet.
 Beșliu Alina, cercet. șt. stag.

Din partea Institutul de Inginerie Electronică și Nanotehnologii "D. Ghițu":

Rusu Emil, cerc. șt. princip
 Guțul Tatiana,

21 noiembrie 2018

**Act nr. 96 din 07.11.2019 de implementare a elaborării „Metodă spectrofotometrică
validată de determinare a activității enzimei catalaza.**

I.P. "INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE"		
leșire Nr.	96	
"07"	11	2019

APROB
Directorul Institutului de Microbiologie
și Biotehnologie
Svetlana CODREANU dr. în șt. biol., conf. cerc.,

"07" 11 2019



ACT
de implementare a elaborării

mun. Chișinău
noiembrie 2019

Subsemnații, comisia în componența: EFREMOVA Nadejda, dr. în șt. biol., conf. cerc., BEȘLIU Alina, cerc. șt., lab. Biotehnologia levurilor, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie; RASTIMEȘINA Inna, dr. în șt. biol., conf. cerc., șef lab. Microbiologia solului, POSTOLACHI Olga, dr. în șt. biol., conf. cerc., lab. Microbiologia solului, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, au întocmit prezentul act privitor la evaluarea implementării:

- Denumirea elaborării:** Metodă spectrofotometrică validată de determinare a activității enzimei catalaza.
- Autorii elaborării:** EFREMOVA Nadejda, dr. biol., conf. cerc., BEȘLIU Alina, cercet. șt.
- Beneficiar:** Laboratorul Microbiologia solului, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.
- Esența invenției:** Determinarea activității enzimei catalaza cu aplicarea protocoalelor de validare.
- Rezultate:** Metoda spectrofotometrică de determinare a activității catalazei, validată conform parametrilor de repetabilitate, precizie intermediară, liniaritate, acuratețe și robustețe au fost valorificate în cercetările efectuate în cadrul laboratorului Microbiologia solului. Eficiența aplicării a fost confirmată prin faptul că metoda dată este exactă, precisă, robustă și validă.
- Propuneri:** Metoda propusă prezintă interes pentru specialiștii din domeniul microbiologiei, biotehnologiei, nanobiotehnologiei, medicinei, industriei alimentare și farmaceutice, în care sunt aplicate nanoparticulele oxizilor metalici.
- Semnăturile membrilor comisiei:**

Laboratorul Biotehnologia levurilor, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie:	Laboratorul Microbiologia solului, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie:
EFREMOVA Nadejda, dr. în șt. biol., conf. cerc. <i>[Signature]</i>	RASTIMEȘINA Inna, dr. în șt. biol., conf. cerc., șef lab. Microbiologia solului. <i>[Signature]</i>
BEȘLIU Alina, cerc. șt. <i>[Signature]</i>	POSTOLACHI Olga, dr. în șt. biol., conf. cerc. <i>[Signature]</i>

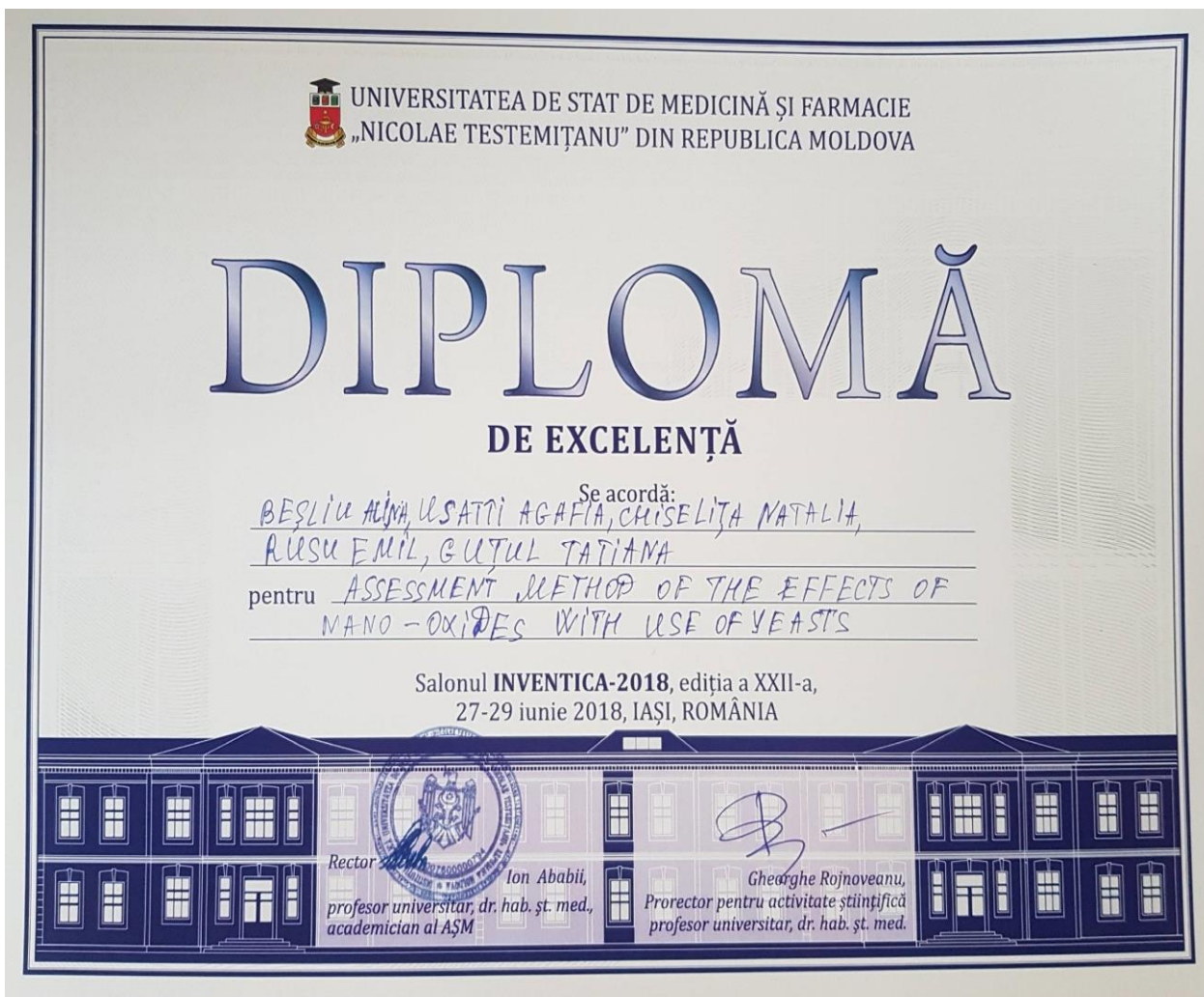
**Diplomă (Medalia de Aur) Expoziția Internațională Specializată
INFOINVENT, 2017 „Procedeu de evaluare a toxicității nanoparticulelor oxizilor de
metale cu utilizarea levurilor”**



Diplomă (Medalia de Aur) Salonul Internațional de Cercetare, Inovare și Transfer Tehnologic, INVENTICA, 2018 „Assessment method of the effects of nano-oxides with use of yeasts”.



Diplomă (De excelență) Salonul Internațional de Cercetare, Inovare și Transfer Tehnologic, INVENTICA, 2018 „ Assessment method of the effects of nano-oxides with use of yeasts”.



Diplomă (Medalia de Aur) Târgul Internațional de Invenții și Idei Practice, INVENT – INVEST, 2018 „Assessment method of the effects of nano-oxides with use of yeasts”.



**Diplomă (Medalia de Aur) Expoziția Internațională Specializată
INFOINVENT, 2019 „Procedeu de cultivare a levurilor *Rhodotorula gracilis*”**



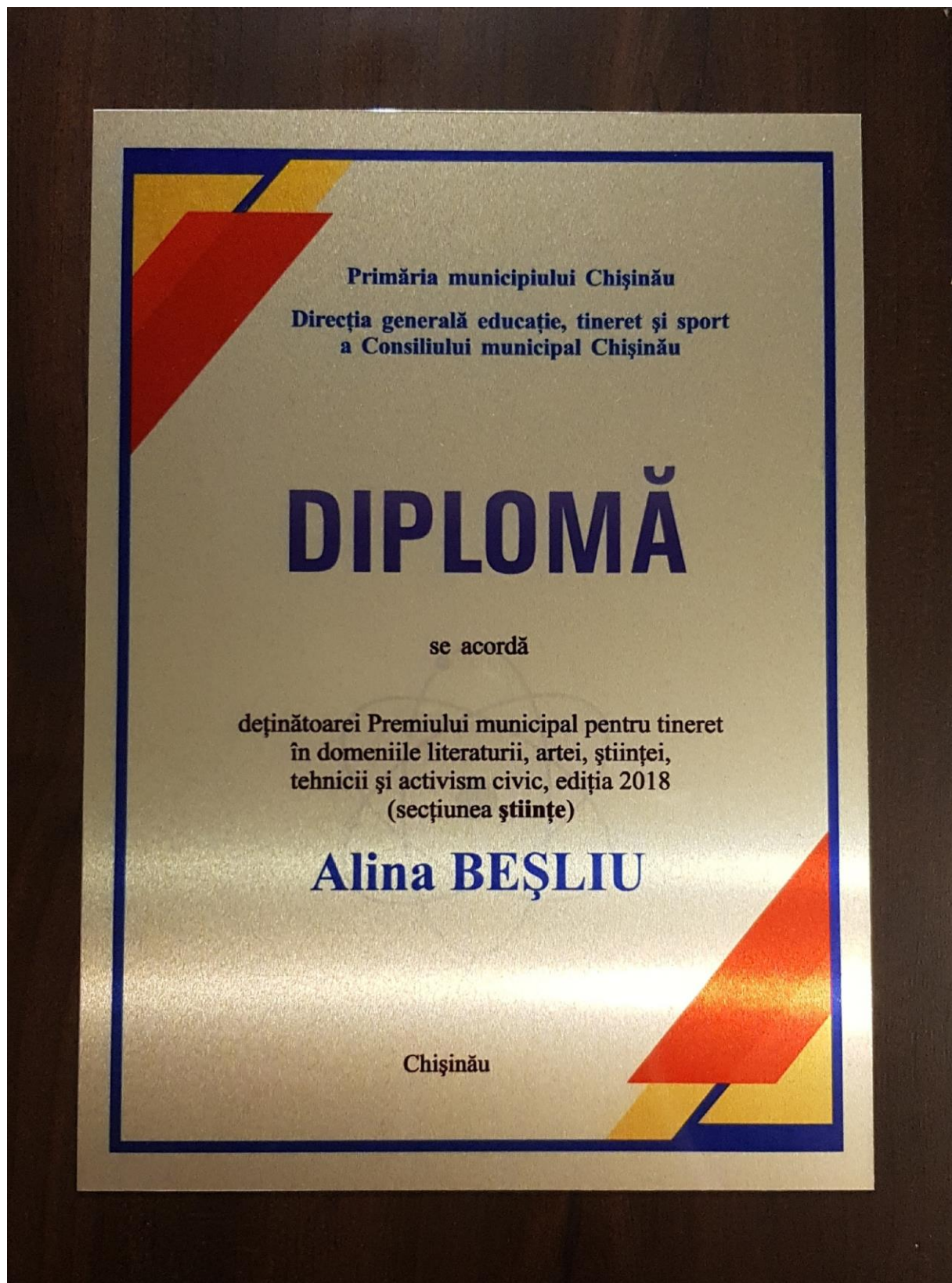
**Diplomă (Medalia de bronz) Expoziția Internațională Specializată
INFOINVENT, 2019 „Validarea testelor microbiologice și biochimice pentru studii de
nanotehnologie”**



Diploma (Medalia de aur) Expoziția Internațională „Cadet Inova '20”, „Assessment method of the effects of nano-oxides with use of yeasts”.



Diplomă Premiul municipal pentru tineret în domeniile științei, tehnicii, literaturii, artelor și activism civic, ediția 2018 (secțiunea științe).



Diplomă de onoare a Ministerului Educației, Culturii și Cercetării



DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

BEȘLIU Alina

Data:

CURRICULUM VITAE

Numele, prenume:	BEȘLIU Alina
Cetățenia	Republica Moldova
Studii	2010-2014 Studii superioare de licență Universitatea de Stat din Tiraspol, Facultatea Geografie, Specialitatea Geografie Biologie. 2014-2016 Studii superioare de Masterat Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, Facultatea Științe ale Naturii, Specialitatea Biologie Moleculară. 2016-2019 Studii superioare de doctorat Universitatea de stat „Dimitrie Cantemir”, specialitatea 167.01 – Biotehnologie, bionanotehnologie.
Participări în proiecte Științifice Naționale și Internaționale	20.80009.5107.16 „Preparate microbiene biologice active noi pentru majorarea potențialului reproductiv și productiv al animalelor de interes zootehnic” (2020-2023). 14.05.076A (2015-2019) Utilizarea nanomaterialelor în biotehnologia cultivării fungilor miceliali și levurilor ca strategie de sporire a performanțelor biotehnologice. 18.80012.51.16A (2018-2019) Validarea testelor microbiologice și biochimice pentru studii de nanotoxicologie.
Domeniile de interes științific	Biotehnologie, bionanotehnologie. Microbiologia și biotehnologia levurilor Biochimie, specializare în domeniul biochimiei levurilor. Bionanotehnologie, specializare în domeniul componentelor bioactive. Validarea metodelor microbiologice și biochimice pentru studii de nanotoxicologie.
Participări la forumuri	The International Conference dedicated to the 70th anniversary of foundation of first research institutes of the ASM, Chișinău, 2016. Symposium „ Nano-2016 Ethical, Ecological and Social Problems of Nanoscience and Nanotechnologies”. Chișinău, 2016. Conferința științifică a doctoranzilor (cu participare internațională), ediția VI-a, V-a „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători, Chișinău, 2017, 2018, 2019. <i>International Scientific Conference on Microbial Biotechnology</i> , 2016, 2018, Chisinau, Republic of Moldova. International scientific conference for students and phd students youth and progress of biology dedicated to the 185th anniversary from the birthday of B. Dybowski, LVIV, 2018. <i>The congress dedicated to the 50th anniversary of Scientific Association of Geneyicists and Breeders of the Republic of Moldova</i> , 2018,

XV International scientific conference for students and Phd students dedicated to the 135th anniversary of J. Parnas, 2019, Lviv, Ukraine.

***Lucrări științifice
publicate***

50 lucrări științifice: 16 în reviste recenzate, 6 în culegeri, 20 teze la internaționale și naționale, 3 brevete de invenție, 7 materiale la saloane de invenții.

Premii și mențiuni

Bursa Federației Mondiale a Savanților (2019-2020)
Premiul municipal pentru tineret în domeniile științei, tehnicii, literaturii, artelor și activism civic, secțiunea științe (2018).
Bursa de Excelență a Guvernului (2018).
Bursa de Cercetare in memoriam Mircea Ciuhrii (2017).
International Student Innovation and Științific Research Exhibition „Cadet Inova”, Sibiu, România, 2020 (medalie de aur).
Expoziția Internațională Specializată Infoinvent, Chișinău, 2019 (Medalie de aur și bronz).
International Salon of Research, Innovation and Technological Transfer, Iași, 2018 (Medalie de Aur și Diplomă de Excelență).
Târgul Internațional de Invenții și Idei Practice, Invent–Invest, 2018 (Medalia de Aur).
Expoziția Internațională Specializată Infoinvent, Chișinău, 2017 (Medalie de aur).

Apartenență la Societăți

Membru al Federației Societăților Europene de Microbiologie (FEMS).

Cunoașterea limbilor

română, rusă, franceză, engleză.

***Date de contact de
serviciu***

Laboratorul Biotehnologia levurilor Institutul de Microbiologie și Biotehnologie. MD 2028, str. Academiei 1, bir. 212A
Tel.: +373 (22) 73 80 13,
e-mail: besliu.imb@gmail.com