IMPACTUL NANOPARTICULELOR DE Fe_2CuO_4 ȘI Fe_2ZnO_4 ASUPRA MICROMICETELOR DIN GENUL *Trichoderma*

Sîrbu¹ T., Timuș¹ I., Gorincioi² V., Moldovan¹ C., Țurcan¹ O.

¹Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, RM, tfsirbu@gmail.com

²Institutul de Chimie, RM, oviorina@gmail.com

<https://doi.org/10.53040/9789975347204.07>

Abstract: The paper presents the result of the study of the impact of nanoparticles (NP) of Fe_2CuO_4 and Fe_2ZnO_4 supplemented in the culture medium of micromycetes of the genus *Trichoderma* on the viability and stability of their antifungal properties after lyophilization and storage. It has been shown that NP of Fe_2CuO_4 and Fe_2ZnO_4 supplemented in the culture medium does not significantly influence the viability of crops after lyophilization and storage, but can modify the antifungal activity (stimulate or diminish) against some phytopathogens.

Keywords: micromycetes, nanoparticles (NP), viability, antifungal activity.

Introducere

Microorganismele sunt cultivate pentru mai multe scopuri: izolarea și identificarea lor; menținerea în stare viabilă, în colecții, fără pierderea funcțiilor importante; studiul structurii și funcției lor; studierea rolului în natură; obținerea de produși rezultați din biomasa celulară, biosinteză, fermentații, bioconversii etc. [1].

Alegerea mediului de cultură pentru cultivarea microorganismelor reprezintă o etapă cheie deoarece poate influența aspectele economice ale procesului de producție; de obicei se apelează la ingrediente ieftine care să constituie sursa de carbon, azot și fosfor. De cele mai multe ori, drept surse complexe de carbon, azot și fosfor sunt utilizate hidrolizatele vegetale, ca și unele subproduse rezultate în diferite industrii (melasă, zeruri etc). [2].

Concentrația și echilibrul între elementele minerale și factorii de creștere constituie un alt punct critic al cultivării microorganismelor la nivel industrial. După cum a fost deja

menționat un rol important în selectarea tulpinilor producători, cât și de conservare a acestora le revine mediilor de cultură, care poate fi universal, cât și individual. Necesitățile nutritive ale microorganismelor pentru creșterea și dezvoltarea optimă sunt individuale și de aceea la prepararea mediilor de cultură este necesar să se țină cont de aceasta.

Se consideră că un element chimic este esențial atunci, când, un deficit în acest element produce o diminuare a funcției biologice, iar prin adăugarea lui în sistem se produce restaurarea funcției respective sau se împiedică diminuarea acesteia. Efectul elementului esențial nu poate fi înlocuit de un alt element [3].

Numeroase cercetări demonstrează acțiunea benefică a nanoparticulelor asupra celulelor vii, însă ca orice tehnologie nouă cea cu nanoparticule prezintă un risc deosebit cu privire la posibilele efecte adverse precum modificarea ADN-ului, accelerarea proceselor de îmbătrânire și moartea celulelor, etc. [4-7]. Conform rezultatelor din diverse publicații științifice, efectul nanoparticulelor asupra activității biosintetice a microorganismelor variază în funcție de compoziția chimică, mărimea și concentrația particulelor, precum și de particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinilor luate în studiu [8-11].

Un interes crescând în diversitatea culturală a determinat microbiologii să se gândească serios la conservarea microbiană. Pe lângă izolarea și cultivarea tulpinilor pure, este necesară conservarea adecvată fără modificări ale caracteristicilor morfologice, fiziologice și genetice. Această revizuire consolidează diferitele metode utilizate pentru conservarea microorganismelor, cu accent pe crioconservare și liofilizare [12]. Cele mai des utilizate metode de conservare a microorganismelor sunt crioconservarea și liofilizare. Liotizarea este utilizată în principal pentru uscarea materialelor termolabile. Această metodă funcționează pe principiul sublimării și este împărțită în trei etape: înghețarea, uscarea primară și uscarea secundară. Există multe avantaje și dezavantaje ale acestei metode, dar aceasta este metoda cea mai utilă de uscare în prezent [13].

Scopul cercetărilor a constat în studierea impactului nanoparticulelor de Fe_2CuO_4 și Fe_2ZnO_4 asupra fungilor din genul *Trichoderma* după liofilizare și conservare în stare liofilizată

Materiale și metode

În calitate de obiect de studiu au fost utilizate 5 tulpini de fungi din genul *Trichoderma* depozitate în CNMN ca potențiali producători de biopreparate cu activitate antifungică înaltă față de o gamă largă de fitopatogeni. Tulpinile au fost cultivate pe mediul Czapek cu glucoză (variante martor - M) și 2 variante suplimentate cu nanoparticule: $\text{M}+\text{Fe}_2\text{CuO}_4$ și $\text{M}+\text{Fe}_2\text{ZnO}_4$ în concentrație de 5 mg/l. Nanoparticulele utilizate au avut diverse mărimi și forme. Nanoparticulele probelor Fe_2ZnO_4 au dimensiuni mai omogene, cuprinse între (8–15) nm. Morfologic, aceste particule au forme neregulate cu tendința spre forma cubică. Nanoparticulele probelor Fe_2CuO_4 posedă forme neregulate cu tendința spre forme cubică și tetraedrică. Dimensiunile acestor particule variază între (20–50) nm, predominând particule cu dimensiunile (30–35) nm. Ele au fost sintetizate de către cercet. șt. de la Institutul de Chimie al AȘM și puse la dispoziția noastră, cărora le mulțumim [14].

După cultivare sporii au fost suspendați în mediul lioprotector lapte degresat+7% glucoză și determinat titrul suspensiei. Viabilitatea tulpinilor până și după liofilizare (exprimate în unități formatoare de colonii UFC ml^{-1}) a fost determinată prin metoda contării coloniilor pe mediul agarizat Czapek în cutii Petri. Pentru rehidratarea și revitalizarea culturilor liofilizate s-a utilizat apa distilată, După efectuarea diluțiilor succesive și inocularea acestora pe mediu agarizat Czapek s-a efectuat calculul unităților formatoare de colonii peste 6 -10 zile de incubare la 28°C. Numărul de celule viabile a fost exprimat prin $\log_{10}$ a

unităților formatoare de colonii (UFC) în 1,0 ml de suspensie [15]. Viabilitatea a fost calculată conform formulei:

$$c \% = (\lg \text{UFC ml}^{-1}_{\text{fin}} / \lg \text{UFC ml}^{-1}_{\text{in}}) \times 100\% \quad (1), \text{ unde:}$$

✓ $\lg \text{UFC ml}^{-1}_{\text{in}}$ este logaritmul (cu baza 10) a numărului unităților formatoare de colonii înainte de liofilizare;

✓ $\lg \text{UFC ml}^{-1}_{\text{fin}}$ este logaritmul numărului unităților formatoare de colonii după liofilizare sau păstrare;

c – viabilitatea culturilor în procente

Pentru stabilirea acțiunii nanoparticulelor asupra proprietăților biosintetice a culturilor de *Trichoderma* a fost determinată activitatea antifungică după 1 an de conservare în stare liofilizată. Proprietățile antifungice au fost studiate conform metodei difuzimetrice, prin utilizarea blocurilor de geloză [16]. În calitate de tulpini-test au fost folosiți fitopatogenii: *Aspergillus niger*; *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*. Toate experiențele au fost efectuate în 3 repetări

Rezultate și discuții

Rezultatele obținute în cercetările efectuate asupra viabilității culturilor, după liofilizare și după 1 an de conservare în stare liofilizată, în variantele testate (Tabel) au demonstrat că, nanoparticulele suplimentate în mediul de cultivare a culturilor, înainte de liofilizare, acționează diferit asupra acestora. Viabilitatea culturilor în variantele testate variază cu $\pm 2-5\%$ față de varianta martor, atât după liofilizare, cât și după 1 an de conservare în stare liofilizată.

Tabel Viabilitatea tulpinilor de micromicete după liofilizare și păstrare

Tulpina	Mediul de cultivare utilizat	Viabilitatea (UFC)	
		După liofilizare	După 1 an de păstrare
<i>Trichoderma virens</i> CNMN FD 13	Martor (M)	93,8 $\pm$ 0,6	91,9 $\pm$ 2,2
	M+Fe ₂ CuO ₄	97,9 $\pm$ 2,6	95,4 $\pm$ 0,9
	M+Fe ₂ ZnO ₄	95,2 $\pm$ 2,1	92,7 $\pm$ 0,7
<i>Trichoderma lignorum</i> CNMN FD 14	M	98,3 $\pm$ 2,0	96,1 $\pm$ 0,7
	M+Fe ₂ CuO ₄	98,5 $\pm$ 0,1	94,6 $\pm$ 2,6
	M+Fe ₂ ZnO ₄	94,5 $\pm$ 0,9	91,0 $\pm$ 2,9
<i>Trichoderma koningii</i> CNMN FD 15	M	96,7 $\pm$ 0,4	90,8 $\pm$ 1,3
	M+Fe ₂ CuO ₄	97,1 $\pm$ 1,8	94,3 $\pm$ 3,1
	M+Fe ₂ ZnO ₄	96,3 $\pm$ 1,0	94,1 $\pm$ 1,3
<i>Trichoderma harzianum</i> CNMN FD 16	M	97,2 $\pm$ 1,8	93,8 $\pm$ 0,7
	M+Fe ₂ CuO ₄	96,5 $\pm$ 2,1	92,4 $\pm$ 0,6
	M+Fe ₂ ZnO ₄	94,5 $\pm$ 1,1	93,2 $\pm$ 2,2
<i>Trichoderma viride</i> CNMN FD 17	M	96,2 $\pm$ 1,3	94,7 $\pm$ 2,5
	M+Fe ₂ CuO ₄	97,4 $\pm$ 1,9	94,2 $\pm$ 2,1
	M+Fe ₂ ZnO ₄	94,7 $\pm$ 0,9	92,4 $\pm$ 3,2

Asupra proceselor biosintetice ale culturilor de *Trichoderma* nanoparticule, suplimentate din mediul de cultivare, de asemenea au influențat diferit (Fig.1). Astfel, activitatea antifungică a tulpinilor cultivate în variantele cu nanoparticule de Fe₂CuO₄, după 1 an de conservare în stare liofilizată, arată în felul următor: *Tr. lignorum* FD 14 a demonstrat o sensibilitate mai înaltă față de *F. solani* și *F. oxysporum* cu 11-12% și o diminuare față de *A. niger* cu 6% față de varianta martor; *Tr. koningii* FD17 – o stimulare de 7% față *A. niger* și de 12% față de *B. cinerea*, iar față de *Alt.altenata* și *F.slani* o diminuare nesemnificativă de

2,5% și respectiv 1,2% comparativ cu martorul; *Tr. viride* FD 17 a înregistrat simulări ne semnificative comparativ cu martorul de 2-6% față de *Alt.alt*, *F.solani* și *F. oxysporum*.

Fig. 1. Activitatea antifungică a tulpinilor cultivate pe mediu Czapek suplimentat cu NP de Fe_2CuO_4 după 1 an de conservare în stare liofilizată.

Activitatea antifungică a culturilor, crescute pe mediul suplimentat cu nanoparticule de Fe_2ZnO_4 , după 1 an de conservare în stare liofilizată, de asemenea a înregistrat unele schimbări (Figura 2).

Figura 2. Activitatea antifungică a tulpinilor cultivate pe mediul Czapek suplimentat cu NP de Fe_2ZnO_4 după 1 an de conservare în stare liofilizată

Astfel, *Tr. lignorum* FD 14 a înregistrat o diminuare de 8,5% față *A. niger*; *Tr. koningii* FD 15 o stimulare de 2 - 9% față de *A.niger*, *B. cinerea*, *F. solani* și o diminuare de 6,5% față de *F.oxyspor* comparativ cu martorul, iar *Tr. viride* FD 17 – stimulări ne semnificative de 2 - 6,5% față de 4 din cei 5 fitopatogeni testați (*A. niger*, *Alt.alt*, *F. solani*, *F.oxysporum*).

Concluzii

Nanoparticulele Fe_2CuO_4 și Fe_2ZnO_4 , suplimentate în mediul de cultivare a tulpinilor de *Trichoderma*, influențează ne semnificativ asupra viabilității acestora după liofilizare, cât și

după 1 an de conservare în stare liofilizată. De asemenea NP pot modifica activitatea antifungică a culturilor după liofilizarea și păstrarea lor în stare liofilizată (stimula sau diminua activitatea).

Bibliografie

1. Jelea M. Microbiologie generală – Note de curs, CEPA II.
2. Microbiologie aplicată.
http://www.biotehnologii.usamv.ro/images/pdf/MICROBIOLOGIE_APLICATA.pdf
3. Spînu C, Ciolan F. Chimie bioanorganică, Editura Universitaria, Craiova, 2013 ISBN 978-606-14-0627-2
4. Alahmadi N. S., Betts J. W, Cheng F. and Wadhawan All. Synthesis and antibacterial effects of cobalt–cellulose magnetic nanocomposites. RSC Advances. Issue 32, 2017, Issue in Progress. DOI:[10.1039/C7RA00920H](https://doi.org/10.1039/C7RA00920H)
5. Artiromov L. Nanotehnologiile alimentare în contextul siguranței consumatorului. Dezvoltarea inovativă, colaborativă, incluzivă a cooperativelor: teorie, practică, perspective", conferință științifico-practică internațională, 2018, Chișinău, p. 50-59. ISBN 978-9975-3272-7-5
6. Bălan G., Burduniuc O., Spînu C., Furtună N. Arta Medica, Nr. 2 (55), 2015, p. 25.
7. Cepoi L., Gutsul T., Miscu, V., Rudî, L., Iațco, I., Chiriac, T., Todosiciuc, A. Antioxidant activity of the system astaxanthine-nano Ag. NANO-2011, Cooperation and Networking of Universities and Research. Kishinev, 2011. Abstract Book. p.15.
8. Hulkoti N.I., Taranath T.C. Biosynthesis of nanoparticles using microbes—A review. In: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014, p. 474-483.
9. Kathrin Kotzybik, et al. Influence of different nanomaterials on growth and mycotoxin production of *Penicillium verrucosum*. PLOS, Published: March 14, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150855>
10. Kitching M. et al. Fungal biosynthesis of gold nanoparticles: mechanism and scale up. In: Microbial biotechnology, 2014, p. 1-14. 17.
11. Sîrbu T., Zop A., Guțul T. Acțiunea nanoparticulelor de Fe₃O₄ și Fe(0) asupra creșterii micromicetelor în prezența trifluralinei. Buletinul AȘM. Științele vieții. Nr. 1(331) 2017, p. 117-124.
12. [Om Prakash](#), [Yogesh Nimonkar](#), [Yogesh S. Shouche](#). Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 339, Issue 1, 1 February 2013, Pages 1–9, <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12034> Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. М. Изд-во. Наука, 2004, 528 с.
13. Soham Shukla. Freeze drying process: a review. International journal of pharmaceutical sciences and research, No 3, 2011, P. 3061-3068. DOI:[http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2\(12\).3061-68](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2(12).3061-68)
14. Gorinchoy V, Shova S, Melnic E, Kravtsov V, Turta C. Homotrimeric Fe₃^{III} μ – oxo salicylate cluster. synthesis, structure and properties. Chemistry Journal of Moldova. 2013; 8 (2); 83–89.
15. Muñoz-Rojas J. et al. Involvement of Cyclopropane Fatty Acids in the Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to Freeze-Drying. Applied Environmental Microbiology, vol. 72, № 1, 2006, p. 472-477.
16. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. М. Изд-во. „Наука”, 2004, с. 5-7.