



MD 4522 C1 2018.05.31

## REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4522** (13) **C1**  
(51) Int.Cl: *C12Q 1/02* (2006.01)  
*C12Q 1/30* (2006.01)  
*C12N 1/16* (2006.01)  
*B82Y 5/00* (2011.01)

### (12) BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: a 2016 0147 (22) Data depozit: 2016.12.22</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2017.10.31, BOPI nr. 10/2017</p>
<p>(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE INGINERIE ELECTRONICĂ ȘI NANOTEHNOLOGII "D. Ghițu", MD</p> <p>(72) Inventatori: USATÎI Agafia, MD; BEȘLIU Alina, MD; CHISELIȚA Natalia, MD; RUSU Emil, MD; GUȚUL Tatiana, MD</p> <p>(73) Titulari: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE INGINERIE ELECTRONICĂ ȘI NANOTEHNOLOGII "D. Ghițu", MD</p>	

#### (54) Procedeu de evaluare a toxicității nanoparticulelor oxizilor de metale cu utilizarea levurilor

##### (57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la biochimie, și anume la un procedeu de evaluare a toxicității nanoparticulelor oxizilor de metale cu utilizarea levurilor.

Procedeul, conform invenției, prevede inocularea levurii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 pe un mediu nutritiv, adăugarea nanoparticulelor oxizilor de metale în concentrații cuprinse între 0,5...15,0 mg/L, cultivarea submersă în decurs de 72 ore,

2  
separarea biomasei, determinarea în biomasă a activității catalazei și a conținutului de  $\beta$ -caroten, totodată nivelul de toxicitate al nanoparticulelor oxizilor de metale se stabilește reieșind din concentrațiile care provoacă diminuarea activității catalazei sau a conținutului de  $\beta$ -caroten cu 50%.

Revendicări: 1

MD 4522 C1 2018.05.31

**(54) Method for assessing the toxicity of metal oxide nanoparticles using yeasts****(57) Abstract:**

1  
The invention relates to biochemistry, in particular to a method for assessing the toxicity of metal oxide nanoparticles using yeasts.

The method, according to the invention, provides sowing *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 yeast on a nutrient medium, adding metal oxide nanoparticles at a concentration in the range of 0.5...15.0 mg/l, deep culturing for 72 hours, separating the biomass, determining in

2  
the biomass the catalase activity and  $\beta$ -carotene content, at the same time the toxicity level of metal oxide nanoparticles is established proceeding from concentrations that provoke a decrease in catalase activity or  $\beta$ -carotene content by 50%.

Claims: 1

**(54) Способ оценки токсичности наночастиц оксидов металлов с использованием дрожжей****(57) Реферат:**

1  
Изобретение относится к биохимии, а именно к способу оценки токсичности наночастиц оксидов металлов с использованием дрожжей.

Способ, согласно изобретению, предусматривает посев дрожжей *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 на питательную среду, добавление наночастиц оксидов металлов в концентрации в пределах 0,5...15,0 мг/л, глубинное культивирование в течение 72 часов,

2  
отделение биомассы, определение в биомассе активности каталазы и содержания  $\beta$ -каротина, при этом уровень токсичности наночастиц оксидов металлов устанавливается исходя из концентраций, которые провоцируют снижение активности каталазы или содержания  $\beta$ -каротина на 50%.

П. формулы: 1

**Descriere:**

Invenția se referă la biochimie, și anume la un procedeu de evaluare a toxicității nanoparticulelor oxizilor de metal cu utilizarea levurilor.

5 Invenția poate fi utilizată la testele de estimare a nivelului nocivității nanoparticulelor cu ajutorul indicatorilor biologici, a activității catalazei și a conținutului de  $\beta$ -caroten.

Una din problemele principale de utilizare a nanoparticulelor constă în evaluarea riscurilor asupra mediului înconjurător și sănătății omului. Pentru moment, nanotehnologiile se află sub protecția legislației curente, cum este Regulamentul Comunității Europene referitor la substanțele chimice și folosirea lor în condiții de securitate – Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances REACH. In acest context, sunt actuale investigațiile privind stabilirea efectelor nanoparticulelor anorganice asupra obiectelor mediului înconjurător.

15 Variația de răspuns individual la administrarea de doze letale a substanței cu efect toxic necesită determinarea gradului toxicității.

Metodologia de evaluare a impactului substanțelor toxice periculoase se bazează pe cea mai mică valoare mediană L(E)C50 pentru trei organisme de mediu cheie: alge, crustacee și pești. Scara toxicității L(E)C50 se exprimă prin: foarte toxică ( $< 1$  mg/L); toxică (1...10 mg/L); nocivă (10...100 mg/L); nu este clasificată ( $>100$  mg/L).

20 Levurile prezintă obiecte comode și reprezentative, care oferă oportunități în modelarea diferitor procese vitale și stabilirea mecanismelor de acțiune a compușilor asupra componentelor celulare. În biotehnologia microbiană, pentru testele funcționale a măsurii de inhibare sau stimulare a unui compus, care se observă prin efectul maxim 50% (curba doză/răspuns), se propune utilizarea termenilor concentrație eficientă (EC<sub>50%</sub>) sau concentrație a inhibării (IC<sub>50%</sub>) de către compus. Aceste teste oferă posibilitatea de a efectua un studiu complet al toxicității nanoparticulelor asupra organismului.

25 Concentrația reprezintă factorul cel mai important care determină toxicitatea unei substanțe. Acest parametru sau derivatele sale se folosesc în scopul aprecierii toxicității substanțelor și al clasificării toxicologice a acestora. Stabilirea relațiilor cantitative concentrație-efect furnizează informații asupra securității unui compus chimic.

30 Ținând cont de informațiile disponibile privind compusul, se administrează o primă concentrație, care n-ar trebui să determine decât efecte minime. După supravegherea atentă și așteptarea unui timp suficient, se administrează concentrații crescătoare, până când se înregistrează efecte evidente de toxicitate.

35 Este cunoscut procedeu de apreciere a efectelor nanoparticulelor cu utilizarea levurilor *Saccharomyces cerevisiae*, care presupune determinarea indicelui EC<sub>50%</sub> (concentrația maximal eficientă). Acest procedeu este recomandat pentru aprecierea gradului de viabilitate a culturii. Dezavantajul procedurii constă în sensibilitatea scăzută a procesului de evaluare a efectelor nanoparticulelor [1].

40 Mai este cunoscut procedeu de evaluare a toxicității nanoparticulelor prin determinarea consumului de oxigen și impactul asupra integrității membranei celulare microbiene [2].

Neajunsul acestui tip de testare constă în faptul că pentru a stabili nivelul de toxicitate al nanoparticulelor se propune ca model al eucariotelor levurile *Saccharomyces cerevisiae*, totodată potențialul toxic al nanoparticulelor față de cultura de levuri nu se evidențiază pe deplin.

45 Soluția cea mai apropiată de obiectul revendicat este procedeu de evaluare a toxicității metalelor grele cu ajutorul levurilor pigmentate din genul *Rhodotorula*. Acest procedeu include aprecierea intensității culorii pigmentilor carotenoidici prin fotografierea coloniilor și determinarea diferenței între culorile canalelor model și, în paralel, determinarea cantității de dialdehidă malonică în biomasa celulară [3].

50 Neajunsul acestui tip de testare constă în faptul că procedurile de determinare sunt anevoioase, necesită aplicarea tehnicilor sofisticate de analiză (determinarea intensității culorilor pigmentilor cu aplicarea programelor specifice) și nu redă gradul sigur de toxicitate al metalelor.

55 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu sigur, eficient, ușor de realizat, de evaluare a toxicității nanoparticulelor oxizilor de metal cu utilizarea levurii pigmentate *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30.

Pornind de la faptul că a fost stabilită o corelare strânsă între activitatea catalazei cu nivelul de toxicitate al nanoparticulelor pe de o parte și o corelare strânsă între cantitatea de

$\beta$ -caroten în biomasă și nivelul de toxicitate al nanoparticulelor pe de altă parte s-a decis de a utiliza acești indicatori pentru elaborarea unui procedeu rapid și sigur de stabilire a toxicității nanoparticulelor cu utilizarea în calitate de obiect test a levurilor pigmentate din genul *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30.

5 Procedeu de evaluare a toxicității nanoparticulelor oxizilor de metale cu utilizarea levurilor prevede inocularea levurii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 pe un mediu nutritiv, adăugarea nanoparticulelor oxizilor de metale în concentrații cuprinse între 0,5...15,0 mg/L, cultivarea submersă în decurs de 72 ore, separarea biomasei, determinarea în biomasă a activității catalazei și a conținutului de  $\beta$ -caroten, totodată nivelul de toxicitate al  
10 nanoparticulelor oxizilor de metale se stabilește reieșind din concentrațiile care provoacă diminuarea activității catalazei sau a conținutului de  $\beta$ -caroten cu 50%.

Cantitatea de nanoparticule care provoacă diminuarea activității catalazei și a conținutului de  $\beta$ -caroten cu 50% se consideră concentrația minimă inhibitorie ( $IC_{50\%}$ ).

15 Rezultatul tehnic al invenției constă în faptul că nivelul de toxicitate al nanoparticulelor poate fi stabilit în termen de 72 ore, rezultatele fiind evaluate prin determinarea concentrației minim inhibitorie ( $IC_{50\%}$ ) a activității catalazei și a conținutului de  $\beta$ -caroten.

20 Rezultatul tehnic obținut se datorează faptului că catalaza, una din enzimele sistemului antioxidant al celulei, este utilizată pentru a micșora acțiunea toxică a speciilor reactive de oxigen formate în biomasa de *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 sub influența factorilor nocivi. Reacția de răspuns la acțiunea substanțelor străine se manifestă în primele ore de interacțiune. Un alt test important,  $\beta$ -carotenul, fiind substanță cu activitate antioxidantă puternică, de asemenea face parte din sistemul de micșorare a influenței radicalilor liberi.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

25 Stabilirea toxicității nanoparticulelor  $TiO_2$  (cu dimensiunea de 30 nm)

30 Se prepară mediul nutritiv steril YPD cu următoarea compoziție, g·L<sup>-1</sup>: peptonă – 20,0; glucoză – 20,0; extract de drojdie - 10 ml; apă potabilă – 1000 ml. În mediul preparat se adaugă nanoparticule  $TiO_2$  (30 nm), în concentrații de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 mg·L<sup>-1</sup>. În 200 ml de mediu nutritiv suplimentat cu nanoparticule se adaugă inoculul de *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 (2x10<sup>6</sup> celule ml<sup>-1</sup>), în cantitate de 5% în bază volumetrică. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmeyer cu capacitatea de 1,0 L, în condiții de agitare continuă (200 r.p.m), la temperatura de 28°C, iluminare permanentă, durata cultivării 72 ore. În calitate de martor servește varianta mediului nutritiv fără aplicarea nanoparticulelor.

35 După 72 ore de cultivare, biomasa levuriană este separată de mediul nutritiv prin centrifugarea la 6000 g timp de 20 min. În biomasa obținută se determină activitatea catalazei și cantitatea de  $\beta$ -caroten.

Valorile calculate pentru probele experimentale sunt raportate la valorile probei martor (în care nu s-au introdus nanoparticule) și se exprimă în %.

40 Nivelul de toxicitate al nanoparticulelor se stabilește reieșind din concentrațiile care provoacă inhibarea veridică din punct de vedere statistic ( $IC_{50\%}$ ) a activității catalazei sau a conținutului de  $\beta$ -caroten în biomasă.

Rezultatele sunt prezentate în tab. 1.

Tabelul 1

45 Nivelul activității catalazei și al cantității de  $\beta$ -caroten la *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 la acțiunea diferitor concentrații de nanoparticule  $TiO_2$  (30 nm)

Indicatorul monitorizat		Concentrația nanoparticulelor $TiO_2$ (30 nm), mg L <sup>-1</sup>					
		0,0	0,5	1,0	5,0	10,0	15,0
Catalaza	$\mu\text{mol/mg}$ proteină/min	31,0±6	34,5±7,0	34,0±3,0	31,5±6,3	27,0±2,3	22,0±5,3
	%	100	111,3	109,6	101,6	87,0	70,9
$\beta$ - carotenul	$\mu\text{g/g}$ s.a.u.	176±4	134±23	120±5	102±3	93±11	53±15
	%	100	76,1	68,2	57,6	52,9	30,1

▪ -  $p \leq 0,01$

Datele din tabelul 1 demonstrează că indicele toxicității ( $IC_{50\%}$ ) nanoparticulelor  $TiO_2$  (30 nm) este  $> 15 \text{ mg L}^{-1}$ .

Exemplul 2

Stabilirea toxicității nanoparticulelor  $Fe_3O_4$  (cu dimensiunea de 30 nm)

5 Se prepară mediul nutritiv steril YPD cu următoarea compoziție,  $g \cdot L^{-1}$ : peptonă – 20,0; glucoză – 20,0; extract de drojdie – 10 ml; apă potabilă – 1000 ml. În mediul preparat se adaugă nanoparticulele  $Fe_3O_4$  (30 nm), în concentrații de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0  $mg \cdot L^{-1}$ . În 200 ml de mediu nutritiv suplimentat cu nanoparticule se adaugă inoculul de *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 ( $2 \times 10^6$  celule  $ml^{-1}$ ), în cantitate de 5% în bază volumetrică. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmeyer cu capacitatea de 1,0 L, în condiții de agitare continuă (200 r.p.m), la temperatura de 28° C, iluminare permanentă, durata cultivării 72 ore. În calitate de martor servește varianta mediului nutritiv fără aplicarea nanoparticulelor.

10 După 72 ore de cultivare, biomasa levuriană este separată de mediul nutritiv prin centrifugarea la 6000 g timp de 20 min. În biomasa obținută se determină activitatea catalazei și cantitatea de  $\beta$ -caroten.

15 Valorile calculate pentru probele experimentale sunt raportate la valorile probei martor (în care nu s-au introdus nanoparticule) și se exprimă în % .

Nivelul de toxicitate al nanoparticulelor se stabilește reieșind din concentrațiile care provoacă inhibarea veridică din punct de vedere statistic ( $IC_{50\%}$ ) a activității catalazei sau a conținutului de  $\beta$ -caroten în biomasă.

20 Rezultatele sunt prezentate în tab. 2.

Tabelul 2

Nivelul activității catalazei și al cantității de  $\beta$ -caroten la *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 la acțiunea diferitor concentrații de nanoparticule  $Fe_3O_4$  (30 nm)

Indicatorul monitorizat		Concentrația nanoparticulelor $Fe_3O_4$ (30 nm), $mg L^{-1}$					
		0,0	0,5	1,0	5,0	10,0	15,0
Catalaza	$\mu\text{mol/mg proteină/min}$	31,0±6,0	25,7±6,1	23,2±4,5	14,2±0,8	13,7±0,1	12,0±0,3
	%	100	82,9	74,8	45,8	44	38,7
$\beta$ -carotenul	$\mu\text{g/g s.a.u.}$	176±4	112±4	108±3	77±5	66±5	32±1
	%	100	63,6	61,3	43,7	37,5	18,2

25 ▪ -  $p \leq 0,01$

Datele din tabelul 2 demonstrează că indicele toxicității ( $IC_{50\%}$ ) al nanoparticulelor  $Fe_3O_4$  (30 nm) constituie  $5 \text{ mg L}^{-1}$ .

Exemplul 3

Stabilirea toxicității nanoparticulelor  $Fe_3O_4$  (cu dimensiunea de 10 nm)

30 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 nanoparticulele  $Fe_3O_4$  (10 nm), în cantități de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0  $mg L^{-1}$ . În 200 ml de mediu nutritiv suplimentat cu nanoparticule se adaugă inoculul de *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 ( $2 \times 10^6$  celule  $ml^{-1}$ ), în cantitate de 5% în bază volumetrică. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmeyer cu capacitatea de 1,0 L, în condiții de agitare continuă (200 r.p.m), la temperatura de 28°C, iluminare permanentă, durata cultivării 72 ore. În calitate de martor servește varianta mediului nutritiv fără aplicarea nanoparticulelor.

35 După 72 ore de cultivare, biomasa levuriană este separată de mediul nutritiv prin centrifugarea la 6000 g timp de 20 min. În biomasa obținută se determină activitatea catalazei și cantitatea de  $\beta$ -caroten.

40 Valorile calculate pentru probele experimentale sunt raportate la valorile probei martor (în care nu s-au introdus nanoparticule) și se exprimă în % .

Nivelul de toxicitate al nanoparticulelor se stabilește reieșind din concentrațiile care provoacă inhibarea veridică din punct de vedere statistic ( $IC_{50\%}$ ) a activității catalazei sau a conținutului de  $\beta$ -caroten în biomasă.

45 Rezultatele sunt prezentate în tab. 3.

Tabelul 3

Nivelul activității catalazei și al cantității de  $\beta$ -caroten la *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 la acțiunea diferitor concentrații de nanoparticule  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (10 nm)

Indicatorul monitorizat		Concentrația nanoparticulelor $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (10 nm), $\text{mg L}^{-1}$					
		0,0	0,5	1,0	5,0	10,0	15,0
Catalaza	$\mu\text{mol/mg}$ proteină/min	22±1	21±1	18,2±0,7	12±0,5	11,2±0,7	10,5±0,1
	%	100	95,4	82,9	54,5	50,9	47,7
$\beta$ - carotenul	$\mu\text{g/g}$ s.a.u.	90±3	59±1	55±3	49±3	30±1	25±1
	%	100	65,5	61,1	57,4	33,3	26,6

▪ -  $p \leq 0,01$

5 Datele din tabelul 3 demonstrează că indicele toxicității ( $\text{IC}_{50\%}$ ) nanoparticulelor  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (10 nm) constituie  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .

Rezultatele prezentate confirmă posibilitatea aprecierii precoce a nivelului de toxicitate al nanoparticulelor oxizilor de metal în baza testelor de determinare a activității catalazei și a conținutului de  $\beta$ -caroten în biomasa de levuri pigmentate *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30.

10

#### (56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Kaja Kasemets, Angela Ivask, Henri-Charles Dubourguier. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology in Vitro*, Volume 23, Issue 6, September 2009, p. 1116-1122
2. Lila Otero-Gonzalez, Citlali Garcia-Saucedo, James A. Toxicity of  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{Fe}_0$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  and  $\text{Mn}_2\text{O}_3$  nanoparticles to the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemosphere*, 2013, 93, 1201-1206
3. Крупей К. С., Рыльский А. Ф. Биоиндикация загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами с помощью каротин синтезирующих дрожжей рода *Rhodotorula*. *Актуальні питання біології, екології та хімії*, 2015, том 9, №1, 64-75

#### (57) Revendicări:

Procedeu de evaluare a toxicității nanoparticulelor oxizilor de metale cu utilizarea levurilor, care prevede inocularea levurii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 pe un mediu nutritiv, adăugarea nanoparticulelor oxizilor de metale în concentrații cuprinse între  $0,5 \dots 15,0 \text{ mg/L}$ , cultivarea submersă în decurs de 72 ore, separarea biomasei, determinarea în biomasă a activității catalazei și a conținutului de  $\beta$ -caroten, totodată nivelul de toxicitate al nanoparticulelor oxizilor de metale se stabilește reieșind din concentrațiile care provoacă diminuarea activității catalazei sau a conținutului de  $\beta$ -caroten cu 50%.