

**MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII AL
REPUBLICII MOLDOVA
INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE**

Cu titlu de manuscris

C.Z.U.: 579.69 : 579.22 : 579.24 : 579.873.1

BÎRSA MAXIM

**VIABILITATEA ȘI VARIABILITATEA TULPINII
Streptomyces canosus CNMN-Ac-02 DUPĂ LIOFILIZARE ÎN PREZENȚA
COMPUȘILOR DE ORIGINE CIANOBACTERIANĂ ȘI VEGETALĂ**

163.04 – MICROBIOLOGIE

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

CHIȘINĂU, 2019

Teza a fost elaborată în cadrul Colecției Naționale de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie.

Conducător științific:

BURȚEVA Svetlana, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător

Consultant științific:

RUDIC Valeriu, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, academician, Om Emerit al Republicii Moldova

Referenți oficiali:

GUDUMAC Valentin, doctor habilitat în științe medicale, profesor universitar

CODREANU Svetlana, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

Componenta consiliul științific specializat:

VOLOȘCIUC Leonid, președinte, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător

CEPOI Liliana, secretar științific, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

ȘALARU Victor, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar

CORCIMARU Serghei, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

BURDUNIUC Olga, doctor în științe medicale, conferențiar cercetător

Susținerea va avea loc la data de „20 decembrie” 2019, ora 14.00 în ședința Consiliul științific specializat D 163.04-113 din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie, or. Chișinău, str. Academiei 1, biroul 352.

Teza de doctor și rezumatul pot fi consultate la Biblioteca Științifică Centrală „A. Lupan” a Academiei de Științe a Moldovei și pe pagina web a ANACEC (www.anacip.md).

Rezumatul a fost expediat la „15” noiembrie” 2019

Secretar științific al Consiliului științific specializat:

CEPOI Liliana, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

Conducător științific:

BURȚEVA Svetlana, doctor habilitat în științe biologice,
profesor cercetător

Consultant științific:

RUDIC Valeriu, doctor habilitat în științe biologice,
profesor universitar, academician, Om Emerit al Republicii Moldova

Autor:

BÎRSA Maxim

CUPRINS

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII	4
CONȚINUTUL TEZEI.....	7
1. STREPTOMICETELE – OBIECTE BIOTEHNOLOGICE IMPORTANTE, CONSERVAREA ȘI PĂSTRAREA LOR	7
2. OBIECTUL DE STUDIU ȘI METODELE APLICATE ÎN CERCETARE	8
3. INFLUENȚA PREPARATELOR DE ORIGINE CIANOBACTERIANĂ ȘI VEGETALĂ ASUPRA VIABILITĂȚII TULPINII <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 ÎN PROCESUL LIOFILIZĂRII.....	9
3.1. Acțiunea preparatelor de origine cianobacteriană asupra viabilității culturii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02, la utilizarea lor în componența mediilor de liofilizare și reactivare a tulpinii.....	10
3.2. Acțiunea glicozidelor de origine vegetală asupra viabilității culturii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02, la utilizarea lor în componența mediilor de liofilizare și reactivare a tulpinii .	12
4. INFLUENȚA PREPARATELOR BIOLOGIC ACTIVE DE ORIGINE CIANOBACTERIANĂ ȘI VEGETALĂ ASUPRA CARACTERELOR MORFO-CULTURALE ALE TULPINII <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 ÎN PROCESUL LIOFILIZĂRII	15
4.1. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 până și după liofilizare în mediu lioprotector suplimentat cu substanțe biologice active de origine cianobacteriană	15
4.2. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 până și după liofilizare în prezența substanțelor biologice active de origine vegetală.....	16
5. ACȚIUNEA PREPARATELOR ASUPRA PRODUCTIVITĂȚII ȘI SINTEZEI LIPIDELOR LA <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02	17
5.1. Evaluarea acțiunii preparatelor de origine cianobacteriană asupra productivității și sintezei lipidelor la <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02	18
5.2. Evaluarea acțiunii preparatelor de origine vegetală asupra productivității și sintezei lipidelor la <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02	20
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	22
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	24
LISTA PUBLICAȚIILOR LA TEMA TEZEI.....	27
ADNOTARE.....	31

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța temei abordate. Păstrarea durabilă a culturilor de microorganisme reprezintă un factor important pentru utilizarea lor atât în calitate de obiecte ale cercetărilor științifice fundamentale, cât și în calitate de obiecte cu potențial biotehnologic. În rezultat a apărut necesitatea fondării instituțiilor responsabile de păstrarea diversității genofondului microbial, iar în Republica Moldova funcțiile unei astfel de instituții sunt îndeplinite de Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie [14].

Cercetările din ultimii ani, ca răspuns la necesitatea asigurării industriei biotehnologice cu tulpini viabile de microorganisme cu parametri biotehnologici stabili, sunt orientate spre elaborarea și implementarea unor metode eficiente de conservare și păstrare a tulpinilor active. Problema păstrării microorganismelor cuprinde o serie de obiective, dintre care cel mai important este depistarea condițiilor optime de conservare și păstrare a celulelor microbiene pentru evitarea leziunii acestora [8].

Păstrarea durabilă și eficientă a microorganismelor depinde de selectarea corectă a metodei de conservare, parametrilor și mediilor de protecție. Actualmente sunt cunoscute diverse metode de conservare, dintre care liofilizarea este considerată a fi o optimă pentru cele mai diverse grupuri de microorganisme [2]. Pe parcursul liofilizării, microorganismele sunt expuse acțiunii unei serii de factori de stres, cum sunt temperaturile joase și uscarea în vid, care duc la moartea celulelor. O altă cauză a pieirii microorganismelor este stresul oxidativ, asociat cu supraacumularea speciilor reactive de oxigen, care au un efect negativ asupra celulelor [7].

Optimizarea parametrilor de liofilizare și selectarea mediilor eficiente de protecție și regenerare a culturilor microbiene ocupă un loc important în procesul menținerii durabile a colecțiilor de microorganisme [5]. O gamă largă de substanțe de diferită origine, cu proprietăți antioxidante (acidul ascorbic, ascorbatperoxidaza) și crioprotectoare (mono-, di-, oligo- și polizaharidele, glutamatul de natriu, tiosulfatul de natriu, aminoacidul prolina, peptona, glicerina, xantanul, maltodextrina, manitolul, polivinilpirolidonul, etilenglicolul) sunt testate în procesul de conservare a microorganismelor în scopul evidențierii acțiunii lor protectoare și stabilizatoare [4, 11].

Indicii de bază ai eficacității metodelor aplicate rezidă în menținerea viabilității și stabilității celulelor microbiene. În această ordine de idei, un interes deosebit prezintă perfecționarea metodelor de păstrare a actinobacteriilor, organisme care se caracterizează prin instabilitate genetică înaltă, în comparație cu alte microorganisme [19].

Actinobacteria (actinomicetele sau bacteriile filamentoase) reprezintă un grup excepțional de microorganisme, ce combină particularitățile moleculare, chimice și fiziologice ale procariotelor cu caracterele morfologice ale ciupercilor eucariote. Descompunători ai substanțelor organice, fixatori de azot, ce se întâlnesc preponderent în sol, actinomicetele produc o gamă largă de substanțe bioactive cu acțiune antibiotică, antifungică, antitumorală, insecticidă, antiparazitară, cu o vastă arie de utilizare. Printre ele se evidențiază genul *Streptomyces* – cel mai mare gen de actinobacterii și genul tip al familiei *Streptomycetaceae* [10, 13]. Tulpina *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene s-a remarcat ca producător important de endo- și exo-metaboliți, care și-au demonstrat eficacitatea în fitotehnie și zootehnie. Printre efectele pozitive ale preparatelor din acest microorganism menționăm majorarea viabilității și sporirea masei vii la puii broiler, diminuarea mortalității la porci, stimularea creșterii animalelor cu blană prețioasă, profilaxia și tratarea bolilor infecțioase la albiși, stimularea creșterii unor culturi agricole, așa ca castraveții, roșiile, tutunul, fasolea, ameliorarea procesului de micropropagare, înrădăcinare și dezvoltare a sistemului radicular la plantele de cultură, îmbunătățirea calității materialului săditor [9].

În pofida faptului, că există numeroase cercetări orientate spre optimizarea procesului de cultivare și păstrare a streptomicetelor, rămâne a fi actuală problema stimulării creșterii și activității biosintetice a tulpinilor de streptomicete cu potențial biotehnologic important, dar mai ales a păstrării acestor parametri pe durata conservării lor în colecțiile de microorganisme [9]. Păstrarea de lungă durată a culturilor microbiene de importanță biotehnologică poate fi realizată prin mai multe metode, dintre care cea mai potrivită este liofilizarea. Este demonstrat, că această metodă asigură viabilitatea înaltă, stabilitatea proprietăților morfologice și păstrarea performanțelor funcționale. Astfel, sunt prevenite răspunsurile metabolice neașteptate ale culturilor de microorganisme. Streptomicetele în general și tulpina *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 în particular, sunt caracterizate prin eterogenitate populațională și capacitate de modificare înaltă sub acțiunea factorilor de mediu. La aplicarea liofilizării în calitate de metodă de păstrare de lungă durată aceste două fenomene pot provoca reducerea activității biosintetice a celulelor microbiene [8]. În scopul diminuării efectelor negative ale liofilizării se recomandă utilizarea substanțelor lioprotectoare. În prezent sunt cunoscute mai multe grupuri de substanțe de acest tip: sulfoxizii; alcoolii organici și derivații acestora; carbohidrații; aminoacizii și acizii carbonici; peptidele, proteinele și glicoproteinele [4]. Cianobacteriile, un grup de microorganisme, care în mediile naturale formează asociații simbiotice cu actinomicetele, sintetizează mai multe substanțe cu un potențial lioprotector. Pornind de la compatibilitatea actinomicetelor și cianobacteriilor, considerăm oportună utilizarea produselor de origine

cianobacteriană în calitate de substanțe lioprotectoare pentru conservarea de lungă durată a actinobacteriilor.

Plantele superioare de asemenea, produc numeroase substanțe care pot proteja celulele microbiene de efectele temperaturilor ultrajoase – oligo- și polipeptide, aminoacizi, diferite mono-, di- și polizaharide. Glicozidele vegetale sunt un grup de substanțe cu activitate biologică variată, inclusiv antioxidantă. Fiind eteri ai glucidelor, aceste substanțe ar putea fi aplicate în calitate de componente ale mediilor de protecție pe durata procesului de liofilizare. Utilizarea glicozidelor în calitate de lioprotectori este o direcție nouă în conservarea microorganismelor.

Astfel, pornind de la faptul, că elaborarea metodelor eficiente de conservare a culturilor de microorganisme de interes biotehnologic rămâne o direcție actuală la nivel mondial și că în literatura de specialitate sunt foarte puține relatări referitoare la utilizarea preparatelor naturale în procesul de liofilizare a tulpinilor de microorganisme, considerăm oportun studiul influenței substanțelor de origine cianobacteriană și vegetală asupra viabilității și stabilității tulpinilor de streptomicete în procesul de păstrare a lor în stare liofilizată [12].

Scopul tezei de doctor a constat în evaluarea influenței preparatelor biologic active de origine cianobacteriană și vegetală asupra viabilității și stabilității tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 în procesul liofilizării.

Obiectivele lucrării au fost următoarele:

1. Evaluarea efectului lioprotector al substanțelor biologic active de origine cianobacteriană prin estimarea viabilității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare;
2. Estimarea efectului lioprotector al extractelor glicozidice vegetale prin estimarea viabilității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare;
3. Aprecierea acțiunii preparatelor cianobacteriene asupra caracterelor morfo-culturale ale *S. canosus* CNMN-Ac-02 în procesul liofilizării;
4. Evaluarea acțiunii preparatelor vegetale asupra caracterelor morfo-culturale ale *S. canosus* CNMN-Ac-02 în procesul liofilizării;
5. Evidențierea acțiunii agenților lioprotectori asupra productivității și raportului fracțiilor lipidice la *S. canosus* CNMN-Ac-02 în vederea elucidării răspunsului celular la acțiunea factorilor de stres.

Ipoteza-cercetării:

➤ Fiind utilizate în calitate de lioprotectori, preparatele cianobacteriene și vegetale pot asigura păstrarea viabilității și stabilității caracterelor morfologice la conservarea de lungă durată prin metoda liofilizării a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02.

➤ **Metodologia cercetării științifice.** În conformitate cu scopul și obiectivele trasate, în vederea demonstrării ipotezelor de cercetare înaintate, au fost aplicate metode clasice și moderne de studiu, inclusiv:

- metode microbiologice clasice de cultivare a streptomicetelor, evaluare a viabilității și determinare a particularităților morfo-culturale;
- metode biochimice de apreciere a activității culturii studiate, de separare și cuantificare a fracțiilor lipidelor din biomasă;
- metode adecvate de păstrare a culturii de colecție (liofilizarea);
- metode statistice de analiză a rezultatelor și evaluare a rentabilității utilizării preparatelor studiate etc.

CONȚINUTUL TEZEI

1. STREPTOMICETELE – OBIECTE BIOTEHNOLOGICE IMPORTANTE, CONSERVAREA ȘI PĂSTRAREA LOR

Acest capitol include analiza realizărilor științifice în domeniul studiului streptomicetelor – un grup abil și divers de microorganisme, care pe parcursul ciclului vital produc un spectru larg de substanțe biologice active, utilizate în diverse ramuri: farmaceutică, cosmetologie, agricultură și industria alimentară. Conform rezultatelor numeroaselor studii, de rând cu locul de lider printre producătorii de antibiotice, aceste microorganisme prezintă avantaje importante pentru creșterea și protecția plantelor, prin contribuția lor la combaterea bolilor, activitatea antimicrobiană și antifungică, abilitatea de a produce compuși volatili și capacitatea de a spori biomasa vegetală. Acest grup de microorganisme prezintă interes și pentru zootehnie în calitate de supliment în rația alimentară a animalelor, fapt raportat de numeroși autori.

O atenție deosebită în acest capitol (a doua parte) este acordată metodelor de păstrare a microorganismelor, în particular a streptomicetelor. După o trecere în revistă a metodelor clasice și moderne, utilizate pentru păstrarea tulpinilor de streptomicete, sunt evidențiate mai multe avantaje ale liofilizării, eficiența căreia este demonstrată și pentru tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neputogene.

Cea de-a treia parte a capitolului 1 este dedicată studiului bibliografic cu referire la mediile protectoare și de rehidratare utilizate la liofilizarea și reactivarea microorganismelor și mecanismelor de acțiune a acestora. Pornind de la studiul factorilor de stres, la care sunt supuse celulele vii în procesul de liofilizare și rolul primordial al agenților de lioprotecție, cercetările savanților sunt orientate spre evidențierea componenței optimale a mediilor de liofilizare pentru

protejarea maximală a celulelor supuse stresului termic și hidric. Este evaluată utilizarea următoarelor grupe de substanțe crioprotectoare: sulfoxizii, alcoolii și derivații lor, mono- și polizaharidele, aminoacizii, peptidele, proteinele și glicoproteinele.

În baza acestui studiu bibliografic amplu, este argumentată necesitatea și importanța investigațiilor ce țin de evaluarea posibilității de utilizare a preparatelor de origine cianobacteriană și vegetală la elaborarea mediilor protectoare pentru conservarea și păstrarea tulpinilor de interes practic și științific.

Capitolul se încheie cu concluzii, după care este formulată problema de cercetare.

2. OBIECTUL DE STUDIU ȘI METODELE APLICATE ÎN CERCETARE

Acest capitol include argumentarea și descrierea obiectelor de studiu și a metodelor de cercetare. În studiu a fost utilizată tulpina *Streptomyces canosus* (Krasilnikov, 1970), depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neputogene a IMB, în calitate de producător valoros de metaboliți secundari, cu atribuirea cifrului *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02. Pentru cultivarea tulpinii au fost utilizate următoarele medii nutritive: mediul Dulaney (obținerea inoculului), mediul M-I (acumularea biomasei), mediu Czapek (determinarea caracterelor morfologice), mediul cu ovăz (păstrarea îndelungată pe medii solide).

În calitate de agenți de lioprotecție au fost utilizate extracte glicozidice, obținute în cadrul Laboratorului Bioreglatori Naturali al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor: glicozide iridoidice extrase din planta *Linaria genistifolia* L. Mill (partea aeriană) și flavonoidice extrase din partea aeriană a plantei *Verbascum phlomoides* L. prin fierbere în soluție hidrometanolică. În același scop, în studiu au fost utilizate preparatele BioR (complex de aminoacizi și peptide) și PSS_{Zn} (complex de polizaharide sulfatate cu zinc), obținute în cadrul Laboratorului Ficobiotehnologie al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie prin procedee biotehnologice de extragere, fracționare și purificare a principiilor bioactive din biomasa tulpinii cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02. Agenții lioprotectori au fost adăugați la mediul protector de bază, selectat în urma unui screening al mediilor uzuale și care are următoarea componență: gelatină – 2,5%, glucoză – 7,5%.

Pentru realizarea cercetărilor au fost utilizate metode de determinare cantitativă a germenilor viabili (metoda calculului logaritmic, descrisă de Munos-Rojas ș.a. [6]) și a biomasei de streptomicete (metoda gravimetrică), de determinare a proprietăților morfo-culturale ale tulpinilor de streptomicete (prin examinarea coloniilor de pe suprafața mediilor agarizate în cutii Petri), de separare a biomasei (prin centrifugare), extragere a lipidelor (metoda Folch modificată), analiză cantitativă și calitativă a fracțiilor lipidelor (metoda cromatografiei în strat

subțire), de liofilizare a biomasei de streptomicete (cu utilizarea liofilizatorului LABCONCO 6 Plus), de analiză statistică a rezultatelor obținute (cu aplicarea instrumentelor statisticii descriptive: calculul mediilor aritmetice, abaterilor standard, coeficientului de variație și statisticii inferențiale: testele de valabilitate și testele de semnificație). Calculul viabilității culturii s-a efectuat prin metoda logaritmării zecimale

3. INFLUENȚA PREPARATELOR DE ORIGINE CIANOBACTERIANĂ ȘI VEGETALĂ ASUPRA VIABILITĂȚII TULPINII *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 ÎN PROCESUL LIOFILIZĂRII

În figura 3.1. este prezentată schema experiențelor realizate la acest capitol, în vederea evidențierii acțiunii preparatelor menționate asupra viabilității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02.

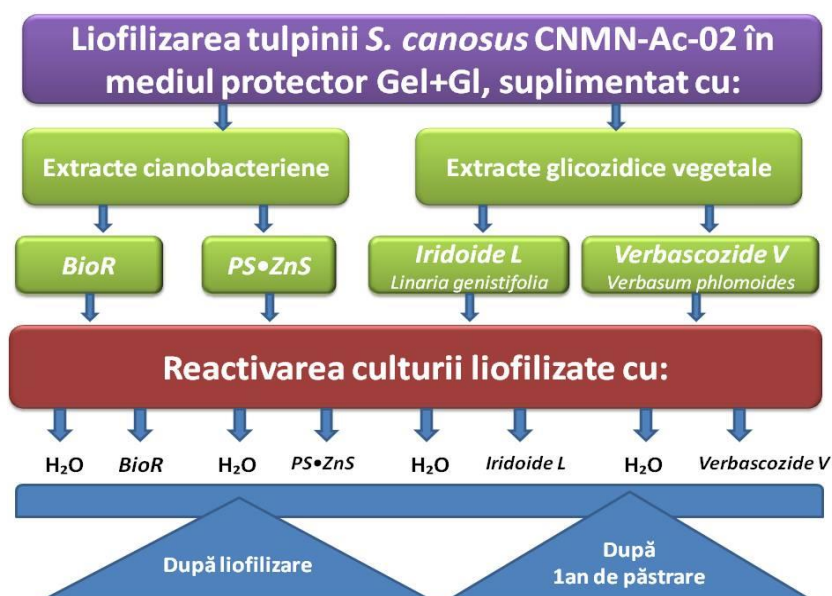


Fig. 3.1. Schema de realizare a experiențelor în vederea evidențierii acțiunii preparatelor de origine cianobacteriană și vegetală asupra viabilității tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 la liofilizare

Liofilizarea, metoda cea mai utilizată pentru conservarea tulpinilor de streptomicete, și-a demonstrat eficacitatea în numeroase cercetări. Însă, de rând cu avantajele pe care le oferă această metoda de păstrare, congelarea și deshidratare rămân a fi doi factori de stres pentru celulele vii. Astfel, utilizarea substanțelor care au potențialul de a proteja celulele de acțiunea nocivă a temperaturilor extreme negative și a insuficienței acute de apă este o condiție a păstrării viabilității celulelor microbiene supuse acestui mod de conservare. În calitate de astfel de

substanțe în această lucrare au fost testate două tipuri de preparate de origine cianobacteriană (BioR și PSS_{Zn}) și două tipuri de extracte glicozidice (LG și VP).

O altă etapă importantă, care solicită utilizarea substanțelor cu activitate biologică înaltă este etapa de reactivare a culturilor microbiene după perioada de păstrare în stare liofilizată. O particularitate a culturii, care a servit drept obiect de studiu în această teză – tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02 este capacitatea ei de a forma spori în condiții de stres. În condițiile reactivării culturii liofilizate se recomandă utilizarea stimulatoarelor pentru germinarea sporilor, iar extractele utilizate la etapa de liofilizare pot fi benefice și la această etapă importantă. De aceea extractele cianobacteriene și glicozidele au fost utilizate atât în calitate de lioprotectori, cât și în calitate de componente ale mediului pentru reactivarea culturii după liofilizare.

3.1. Acțiunea preparatelor de origine cianobacteriană asupra viabilității culturii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02, la utilizarea lor în componența mediilor de liofilizare și reactivare a tulpinii

În studiu au fost incluse două preparate cu potențial lioprotector obținute din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*: preparatul PSS_{Zn} (complex de polizaharide sulfatate ce conține zinc, care a fost aplicat în cantitate de 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 și 50,0% din componența mediului pentru liofilizare) și BioR (complex de aminoacizi și oligopeptide, în concentrație de 0,1; 1,0 și 10,0% din componența mediului). Agenții lioprotectori au fost adăugați la mediul protector de bază cu următoarea componență: gelatină – 2,5%, glucoză – 7,5%, (numit în continuare mediu Gel+Gl). În calitate de medii de rehidratare a culturii au fost utilizate diluțiile extractelor cianobacteriene cu concentrațiile substanței active de 0,001 – 5,0%.

Viabilitatea culturii a fost verificată imediat după liofilizare și peste un an de păstrare în condiții adecvate în stare liofilizată. Rehidratarea a fost făcută cu apă distilată și cu extracte cianobacteriene diluate. Rezultatele obținute au demonstrat, că utilizarea preparatelor BioR și PSS_{Zn} în concentrațiile indicate mai sus a dus la creșterea viabilității în comparație cu proba martor, dar și o viabilitate mai mare față de situația de înainte de liofilizare. Sporirea viabilității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare se explică prin faptul, că compușii de origine cianobacteriană, în calitate de activatori de creștere, contribuie la germinarea sporilor, care în condiții de cultivare standard nu germinează [18].

În figura 3.2 (A) drept exemplu sunt prezentate unele dintre rezultatele obținute la revitalizarea culturii imediat după liofilizare, unde preparatele cianobacteriene au fost utilizate ca componente ale mediilor de liofilizare. Aceste rezultate demonstrează, că preparatul BioR

asigură o sporire a viabilității față de proba martor cu $16,25 \pm 0,66 - 21,09 \pm 1,15\%$, iar preparatul PSS_{Zn} – cu $38,93 \pm 6,30\%$ în cazul concentrației PSS_{Zn} în mediu de 30,0%.

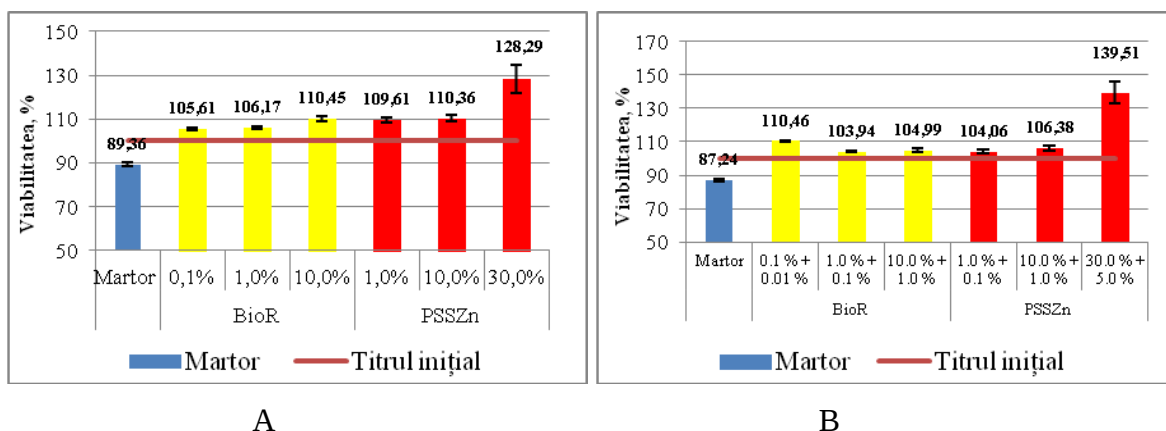


Fig. 3.2. Viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 în urma liofilizării, cu utilizarea mediului lioprotector Gel+Gl suplimentat cu principii de origine cianobacteriană și rehidratării cu apă distilată(A) și cu soluții diluate ale extractelor (B)

Aceleași preparate au fost testate și în calitate de soluții de rehidratare a culturilor liofilizate, fiind luate în diluții zecimale față de concentrațiile respective în mediile de liofilizare (Fig.3.2(B)). Figura 3.2 (A și B) include drept exemplu, rezultate comparative obținute la rehidratarea culturii de streptomicete cu apă distilată și cu extracte cianobacteriene diluate.

Deși preparatele naturale nu au avut un efect stimulator în calitate de rehidratant, viabilitatea culturii liofilizate în prezența lor rămâne cu $19,14 \pm 0,53 - 23,22 \pm 1,52\%$ mai înaltă față de proba martor, rehidratată cu apă distilată.

Același lucru se observă și la revitalizarea culturii după un an de păstrare. În figura 3.3. sunt prezentate unele dintre rezultatele comparative obținute la revitalizarea culturii de *S. canosus* CNMN-Ac-02 după un an de păstrare în stare liofilizată, unde în calitate de mediu de rehidratare s-a folosit apa distilată versus extracte cianobacteriene diluate. Viabilitatea culturii peste 1 an de păstrare în stare liofilizată în mediu cu BioR a scăzut cu cca. $2,0 \pm 0,23\%$ comparativ cu cea inițială și cu cca. $4,0 \pm 0,16 - 5,0 \pm 0,27\%$ în cazul utilizării extractului PSS_{Zn} (în concentrații de 1,0-10,0%), de 2 ori mai puțin decât la proba martor.

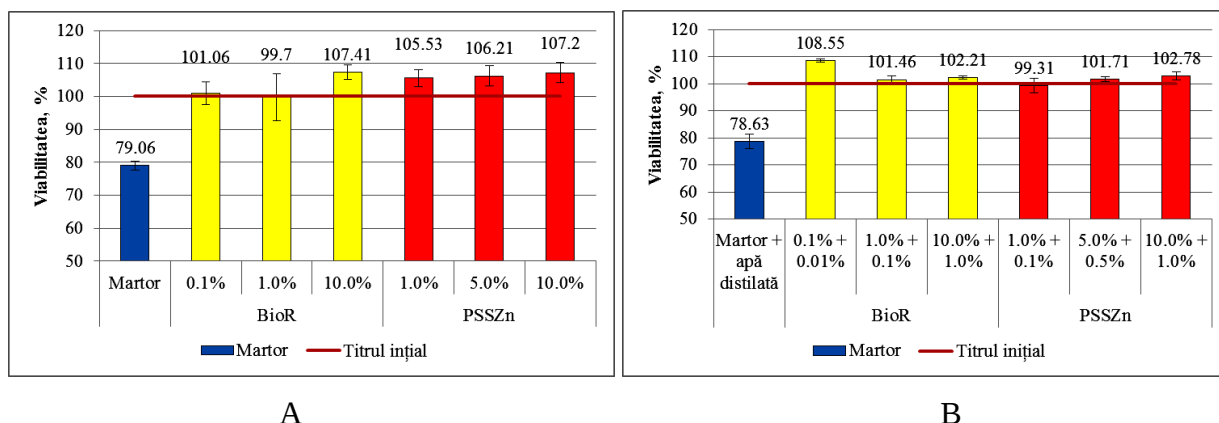


Fig.3.3. Viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după 1 an de păstrare în stare liofilizată în mediul lioprotector Gel+Gl suplimentat cu BioR și PSSZn, reactivată cu apă distilată (A) și cu soluții respective de extracte de origine cianobacteriană (B)

Cultura de *S. canosus* CNMN-Ac-02 care a fost liofilizată cu utilizarea mediului de protecție cu concentrația extractului PSSZn de 20,0; 30,0 și 50,0% a fost rehidratată în soluție de PSSZn de 5%. Rezultatele comparative cu rehidratarea în apă distilată pot fi văzute în figura 3.4.

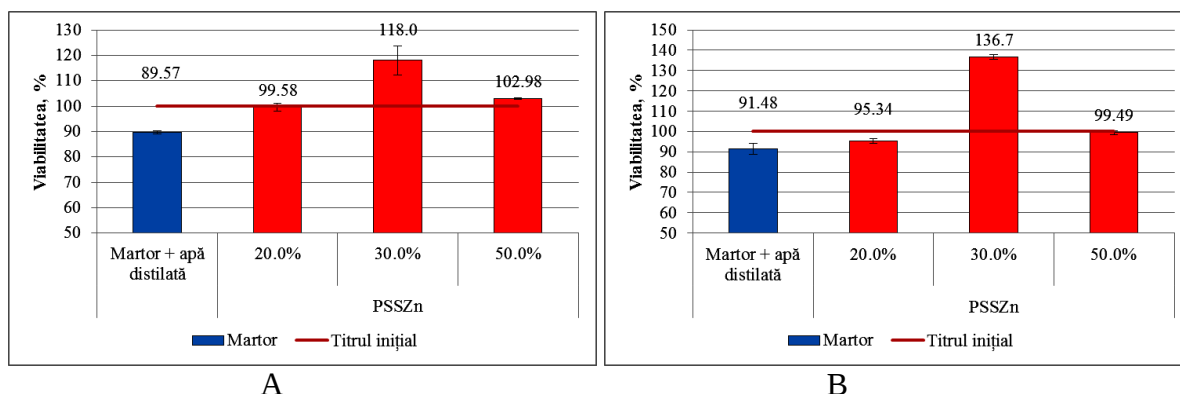


Fig. 3.4. Viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după 1 an de păstrare în stare liofilizată în mediul lioprotector Gel+Gl suplimentat cu PSSZn, reactivată cu apă distilată (A) și cu soluție de PSSZn 5,0% (B)

Cel mai bun rezultat a fost obținut în urma reactivării cu soluție de PSSZn de 5,0% a culturii de *S. canosus* CNMN-Ac-02 păstrate în stare liofilizată în mediul lioprotector suplimentat cu PSSZn în concentrație de 30,0%, viabilitatea culturii din proba experimentală depășind cu mai bine de 45,0±1,94% proba martor. Pe baza celor constatate mai sus, putem afirma că cel mai eficient supliment la mediul lioprotector Gel+Gl pentru păstrarea în stare liofilizată de durată a tulpinii este extractul cianobacterian PSSZn în concentrație de 30,0%, iar pentru reactivarea culturii după liofilizare cea mai potrivită este soluția PSSZn de 5,0%. Această

concluzie este susținută de cea mai înaltă rată a viabilității culturii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare – $139,51 \pm 1,23\%$ și după 1 an de păstrare în stare liofilizată – $136,7 \pm 1,94\%$, în ambele cazuri depășind cu cca 45,0% proba martor.

3.2. Acțiunea glicozidelor de origine vegetală asupra viabilității culturii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02, la utilizarea lor în componența mediilor de liofilizare și reactivare a tulpinii

Numeroase specii de plante - reprezentanți ai florei sălbatice, constituie o bogată sursă de substanțe biologic active, cum ar fi flavonoidele, glicozidele, alcaloizii, diterpenoizii, ș. a. Polifenolii proveniți din plante beneficiază de un interes considerabil datorită potențialelor proprietăți antioxidante și sunt testați pentru o gamă largă de acțiuni stimulatorie [16]. În cercetările noastre au fost utilizate extractele glicozidice vegetale: extractul LG (iridoide obținute din *Linaria genistifolia*) și extractul VP (flavonoide obținute din *Verbascum phlomoides*).

În figura 3.5. sunt prezentate rezultatele evaluării viabilității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 în urma liofilizării în mediul lioprotector Gel+Gl, suplimentat cu extractele LG și VP în diverse concentrații și rehidratării variantelor liofilizate cu apă distilată (A) și soluții de glicozide (B).

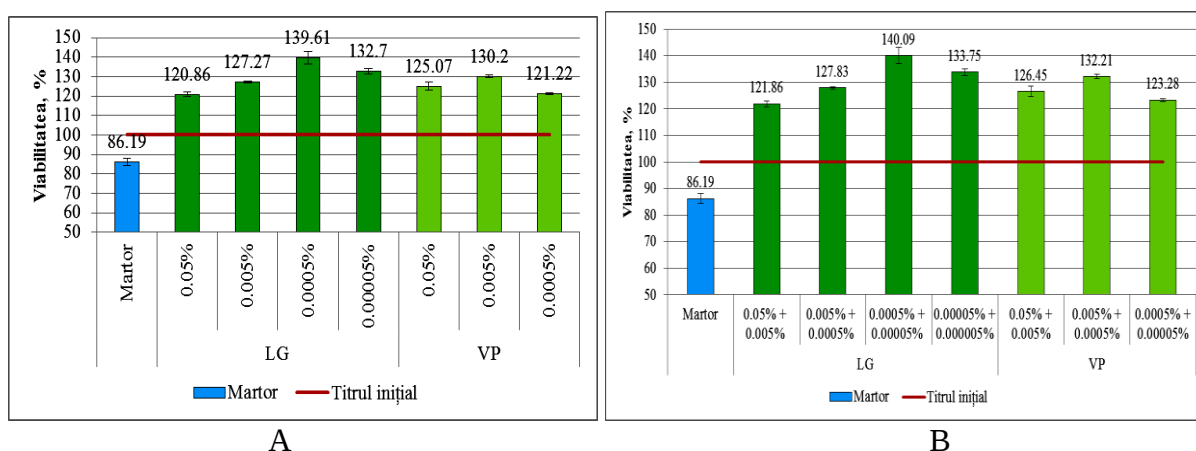


Fig. 3.5. Viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 imediat după liofilizare, cu utilizarea mediului lioprotector Gel+Gl suplimentat cu glicozide, la reactivare cu apă distilată (A) și cu soluții de glicozide (B)

La utilizarea în calitate de supliment la mediul lioprotector Gel+Gl a extractului LG din *Linaria genistifolia* în concentrații de 0,05 – 0,00005%, viabilitatea culturii după liofilizare a depășit cu $34,67 \pm 1,36$ – $53,42 \pm 4,11\%$ proba martor. Rezultatul maximal a fost obținut în urma utilizării acestui extract în concentrație de 0,0005%, viabilitatea culturii după liofilizare

constituind $139,61 \pm 3,17\%$. În general, toate variantele experimentale au prezentat rezultate mult mai înalte comparativ cu proba martor, viabilitatea fiind cuprinsă între $120,86 \pm 1,11 - 139,61 \pm 3,17\%$.

În mod similar au acționat și flavonoidele **VP**, tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02 supraviețuind mai bine, comparativ cu proba martor, după liofilizare pe mediul lioprotector suplimentat cu flavonoide în concentrație de 0,05 – 0,0005%, cu o viabilitate de $121,22 \pm 0,66 - 130,20 \pm 0,80\%$ (cu $35,03 \pm 1,54 - 44,01 \pm 1,92\%$ mai mare decât varianta de control). Valoarea maximală a viabilității de $130,20 \pm 0,80\%$ a fost obținută prin suplimentarea mediului lioprotector cu extract **VP** în concentrație de 0,005% [1]. Diferențele între variantele de rehidratare sunt nesemnificative.

Peste un an de păstrare a culturii în stare liofilizată au fost repetate aceleași teste. Rezultatele pot fi urmărite pe figura 3.6.

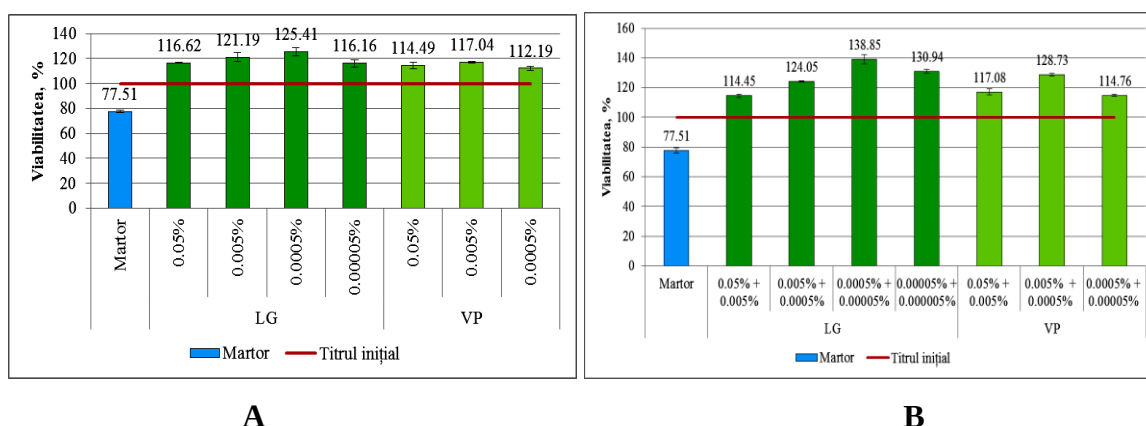


Fig. 3.6. Viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după 1 an de păstrare în stare liofilizată în mediul lioprotector Gel+Gl suplimentat cu glicozide, reactivat în apă distilată (A) și în medii cu extracte glicozidice (B)

Analiza rezultatelor prezentate în figura 3.6 (A și B) evidențiază acțiunea favorabilă a extractelor glicozidice în calitate de soluții de rehidratare a culturii de streptomicete după 1 an de păstrare. Astfel, la reactivarea culturii liofilizate cu extract **LG**, viabilitatea ei a depășit cu până la $13,44 \pm 3,11\%$ aceleași variante experimentale rehidratate cu apă distilată, și cu până la $11,69 \pm 0,61\%$ în cazul utilizării pentru reactivare a extractului **VP**. S-a observat, de asemenea, scăderea viabilității culturii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după 1 an de păstrare cu până la $12,0 \pm 0,95\%$ comparativ cu situația imediat după liofilizare.

Cu toate acestea, viabilitatea tulpinii de streptomicete este mai mare comparativ cu martorul peste 1 an de păstrare în stare liofilizată pe medii protectoare suplimentate cu glicozide

vegetale: cu $36,94 \pm 2,72$ – $61,34 \pm 3,50\%$ în cazul utilizării extractului **LG** și cu $37,25 \pm 2,68$ – $51,22 \pm 3,04\%$ în cazul utilizării extractului **VP**.

În baza rezultatelor de ansamblu, putem constata influența pozitivă a extractelor glicozidice obținute din *Linaria genistifolia* și *Verbasum phlomoides* asupra viabilității tulpinii *S.canosus* CNMN-Ac-02 la liofilizare și conservare pentru o perioadă îndelungată în colecțiile de microorganisme, iar utilizarea acestora în calitate de soluții de rehidratare în condițiile testate nu poate oferi beneficii suplimentare.

4. INFLUENȚA PREPARATELOR BIOLOGIC ACTIVE DE ORIGINE CIANOBACTERIANĂ ȘI VEGETALĂ ASUPRA CARACTERELOR MORFO-CULTURALE ALE TULPINII *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 ÎN PROCESUL LIOFILIZĂRII

Asigurarea stabilității culturii în procesul de păstrare prezintă interes atât pentru industrie cât și pentru cercetare. În procesul de adaptare a microorganismelor la factorii de stres se observă o heterogenitate sporită a populației bacteriene, determinată de specificul dezvoltării lor, genomul haploid de dimensiuni mici, ciclul scurt de dezvoltare [15]. Cu atât mai important este acest aspect în procesul de păstrare a actinomicetelor, ce se caracterizează printr-o variabilitate mult mai mare în comparație cu alte microorganisme [13].

4.1. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 până și după liofilizare în mediu lioprotector suplimentat cu substanțe biologic active de origine cianobacteriană

În urma cercetărilor au fost stabilite următoarele: culoarea miceliului aerian după liofilizare practic nu s-a schimbat, modificarea fiind observată doar la nivel de nuanță a culorii, spre exemplu acestea fiind albul sau alb-gri. Modificări mai importante au fost observate la toate variantele experimentale comparativ cu varianta martor, în ceea ce privește miceliul de substrat. Aceste schimbări au fost mai evidente în cazul utilizării extractului de polizaharide sulfatate. Apariția pigmentului solubil, care modifică culoarea mediului agarizat de cultivare Czapek în roz-pal a fost înregistrată la variantele liofilizate și reactivate în prezența extractului PSS_{Zn}.

În ceea ce privește particularitățile formei, marginii și profilului coloniilor caracteristice variantelor experimentale liofilizate și reactivate cu utilizarea preparatelor de origine cianobacteriană, modificări majore nu au fost înregistrate. După liofilizare caracteristicile morfologice enumerate nu au suferit schimbări.

4.2. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 până și după liofilizare în prezența substanțelor biologic active de origine vegetală

Studiul efectuat în capitolul precedent, a demonstrat eficacitatea utilizării glicozidelor vegetale din *Linaria genistifolia* și *Verbascum phlomoides* în calitate de lioprotectori și rehidratanti în procesul liofilizării și reactivării tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02, contribuind la păstrarea și sporirea viabilității culturii.

În continuarea acestor cercetări am decis să evaluăm acțiunea iridoidelor **LG** din *Linaria genistifolia* și flavonoidelor **VP** din *Verbascum phlomoides* asupra proprietăților morfo-culturale ale tulpinii de streptomicete în procesul liofilizării.

Modificările proprietăților morfo-culturale ale tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 sub influența preparatelor glicozidice, prin rehidratarea variantelor cu apă distilată. Rezultatele indică colonii de dimensiuni mai mari ale culturii din variantele experimentale față de varianta martor. Acest lucru se observă în particular la variantele cu utilizarea iridoidelor **LG** în concentrație de 0,0005% și flavonoidelor **VP** în concentrație de 0,005%. Culoarea miceliului aerian nu a fost influențată de prezența glicozidelor în mediul de liofilizare a streptomicetei, pe când miceliul de substrat a manifestat, în dependență tipul și concentrația extractului utilizat, o varietate de culori: gri, galben-verzui, samoa, cafeniu.

În continuare, au fost studiate proprietăților morfo-culturale ale tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după 1 an de păstrare în stare liofilizată. Tulpina a fost liofilizată în prezența glicozidelor **LG** și **VP**, iar pentru reactivare a servit apa distilată. Conform datelor analizate, putem observa că utilizarea glicozidelor vegetale din *Linaria genistifolia* și *Verbascum phlomoides* a influențat diametrul coloniilor tulpinii păstrate în stare liofilizată, cu cel mai evident rezultat înregistrat la aplicarea iridoidelor **LG** în concentrația de 0,0005% și a flavonoidelor de 0,005% **VP**.

Culoarea miceliul aerian atât la varianta martor, cât și la variantele experimentale nu a suferit schimbări esențiale, variind în dependență de compusul utilizat și concentrația acestuia de la albui până la alb-gri cu nuanțe de crem și alb de cretă. O schimbare mai evidentă a fost observată în ce privește culoarea miceliului de substrat a culturii studiate, cu nuanța gri-închis pentru varianta martor și cafeniu, galben-verzui și samoa la variantele experimentale. Este necesar de a menționa, că peste 1 an de păstrare, la tulpina studiată se menține proprietatea de a sintetiza pigmentul solubil care colorează mediul agarizat în culoarea roz-pal.

Forma coloniilor neregulată atât la martor, cât și la majoritatea variantelor experimentale a rămas neschimbată în urma procesului de liofilzare. Variații ale formei coloniilor au fost observate la utilizarea în componența mediului lioprotector a glicozidelor **VP**, unde în

dependență de concentrațiile aplicate, au fost observate forma cutată, neregulată și concentrică a coloniilor. Nu au fost depistate diferențe esențiale între varianta martor și variantele experimentale în ce privește profilul și marginile coloniilor studiate.

În continuarea cercetărilor la acest capitol, au fost studiate proprietăților morfo-culturale ale tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după 1 an păstrare în stare liofilizată și reactivare în prezența glicozidelor **LG** și **VP**.

Analiza datelor după 1 an de păstrare a tulpinii de streptomicete, demonstrează că caracterele sale fenotipice nu au suferit modificări radicale.

Tendința preparatelor glicozidice de a influența diametrul coloniilor se păstrează și la această etapă a cercetărilor. Astfel, coloniile de *Streptomyces* dezvoltate pe mediul agarizat Czapek după liofilizare în prezența glicozidelor au avut un diametru mult mai mare decât în cazul variantei martor. Nu au fost observate deosebiri majore între varianta martor și cele experimentale în ce privește culoarea miceliului aerian, gama de culori variind în diapazonul alb-gri – gri-albui – alb de cretă. La miceliul de substrat a fost observată culoarea gri-închis la varianta martor și culoare samoa sau gri-închis la variantele experimentale.

După 1 an de păstrare în stare liofilizată, tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02 dezvoltă capacitatea de a sintetiza pigmentul solubil care colorează mediul agarizat în culoarea roz-pal.

Aspectul coloniilor după 1 an de păstrare în stare liofilizată în condițiile acestui experiment nu s-a schimbat față de formele inițiale. La fel, și în raport cu martorul, nu sunt atestate deosebiri esențiale: forma circulară cu margini bombate și profilul ombilicat al coloniilor pentru toate variantele studiate, marginea coloniilor netedă sau ondulată. În calitate de indicator de adaptare a culturii la factorii de stres, poate fi atestată producerea pigmentului solubil roz-pal de către tulpina studiată. Rehidratarea culturii de streptomicete cu soluții apoase de glicozide vegetale accelerează cu 48 ore germinarea sporilor.

Astfel, menținerea morfologiei coloniilor specifice pentru tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02, asigurarea creșterii mai rapide și mai intense, manifestată prin mărimile coloniilor obținute în condițiile suspendării, liofilizării și reactivării culturii după 1 an de păstrare în prezența extractelor cianobacteriene și vegetale, indică asupra eficienței acestor preparate naturale în menținerea stabilității și activității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 în procesul de conservare.

5. ACȚIUNEA PREPARATELOR ASUPRA PRODUCTIVITĂȚII ȘI SINTEZEI LIPIDELOR LA *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02

Rolul lipidelor este foarte important în procesul de conservare a microorganismelor, care presupune implicarea lor în răspunsul la acțiunea factorilor de stres termic și hidric. Majoritatea

proceselor de deteriorare a celulelor în aceste condiții sunt bazate pe structurile membranelor celulare – cele mai sensibile componente structurale ale obiectelor biologice conservate. Starea și raportul fracțiilor lipidelor membranare sunt indici importanți în elucidarea mecanismelor de răspuns ale membranelor celulare la acțiunea factorilor de stres, precum și ale mecanismelor de interacțiune dintre componentele mediilor de liofilizare și lipidele membranare în vederea stabilizării membranelor celulare [17].

Componentele de bază ale membranelor biologice sunt fosfolipidele. Frațiile fosfolipidice ale actinobacteriilor pot avea organizare structurală diferită, în dependență de condițiile de temperatură și hidratare. Se presupune, că eficiența mediilor protectoare, utilizate în procesul de liofilizare a microorganismelor, este determinată de capacitatea lor de a menține echilibrul dintre diverse fracții lipidice, dintre lipide și proteine pentru a asigura stabilitatea membranelor în condiții de dehidratare sau temperaturi joase [20].

O importanță nu mai puțin semnificativă în procesul de păstrare a microorganismelor o au sterinele – fracție lipidică cu rol important în procesele biologice fundamentale, cum ar fi semnalarea transducției, reorganizarea citoscheletului, creșterea asimetrică etc. Aceste componente sunt considerate molecule-cheie în menținerea membranelor celulare într-o stare de fluiditate adecvată funcției. Rolul sterinelor în realizarea protecției celulei a fost demonstrată în cadrul numeroaselor studii, fiind elucidată acțiunea lor de sporire a coeziunii membranelor pentru a le menține într-o stare dinamică mai puțin sensibilă față de șocurile termice [3].

De rând cu conținutul adecvat al fracțiilor lipidice, producerea de biomasă este de asemenea un indicator important al prezenței ori lipsei stării de stres în cultura de actinomicete. Acest parametru are și o importanță biotehnologică mare, deoarece pe lângă lipide biomasă de *S. canosus* CNMN-Ac-02 conține diverse substanțe biologice active ca aminoacizii, enzimele, vitaminele din diverse grupuri și substanțe cu proprietăți antimicrobiene.

Ținând cont de specificul tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 în calitate de producător de lipide, dar și de importanța lipidelor în calitate de constituenți ai membranelor celulare, ne-am propus să studiem acțiunea preparatelor naturale utilizate în procesul liofilizării asupra productivității și componenței calitative și cantitative a lipidelor la cultura în studiu.

5.1. Evaluarea acțiunii preparatelor de origine cianobacteriană asupra productivității și sintezei lipidelor la *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02

Rezultatele studiului influenței preparatelor cianobacteriene asupra cantității de biomasă și conținutului de lipide totale a tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 sunt prezentate în figura 5.1 (A) și 5.1 (B), corespunzător. Datele indică o influență stimulatorie a preparatului BioR asupra

creșterii cantității de biomasă, variind în limitele $10,09 \pm 2,26 - 81,38 \pm 3,86\%$ ($5,93 \pm 0,04 - 9,77 \pm 0,29$ g/l) în comparație cu martorul, în care cantitatea de biomasă este de $5,38 \pm 0,23$ g/l. O stimulare maximă a productivității a fost înregistrată la BioR în concentrația de 20,0% în mediu, iar odată cu depășirea acestei concentrații optime, se observă tendința de scădere a efectului stimulator.

Studiul influenței preparatului de polizaharide sulfatate PSS_{Zn} asupra creșterii tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 a identificat o tendință de stimulare similară, dar un efect mai puțin pronunțat în comparație cu preparatul BioR. În acest caz a fost înregistrată o sporire a cantității de biomasă cu $12,75 \pm 1,52 - 63,91 \pm 4,07\%$ ($6,07 \pm 0,35 - 8,83 \pm 0,15$ g/l) în comparație cu martorul, efectul maximal fiind asigurat în acest caz de PSS_{Zn} în concentrația de 30,0%, cu tendința de scădere a efectului stimulator la mărirea ulterioară a concentrației preparatului.

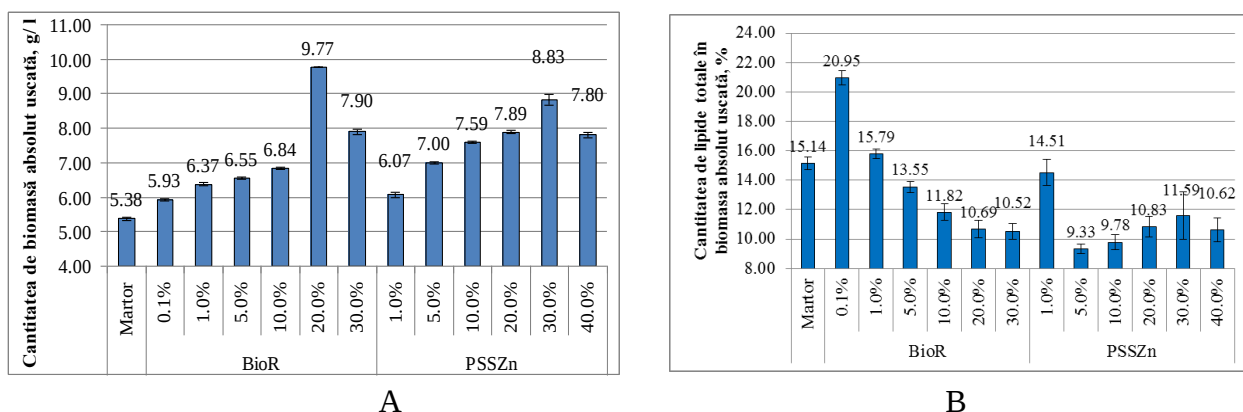


Fig. 5.1. Cantitatea de biomasă absolut uscată (A) și cantitatea de lipide totale în biomasă tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după cultivare pe mediul M-I suplimentat cu preparate de origine cianobacteriană

Analiza rezultatelor prezentate în figura 5.1 B. cu privire la lipidogeneza tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 sub influența principiilor BioR și PSS_{Zn} indică un efect predominant inhibitor asupra acumulării lipidelor totale în biomasă. Un efect pozitiv sesizabil – $138,36 \pm 0,49\%$ față de martor a fost stabilit numai la utilizarea preparatului BioR în concentrație de 0,1%. Cu toate acestea, producerea totală de lipide la un litru de mediu este la nivelul martorului, sau mai mare (cu până la $50,0 \pm 2,44\%$ în cazul utilizării preparatului BioR în concentrație de 0,1% la mediu). Efectul se datorează creșterii cantității totale de biomasă sub acțiunea preparatului.

Raportul cantitativ al fracțiilor lipidice obținute din biomasă *S. canosus* CNMN-Ac-02 de asemenea se modifică sub influența diferitor concentrații ale preparatelor BioR și PSS_{Zn}. În figura 5.2. sunt prezentate rezultatele obținute la utilizarea preparatului BioR. S-a constatat un efect pozitiv al preparatului BioR asupra ponderii fracției de fosfolipide. Cele mai bune rezultate

au fost înregistrate la utilizarea preparatului în concentrațiile de 0,1% și 1,0%, sporul pozitiv constituind $18,2 \pm 0,54\%$ și respectiv cu $25,39 \pm 0,07\%$ față de varianta martor. Cantitatea de sterine și trigliceride nu a fost modificată semnificativ la adăugarea preparatului BioR la mediul nutritiv.

Majorarea sintezei de fosfolipide a fost înregistrată și în cazul utilizării PSS_{Zn}. O stimulare maximală a sintezei fosfolipidelor a fost obținută în urma suplimentării mediului de cultivare M-I cu PSS_{Zn} 1,0% - cu circa $40,0 \pm 0,28\%$ față de martor. Spre deosebire de preparatul BioR, utilizarea preparatului PSS_{Zn} a favorizat sinteza fracției sterinice cu până la $17,0 \pm 0,28\%$ față de martor în cazul concentrației preparatului de 1,0%. În cazul trigliceridelor preparatul PSS_{Zn} a avut un efect stimulator la concentrațiile de 10 și 20% ale preparatului și un efect inhibitor la concentrațiile de 30 și 40% ale preparatului în mediu.

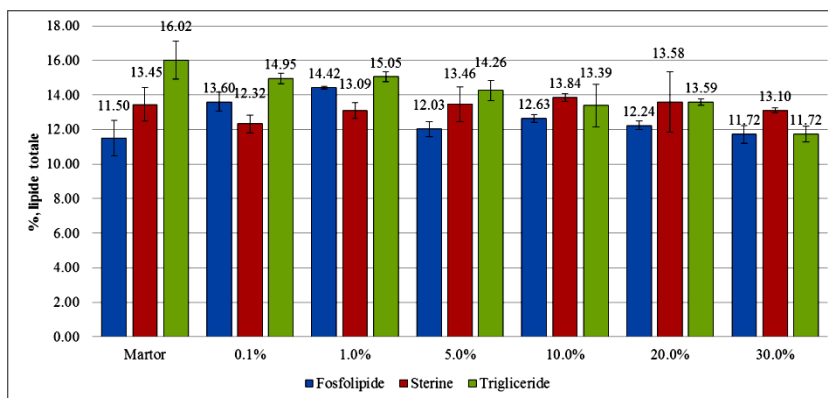


Fig. 5.2. Raportul cantitativ al fracțiilor lipidice principale în biomasa de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 sub influența preparatului BioR

Astfel, generalizând rezultatele din acest compartiment, putem spune, că variantele cu cel mai înalt nivel de acumulare a biomasei bacteriene (la concentrațiile de 10% BioR și 30% PSS_{Zn}) au dat cele mai bune rezultate de viabilitate a culturii după liofilizare. În același timp, rezultatele cu referire la lipidogeneză și la coraportul fracțiilor lipidice nu susțin rezultatele descrise în compartimentul 3.1.

5.2. Evaluarea acțiunii preparatelor de origine vegetală asupra productivității și sintezei lipidelor la *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02

La următoarea etapă a cercetărilor a fost studiată influența celor 2 extracte vegetale asupra acumulării de biomasă și conținutului de lipide la *S. canosus* CNMN-Ac-02. În tabelul 5.1. sunt prezentate rezultatele referitoare la capacitatea acumulării de biomasă și activitatea de lipidogeneză a tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 cultivată pe mediul lichid complex M-I suplimentat cu glicozide vegetale **LG** și **VP** în diferite concentrații.

Tabelul 5.2. Cantitatea de biomasă și conținutul de lipide totale la tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02 în urma cultivării pe mediul M-I suplimentat cu extracte glicozidice vegetale

Varianta	BAU, (g/l)	BAU, (% Martor)	Lipide totale, (% din BAU)	Lipide totale, (% Martor)
Martor (M-I)	8,15±0,50	100,00±0,05	6,40±0,27	100,00±0,05
M-I + glicozide LG 0,05%	10,94±0,60	134,17±4,49	3,81±0,35	59,52±3,37
M-I + glicozide LG 0,005%	7,05±0,59	86,44±4,63	4,89±0,47	76,36±7,92
M-I + glicozide LG 0,0005%	5,55±0,62	68,14±8,52	10,16±1,65	158,67±24,01
M-I + glicozide VP 0,05%	5,38±0,53	65,96±4,44	12,88±0,12	201,14±9,79
M-I + glicozide VP 0,005%	5,42±0,52	66,52±2,34	10,21±0,41	159,45±1,82
M-I + glicozide VP 0,0005%	7,64±0,50	93,74±3,35	11,38±0,68	177,78±4,79

Studiul procesului de lipidogeneză la tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02: preparatul **LG** în concentrație de 0,0005%/V, cantitatea de lipide constituind 158,67±24,01% față de martor; o acțiune stimulatorie și mai importantă a fost înregistrată la utilizarea flavonoidelor **VP** cu un randament al lipidogenezei de 159,45±1,82 – 201,14±9,79% față de martor și cea mai mare cantitate de lipide asigurată de preparatul **VP** în concentrația de 0,005% în mediul de cultură. Astfel, comparativ cu varianta martor cantitatea de lipide totale crește de peste 1,5-2,0 ori.

Conform rezultatelor prezentate în figura 5.3. raportul cantitativ al fracțiilor lipidice principale din biomasa *S. canosus* CNMN-Ac-02 au suportat modificări sub influența preparatului glicozidic **LG** și **VP**. Astfel, pentru varianta martor a fost înregistrat următorul raport: fosfolipide – 15,78±1,28%; sterine – 6,42±1,48%; trigliceride – 18,57±0,26% din lipide totale.

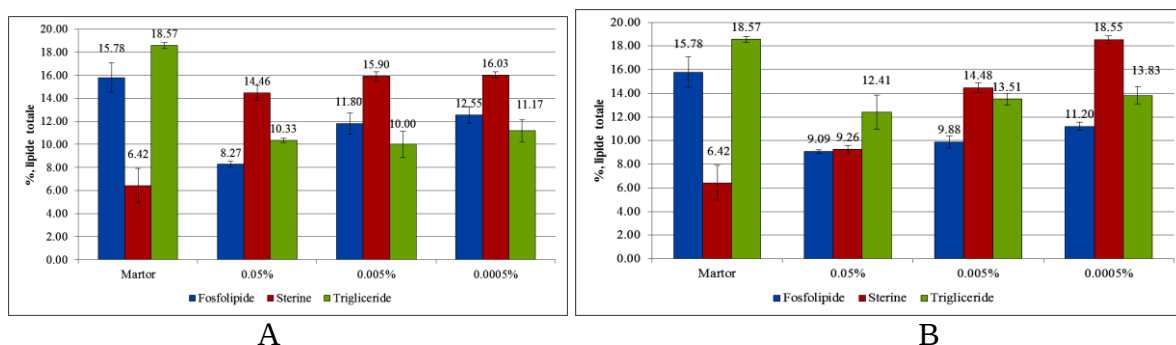


Fig. 5.3. Influența glicozidelor LG (A) și VP (B) asupra raportului cantitativ al fracțiilor principale de lipide la tulpina *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02

Analizând modificările conținutului fracției de fosfolipide în variantele experimentale cu utilizarea preparatului **LG**, se observă un conținut procentual redus al acestei fracții față de varianta martor. Aceeași situație se observă și pentru fracția trigliceridelor. Adăugarea în mediul de cultivare a glicozidelor **LG** are efect pozitiv asupra cantității de sterine din biomasa tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02. Acest efect este evident pentru toate concentrațiile preparatului, iar cea

mai mare cantitate de sterine – $16,03 \pm 0,26\%$ din lipide totale (cu cca. 1,5 ori mai mult comparativ cu martorul) este asigurată de suplimentarea mediului de cultivare M-I cu glicozide **LG** în concentrația 0,0005%. Astfel extractul glicozidic **LG** contribuie activ la sinteza sterinelor de către *S. canosus* CNMN-Ac-02, cantitatea acestei fracții majorându-se de 2,2-2,5 ori comparativ cu varianta martor.

Influența glicozidelor **VP** asupra fosfolipidelor, sterinelor și trigliceridelor (fig.5.3.B) este similară glicozidelor **LG**. Pornind de la o cantitate de fosfolipide în varianta martor de $15,78 \pm 1,28\%$ din lipide totale, observăm diminuarea acestei fracții cu circa $30,0 \pm 0,69$ – $38,0 \pm 0,23\%$ în prezența preparatului **VP** în concentrațiile studiate. Același efect inhibitor al preparatului **VP**, variind în limitele $26,0 \pm 0,36$ – $35,0 \pm 0,15\%$, se observă și în cazul trigliceridelor. Efectul pozitiv asupra sintezei sterinelor a fost constatat în toate variantele experimentale suplimentate cu glicozide **VP**. Cel mai puternic efect stimulator s-a manifestat la preparatul **VP** în concentrația de 0,0005%, cantitatea de sterine fiind de aproape 3 ori mai mare comparativ cu varianta martor.

Este necesar de remarcat faptul că glicozidele vegetale obținute din *Linaria genistifolia* și *Verbascum phlomoides* influențează în același mod raportul cantitativ al sterinelor la tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02. O cantitate înaltă de sterine în membrana celulară contribuie la o pregătire mai bună a celulelor de streptomicete de a rezista la factorii de stres pe parcursul liofilizării.

Cu toate acestea, comparând rezultatele descrise în acest compartiment, cu cele din compartimentul 3.2 devine clar, că nu există o corelare între acțiunea glicozidelor asupra cantității de biomasă și/sau coraportul fracțiilor lipidice cu viabilitatea culturii după liofilizare. Ca și în cazul extractelor cianobacterine, extractele glicozidice pot fi aplicate cu succes în biotehnologiile orientate spre obținerea produselor țintă din biomasa de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

1. Utilizarea extractelor cianobacteriene și vegetale în calitate de agenți lioprotectori, asigură o rată de supraviețuire sporită, cu cca. $40,0 \pm 6,30$ – $61,0 \pm 3,50\%$, a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 în procesul liofilizării, precum și o stabilitate morfologică a culturii, caracterizată de păstrarea caracterelor fenotipice după 1 an de conservare a tulpinii.

2. Utilizarea extractului de polizaharide sulfatate PSS_{Zn} în concentrație de 30,0% în componența mediului lioprotector Gelatină 2,5% + Glucoză 7,5% atestă cel mai bun efect lioprotector dintre toate extractele cianobacteriene testate.
3. Glicozidele vegetale obținute din *Linaria genistifolia* și *Verbascum phlomoides* au manifestat o acțiune lioprotectoare mai pronunțată comparativ cu extractele cianobacteriene, cel mai bun efect fiind înregistrat la suplimentarea mediului lioprotector Gelatină 2,5% + Glucoză 7,5% cu iridoide din *Linaria genistifolia* în concentrație de 0,0005%.
4. Preparatele naturale studiate s-au manifestat nu doar în calitate de agenți lioprotectori, ci și ca modulatori ai producerii de biomasă și lipide de către tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02 la cultivare submersă pe mediul complex lichid M-I.
5. Extractele cianobacteriene și glicozidele vegetale studiate pot fi aplicate cu succes în biotehnologiile orientate spre obținerea produselor țintă din biomasa de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02.

Problema științifică importantă soluționată în lucrare constă în elucidarea acțiunii preparatelor de origine cianobacteriană și vegetală în calitate agenți lioprotectori pentru liofilizarea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02, ceea ce a dus la evidențierea eficienței acestor preparate în menținerea viabilității și stabilității streptomicetei în procesul păstrării în stare liofilizată, fapt ce a permis perfecționarea metodelor de păstrare a culturii în cadrul Colecției Naționale de Microorganisme Neputogene.

Aportul personal. Rezultatele obținute și analiza acestora, generalizările și concluziile conform temei abordate aparțin integral autorului. În comun cu colegii Institutului de Microbiologie și Biotehnologie și Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecția Plantelor au fost obținute 4 brevete de invenție, astfel autorului îi revine cota parte în corespundere cu lista autorilor.

Recomandări practice

- Extractele cianobacteriene (BioR, PSS_{Zn}) și glicozidele vegetale (din *Linaria genistifolia* și *Verbascum phlomoides*) se recomandă în calitate de suplimente la mediul lioprotector Gelatină + Glucoză pentru liofilizarea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02, în vederea asigurării viabilității și stabilității culturii în procesul conservării. Eficacitatea acestor extracte este demonstrată de Brevetele de invenție MD 4473 (2016), MD 4474

(2016), MD 1226 (2017), MD 1235 (2017) „Mediu de protecție pentru conservarea și păstrarea îndelungată a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02”.

- Se recomandă utilizarea extractelor BioR și PSS_{Zn} obținute din cianobacteria *Spirulina platensis*; a glicozidelor vegetale obținute din *Linaria genistifolia* și *Verbascum phlomoides* în calitate de stimulatori ai producției de biomasă și reglatori ai raportului fracțiilor lipidice produse de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02.

Sugestii privind cercetări de perspectivă

- ✓ Extinderea cercetărilor asupra altor tulpini de streptomicete din cadrul CNMN și asupra noilor preparate naturale utilizate pentru liofilizarea lor.
- ✓ Aprofundarea cunoștințelor asupra mecanismelor posibile de acțiune a agenților lioprotectori asupra celulelor vii prin utilizarea metodelor biologiei moleculare de studiu a factorilor implicați în protecția față de factorii de stres.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. CHISELIȚA, O., BURȚEVA, S., BÎRSA, M., MAȘCENCO, N. *Mediu de protecție pentru conservarea și păstrarea îndelungată a tulpinii Streptomyces canosus CNMN-Ac-02*. Brevet de invenție MD 1226. Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM; Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al AȘM. Data depozit 29.06.2017. Publicat: 31.01.2018. In BOPI: 2018, nr. 1, p. 47-48.
2. CHISELIȚA, O., BURȚEVA, S., BÎRSA, M., VASILICIUC, A. Influence of various regimes of freezing on viability and variability of streptomycetes after lyophilization. In: *Life science in the dialogue of generations: „Connections between universities, academia and business community”*. Abstract book. 25 March 2016. Chișinău: Biotehdesign, 2016, p. 163. ISBN 978-9975-933-78-0.
3. DUFOURC, E.J. Sterols and membrane dynamics. In: *Journal of Chemical Biology*. 2008, nr. 1(1-4), pp. 63-77. ISSN 1864-6158.
4. HUBALECK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. In: *Criobiology*. 2003, nr. 46(3), pp. 205-229. ISSN 0011-2240.
5. MORGAN, C., VESEY, G. Freeze-Drying of Microorganisms. In: *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*. Oxford: Academic Press, 2009, pp. 162-173. ISBN 978-0-12-373939-1.

6. MUÑOZ-ROJAS, J., BERNAL, P., DUQUE, E., GODOY, P., SEGURA, A., RAMOS, J.-L. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. In: *Applied Environmental Microbiology*. 2006, nr. 72(1), pp. 472-477. ISSN 0099-2240.
7. PRAKASH, O., YOGESH, N., YOGESH, S.S. Practice and prospects of microbial preservation. In: *FEMS Microbiology Letters*. 2013, nr. 339(1), pp. 1-9. ISSN 1574-6968.
8. SHE, R.C., CATHY, A.P. Chapter 11: Procedures For the storage of microorganisms. In: *Manual of Clinical Microbiology*. 11th ed. USA: ASM Press, 2015, pp. 161-169. ISBN 978-1-55581-737-4.
9. БУРЦЕВА, С.А. *Биологически активные вещества стрептомицетов (Биосинтез, свойства, перспективы применения)*: автореф. дис. д-ра хабилитат биологических наук. Кишинев, 2002. 39 с.
10. БУРЦЕВА, С.А., БРАТУХИНА, А.А., БЫРСА, М.Н., АКИРИ, И., БЕРЕЗЮК, Ю.Н., ПОЙРАС Н.А. Стрептомицеты почвы центральной части Молдовы и их биологическая активность. В: *Всероссийский симпозиум с международным участием "Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов"*, Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, 24–27 декабря 2014. Москва: МАКС Пресс, 2014, с. 47. ISBN 978-5-317-04881-5.
11. ГОЛОВАЧ, Т.Н., ГРОМА, Л.И. Влияние криоконсервации и лиофилизации на синтез экзополисахарида и жизнеспособность *Xantomonas campestris* pv. *campestris* IMB В-7001. В: *Мікробіологічний журнал*. 2013, № 75(1), с. 14-20. ISSN 1028-0987.
12. ЗВЯГИНЦЕВ, Д.Г., ЗЕНОВА, Г.М., ЛОБАКОВА, Е.С., НИКОЛАЕВ, Г.М., ОМАРОВА, Е.О., ИВАНОВА, Е.А., САВЕЛЬЕВ, И.Б. Морфолого-физиологические изменения цианобактерии в экспериментальных цианобактериально-актиномицетных ассоциациях. В: *Микробиология*. 2010, № 79(3), с. 329-336. ISSN 0026-3656.
13. ЗЕНОВА, Г.М., ЗВЯГИНЦЕВ, Д.Г. *Разнообразие актиномицетов в наземных экосистемах*. Москва: МГУ, 2002. 135 с. ISBN 5-211-04632-3.
14. КИСЕЛИЦА, О., БУРЦЕВА, С., СЫРБУ, Т., СЛАНИНА, В., БАТЫР, Л., БЫРСА, М. Национальная Коллекция Непатогенных Микроорганизмов Института Микробиологии и Биотехнологии АН РМ и её задачи. В: *Всероссийский симпозиум с международным участием "Современные проблемы физиологии, экологии и*

- биотехнологии микроорганизмов", Москва, 24–27 декабря 2014. 2014, с. 118. ISBN 978-5-317-04881-5.*
15. МАГДАНОВА, Л.А., ГОЛЯСНАЯ, Н.В. Гетерогенность как адаптивное свойство бактериальной популяции. В: *Микробиология*. 2013, нр. 82(1), с. 3-13. ISSN 0026-3656.
 16. МАЩЕНКО, Н.Е., ОНИКА, Е.И., БОРОВСКАЯ, А.Д., ИВАНОВА, Р.А. Применение природных биорегуляторов для укоренения черенков облепихи крушиновидной. В: *Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. ВНИИССОК*. 2016, нр. 12, с. 433-436.
 17. СЫСОЕВА, М.А., ХАБИБРАХМАНОВА, В.Р., ГАМАЮРОВА, В.С., ТАЗЕЕВА, А.Х. Исследование золя водных извлечений чаги. XI. Липиды водного извлечения чаги. В: *Химия растительного сырья*. 2008, № 3, с. 119-122. ISSN 1029-5151.
 18. ФЕОФИЛОВА, Е.П., ИВАШЕЧКИН, А.А., АЛЁХИН, А.И., СЕРГЕЕВА, Я.Э. Споры грибов: покой, прорастание, химический состав и значение для биотехнологии (Обзор). В: *Прикладная биохимия и микробиология*. 2012, нр. 48(1), с. 5-17. ISSN 0555-1099.
 19. ФИЛИППОВА, С.Н., СУРГУЧЕВА, Н.А., ГАЛЬЧЕНКО, В.Ф. Многолетнее хранение коллекционных культур актинобактерий. В: *Микробиология*. 2012, № 81(5), с. 682-690. ISSN 0026-3656.
 20. ФИЛИППОВА, С.Н., СУРГУЧЕВА, Н.А., ЕРМАКОВА, Е.В., КИСЕЛЕВ, М.А., ТЕРЕХОВА, Л.П., СИНЕВА, О.Н., ГАЛАТЕНКО, О.А., ЗАБЕЛИН, А.В., ГАЛЬЧЕНКО, В.Ф. Изучение фазово-структурного состояния фосфолипидных фракций актинобактерий в связи с условиями их хранения. В: *Микробиология*. 2013, нр. 82(3), с. 335-343. ISSN 0026-3656.

LISTA PUBLICAȚIILOR LA TEMA TEZEI

2. Articole în diferite reviste științifice

2.1. în reviste din bazele de date Web of Science și SCOPUS

1. BURTSEVA, S., CHISELITSA, O., **BYRSA, M.**, CHISELITSA, N. Accumulation of biomass and synthesis of lipids by *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 cultivated on complex medium added with cyanobacterial polysaccharides. In: *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*. 2017, nr. 24(2), pp. 54-59. ISSN 1224-5119.
2. **BYRSA, M.** The influence of cyanobacterial extract of amino acids and oligopeptides on bio-parameters of *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 strain. In: *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*. 2017, nr. 24(2), pp. 48-53. ISSN 1224-5119.

2.2 în reviste din străinătate recunoscute

3. BOORTSEVA, S., **BYRSA, M.**, CHISELITSA, N., CHISELITSA, O. The viability, population, yield of biomass and lipids of *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 strain after freeze-drying. In: *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*. 2014, nr. 21(1), pp. 7-13. ISSN 1224-5119.

2.3 în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, cu indicarea categoriei

Categoria B

4. **BÎRSA, M.** Viabilitatea și caracterele morfo-culturale a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare în prezența extractului de origine cianobacteriană. In: *Buletinul AȘM „Științele vieții”*. 2017, nr. 331(1), pp. 132-141. ISSN 1857-064X.
5. CHISELIȚA, O., BURȚEVA S., **BÎRSA M.**, BULIMAGA V., VASILICIUC A. Viability and antimicrobial activity of streptomyces strains from NCNM after lyophilization. In: *Studia Universitatis Moldaviae, Seria Științe reale și ale naturii*. 2016, nr. 91(1), pp. 61-71. ISSN 1814-3237.

3. Articole în culegeri științifice

3.1. Culegeri de lucrări ale conferințelor internaționale (peste hotare)

6. БУРЦЕВА, С.А. **БЫРСА, М.Н.**, БЕРЕЗЮК, Ю.Н., ПОЙРАС, Н.А. Стрептомицеты почв Молдовы как потенциальные агенты биоконтроля фитопатогенных грибов. В: *Современная Микология в России – Том 5. Материалы III Международного Микологического Форума. 14-15 апреля 2015*. Москва: Нац. акад. микол., 2015, с. 25-27. ISBN 978-5-901578-22-3.
7. БУРЦЕВА, С.А., **БЫРСА, М.Н.**, РУДИК, В.Ф. Влияние цианобактерий на рост и липидообразование стрептомицетов. В: *Водоросли и цианобактерии в природных и сельскохозяйственных экосистемах. Материалы II Международной научно-*

практической конференции, посвященной 105-летию со дня рождения профессора Эмилии Адрияновны Штиной. 19-23 октября 2015. Киров: Вятская ГСХА, 2015, с. 65-70. ISBN 978-5-9906634-8-0.

8. БУРЦЕВА, С.А., СТАРЧУК, Н.В., МАНЧУ, А.И., **БЫРСА, М.Н.**, БЕРЕЗЮК, Ю.Н. Использование метаболитов коллекционных и выделенных из почвы Молдовы стрептомицетов в животноводстве и птицеводстве. In: *XIth international scientific-applied conference daRostim-2015. Theory, practice and perspectives of the application of biologically active compounds in agriculture. 17-19 June 2015.* Сыктывкар: Институт химии Коми НЦ УрО РАН, 2015, с. 33-35. ISBN 978-5-89606-541-8.

3.4. culegeri de lucrări ale conferențelor naționale (Republica Moldova)

9. **BÎRSA, M.**, BEREZIUC Y., MANCIU, A., VASILICIUC, A. Perspectiva utilizării substanțelor biologice active din streptomicete. In: *Conferința Științifică Internațională a Doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”. Ediția a V-a, 25 mai 2016.* Chișinău: UnAȘM, 2016, pp. 132-135.
10. **BÎRSA, M.**, BEREZIUC, Y., VASILICIUC, A., BURȚEVA, S. Utilizarea preparatelor de origine streptomicetă în ecologie, fitotehnie și zootehnie. In: *Conferința științifică națională cu participare internațională „Integrare prin cercetare și inovare”. Rezumate ale comunicărilor – Științe ale naturii și exacte. 28-29 septembrie 2016.* Chișinău: CEP USM, 2016, pp. 131-134. ISBN 978-9975-71-814-1.

4. Teze în culegeri științifice

4.1. în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare)

11. **BYRSA, M.**, VASILICIUC, A. Viability of streptomycetes freeze-dried on different cryoprotective media. In: *XII International Scientific Conference for students and PhD students „Youth and progress of biology”. 19-21 April 2016.* Lviv: Ivan Franko National University of Lviv, 2016, p. 258.
12. БУРЦЕВА, С.А., **БЫРСА, М.Н.**, КИСЕЛИЦА, О.А., РУДИК, В.Ф. Перспективы применения экстрактов водорослей при культивировании и консервации стрептомицетов. В: *5-й Всероссийский симпозиум с международным участием "Автотрофные микроорганизмы", Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова. Биологический факультет. 21–24 декабря, 2015.* Москва: МАКС Пресс, 2015, с. 31. ISBN 978-5-317-05141-9.
13. **БЫРСА, М.Н.** Влияние препаратов цианобактериальной природы на рост и липидообразование *Streptomyces canosus* CNMN-As-02. В: *21-я Международная*

пущинская школа-конференция молодых учёных «Биология – Наука XXI века», 18-22 апреля 2017. Пущино: 2017, с. 11. ISBN 978-5-9908139-1-5.

14. **БЫРСА, М.Н.** Выживаемость и антимикробные свойства стрептомицетов после лиофилизации с разными защитными средами. В: 20-я Международная пущинская школа-конференция молодых учёных «Биология – Наука XXI века», 18-22 апреля 2016. Пущино: 2016, с. 12. ISBN 978-5-9908139-0-8.
15. **БЫРСА, М.Н.** Выживаемость и состав популяции стрептомицетов после лиофилизации. В: 19-я Международная пущинская школа-конференция молодых учёных «Биология – Наука XXI века», 18-22 апреля 2015. Пущино: 2015, с. 166-167. ISBN 978-5-9906586-0-8.
16. **БЫРСА, М.Н.,** ВАСИЛЬЧУК, А.В. Морфокультуральные особенности стрептомицетов – продуцентов физиологически активных веществ при культивировании на синтетических, органических и комплексных средах. In: *Materials of IVth International scientific conference for students and young scientists „Fundamental and applied research in biology and ecology”, 12-14 April 2016.* Vinnytsia: DRUK, 2016, pp. 202-203. ISBN 978-966-8302-13-6.

4.2. în lucrările conferințelor științifice internaționale (Republica Moldova)

17. **BÎRSA, M.** Acțiunea compoziției mediului protector asupra modificării proprietăților culturale la streptomicete după liofilizare. In: *Conferința Științifică Internațională a Doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”. Ediția a IV-a, 10 martie 2015.* Chișinău: UnAȘM, 2015, p. 61. ISBN 978-9975-3036-4-4.
18. **BYRSA, M.,** VASILICIUC, A. Composition of the population and survival of streptomycetes after lyophilization at different temperature regimes. In: *3rd International Conference on Microbial Biotechnology, 12-13 October 2016.* Chișinău: Tipografia ”Artpoligraf”, 2016, p. 177. ISBN 978-9975-4432-8-9.
19. CHISELITA, O., **BYRSA, M.,** VASILICIUC, A., BURTSEVA, S. Lioprotective potential of cyanobacterial extracts. International scientific conference on microbial biotechnology. In: *3rd International Conference on Microbial Biotechnology, 12-13 October 2016.* Chișinău: Tipografia ”Artpoligraf”, 2016, p. 180. ISBN 978-9975-4432-8-9.

6. Brevete de invenții și alte obiecte de proprietate intelectuală, materiale la saloanele de invenții

20. **BÎRSA, M.**, BURȚEVA, S., CHISELIȚA, O., RUDIC, V. *Mediu de protecție pentru liofilizarea și păstrarea îndelungată a tulpinii Streptomyces canosus CNMN-Ac-02*. Brevet de invenție MD 4473. Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM. Data depozit 15.07.2016. Publicat: 31.03.2017. In BOPI. 2017, nr. 3, p. 30.
21. CHISELIȚA, O., BURȚEVA, S., **BÎRSA, M.**, MAȘCENCO, N. *Mediu de protecție pentru conservarea și păstrarea îndelungată a tulpinii Streptomyces canosus CNMN-Ac-02*. Brevet de invenție MD 1226. Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM; Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al AȘM. Data depozit 29.06.2017. Publicat: 31.01.2018. In BOPI. 2018, nr. 1, p. 47-48.
22. CHISELIȚA, O., BURȚEVA, S., **BÎRSA, M.**, MAȘCENCO, N. *Mediu de protecție pentru conservarea și păstrarea îndelungată a tulpinii Streptomyces canosus CNMN-Ac-02*. Brevet de invenție MD 1235. Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM; Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al AȘM. Data depozit 29.06.2017. Publicat: 28.02.2018. In BOPI. 2018, nr. 2, p. 58.
23. CHISELIȚA, O., BURȚEVA, S., **BÎRSA, M.**, RUDIC, V., BULIMAGA, V. *Mediu de protecție pentru liofilizarea și păstrarea îndelungată a tulpinii Streptomyces canosus CNMN-Ac-02*. Brevet de invenție MD 4474. Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM. Data depozit 15.07.2016. Publicat: 31.03.2017. In BOPI. 2017, nr. 3, p. 31.
24. CHISELITA, O., BURȚEVA, S., **BÎRSA, M.**, RUDIC, V. *Medii lioprotective pentru conservarea tulpinilor de streptomicete*. InfoInvent 2017. Diplomă – Medalia de aur. Catalog oficial. Expoziția internațională (Ediția a XV-a). p. 40. Chișinău, Republica Moldova.
25. CHISELITA, O., BURȚEVA, S., **BÎRSA, M.**, RUDIC, V. *Protective media for streptomyces strains for lyophilization and long-term storage*. EuroInvent 2017. Diploma of Gold Medal. Proceedings of The 9th Edition of EUROINVENT EUROPEAN EXHIBITION OF CREATIVITY AND INNOVATION. pp. 194-195. Iași, România. ISBN 978-606-775-212-0.

ADNOTARE

Bîrsa Maxim „Viabilitatea și variabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare în prezența compușilor de origine cianobacteriană și vegetală”, teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2019.

Teza constă din 130 pagini text de bază și conține introducere, cinci capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie cu 268 titluri, 51 figuri, 18 tabele și 12 anexe. Rezultatele obținute sunt publicate în 25 publicații științifice.

Cuvintele cheie: *Streptomyces canosus*, liofilizare, viabilitate, lioprotectori, variabilitate, preparate de origine cianobacteriană și vegetală, lipide.

Scopul lucrării: evaluarea influenței preparatelor biologice active de origine cianobacteriană și vegetală asupra viabilității și stabilității tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 în procesul liofilizării.

Obiectivele cercetării: 1) Evaluarea efectului lioprotector al substanțelor biologice active de origine cianobacteriană prin estimarea viabilității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare; 2) Estimarea efectului lioprotector al extractelor glicozidice vegetale prin estimarea viabilității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare; 3) Aprecierea acțiunii preparatelor cianobacteriene asupra caracterelor morfo-culturale ale *S. canosus* CNMN-Ac-02 în procesul liofilizării; 4) Evaluarea acțiunii preparatelor vegetale asupra caracterelor morfo-culturale ale *S. canosus* CNMN-Ac-02 în procesul liofilizării; 5) Evidențierea acțiunii agenților lioprotectori asupra productivității și lipidogenezei la *S. canosus* CNMN-Ac-02 în vederea elucidării răspunsului celular la acțiunea factorilor de stres.

Noutatea și originalitatea științifică: 1) Pentru prima dată a fost demonstrată eficiența extractelor biologice active de origine cianobacteriană și vegetală în calitate de lioprotectori și substanțe rehidratante la păstrarea de lungă durată a *S. canosus* CNMN-Ac-02; 2) Au fost elaborate și brevetate medii de protecție noi pentru liofilizarea eficientă și păstrarea durabilă a tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 cu utilizarea extractelor de origine cianobacteriană și vegetală; 3) În premieră a fost studiată influența extractelor de origine cianobacteriană și vegetală ca reglatori ai creșterii și lipidogenezei la tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02.

Rezultatul obținut, care contribuie la soluționarea unei probleme științifice importante constă în elucidarea acțiunii preparatelor de origine cianobacteriană și vegetală în calitate agenți lioprotectori pentru liofilizarea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02, ceea ce a dus la evidențierea eficienței acestor preparate în menținerea viabilității și stabilității streptomicetei în procesul păstrării în stare liofilizată, fapt ce a permis perfecționarea metodelor de păstrare a culturii în cadrul Colecției Naționale de Microorganisme Nepatogene.

Semnificația teoretică: a fost adusă o contribuție importantă la fundamentarea științifică și demonstrarea posibilității utilizării extractelor de origine cianobacteriană și vegetală atât în calitate de protectori la liofilizarea streptomicetelor, cât și stimulatori ai productivității și lipidogenezei la tulpina *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02.

Valoarea aplicativă a lucrării: au fost elaborate și brevetate 4 medii de protecție noi pentru liofilizarea și păstrarea durabilă a tulpinii studiate; au fost propuse medii nutritive noi pentru sporirea potențialului biosintetic și modelarea raportului fracțiilor lipidice la tulpina *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02.

Implementarea rezultatelor științifice: rezultatele obținute au fost implementate în cadrul Colecției Naționale de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie: Actele de implementare nr. 1, 2, 5 și 6 din 03.12.2018.

АННОТАЦИЯ

Бырса Максим „Выживаемость и вариабильность штамма *Streptomyces canosus* CNMN-Ас-02 после лиофилизации в присутствии веществ цианобактериальной и растительной природы”, диссертация доктора биологических наук, Кишинев, 2019.

Диссертация состоит из 130 страниц основного текста и содержит введение, пять глав, общие выводы и рекомендации, библиографию из 268 источников, 51 рисунок, 18 таблиц и 12 приложений. Результаты отражены в 25 научных публикациях.

Ключевые слова: *Streptomyces canosus*, лиофилизация, выживаемость, лиопротекторы, вариабильность, экстракты цианобактериального и растительного происхождения, липиды.

Цель работы: оценка влияния биологически активных препаратов цианобактериальной и растительной природы на выживаемость и стабильность штамма *Streptomyces canosus* CNMN-Ас-02 при лиофилизации.

Задачи исследования: 1) Оценка лиопротекторного действия биологически активных веществ цианобактериального происхождения путем определения жизнеспособности штамма *Streptomyces canosus* CNMN-Ас-02 после лиофилизации; 2) Определение лиопротекторного действия экстрактов растительных гликозидов путем определения жизнеспособности штамма *S. canosus* CNMN-Ас-02 после лиофилизации; 3) Оценка действия препаратов цианобактерий на морфокультуральные свойства *Streptomyces canosus* CNMN-Ас-02 при лиофилизации; 4) Оценка действия растительных препаратов на морфокультуральные свойства *Streptomyces canosus* CNMN-Ас-02 при лиофилизации; 5) Изучение действия лиопротекторных препаратов на продуктивность и синтез липидов у *Streptomyces canosus* CNMN-Ас-02;

Научная новизна и оригинальность: 1) Впервые была показана эффективность биологически активных цианобактериальных и растительных экстрактов в качестве лиопротекторов и регидратантов для длительного хранения *Streptomyces canosus* CNMN-Ас-02; 2) Разработаны и запатентованы новые защитные среды для успешной лиофилизации и длительного хранения штамма *Streptomyces canosus* CNMN-Ас-02 с использованием цианобактериальных и растительных экстрактов; 3) Впервые изучено влияние экстрактов цианобактериального и растительного происхождения как регуляторов роста и образования липидов штамма *Streptomyces canosus* CNMN-Ас-02.

Полученный результат, способствующий решению важной научной проблеме заключается в определении действия препаратов цианобактериального и растительного происхождения в качестве лиопротекторов при лиофилизации штамма *Streptomyces canosus* CNMN-Ас-02, что привело к выявлению эффективности этих препаратов в поддержании жизнеспособности и стабильности стрептомицетов в процессе лиофилизации и позволило улучшить методы хранения культуры в рамках Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов.

Теоретическое значение: внесен значительный вклад в научное обоснование возможности использования биологически активных веществ цианобактериального и растительного происхождения как в качестве протекторов при лиофилизации стрептомицетов, так и стимуляторов накопления биомассы и липидообразования штамма *Streptomyces canosus* CNMN-Ас-02.

Прикладная ценность работы: разработаны и запатентованы 4 новые защитные среды для лиофилизации и длительного хранения исследуемого штамма; предложены новые питательные среды для повышения биосинтетического потенциала и регулирования соотношения липидных фракций штамма *Streptomyces canosus* CNMN-Ас-02.

Внедрение научных результатов: полученные результаты внедрены в рамках Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов Института Микробиологии и Биотехнологии: Акты о внедрении №1, 2, 5 и 6 от 03.12.2018.

ANNOTATION

Bîrsa Maxim „Viability and variability of *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 strain after lyophilization in the presence of compounds of cyanobacterial and plant origin”, PhD thesis in biological sciences, Chisinau, 2019.

The thesis consists of 130 pages of basic text and contains an introduction, five chapters, general conclusions and recommendations, a bibliography with 268 titles, 51 figures, 18 tables and 12 annexes. The results are reflected in 25 scientific publications.

Key words: *Streptomyces canosus*, lyophilization, viability, lyoprotectors, variability, extracts of cyanobacterial and vegetal origin, lipids.

Purpose of the work: assessing the influence of biologically active preparations of cyanobacterial and vegetal origin on the viability and stability of *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 strain during lyophilization process.

Objectives of the research: 1) Assessment of the lioprotective effect of biologically active substances of cyanobacterial origin by estimating the viability of *S. canosus* CNMN-Ac-02 strain after lyophilization; 2) Evaluation of the lioprotective effect of vegetal glycoside extracts by estimating the viability of *S. canosus* CNMN-Ac-02 strain after lyophilization; 3) Evaluation of the action of cyanobacterial preparations on the morpho-cultural characteristics of *S. canosus* CNMN-Ac-02 during lyophilization process; 4) Evaluation of the action of vegetal preparations on the morpho-cultural characteristics of *S. canosus* CNMN-Ac-02 during lyophilization process; 5) Study of the action of lioprotectors on productivity and lipid synthesis at *S. canosus* CNMN-Ac-02;

Novelty and scientific originality: 1) For the first time, the effectiveness of biologically active extracts of cyanobacterial and vegetal origin as lioprotectors and rehydratants for the long-term preservation of *S. canosus* CNMN-Ac-02 has been demonstrated; 2) New protective media have been developed and patented for efficient lyophilization and sustainable preservation of *S. canosus* CNMN-Ac-02 strain using extracts of cyanobacterial and vegetal origin; 3) For the first time the influence of extracts of cyanobacterial and vegetal origin as regulators of growth and ratio of lipid fractions of *S. canosus* CNMN-Ac-02 was studied.

The result obtained, which contributes to the solution of an important scientific problem consists in elucidating the action of the preparations of cyanobacterial and vegetal origin as lyoprotectors for lyophilization of *S. canosus* CNMN-Ac-02 strain, which led to the highlighting of the effectiveness of these preparations in maintaining the viability and stability of streptomycetes in the freeze-drying process, which allowed the improvement of culture preservation methods within the National Collection of Nonpathogenic Microorganisms.

Theoretical significance: A significant contribution was made to the scientific basis of the possibility of using biologically active preparations obtained from cyanobacteria and plants both as protectors for lyophilization of streptomycetes and stimulators of *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 strain biomass production and lipidogenesis.

Applicative value of the work: 4 new protection media have been developed and patented for lyophilization and sustained storage of the studied strain; new nutrient culture media have been proposed to enhance the biosynthetic and adjusting the ratio of lipid fractions of *S. canosus* CNMN-Ac-02 strain.

Implementation of scientific results: the results obtained were implemented within the National Collection of Nonpathogenic Microorganisms of the Institute of Microbiology and Biotechnology: Acts of Implementation nr. 1, 2, 5 and 6 of 03.12.2018.

BÎRSA MAXIM

**VIABILITATEA ȘI VARIABILITATEA TULPINII
Streptomyces canosus CNMN-Ac-02 DUPĂ LIOFILIZARE ÎN PREZENȚA
COMPUȘILOR DE ORIGINE CIANOBACTERIANĂ ȘI VEGETALĂ**

163.04 – MICROBIOLOGIE

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

Aprobat spre tipar: 11.11.2019
Hârtie offset. Tipar offset.
Coli de tipar: 2,0 coli de autor

Formatul hârtiei 60x84 1/16
Tiraj 50 ex.
Comanda nr. 113/19
