

**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

Teză de doctor în științe biologice

Conducător științific:

BURȚEVA Svetlana, doctor habilitat în
științe biologice, profesor cercetător,
specialitatea 163.04 Microbiologie

Consultant științific:

RUDIC Valeriu, doctor habilitat în științe
biologice, profesor universitar, academician,
Om Emerit al Republicii Moldova,
specialitatea 167.01. Biotehnologie,
bionanotehnologie, 163.04 Microbiologie

Autor:

CHIȘINĂU, 2019

© Bîrsa, Maxim, 2019

CUPRINS

ADNOTARE.....	5
LISTA TABELELOR.....	8
LISTA FIGURILOR.....	10
LISTA ABREVIERILOR.....	14
INTRODUCERE.....	15
1. STREPTOMICETELE – OBIECTE BIOTEHNOLOGICE IMPORTANTE, CONSERVAREA ȘI PĂSTRAREA LOR.....	23
1.1. Substanțe biologic active sintetizate de streptomicete.....	23
1.2. Metode de păstrare a microorganismelor și eficiența lor.....	29
1.3. Medii protectoare și de rehidratare pentru liofilizarea microorganismelor și mecanismul acțiunii acestora.....	39
1.4. Concluzii la capitolul 1.....	47
2. OBIECTUL DE STUDIU ȘI METODELE APLICATE ÎN CERCETARE.....	48
2.1. Obiectul de studiu.....	48
2.2. Medii, condiții și preparate pentru cultivarea și păstrarea tulpinii.....	49
2.3. Metodele de cercetare.....	52
2.4. Concluzii la capitolul 2.....	57
3. INFLUENȚA PREPARATELOR DE ORIGINE CIANOBACTERIANĂ ȘI VEGETALĂ ASUPRA VIABILITĂȚII TULPINII <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 ÎN PROCESUL LIOFILIZĂRII.....	58
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.....	61
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.....	72
3.3. Concluzii la capitolul 3.....	77
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.....	78
4.1. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 până și după liofilizare în mediu lioprotector suplimentat cu substanțe biologic active de origine	

cianobacteriană.....	83
4.2. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 până și după liofilizare în prezența substanțelor biologic active de origine vegetală.....	100
4.3. Concluzii la capitolul 4.....	110
5. ACȚIUNEA PREPARATELOR ASUPRA PRODUCTIVITĂȚII ȘI SINTEZEI LIPIDELOR LA <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02.....	111
5.1. Evaluarea acțiunii preparatelor de origine cianobacteriană asupra productivității și sintezei lipidelor la <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02.....	113
5.2. Evaluarea acțiunii preparatelor de origine vegetală asupra productivității și sintezei lipidelor la <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02.....	121
5.3. Concluzii la capitolul 5.....	127
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI.....	128
BIBLIOGRAFIE.....	131
ANEXE.....	160
Anexa 1. Brevet de invenție MD 4473 din 15.07.2016.....	161
Anexa 2. Brevet de invenție MD 4474 din 15.07.2016.....	162
Anexa 3. Brevet de invenție MD 1226 din 29.06.2017.....	163
Anexa 4. Brevet de invenție MD 1235 din 29.06.2017.....	164
Anexa 5. Act de implementare a brevetului MD 4473, nr. 1 din 03.12.2018.....	165
Anexa 6. Act de implementare a brevetului MD 4474, nr. 2 din 03.12.2018.....	166
Anexa 7. Act de implementare a brevetului MD 1226, nr. 5 din 03.12.2018.....	167
Anexa 8. Act de implementare a brevetului MD 1235, nr. 6 din 03.12.2018.....	168
Anexa 9. Diplomă „Medalia de aur” Expoziția Europeană a Creativității și Inovării EUROINVENT, 2017.....	169
Anexa 10. Diplomă „Medalia de aur” Expoziția Internațională Specializată, INFOINVENT, 2017.....	170
Anexa 11. Diplomă „Medalia de aur” Salonul Internațional de Cercetare, Inovare și Transfer Tehnologic, INVENTICA, 2018.....	171
Anexa 12. Diplomă „Medalia de aur” Târgul Internațional de Invenții și Idei Practice, INVENT – INVEST, 2018.....	172
Declarația privind asumarea răspunderii.....	173
CV-ul candidatului.....	174

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.

LISTA TABELELOR

Tabelul 4.1. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL și DL în prezența preparatelor de origine cianobacteriană, rehidratată cu apă distilată.....	84
Tabelul 4.2. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL și DL și reactivare în prezența extractelor de origine cianobacteriană.....	86
Tabelul 4.3. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL și DL și rehidratate în prezența compușilor de origine cianobacteriană (stabilirea limitelor efectului pozitiv).....	88
Tabelul 4.4. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL și DL în prezența concentrațiilor sporite ale preparatului PSS _{Zn} , rehidratată cu apă distilată.....	89
Tabelul 4.5. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL și DL și rehidratate în prezența extractului PSS _{Zn}	91
Tabelul 4.6. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02, PL și după 1 an de păstrare în stare liofilizată în prezența compușilor de origine cianobacteriană, rehidratată cu apă distilată.....	92
Tabelul 4.7. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL și după 1 an de păstrare în stare liofilizată, rehidratate în prezența compușilor de origine cianobacteriană.....	94
Tabelul 4.8. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL și după 1 an de păstrare în stare liofilizată și rehidratate în prezența compușilor de origine cianobacteriană, în cadrul stabilirii limitelor efectului pozitiv...	96
Tabelul 4.9. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 pe mediul agarizat Czapek, PL și după 1 an de păstrare în stare liofilizată în prezența PSS _{Zn} , rehidratate cu apă distilată.....	97
Tabelul 4.10. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 pe mediul Czapek, PL și după 1 an de păstrare în stare liofilizată și rehidratate în prezența polizaharidelor sulfatate cu zinc.....	99
Tabelul 4.11. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 pe mediul Czapek, PL și DL în prezența glicozidelor de origine vegetală, la rehidratare cu apă distilată.....	101

Tabelul 4.12. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 pe mediul Czapek, PL și DL și rehidratate în prezența glicozidelor de origine vegetală.....	103
Tabelul 4.13. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 pe mediul Czapek, PL și după 1 an de păstrare în stare liofilizată în prezența glicozidelor de origine vegetală.....	105
Tabelul 4.14. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL și după 1 an de păstrare în stare liofilizată și rehidratate în prezența glicozidelor de origine vegetală.....	108
Tabelul 5.1. Numărul de UFC ml ⁻¹ a tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 în urma cultivării pe mediul M-I suplimentat cu principii de origine cianobacteriană.....	114
Tabelul 5.2. Cantitatea de biomasă și conținutul de lipide totale ale tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 la cultivare pe mediul M-I suplimentat cu preparate de origine cianobacteriană.....	115
Tabelul 5.3. Numărul UFC ml ⁻¹ a tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 în urma cultivării pe mediul M-I suplimentat cu extracte de origine vegetală.....	121
Tabelul 5.4. Cantitatea de biomasă și conținutul de lipide totale la tulpina <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 în urma cultivării pe mediul M-I suplimentat cu extracte glicozidice vegetale..	122

LISTA FIGURILOR

Fig. 1.1. Activitatea antifungică a <i>Streptomyces canosus</i> față de <i>Alternaria alternata</i> (A) și <i>Aspergillus niger</i> (B).....	25
Fig. 2.1. Aspectul coloniilor tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02.....	48
Fig. 2.2. Componenta mediilor de cultură utilizate în studiul tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02.....	50
Fig. 2.3. <i>Linaria genistifolia</i> L. Mill.....	51
Fig. 2.4. <i>Verbascum phlomoides</i> L.....	51
Fig. 2.5. Cianobacteria <i>Spirulina platensis</i> CNM-CB-02.....	52
Fig. 2.6. Prepararea diluțiilor succesive pentru însămânțarea pe medii de cultură solide.....	53
Fig. 2.7. Etapele respectate în procesul de liofilizare și reactivare a tulpinilor de streptomicete..	56
Fig. 3.1. Schema de realizare a experiențelor în vederea evidențierii acțiunii preparatelor de origine cianobacteriană și vegetală asupra viabilității tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 la liofilizare.....	60
Fig. 3.2. Viabilitatea tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 în urma liofilizării, cu utilizarea mediului lioprotector Gel+Gl suplimentat cu principii de origine cianobacteriană și rehidratării cu apă distilată.....	62
Fig. 3.3. Viabilitatea tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 sub influența extractelor de origine cianobacteriană, utilizate în componența mediilor de liofilizare și rehidratare.....	62
Fig. 3.4. Viabilitatea tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02, la utilizarea concentrațiilor optime ale preparatelor de origine cianobacteriană în componența mediului de liofilizare și a soluției de rehidratare a culturii liofilizate.....	64
Fig. 3.5. Viabilitatea tulpinii liofilizate de <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 în dependență de concentrația extractului PSS _{Zn} în componența mediului de protecție, la rehidratarea tulpinii cu apă distilată.....	65
Fig. 3.6. Viabilitatea tulpinii liofilizate de <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 în dependență de concentrația extractului PSS _{Zn} în componența mediului de protecție, la rehidratarea tulpinii cu soluție 5,0% PSS _{Zn}	66
Fig. 3.7. Viabilitatea tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 după un an de păstrare în stare liofilizată în mediul lioprotector Gel+Gl suplimentat cu extracte de origine cianobacteriană, reactivată cu apă distilată.....	67

Fig. 3.8. Viabilitatea tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 după 1 an de păstrare în stare liofilizată în mediul lioprotector Gel+Gl suplimentat cu BioR și PSS _{Zn} , reactivată cu soluții respective de extracte de origine cianobacteriană.....	69
Fig. 3.9. Viabilitatea tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 după 1 an de păstrare în stare liofilizată în mediul lioprotector Gel+Gl suplimentat cu PSS _{Zn} în concentrații sporite, reactivată cu apă distilată.....	70
Fig. 3.10. Viabilitatea tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 după 1 an de păstrare în stare liofilizată în mediul lioprotector Gel+Gl suplimentat cu PSS _{Zn} în concentrații sporite, reactivată cu soluție de PSS _{Zn} 5,0 %	71
Fig. 3.11. Viabilitatea tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 în urma liofilizării, cu utilizarea mediului lioprotector Gel+Gl suplimentat cu glicozide, la reactivare cu apă distilată..	72
Fig. 3.12. Viabilitatea tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 în urma liofilizării și reactivării în medii cu extracte glicozidice.....	74
Fig. 3.13. Viabilitatea tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 după 1 an de păstrare în stare liofilizată în mediul lioprotector Gel+Gl suplimentat cu glicozide, reactivată cu apă distilată ...	75
Fig. 3.14. Viabilitatea tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 după 1 an de păstrare în stare liofilizată în mediul lioprotector Gel+Gl suplimentat cu glicozide, reactivat în medii cu extracte glicozidice.....	76
Fig. 4.1. Reprezentarea schematică a celor două tipuri de miceliu caracteristic actinobacteriilor.....	78
Fig. 4.2. Reprezentarea schematică a ciclului vital al actinomicetelor.....	79
Fig. 4.3. Exemple de pigmenții produși de streptomicete.....	80
Fig. 4.4. Etapele studiului stabilității morfologice a tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 la păstrare în stare liofilizată.....	82
Fig. 4.5. Aspectul coloniilor de <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL (martor) și DL (probe experimentale) în prezența compușilor de origine cianobacteriană.....	83
Fig. 4.6. Aspectul coloniilor de <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL (martor) și DL (probe experimentale) și reactivare în prezența extractelor de origine cianobacteriană.....	87
Fig. 4.7. Aspectul coloniilor de <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL (martor) și DL (probe experimentale) și reactivare în prezența extractelor de origine cianobacteriană, în cadrul stabilirii limitelor efectului lor pozitiv.....	88

Fig. 4.8. Aspectul coloniilor de <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL (martor) și DL (probe experimentale) în prezența polizaharidelor sulfatate cu zinc, rehidratată cu apă distilată	90
Fig. 4.9. Coloniile tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL (martor) și DL (probe experimentale) în prezența polizaharidelor sulfatate cu zinc, rehidratate cu soluții de principii utilizate.....	91
Fig. 4.10. Aspectul coloniilor de <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL (martor) și după 1 an de păstrare în stare liofilizată (probe experimentale) în prezența compușilor de origine cianobacteriană, la rehidratare cu apă distilată.....	93
Fig. 4.11. Coloniile tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL (martor) și după 1 an de păstrare în stare liofilizată (probele experimentale) în prezența compușilor de origine cianobacteriană, rehidratat cu soluții de principii utilizate.....	95
Fig. 4.12. Coloniile tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL (martor) și după 1 an de păstrare în stare liofilizată (probele experimentale) și rehidratate în prezența compușilor de origine cianobacteriană, în cadrul stabilirii limitelor efectului pozitiv...	96
Fig. 4.13. Aspectul coloniilor de <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 pe mediul Czapek, PL (martor) și după 1 an de păstrare în stare liofilizată (probele experimentale) în prezența polizaharidelor sulfatate cu zinc, la rehidratare cu apă distilată.....	98
Fig. 4.14. Aspectul coloniilor tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 pe mediul Czapek, PL (martor) și după 1 an de păstrare în stare liofilizată (probele experimentale) și rehidratare în prezența polizaharidelor sulfatate cu zinc.....	99
Fig. 4.15. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 pe mediul Czapek, PL (martor) și DL (probele experimentale) în prezența glicozidelor de origine vegetală, la rehidratare cu apă distilată.....	102
Fig. 4.16. Aspectul coloniilor de <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 pe mediul Czapek, PL (martor) și DL (probele experimentale) și rehidratate în prezența glicozidelor de origine vegetală.....	104
Fig. 4.17. Aspectul coloniilor de <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 pe mediul Czapek, PL (martor) și după 1 an de păstrare în stare liofilizată (probele experimentale) în prezența glicozidelor de origine vegetală, la rehidratare cu apă distilată.....	106
Fig. 4.18. Aspectul coloniilor la <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 pe mediul Czapek, PL (martor) și după 1 an de păstrare în stare liofilizată (probele experimentale) și rehidratate în prezența glicozidelor de origine vegetală.....	109

Fig. 5.1. Etapele de realizare a studului de evidențiere a efectului preparatelor naturale asupra dezvoltării și activității biosintetice a tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02.....	113
Fig. 5.2. Cantitatea de lipide totale obținute la 1 litru mediu de cultivare a <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 în prezența preparatelor cianobacteriene.....	116
Fig. 5.3. Raportul cantitativ al fracțiilor lipidice principale în biomasa de <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 sub influența preparatului BioR.....	117
Fig. 5.4. Raportul cantitativ al fracțiilor lipidice principale în biomasa de <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 sub influența preparatului PSS _{Zn}	118
Fig. 5.5. Raportul cantitativ al fracțiilor lipidice secundare în biomasa de <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 în urma cultivării pe mediul M-I suplimentat cu BioR	119
Fig. 5.6. Raportul cantitativ al fracțiilor lipidice secundare în biomasa de <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02 în urma cultivării pe mediul M-I suplimentat cu PSS _{Zn}	119
Fig. 5.7. Acțiunea extractelor vegetale asupra cantității totale de lipide (g/l) în biomasa de <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02.....	123
Fig. 5.8. Influența glicozidelor LG asupra raportului cantitativ al fracțiilor principale de lipide la tulpina <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02	123
Fig. 5.9. Influența glicozidelor LG asupra raportului cantitativ al fracțiilor secundare de lipide la tulpina <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02.....	124
Fig. 5.10. Influența glicozidelor VP asupra raportului cantitativ al fracțiilor principale de lipide la tulpina <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02.....	125
Fig. 5.11. Influența glicozidelor VP asupra raportului cantitativ al fracțiilor secundare de lipide la tulpina <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02	126

LISTA ABREVIERILOR

BAU – biomasa absolut uscată

DL – după liofilizare

Gel+Gl – mediul lioprotector gelatină 2,5% + glucoză 7,5%

LG – glicozide de *Linaria genistifolia* L. Mill.

PL – până la liofilizare

PSS_{Zn} – polizaharide sulfatate cu zinc

UFC – unități formatoare de colonii

VP – glicozide de *Verbascum phlomoides* L.

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța temei abordate. Păstrarea durabilă a culturilor de microorganisme reprezintă un factor important pentru utilizarea lor atât calitate de obiect al 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 [44, 69, 135, 136, 154, 158, 207, 215, 216, 219, 232, 233, 260].

Astfel, 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 [131].

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 metodă optimală pentru cele mai diverse grupuri de microorganisme [42]. Pe parcursul liofilizării, microorganismele sunt expuse la o serie de factori stresanți (temperaturi joase și uscare în vid), care duc la moartea celulelor. O altă cauză a pieirii microorganismelor este stresul oxidativ, în rezultatul căruia se formează speciile reactive de oxigen, care au un efect negativ asupra celulelor [93, 111, 261].

Astfel, optimizarea parametrilor de liofilizare și selectarea mediilor de protecție și regenerare eficiente ocupă un loc important în procesul menținerii durabile a colecțiilor de microorganisme [87, 215]. O gamă largă de substanțe de diferită origine, cu proprietăți antioxidante (acid ascorbic, ascorbatperoxidaza) și crioprotectoare (mono-, di-, oligo- și polizaharide, glutamat de natriu, tiosulfat de natriu, aminoacizi ca prolin și pepton, glicerină, xantan, maltodextrin, manitol, polivinilpirolidon, etilenglicol) sunt testate în procesul de conservare a microorganismelor cu scopul evidențierii acțiunii protectoare și stabilizatoare asupra populațiilor [32, 134, 156, 199, 259].

Indicii de bază pentru aprecierea 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, care se caracterizează prin instabilitate genetică înaltă, în comparație cu alte microorganisme [46, 54, 119, 265, 267].

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, antifungală, 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* [72, 95, 97, 184, 185, 198, 212]. 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, 12, 65, 76, 109, 182].

În procesul de studiere a streptomicetelor, cercetătorii au identificat următoarele particularități: eterogenitatea naturală a populațiilor de streptomicete favorizează modificarea caracteristicilor fiziologice și biochimice în procesul liofilizării, fapt ce se exprimă prin reducerea activității biosintetice a tulpinilor [22, 230, 265].

O altă concluzie a numeroaselor cercetări este că, în vederea selectării corecte a metodei de conservare și a mediilor de protecție eficiente, este nevoie de o abordare individuală, care ar asigura rezultate maxime pentru fiecare tulpină microbiană în parte [87, 111, 250, 265].

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 [211, 213].

Scopul tezei de doctor a constatat 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:

- ✓ Evaluarea efectului lioprotector al substanțelor biologic active de origine cianobacteriană prin estimarea viabilității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare;
- ✓ Estimarea efectului lioprotector al extractelor glicozidice vegetale prin estimarea viabilității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare;

- ✓ Aprecierea acțiunii preparatelor cianobacteriene asupra caracterelor morfo-culturale ale *S. canosus* CNMN-Ac-02 în procesul liofilizării;
- ✓ Evaluarea acțiunii preparatelor vegetale asupra caracterelor morfo-culturale ale *S. canosus* CNMN-Ac-02 în procesul liofilizării;
- ✓ 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 ipotezei 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.

Sumarul capitolelor tezei:

Capitolul 1. „STREPTOMICETELE – OBIECTE BIOTEHNOLOGICE IMPORTANTE, CONSERVAREA ȘI PĂSTRAREA LOR” include analiza realizărilor științifice în domeniul studiului streptomicetelor – un grup abil și divers de microorganisme, care pe parcursul ciclului său 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 antifungală, 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 Nepatogene.

Cea de-a treia parte a capitolului 1 este dedicată studiului bibliografic cu referire la mediile protectoare și de rehidratare utilizate în procesul de liofilizare a microorganismelor și mecanismului acțiunii 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 optime 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 acestora, 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.

Capitolul 2. „OBIECTUL DE STUDIU ȘI METODELE APLICATE ÎN CERCETARE” conține 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 Nepatogene a IMB, în calitate de producător valoros de metaboliți secundari, cu atribuirea cifrului *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02. Pentru cultivarea tulpinii, în dependență de etapele și scopul experiențelor efectuate, au fost utilizate următoarele medii nutritive: mediul Dulaney (pentru obținerea inoculului), mediul M-I (pentru acumularea biomasei), mediul Czapek (pentru determinarea caracterelor morfologice), mediul cu ovăz (pentru păstrarea îndelungată pe medii solide).

În calitate de agenți de lioprotecție au fost utilizate extracte glicozidice vegetale, 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 flavonoide 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 cu următoarea componență: gelatină – 2,5%, glucoză – 7,5%, selectat în urma unui screening al mediilor uzuale.

Pentru realizarea cercetărilor au fost utilizate metode de determinare cantitativă a germenilor viabili (metoda calculului logaritmic) 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 standart, coeficientului de variație și statisticii inferențiale: testele de valabilitate și testele de semnificație).

Capitolul 3. „INFLUENȚA PREPARATELOR DE ORIGINE CIANOBACTERIANĂ ȘI VEGETALĂ ASUPRA VIABILITĂȚII TULPINII *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 ÎN PROCESUL LIOFILIZĂRII” reflectă rezultatele cercetărilor de evidențiere a acțiunii preparatelor de origine cianobacteriană și vegetală asupra viabilității culturii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02, la utilizarea lor în componența mediilor de liofilizare și reactivare a tulpinii. Preparatele BioR și PSS_{Zn}, precum și glicozidele vegetale au fost utilizate în calitate de agenți de lioprotecție în componența mediului de liofilizare, cât și în calitate de soluții de rehidratare a culturii după liofilizare. Viabilitatea culturii a fost evaluată îndată după liofilizare și după 1 an de păstrare a tulpinii în condiții de colecție.

În rezultatul cercetărilor s-a constatat, că utilizarea extractelor cianobacteriene și vegetale în calitate de agenți lioprotectori, asigură o rată de supraviețuire sporită a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 în procesul liofilizării, precum și o acțiune stimulatorie a extractelor naturale asupra germinării sporilor streptomicetei, care se aflau în stare de latență.

În cadrul acestor cercetări au fost determinate concentrațiile optime ale preparatelor testate, precum și concentrațiile minime cu efect pozitiv. În ce privește preparatele cianobacteriene, efectul maxim a fost asigurat de concentrațiile de 0,1% BioR și 30% PSS_{Zn}.

Glicozidele vegetale obținute din *Linaria genistifolia* și *Verbascum phlomoides* au manifestat o acțiune lioprotectoare mai pronunțată comparativ cu extractele de origine cianobacteriană. Cel mai bun efect lioprotector al extractelor vegetale a fost înregistrat la suplimentarea mediului lioprotector gelatină 2,5% + glucoză 7,5% cu iridoide din *Linaria genistifolia* în concentrație de 0,0005%.

Utilizarea extractelor cianobacteriene și vegetale în calitate de soluții de reactivare a culturii după păstrare în stare liofilizată a stimulat nesemnificativ viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02, în comparație cu apa distilată.

Capitolul 4. „INFLUENȚA PREPARATELOR BIOLOGIC ACTIVE DE ORIGINE CIANOBACTERIANĂ ȘI VEGETALĂ ASUPRA CARACTERELOR MORFO-CULTURALE ALE TULPINII *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 ÎN PROCESUL LIOFILIZĂRII” include analiza caracterelor morfo-culturale la tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02 până și după liofilizare și păstrare timp de 1 an în prezența substanțelor de origine cianobacteriană și vegetală. Pornind de la premiza, că există o dependență între tipul morfologic al coloniei și activitatea sa, a fost studiată evoluția coloniilor tipice ale tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 sub influența preparatelor de origine cianobacteriană și glicozidelor vegetale, utilizate în mediile de suspendare a sporilor streptomicetei înainte de liofilizare și în mediile de reactivare a culturii după păstrare în stare liofilizată.

Examenul coloniilor a fost realizat după 7-10 zile de dezvoltare a culturii pe medii solide, prin aprecierea următoarelor caracteristici: mărimea, forma, profilul, marginea, culoarea miceliului aerian și a miceliului de substrat. La fel a fost luată în considerare și capacitatea culturilor de streptomicete de a elibera în mediu a pigmentilor solubili, asociată cu adaptarea tulpinii la factorii de stres.

În urma cercetărilor efectuate la acest capitol s-a constatat că, extractele cianobacteriene (BioR și PSS_{Zn}) și glicozidele vegetale (iridoide și flavonoide), utilizate în calitate de lioprotectori în componența mediului Gel+Gl, la liofilizarea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 au asigurat o stabilitate morfologică a culturii, caracterizată de păstrarea caracterelor fenotipice după 1 an de conservare a tulpinii. Dintre caracterele morfo-culturale studiate, cea mai scăzută variabilitate a manifestat-o culoarea miceliului aerian, forma, profilul și marginea coloniilor; o variabilitate relativă a fost înregistrată în ce privește culoarea miceliului de substrat. Caracterul

de formare a pigmentului solubil de culoare roz-pal, apărut în urma suspendării culturii în mediul lioprotector suplimentat cu extracte glicozidice vegetale, ceea ce indică capacitatea de adaptare a tulpinii studiate la factorii de stres și crearea condițiilor de germinare a sporilor după liofilizare.

Capitolul 5. „ACȚIUNEA PREPARATELOR ASUPRA PRODUCTIVITĂȚII ȘI SINTEZEI LIPIDELOR LA *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02” vine să completeze, să argumenteze și să explice rezultatele cercetărilor efectuate în capitolele precedente, în vederea alegerii unor metode specifice de conservare a tulpinilor de streptomicete din Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene.

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, a fost studiată acțiunea preparatelor naturale utilizate în procesul liofilizării asupra productivității și componenței calitative și cantitative a lipidelor la cultura în studiu.

Studiul acțiunii preparatelor de origine cianobacteriană și vegetală asupra creșterii, dezvoltării și activității biosintetice a tulpinii de streptomicete *S. canosus* CNMN-Ac-02 a permis evidențierea unui efect pozitiv al preparatelor testate asupra procesului de acumulare a biomasei la cultivarea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 pe mediul complex lichid M-I. Extractele naturale studiate au influențat și compoziția fracționară a lipidelor la streptomicete, mai cu seamă raportul fracțiilor de bază. Extractele de origine cianobacteriană au stimulat producerea de fosfolipide, pe când extractele de origine vegetală (glicozide din *Linaria genistifolia* și *Verbascum phlomoides*) au sporit esențial cantitatea de sterine produse de tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02 pe mediul complex lichid M-I.

Aceste rezultate indică asupra faptului că acțiunea protectoare a preparatele cianobacteriene se explică prin efectul lor stimulator asupra componentelor fosfolipidice a membranelor celulare, pe când extracetele glicozidice vegetale determină o reorganizare a structurii membranei celulare, deci și o pregătire mai bună pentru condițiile de stres. Reorganizarea structurii membranei celulare în prezența glicozidelor vegetale explică și viabilitatea sporită a tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 în procesul liofilizării, precum și capacitatea culturii de a produce pigmenți solubili în prezența acestor preparate.

Compartimentul **CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI** prezintă concis concluziile generale, ce reflectă analiza rezultatelor obținute, exprimă valoarea practică a lucrării prin recomandările înaintate și schițează tematica unor cercetări ulterioare, care vor asigura continuarea logică a cercetărilor expuse în prezenta teză de doctorat.

BIBLIOGRAFIA include cele 268 surse citate în teză.

Compartimentul **ANEXE** conține copiile titlurilor de brevet de invenție și ale actelor de implementare a lor, copiile diplomelor de însoțire a medaliilor, obținute la saloanele internaționale de invenții.

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

1.1. Substanțe biologice active sintetizate de streptomicete

Actinobacteriile, datorită ciclului vital unic pentru procariote, precum și abilității lor de a produce cel mai mare număr de metaboliți secundari, prezintă un important interes științific și practic. De aceea cercetările fundamentale ale acestui grup deosebit de microorganisme au fost întotdeauna printre preocupările majore ale specialiștilor din domeniu [155, 168, 212, 214, 226].

Actinobacteriile sunt microorganisme filamentoase, procariote, Gram-pozitive, care formează miceliu ramificat cu diametrul hifelor 0,4-1,5 mkm. Diametrul celulelor are dimensiuni de la 0,5 până la 2,0 mkm. Se reproduc prin fisiune, spori sau conidii. Actinobacteriile se referă la bacterii cu un grad înalt de variabilitate. După gradul de variabilitate, acestea pot fi comparate cu cianobacteriile, mixobacteriile și bacteriile filamentoase, iar dintre bacteriile Gram-pozitive, pot fi comparate numai cu bacteriile care se înmulțesc prin spori [11, 212, 218].

Cel mai reprezentativ grup de actinobacterii face parte din ordinul *Actinomycetales*, genul *Streptomyces* și reprezintă microorganisme unice, fiind unul din cele mai răspândite genuri, ce îmbină caracteristicile procariotelor și eucariotelor [194]. Acest gen cuprinde specii foarte variabile din punct de vedere morfologic, fiziologic, biochimic, al rolului lor în procesele naturale și al utilizării practice. Studii detaliate ale acestora se efectuează conform următoarelor direcții: taxonomie, fiziologie, variabilitate, structură, biotehnologie, etc. [107].

Streptomicetele pe parcursul ciclului său vital produc un spectru larg de substanțe biologice active, care se utilizează în diverse ramuri: farmaceutică, cosmetologie, agricultură și industria alimentară. Interes major prezintă: vitaminele, antibioticele, aminoacizii, enzimele, hormonii, lipidele, etc. [16, 22, 130, 137, 150, 161].

Streptomicetele se află mereu în vizorul savanților, deoarece sunt o sursă inepuizabilă de antibiotice. Actualmente peste 75,0 % din antibioticele cunoscute sunt produse de streptomicete, iar lista lor continuă să fie completată prin identificarea noilor compuși produși de tulpini noi.

Studii recente s-au soldat cu identificarea noilor antibiotice: belomicina, doxorubicina și mitomicina C [71]. Bleomicina este un amestec de antibiotice glicopeptidice (bleomicina A2 cu formula chimică $C_{55}H_{84}N_{17}O_{21}S_3$ și bleomicina B2 cu formula chimică $C_{55}H_{84}N_{20}O_{21}S_2$) cu proprietăți citotoxice, obținute din *Streptomyces verticillus*. Bleomicina induce scindarea ADN-ului sub influența oxigenului, metalelor și ionilor. Bleomicina leagă ADN-ul, în timp ce Fe (II) și radicalii hidroxil sunt eliberați sub influența oxigenului molecular, provocând în consecință

deteriorarea lui și oxidarea Fe (II). Substanța este utilizată în tratamentul carcinomului scuamos, a bolii Hodgkin, a limfomului non-Hodgkin, carcinomului testicular, cancerului ovarian și a efuzelor pleurale maligne [71].

Doxorubicina este un antibiotic antraciclinic cu activitate antitumorală, obținut inițial din *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Este o moleculă amfifilă care conține două părți: aglicon insolubil în apă (adriamicinonă: $C_{21}H_{18}O_9$) și grup funcțional amino-zaharat (daunosamină: $C_6H_{13}NO_3$). Doxorubicina acționează asupra acizilor nucleici ai celulelor în dividere, prin intermediul a două mecanisme principale: (i) intercalarea perechilor de baze ale lanțurilor ADN și inhibarea sintezei ADN și ARN în celulele cu creștere rapidă prin blocarea proceselor de replicare și transcriere; și (ii) generarea de radicali liberi mediată de fier, provocând leziuni oxidative la membranele celulare, proteine și ADN. Doxorubicina este unul din cele mai frecvent utilizate medicamente în chimioterapie. În prezent, această substanță este recomandată în cazul leucemiei limfoblastice acute, leucemiei mieloblastice acute, a tumorii lui Wilms, neuroblastomului, sarcoamelor osoase și a țesuturilor moi, carcinomului mamar, carcinomului ovarian, carcinomului tiroidian, carcinomului gastric, bolii Hodgkin, limfomului malign și carcinomului bronhogenic, în care tipul histologic celular cu celule mici este cel mai receptiv în comparație cu alte tipuri de celule. Preet și colab. a demonstrat că combinarea doxorubicinei cu nisină poate îmbunătăți eficiența tratamentului cancerului de piele [71].

Mitomicina C ($C_{15}H_{18}N_4O_5$) a fost izolată dintr-o tulpină de actinomicete *Streptomyces caespitosus*. Acest agent antitumoral inhibă sinteza ADN prin alchilarea ADN-ului, care are ca rezultat reticularea lanțurilor de ADN dublu elicoidal. Mitomicina C este utilizată în tratamentul cancerului mamar, pancreatic, colorectal și anal, a stomacului, a capului și gâtului, plămânilor, colului uterin, vezicii urinare, carcinomului hepatic [71]. Circa cincizeci de antibiotice de origine streptomicetă și-au găsit aplicații practice în medicină, veterinarie și agricultură [51].

Streptomicetele, acest grup abil și divers de microorganisme, prezintă avantaje importante pentru creșterea și protecția plantelor, prin contribuția lor la combaterea bolilor, activitatea antimicrobiană și antifungală, abilitatea de a produce compuși volatili și capacitatea de a spori biomasa vegetală.

Aceste microorganisme de rizosferă contribuie la ameliorarea plantelor utilizând diverse mecanisme [59, 106, 151]. Acțiunea poate fi directă, sporind accesibilitatea nutrienților prin mobilizarea fosfaților, fixarea azotului, absorbția ferului, ceea ce permite plantelor să colonizeze soluri sărace în substanțe nutritive [23, 81]. Un alt mecanism utilizat de streptomicete pentru a stimula creșterea plantelor este producerea de fitohormoni sau enzime și alți compuși ce modifică rețeaua hormonală a plantelor [138].

Paralel cu acestea, streptomicetele sunt foarte eficiente în controlul biologic, prin producerea de substanțelor antimicrobiene eficiente în combaterea microorganismelor fitopatogene. Indirect, streptomicetele și metaboliții lor pot activa sistemul de rezistență indusă a plantelor contra bolilor și infecțiilor [162]. La fel, pot veni în ajutorul plantelor în condiții de stres salin și secetă, sau pot fi folosite în calitate de fertilizanți și pesticide alternative [49, 106].

Specificul streptomicetelor o reprezintă și capacitatea de a sintetiza substanțe antifungice, care inhibă creșterea și dezvoltarea micromicetelor. Utilizarea acestui potențial permite soluționarea unor astfel de probleme ca bolile provocate de fungi la om, animale și culturile agricole. [172, 184, 208, 255].

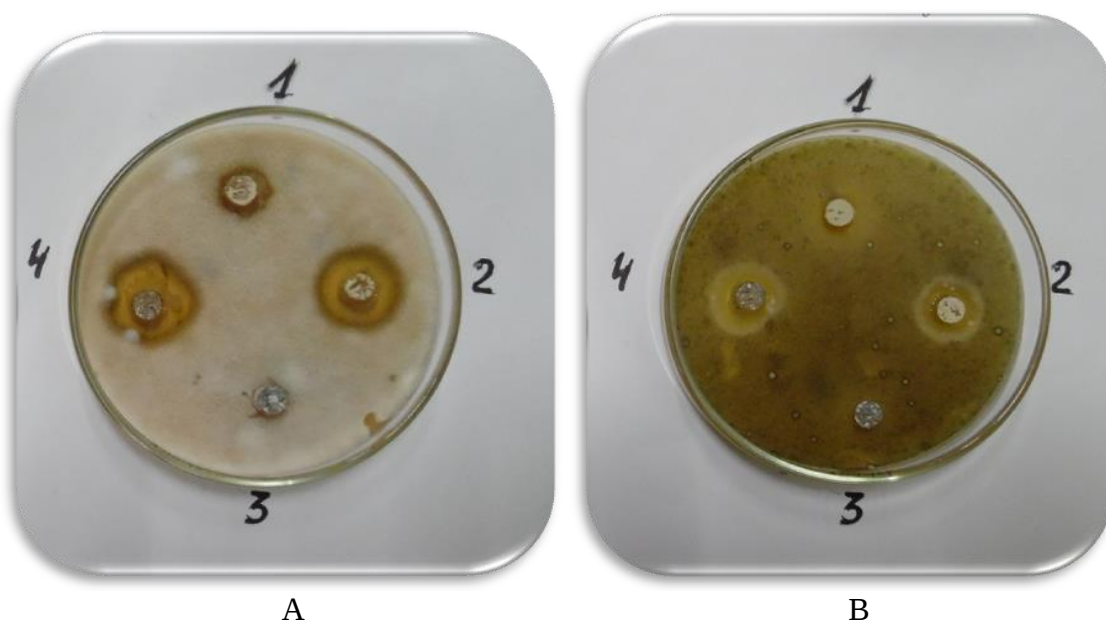


Fig. 1.1. Activitatea antifungică a *Streptomyces canosus* față de *Alternaria alternata* (A) și *Aspergillus niger* (B)

În ciuda faptului că multe taine ale strategiilor de colonizare și interacțiunii dintre aceste microorganisme și plante rămân a fi descoperite, streptomicetele au devenit cele mai importante rizobacterii utilizate în agricultură [152].

Rolul important atribuit streptomicetelor în evoluția solului și colonizarea terenurilor de către plantele verzi, se datorează ciclului vital complex și capacității de a produce spori. În acest habitat, sporii de *Streptomyces* rezistenți la deshidratare sunt de obicei abundenți, dând naștere unor filamente de ramificație hifale în condiții adecvate. Prin această adaptare, ele contribuie la asimilarea de nutrienți de către ciuperci, plante și alte organisme, în urma descompunerii rămășițelor organice cu ajutorul exoenzimelor hidrolitice. La cultivare timp de câteva zile în condiții de laborator asemănătoare cu cele naturale, streptomicetele formează un miceliu de

substrat dens, din care apar ramuri aeriene, formând eventual lanțuri de spori. Creșterea aeriană se realizează în detrimentul biomasei miceliene a substratului, care suferă o liză extensivă și reutilizare pentru a alimenta faza de reproducere. Câteva miligrame (greutatea umedă) a miceliului de substrat al coloniei sunt astfel transformate în zeci de milioane de spori. Producția de antibiotice și alți metaboliți secundari este în mare parte asociată cu această fază de dezvoltare [35].

Alt aspect, care provoacă interes sporit față de reprezentanții genului *Streptomyces* este capacitatea lor de a sintetiza fitohormoni, care stimulează creșterea și dezvoltarea plantelor agricole, sporind productivitatea lor. În acest context, cercetătorii din țara noastră au realizat experimente cu așa culturi agricole ca roșiile, soia, sfecla de zahăr, tutunul, porumbul, etc. Metaboliții tulpinilor *S. levoris* CNMN-Ac-01, *S. canosus* CNMN-Ac-02, și *S. massasporeus* CNMN-Ac-06, au influențat diferit, în dependență de varietatea taxonomică a tulpinii și concentrația utilizată. Influență pozitivă a fost înregistrată în majorarea numărului de semințe germinate, stimularea creșterii rădăcinilor și lăstarilor plantulei, sporirea recoltei obținute. Remarcabil este faptul, că produsele obținute în baza streptomicetelor sunt naturale, ecologice și sigure pentru consum. [15, 27, 34].

Informațiile disponibile privind prezența genului *Streptomyces* în regiunea rădăcinilor diferitelor specii de plante ar trebui comparate cu prudență din cauza setărilor, metodelor, primelor, instrumentelor analitice și bazelor de date de referință divergente. De exemplu, combinațiile primare de gene pentru ARN 16S deja influențează puternic diversitatea bacteriană detectată. Cu toate acestea actinobacteriile, în general, au fost frecvent descoperite a fi una dintre cele cinci filumuri bacteriene dominante în sol, constituind peste o zecime din totalul microbiotei solului. În sol plantele au un efect selectiv asupra compoziției comunităților microbiene din rizosferă și din endosferă. Deși geochimia solului s-a dovedit a fi principalul motor al diversității microbiene, componența comunității microbiene din rizosfera și endosfera mai multor specii de plante model și de plante recoltate, cum ar fi *Arabidopsis thaliana* și porumb (*Zea mays*), diferă foarte mult de diversitatea găsită în probele de sol lipsite de vegetație. În aceste și alte sisteme de plante, cum ar fi plopul (*Populus* sp.), vița de vie (*Vitis vinifera*), orezul (*Oryza sativa*), grâul (*Triticum aestivum*), ovăzul (*Avena aestivum*), mazărea (*Pisum sativum*), o parte importantă a comunităților microbiene în ambele compartimente rizosferice și endosferice ale rădăcinilor plantelor este preluată de actinobacterii, deși abundența acestora variază foarte mult între specii. În plus, endosfera rădăcinii este semnificativ mai bogată în actinobacterii pentru mai multe din aceste specii de plante decât solul fără vegetație și compartimentul rizosferic, ceea ce indică faptul că aceste organisme au dezvoltat mecanisme adecvate pentru a coloniza și locui în

endosferă. O comunitate microbiană experimentală comparativă în *Arabidopsis* și vița de vie între frunze și rădăcini a arătat că actinobacteriile din endosfra organelor supratereștrii din *Arabidopsis* este de 2 ori mai puțin abundentă, în timp ce acestea au fost complet absente în frunzele de vița de vie. [152]

În domeniul zootehniei producătorii tot mai des optează pentru utilizarea preparatelor ecologice, naturale care sporesc creșterea și dezvoltarea animalelor și păsărilor. Însă problema majoră este deficitul în astfel de preparate. Soluționarea acestei probleme constă în utilizarea biomasei și produșilor metabolici de origine microbiană. Eficiența preparatelor obținute în baza tulpinilor de streptomicete, izolate din solurile Moldovei, a fost demonstrată în rezultatul unor experiențe vaste. S-a constatat, că introducerea în dieta porcinelor a preparatelor biologic active din tulpinile de streptomicete *S. canosus* CNMN-Ac-02 și *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 păstrate în CNMN, contribuie la majorarea greutateii corporale cu 10-15 %. În timp ce la vulpi, preparatele în baza exometaboliților de streptomicete - «EM-02» și «EM-06», sporeau zilnic masa corporală a animalelor cu 37,0 și 33,0 g. Creșterea și greutatea puilor broiler, care au primit în rația furajeră preparatul «BM-06», a constituit 16,8 % comparativ cu lotul martor. Biomasa și metaboliții tulpinii *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 de asemenea au un efect pozitiv asupra creșterii și dezvoltării păsărilor. Remarcabil este faptul, că metaboliții streptomicetelor nu provoacă tulburări fiziologice în organismul animalelor [174, 188].

O parte componentă importantă a streptomicetelor sunt lipidele. Clasa dată de substanțe este indispensabilă pentru organismele vii, reprezintă fundamentul tuturor celulelor și îndeplinește diverse funcții. Lipidele sunt componente cheie ale membranei plasmatică și ale altor compartimente celulare așa ca: membrana nucleară, reticulul endoplasmatic, aparatul Golgi, endosomii și lizozomii. Compoziția lipidică a diferitor organele, tipuri de celule și țesuturi variază substanțial, sugerând că pentru diverse funcții sunt necesare lipide cu compoziție chimică diferită [74]. Celulele vii produc numeroși compuși lipidici și folosesc sute de proteine pentru a le sintetiza, metaboliza și transporta. Complexitatea și diversitatea lipidelor se apropie de cea a proteinelor, însă mecanismul funcționării acestora este slab studiat, deși aceste substanțe sunt indispensabile în numeroasele procese biologice la care participă [91].

Proprietățile fizico-chimice ale lipidelor au un rol esențial, deoarece de ele depinde modul lor de interacțiune cu alți compuși lipidici și proteici. Lipidele sunt mult mai mici decât proteinele și prin urmare, o mare parte din suprafața lor participă la formarea diferitor structuri în calitate de compuși de legătură. Aceste procese stau la baza stabilității structurilor celulare și determină relevanța compușilor lipidici [91].

Deoarece costurile de obținere a lipidelor din surse tradiționale sunt înalte, tot mai des se apelează la lipide de origine microbiană, care pot fi utilizate în diverse domenii ale medicinei, agriculturii și industriei alimentare. Conținutul lor în biomasa microorganismelor poate ajunge până la 20,0-80,0% [96].

În zootehnie o mare importanță au lipidele de origine actinobacteriană (streptomicetă), în special, fracțiunile fiziologic importante pentru organismele vii – fosfolipidele și sterinele [86, 148, 182]. Suplinirea rației alimentare cu acizi grași polinesaturați direct influențează starea de sănătate a organismelor vii [10]. Acizii ω -3 și ω -6 au rol important nu numai ca componente structurale ale fosfolipidelor membranare, dar și ca precursori ai eicosanoidelor, esențiale pentru creșterea și dezvoltarea mamiferelor [142]. Compușii menționați, prin diverse mecanisme contribuie la dezvoltarea diferitor organe la animale [10].

Sterinele sunt componente importante ale membranei celulare și precursori pentru sinteza vitaminelor și a hormonilor steroizi la mamifere, care prin intermediul sterol 24-C-metiltransferazei participă la sinteza compușilor indispensabili pentru creșterea și majorarea masei corporale a animalelor [159].

Deoarece utilizarea preparatelor lipidice de origine microbiană în diferite domenii este permanent în creștere, apare necesitatea în obținerea a unor cantități mai mari de biomasă cu conținut înalt de lipide. O modalitate eficientă de a stimula productivitatea și capacitățile biosintetice ale microorganismelor, în special ale streptomicetelor, este optimizarea condițiilor de cultivare și componenței mediilor nutritive. De regulă, în componența acestor medii sunt incluse diverse surse de carbon, azot și complex de săruri minerale [182, 187].

Astfel, o serie de experiențe cu privire la influența substanțelor de origine cianobacteriană asupra creșterii și dezvoltării tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 au fost realizate de către D-na profesor Burțeva S. (2002). Utilizarea extractelor din *Porfiridium cruentum* în calitate de supliment la mediul de cultivare a avut un efect stimulator asupra acumulării biomasei tulpinii studiate. Astfel, acest extract în concentrație de 0,1-30,0 mg/l a majorat cantitatea de BAU cu 4,78-17,5% și sinteza fosfolipidelor cu cca. 32,0%. De asemenea au fost utilizate și extracte din *Nostoc linckia*, care în concentrație de 1,0 mg/l, a majorat cu 24,1%, comparativ cu proba martor, cantitatea de biomasă a tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 [182, 187].

Cercetările D-nei doctor Codreanu S. (1995), cu privire la cultivarea bacteriilor propionice pe medii suplimentate cu extracte din *Dunaliella salina* și *N. linckia* în scopul stimulării creșterii, sintezei ciancobalaminei și porfirinelor, au rezultat în majorarea cantității de porfirine obținute a crescut cu 113,3-123,7 % și respectiv 203,9-245,5 % comparativ cu proba martor [45].

Cercetătorii au demonstrat eficiența utilizării biomasei din spirulina pentru cultivarea bacteriilor lactice și majorarea productivității de biomasă a acestora. Astfel, suplینirea mediului nutritiv cu biomasa uscată de *Spirulina platensis* în concentrație de 1 mg, 5 mg și 10 mg/ml contribuie la creșterea și dezvoltarea bacteriilor lactice *Lactobacillus acidophilus*, cantitatea de biomasă constituind 171,67-185,84 % mai mare față de martor [12].

O direcție nouă de perspectivă în cultivarea microorganismelor este utilizarea în calitate de suplimente la mediile nutritive glicozidelor din plante. Literatură disponibilă în acest domeniu este foarte puțină, însă este cunoscut faptul că glicozidele posedă o activitate biologică înaltă și ușor pot fi asimilate de către microorganisme [67].

Astfel, luând în considerație cele expuse, interes deosebit prezintă studiul influenței extractelor de origine cianobacteriană și glicozidelor din plante în stimularea productivității de biomasă și proprietăților biosintetice a tulpinilor de streptomicete din CNMN ce prezintă interes științific și practic.

1.2. Metode de păstrare a microorganismelor și eficiența lor

Conservarea microorganismelor de interes științific și practic prin diferite metode este un compartiment important al microbiologiei clasice. În prezent conform surselor literare, nu sunt clare și pe deplin elucidate mecanismele care influențează intrarea și ieșirea microorganismelor din starea de anabioză. Cu toate că conservarea microorganismelor este studiată cca. 80 de ani, în prezent, totuși nu există reguli și recomandări universale pentru păstrarea potențialului biosintetic, fiziologo-biochimic și a viabilității tulpinilor de interes biotehnologic și științific [250].

Actualmente sunt cunoscute diverse metode de conservare a microorganismelor, precum și numeroase modificări ale acestora, însă fiecare dintre acestea are avantajele și dezavantajele sale. Cel mai des aplicate în cadrul colecțiilor de microorganisme sunt: reînsămânțarea periodică, păstrarea sub strat de ulei mineral, în stare uscată; crioconservarea și liofilizare [250].

Metoda eficientă de conservare a microorganismelor este selectată în funcție de varietatea taxonomică a acestora [209, 250].

Reînsămânțarea periodică. Această metodă a fost una dintre primele metode de păstrare îndelungată a microorganismelor în condiții de laborator și este încă utilizată pe scară largă în practica studiilor microbiologice. De regulă, prin această metodă, sunt păstrate microorganisme aerobe, care sunt transferate pe suprafața unui mediu nutritiv specific ce conține 0,2-0,3% agar [132, 241, 250].

Frecvența transferului microorganismelor pe un mediu proaspăt diferă și, în mare măsură, depinde de proprietățile acestora. Majoritatea microorganismelor pot fi reînsămânțate o dată la 1-3 luni, inclusiv streptomicetele, deși unele, cum ar fi lactobacilii, au nevoie de transfer mai frecvent. Stocarea culturilor în frigider la $t^{\circ}=4-6^{\circ}\text{C}$ permite reducerea numărului de reînsămânțări [132, 241, 250].

Păstrarea și menținerea culturilor de microorganisme prin reînsămânțări regulate are un număr mare de dezavantaje esențiale. Unul din cele mai principale este probabilitatea înaltă a pierderii unor particularități morfo-fiziologice importante. În plus, transferul frecvent, deseori reduce activitatea biosintetică a culturilor, crește riscul de infectare cu microflora exogenă. Prin reînsămânțări frecvente, în special pe medii lichide, crește semnificativ probabilitatea apariției mutațiilor genetice spontane și, în final, această metodă prevede un volum de lucru enorm și consum semnificativ de medii nutritive costisitoare [132, 241, 250].

Unul din puținele avantaje ale metodei constă în disponibilitatea permanentă a stocurilor de culturi proaspăt însămânțate, gata pentru cercetări.

Un exemplu elocvent al ineficienței păstrării actinobacteriilor prin reînsămânțare periodică poate servi un studiu recent al cercetătorilor azeri. Aceștea au studiat supraviețuirea a 15 tulpini de actinobacterii din colecția Departamentului de Microbiologie al Universității de Stat din Baku, după conservare prin reînsămânțare periodică pe mediu nutritiv agarizat. În timpul depozitării prin metoda dată, timp de 10 luni, actinobacteriile au menținut o creștere rapidă (în decurs de 3-5 zile), deși unele dintre ele au prezentat o diminuare a dimensiunii celulelor. După 10 luni de păstrare, viabilitatea tulpinilor constituia 70,0-86,0%, în scădere cu 14,0-30,0% [116]. Alt exemplu a demonstrat, că tulpina *Streptomyces ambofaciens* a pierdut aproximativ 20,0% din activitate inițială de sinteză a spiromicinei după 4 însămânțări periodice [119].

Conservarea sub strat de ulei mineral – este aplicată pentru păstrarea microorganismelor în colecții și în condiții de laborator. Metoda dată se caracterizează prin simplitatea sa, nu necesită utilaj special și asigură o viabilitate îndelungată a microorganismelor. Astfel, sunt păstrate caracteristicile utile ale tulpinilor care prezintă interes [250].

Prima dată uleiul de vazelină a fost aplicat de Lumiere și Chevrotier (1914) pentru păstrarea gonococilor. Principiul metodei constă în cultivarea tulpinii pe mediul nutritiv specific și plasarea sub un strat de ulei mineral steril. Stratul de ulei (0,5 – 1,0 cm) nu permite pătrunderea oxigenului ce asigură reducerea vitezei metabolismului microorganismelor, riscului formării speciilor reactive de O_2 și protejează suprafața mediului de uscare [250].

Microorganismele sunt cultivate în tuburi pe medii agarizate înclinate (sub un unghi de $\sim 45^{\circ}$) cu un volum de 5-6 ml. Importanță esențială are momentul plasării culturilor sub ulei, care

la microorganismele sporogene și asporogene diferă. Cele asporogene se plasează sub ulei înainte de a începe faza staționară de creștere, iar cele sporogene – în perioada de sporulare [250].

Pentru conservare se utilizează ulei de vazelină pur, sterilizat în autoclav timp de 60 min. la presiunea $1 \cdot 10^4$ Pa. După sterilizare acesta este încălzit în dulapul de uscare ($t_{\max}=150^{\circ}\text{C}$; $\tau=120$ min.) sau se menține timp de 2-3 zile la temperatura camerei pentru înlăturarea apei remanente. Pentru a proteja mediul de deshidratare stratul de ulei trebuie să depășească cu cel puțin 1 cm marginea superioară a mediului agarizat. Microorganismele sunt păstrate în frigider (5°C) sau la temperatura camerei în întuneric. Pentru reînsămânțare uleiul este înlăturat, deoarece acesta inhibă creșterea microorganismelor [250].

Perioada de reînsămânțare a diferitor specii de microorganisme diferă.

Majoritatea speciilor de drojdii sunt reînsămânțate o dată în an. Micromicetele sunt reînsămânțate la fiecare doi–trei ani [145].

Caracterele morfo-culturale și proprietățile fiziologo-biochimice ale microorganismelor păstrate timp îndelungat sub ulei mineral practic nu se modifică, însă uneori păstrarea sub ulei cauzează încetinirea succesiunii fazelor de creștere a microorganismelor (de 1,5 – 2,0 ori în comparație cu reînsămânțările periodice) și scade viteza utilizării substanțelor din mediul nutritiv [57].

Ca și alte metode de conservare, păstrarea sub ulei mineral are avantajele și dezavantajele sale. Din avantaje putem menționa: asigurarea păstrării îndelungate și stabilității majorității microorganismelor; micșorarea numărului de reînsămânțări necesare și implicit a cantității mediilor nutritive utilizate [132].

La dezavantaje pot fi atribuite: riscul inflamării uleiului, necesitatea de mai mult timp și detergenți pentru spălarea veselei și ustensililor de ulei, riscul înalt de deshidratare a mediului nutritiv și de contaminare cu floră exogenă, în cazul stocării (păstrării neconforme) [132].

Păstrare în formă uscată – cea mai simplă metodă de păstrare a microorganismelor. Majoritatea microorganismelor ușor suportă procesul natural de uscare (în sol, nisip, lut) și pe diverse produse alimentare. În timpul uscării are loc dehidratarea celulei microbiene. În stare normală celulele conțin până la 80,0 – 90,0% de apă din masa totală. În timpul uscării celulele pierd apa liberă și creșterea microorganismelor se stopează când conținutul de apă ajunge la 10,0 – 12,0%. Dehidratarea până la nivelul de 2,0 – 5,0% (celula păstrează doar apa legată) duce la stoparea activității metabolice și inhibarea reacțiilor biochimice [250].

Rezistența microorganismelor la uscare depinde de mai mulți factori: varietatea lor taxonomică; compoziția mediilor nutritive; condițiile de cultivare; metoda de uscare; cantitatea de umiditate remanentă; condițiile de păstrare și reactivare [3].

Procesul de uscare este mai ușor suportat de microorganismele sporogene. Capacitatea de sporulare a apărut la anumite specii de microorganisme pe parcursul evoluției, ca răspuns la factorii nefavorabili ai mediului, deoarece sporii microorganismelor sunt rezistenți la diferite condiții de stres [3]. Sporii actinobacteriilor sunt de regulă conservați și păstrați în sol steril uscat sau pe medii agarizate uscate [209].

Compoziția mediului, raportul între azot și carbon, condițiile de aerare, pH-ul mediului influențează mult rezistența microorganismelor la deshidratare. În laboratoare, de regulă, este aplicată metoda de uscare a microorganismelor sporogene prin aerare pe diverși adsorbenți: fosfați insolubili, carbonat de calciu, amidon, cristale de zaharoză, etc. Se consideră că, adsorbenții protejează microorganismele de suprauscare, leagă apa liberă și mențin un anumit nivel de umiditate. În industrie pe larg sunt folosite metodele de uscare de contact (pe adsorbenți) și convexă (în aer uscat) [177, 250].

Metoda de uscare datorită simplității sale este pe larg utilizată la păstrarea microorganismelor în laborator. Microorganismele uscate pot fi ușor păstrate și transportate. Unul din neajunsurile acestei metode este riscul, că uneori tulpinile conservate din anumit motiv nu pot fi reactivate [88, 227].

Crioconservarea. Începând cu anii '60 ai secolului XX, pentru păstrarea îndelungată a microorganismelor sunt utilizate metode de conservare ca crioconservare. Astfel, aceste cercetări sunt abordate de o știință relativ nouă „Criobiologie” [47, 203].

Pentru conservarea și păstrare la temperaturi joase a culturilor microbiene, acestea sunt plasate în suspensii vâscoase (medii crioprotectoare), care protejează celulele de leziuni. În condiții de laborator, în calitate de crioagenți sunt folosite următoarele amestecuri: gheață/NaCl în proporție de 3:1, cu temperatura de -21°C ; gheață/ CaCl_2 în proporție de 2:1, cu temperatura de -56°C ; CO_2 solid cu temperatura de -78°C . Conservarea microorganismelor are loc în vase Dewar, care sunt păstrate în congelator la temperatura de $-12\ldots-80^{\circ}\text{C}$ [64].

În ultimii ani pentru conservarea microorganismelor în colecții mari sunt utilizate congelatoare cu azot: aflat în faza gazoasă (-130 sau -170°C) sau lichidă (-196°C). Aceste congelatoare au un volum de la 10 până la 35 l. În azot lichid sunt păstrate microorganismele care nu suportă procesul de liofilizare, așa ca bacteriile autotrofe sau unii viruși. De asemenea în azot lichid bine se păstrează culturile starter: bacteriile acidolactice, drojdiile și actinobacteriile, care prezintă interes biotehnologic și se utilizează în industria alimentară [120].

Păstrarea viabilității microorganismelor în procesul de congelare și decongelare depinde de varietatea taxonomică a microorganismelor, vârsta și densitatea populației, condițiile de cultivare, natura crioprotectorului, viteza de congelare / decongelare, etc. Specificul microorganismelor în cazul dat constă în faptul că tulpinile unui gen se deosebesc prin toleranță diferită față de temperaturile joase. Microorganismele Gram pozitive sunt mai rezistente față de congelare, decât cele Gram negative [250].

Pentru conservare microorganismele sunt cultivate în condiții optime până la începutul fazei staționare. Microorganismele în faza exponențială de creștere sunt mai sensibile la șocul termic, decât în faza staționară. Sporii sunt mai rezistenți la congelare decât celulele vegetative [209].

Microorganismele, cultivate pe medii sintetice, sunt mai sensibile față de diferite stresuri, decât cele cultivate pe medii naturale bogate în substanțe nutritive. Astfel, prin modificarea compoziției mediilor de cultivare e posibil de orientat procesele biosintetice din celulă spre sinteza substanțelor de rezervă – glicogen, lipide și peptide, care le protejează de leziuni în timpul congelării / decongelării [223, 224].

Deoarece apa în calitate de mediu protector este relativ letală pentru microorganisme, în calitate de crioprotectori sunt utilizate substanțe micromoleculare (glicerină 10 – 20%, dimetilsulfoxid 7 – 10%, zaharoza 10 – 20%) și macromoleculare (proteine, polivinilpirolidon 10%). Sporii sau celulele vegetative se plasează în mediul crioprotector până la concentrația de 10^8 – 10^{12} celule/ml. Este cunoscut faptul că, cu cât este mai mare concentrația microorganismelor în mediu, cu atât ele sunt mai rezistente la acțiunea diferitor factori nefavorabili [209].

Crioprotectorii, după mecanismul de protecție sunt divizați în două grupe: substanțe care sunt absorbite de celule – penetrante (glicerină, dimetilsulfoxid) și nepenetrante (de exemplu polivinilpirolidon) [144].

Mecanismul de crioprotecție a acestor substanțe nu este până la sfârșit studiat. Se cunoaște, că prezența crioprotectorilor micșorează concentrația electroliților, reduce presiunea osmotică, modifică structura apei aflate în afara celulelor, stabilizează membrana celulară și permeabilitatea lor [153].

Viabilitatea microorganismelor congelate în mare măsură depinde de viteza de congelare a probelor. De regulă, congelarea se efectuează în 2 etape: congelarea lentă (viteza de răcire $1^{\circ}\text{C}/1\text{ min.}$) până la -30°C ; urmată de congelarea bruscă de la $15-30^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ până la -150°C . Probele sunt păstrate în azot lichid la temperatura de -196°C . Decongelarea probelor trebuie să decurgă

rapid, pentru evitarea leziunilor celulare, care pot fi produse în urma recristalizării. De obicei obiectul este decongelat la temperaturile +30 și +45°C [209].

Avantajele crioconservării microorganismelor constau în: micșorarea probabilității de infectare a probelor; stabilitatea proprietăților morfo-culturale și productivității tulpinilor; cheltuieli reduse de timp și materiale necesare; probele decongelate, fără reînsămânțări intermediare pot fi utilizate pentru prepararea inoculumului [250].

Dezavantajele metodei constau în: necesitatea de echipament special și controlul permanent al funcționării acestuia; respectarea condițiilor de securitate în etanșarea probelor pentru evitarea exploziei fiolelor de sticlă; costul înalt al gazelor inerte, în special al azotului [250].

Liofilizarea. În ultimile decenii această metodă este tot mai des utilizată în instituțiile care sunt specializate în conservarea și păstrarea microorganismelor. Ea constă în uscarea în vid a celulelor microbiene aflate în stare congelată, prin evitarea fazei lichide (analogică cu procesul de sublimare) [87, 127, 133, 250].

Pentru prima dată această metodă a fost aplicată de Altman în anul 1890, în cercetările histologice. Liofilizarea microorganismelor a fost aplicată de Hammer în anii 1909-1914. În primele experiențe de liofilizare în calitate de lioprotectori au fost utilizate apa distilată, soluția fiziologică, bulionul de carne și laptele. Alegerea corectă a unui rehidratant eficient are un caracter empiric [209]. În prezent liofilizarea este pe larg utilizată în colecții pentru conservarea și păstrarea îndelungată a bacteriilor, actinobacteriilor, fungilor, levurilor, algelor, virusurilor, vaccinurilor și plasmei sangvine. De exemplu, reprezentanții bacteriilor saprofite sunt păstrați în Colecția Catedrei de Microbiologie (Universitatea de Stat din Moscova) mai mult de 25 de ani [111, 157, 217, 265].

Procesul de liofilizare poate fi divizat în două faze:

1. Probele congelate în fiole sunt plasate pe rafturile camerei în care are loc liofilizarea. Congelarea se efectuează în utilaj special. În cazul congelării lente, crește riscul apariției cristalelor mari de gheață, care afectează grav membranele celulare și diminuează semnificativ viabilitatea microorganismelor. Congelarea rapidă duce la apariția numeroșilor pori în probe la finele procesului de sublimare, care fac dificilă desfășurarea procesului de difuzie a aburilor de apă prin stratul produsului care deja a fost dehidratat.

2. Evaporarea gheții are loc în vid, în camera de liofilizare. Aburii formați sunt eliminați în condensator, unde intrând în contact cu spirala acestuia se transformă în gheață [37, 133].

Pe parcursul liofilizării, microorganismele sunt supuse diferitor factori de stres: temperaturi și presiuni joase, deshidratare, rehidratare, etc., care provoacă leziuni celulare [111].

În baza mai multor cercetări s-a constatat, că viabilitatea microorganismelor depinde de: varietatea taxonomică a culturii, faza de creștere, concentrația celulelor în mediu protector, compoziția acestor medii, regimul de liofilizare, condițiile de păstrare (temperatura, iluminare, durata), condițiile de reactivare (compoziția mediului de rehidratare, temperatura) [133].

Ulterior s-a stabilit, că proprietăți lioprotectoare pronunțate posedă substanțele cu o compoziție complexă: serul sanguin, proteinele, gelatina, laptele, bulionul de carne, dextrinele, amidonul, polietilenglicolul, polivinilpirolidonul, peptona [64].

Efect protector posedă și substanțele simple: glucoza, zaharoza, galactoza, glutamatul de sodiu, etc. De regulă, pentru liofilizarea microorganismelor sunt folosite medii complexe: 1,0% gelatină + 10,0% zaharoză; lapte degresat + 7,0% glucoză; 75,0% ser de cal + 7,5% glucoză; 2,0% dextrină + 0,5% clorură de amoniu + 0,5% tiocarbamid + 0,5% acid ascorbic; ser de vițel + 5,0% mezoinozitol; 10,0% lapte praf + 1,0% glutamat monosodic [64, 143, 191].

Există mai multe ipoteze care explică mecanismul de acțiune a mediilor lioprotectoare:

- ✓ mediul lioprotector conține substanțe care păstrează umiditatea remanentă la un anumit nivel; cantitatea minimală de electroliți servește ca matrice de protecție pe care este uscată celula;
- ✓ mecanismul de protecție este legat de factorii fizico-chimici. Compușii cu masă moleculară mică (zaharoza), pătrund în celulă, egalând presiunea osmotică cu cea extracelulară, astfel eliminând pericolul leziunii peretelui celular pe parcursul uscării. Compușii cu masă moleculară mare nu pătrund în celulă, dar formează o presiune osmotică în afara celulei, efectuând o acțiune asupra învelișului celular, ca acesta să se așeze mai dens față de plasmă;
- ✓ după o altă ipoteză proprietățile lioprotectoare a unor compuși sunt strâns legate de structura chimică a acestora (proprietatea de a forma legături cu componentele celulare): de exemplu la acidul glutamic și arginină – cu grupa NH_2 , iar la zaharuri și polialcoolii – cu grupele OH. Se presupune că soluțiile lioprotectoare stabilizează structurile celulare în special, membrana acesteia [87].

Pentru liofilizarea microorganismelor din diferite grupe taxonomice sunt utilizate diverse regimuri. De exemplu, suspensia de fungi ($10^9 - 10^{10}$ celule/ml) în mediul protector (lapte + 5,0% lactoza + 5,0% zaharoză) se congelează la $-20, -24^\circ\text{C}$, și se liofilizează la temperatura sublimatorului de $+20...+26^\circ\text{C}$, refrigeratorului $-45...-60^\circ\text{C}$, în vacuum la $0,11 - 0,07 \text{ mm/Hg}$. Timpul de congelare – uscare este de 5-6 h, uscare – 2 h. Fiolele sunt sigilate în vacuum și sunt păstrate la întuneric la 4°C [64, 111, 209].

Celulele liofilizate se păstrează mai bine în vid sau gaz inert (argon, neon, heliu, kripton), decât în aer. Oxigenul are efect negativ, corelat cu formarea radicalilor liberi și lezarea membranei celulare. Culturile liofilizate de regulă se păstrează în frigider la temperatura de 4-6°C, deoarece păstrarea la temperatura de 18-37°C, duce la micșorarea esențială a numărului de celule vii [133].

Cantitatea de apă rămasă în probele liofilizate influențează viabilitatea celulelor după liofilizare și pe durata păstrării. Cantitatea de apă remanentă variază între 2,0-6,0%, în dependență de: mediul lioprotector utilizat, particularitățile morfologice și fiziologice ale tulpinii, condițiile de păstrare. Uscarea probelor până la nivelul de 0,5-1,5% apă este letal pentru microorganisme [209].

Lumina de asemenea influențează negativ asupra viabilității celulelor, de aceea probele sunt păstrate la întuneric [209].

Un rol decisiv pentru viabilitatea tulpinii liofilizate îl are procesul de rehidratare a celulelor, cu alte cuvinte reactivarea din stare de anabioză. Condițiile care diminuează stresul și șocul osmotic, majorează numărul de celule viabile. Aceste condiții optime, de regulă, pot fi obținute prin utilizarea în calitate de mediu de rehidratare a apei distilate sau de robinet. De asemenea în calitate de rehidranți, pot fi utilizate: bulionul de carne, peptona, soluțiile de acizi organici sau diverse medii nutritive. În unele colecții, bacteriile sunt rehidratate în bulion de carne timp de 10 min., fungii în apă de robinet timp de 15 – 20 min., pentru streptomicete este preferabilă utilizarea soluțiilor apoase de săruri [38, 87, 229].

Celulele care au suferit leziuni în procesul de congelare-uscăre și păstrare se deosebesc prin sensibilitate înaltă față de mediile de reactivare și își restabilesc mai ușor structura pe medii specifice [209].

De regulă, în procesul de liofilizare, este lezat peretele sau membrana celulară și ARN-ul. Celulele liofilizate au *lag* faza de creștere mai îndelungată, însă aceasta revine la normal după 2-3 pasaje sau dacă mediul de cultivare a fost suplinit cu peptide sau aminoacizi [209].

De regulă, la tulpinile de microorganisme păstrate timp îndelungat în stare liofilizată sau prin alte metode este verificată viabilitatea și stabilitatea proprietăților valoroase, în special a productivității de biomasă, proprietăților antimicrobiene, activității biosintetice, etc. [110, 119].

Rezultatele mai multor cercetări au demonstrat, că liofilizarea este o metodă sigură de păstrare a viabilității microorganismelor și a proprietăților valoroase pe o perioadă îndelungată. De exemplu, la Catedra de Microbiologie a Universității de Stat a Moscovei, după păstrare timp de 20 – 25 de ani, speciile genului *Actinomyces* și-au păstrat la nivel înalt viabilitatea și proprietățile morfo-culturale. Actinobacteriile liofilizate – producători ai streptomicinei,

clortetraciclinei și oxitetraciclinei, nu au înregistrat scădere a activității antibiotice timp de 3 – 4 ani [265]. Conform datelor altor savanți ruși, atât microorganismele eucariote, cât și cele procariote și-au păstrat viabilitatea și peste 50 de ani de păstrare, deși titrul a scăzut cu 2 – 3 ordine, cantitatea de celule viabile a fost suficientă pentru restabilirea tulpinilor [231].

Savanții români Coman și Radvan, efectuând studiul păstrării calităților biotehnologice ale tulpinilor de streptomicete *Streptomyces* sp. P7-72, *Streptomyces* sp. P11-118, *Streptomyces* sp. P12-137, de asemenea au recomandat liofilizarea ca metodă eficientă de păstrare a actinobacteriilor, însă au constatat, că actinobacteriile sunt destul de sensibile, față de acest proces, iar compoziția mediului de protecție trebuie selectată pentru fiecare tulpină aparte [46].

Experiințe legate de păstrarea actinobacteriilor au fost efectuate și de alți autori [140, 195, 244, 266].

Astfel, comparând diverse metode de conservare și influența acestora asupra tulpinilor microbiene, putem constata, că liofilizarea este cea mai eficientă metodă de conservare datorită căreia pot fi păstrate calitățile biotehnologice.

Viabilitatea înaltă și stabilitatea activității biosintetice sunt parametrii de bază care sunt monitorizați pe durata conservării și păstrării îndelungate a tulpinilor de microorganisme de interes biotehnologic [119, 208, 222].

Astfel, în CNMN, pe durata a 3 – 5 ani a fost monitorizată viabilitatea, producția de biomasă și activitatea antimicrobiană a tulpinilor de streptomicete păstrate prin transfer periodic, sub ulei mineral și stare liofilizată [27].

În rezultat s-a stabilit că, tulpina *S. levoris* CNMN-Ac-01 avea o capacitate de acumulare a biomasei diferită, în funcție de metoda de păstrare. Astfel, la tulpina păstrată prin transfer periodic productivitatea de biomasă a scăzut cu 23,6%, la cea păstrată sub ulei mineral – cu 15,6%, iar la cea păstrată în stare liofilizată nu s-a modificat [27].

Activitatea antimicrobiană s-a schimbat în felul următor: în urma păstrării tulpinii sub ulei mineral și prin transfer periodic, a scăzut esențial activitatea față de tulpina *Clavibacter michiganensis*, iar în urma păstrării prin toate 3 metode, activitatea față de *Erwinia carotovora*, *Aspergillus niger* și *Alternaria alternata* a scăzut cu 10,0 – 19,0% [27].

La tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02 și variantele ei obținute prin acțiunea razelor γ și UV, păstrate în formă liofilizată, activitatea antimicrobiană a scăzut nesemnificativ față *C. michiganensis*, *A. tumefaciens* și *A. niger* cu doar 6,7 – 7,75% [183].

Liofilizarea este o metodă eficientă de obținere a preparatelor concentrate de microorganisme, astfel volume mici pot conține un număr înalt de celule viabile. După reactivare microorganismele își manifestă rapid activitatea, ceea ce permite economisirea timpului și altor

surse prețioase în cadrul procesului industrial. Pe lângă acest fapt culturile liofilizate nu sunt supuse riscului de variabilitate a populației și apariției mutațiilor spontane, care se pot manifesta la culturile păstrate prin reînsămânțări sau sub ulei. Astfel se evită înlocuirea fenotipului dominant cu altul, care dispune de alte proprietăți și activitate productivă mai scăzută [268].

Microorganismele variază foarte mult în capacitatea lor de a supraviețui pe parcursul liofilizării. În general, bacteriile Gram-pozitive prezintă o rată mai mare de supraviețuire decât bacteriile Gram-negative. De asemenea, se cunoaște că, sporiile sunt mult mai rezistenți decât celulele vegetative, la diferite forme de stres, inclusiv liofilizare [87].

Atunci când un spor găsește condiții favorabile de temperatură, nutrienți și umiditate, se formează tubul germinativ și se dezvoltă hifele. Urmează hifele aeriene și un șir de procese ale ciclului celular. Celulele sporogene pot conține 50 sau mai multe copii ale cromozomului; ordinea, poziția și segregarea cromozomilor în timpul sporulării este liniară, care implică cel puțin două sisteme (ParAB și FtsK), care conduc la diferențierea și separarea celulelor apicale în lanțuri de spori. Mai multe gene importante pentru procesul de sporulare a hifelor aeriene au fost raportate în *S. coelicolor*, de exemplu, genele ca *whiA*, *whiB* și *whiD*. Explicația pentru prezența sporiilor în *Streptomyces* rezidă probabil în faptul, că aceste fragmente miceliale au apărut sub presiune selectivă, ceea ce ar putea implica necesitatea de a supraviețui independent de alte organisme sau în medii extreme.

Capacitatea sporilor de a supraviețui în aceste medii ostile ar trebui să fie în legătură directă cu eliminarea pigmentilor și aromei specifice pentru unele specii, care stimulează dezvoltarea celulelor și producția de metaboliți secundari. Un alt punct important este vârful hifelor, considerat a fi cea mai importantă regiune în care proteinele și lipidele membranare pot fi secretate, în special în zona apicală a creșterii. La unele streptomicete metabolismul secundar și diferențierea pot fi corelate. Din punct de vedere filogenetic, streptomicetele fac parte din actinobacterii, un grup de microorganisme Gram-pozitivi al căror material genetic (ADN) este bogat în GC (70%) comparativ cu alte bacterii, cum ar fi *Escherichia coli* (50%). Importanța deosebită a streptomicetelor se datorează parțial faptului că acestea se numără printre cele mai numeroase și mai versatile microorganisme din sol, având în vedere rata mare de producție a metabolitului și procesele de biotransformare, capacitatea lor de a degrada lignoceluloza și chitina și rolul lor fundamental în ciclurile biologice ale materiei organice [113].

Streptomicetele sunt Gram-pozitive și se înmulțesc prin spori, ceea ce și vorbește în favoarea depozitării lor în stare liofilizată [201]. Pentru congelarea bacteriilor sunt necesare medii de protecție care conțin zaharuri și compuși proteici [1, 68].

Astfel, consultând sursele literare și comparând diverse metode de păstrare și acțiunea acestora asupra culturilor microbiene de interes biotehnologic, putem concluziona că liofilizarea este cea mai optimă și acceptabilă metodă pentru conservarea și păstrarea microorganismelor și proprietăților lor biotehnologice.

Odată cu creșterea importanței metodei de liofilizare a evoluat și aparatajul destinat acestui proces. Primele tipuri de utilaje folosite pentru liofilizare au fost sublimatoarele TG 50 Hochvakuumtechnik Dresden (RDG) și Frigera LZ 45, KS 30 (Republica Cehoslovacă). Aceste sublimatoare au fost folosite pe parcursul a 35 de ani și posedau o serie de neajunsuri ca incomoditatea în folosire și timpul îndelungat de desfășurare a procesului. Un moment pozitiv al aparatelor moderne este că datorită dimensiunilor mici și a ușurinței în exploatare, liofilizatorul poate fi ușor amplasat în laborator [166, 234].

Liofilizatoarele FreeZone Freeze Dry Systems de marca LABCONCO, sunt destinate pentru efectuarea cercetărilor în domeniul liofilizării în incinta laboratoarelor și întreprinderilor industriale. Liofilizatorul FreeZone Plus 12 Liter Cascade Console Freeze Dry System, acest tip de liofilizator poate fi folosit în instituțiile științifice pentru cercetări de păstrare a materialelor biologice (utilajul dat a fost utilizat în cadrul cercetărilor prezente).

Liofilizatoarele de acest tip sunt înzestrate cu interface electronic și accesorii necesari ca procesul de liofilizare să fie ușor monitorizat și să fie desfășurat calitativ. În camera de liofilizare temperatura poate ajunge până la -50°C , iar volumul variază 1 – 18 litri.

Sistemul de condensare în dependență de marcă poate avea un volum de 2.5, 4.5, 6 și 12 litri, iar temperatura poate ajunge până la -84°C . Această temperatură este ideală pentru liofilizarea substanțelor care conțin substanțele de acetonitril.

Datorită sistemului de condensare cu un volum de 4.5 l, și cu o temperatură de la -105°C , poate fi folosit pentru liofilizarea substanțelor diluate cu conținut de metanol sau etanol [56].

1.3. Medii protectoare și de rehidratare pentru liofilizarea microorganismelor și mecanismul acțiunii acestora

Microorganismele pe durata ciclului vital, de regulă, sunt supuse diferitor factori de stres. Stresul reprezintă orice schimbare a condițiilor mediului înconjurător, care duce la scăderea vitezei de creștere sau a viabilității microorganismelor, ce poate duce la modificări esențiale în genom sau proteom. La factori stresanți pot fi atribuiți parametrii sub- sau supraoptimali ai mediului: temperatura, presiunea, pH-ul, iluminarea, compoziția chimică, activitatea apei, etc. Se cunoaște faptul, că celulele care se regăsesc în faza staționară sau se află în stare de anabioză, sunt mai rezistente față de factorii stresanți. Temperaturile joase spre deosebire de pH-ul și

salinitatea nonoptimală nu provoacă denaturarea proteinelor, însă pot induce diferite mutații în genom. Pe parcursul stresului hipotermic are loc stabilizarea structurii secundare a acizilor nucleici, fapt ce duce la stoparea transcripției și translației genelor și inhibiția replicării ADN-ului. De asemenea sub influența stresului hipotermic are loc scăderea activității enzimelor, lichidității membranelor, ce împiedică transportul substanțelor în celulă. Pe lângă cele enumerate, în celulă și la suprafața acesteia se formează cristale de gheață care pot leza organele celulare și duce la pieirea celulei. Cu toate acestea, mecanismul de răspuns al celulei față de factorii stresanți nu este pe deplin cunoscut [7, 141, 196].

Pentru supraviețuirea în condiții nefavorabile ale mediului înconjurător, microorganismele activează un set de mecanisme de protecție. Metaboliții extracelulari, sintetizați de microorganisme, care reglează activitatea acestora se numesc autoregulatori. Din numeroasele funcții ale metaboliților autoregulatori, cele care asigură adaptarea organismului la condiții fizico-chimice nefavorabile ale mediului înconjurător sunt puțin studiate. O serie de microorganisme posedă capacitatea de a sintetiza substanțe de protecție (alchiloxibenzoli). Aceste substanțe stabilizează structura proteinelor, posedă efect membranotrop și efect antioxidant [67, 245]. Sub influența factorilor stresanți are loc sinteza și altor substanțe protectoare ca: terpenelor, poliolilor, betainei și a unor aminoacizi. Pe lângă acesta un rol important le revine lipidelor localizate în membrana celulară. Este cunoscut că în condiții de hipotermie are loc stimularea lipidogenezei pentru asigurarea supraviețuirii tulpinilor de microorganisme, se modifică compoziția fosfolipidelor, sterinelor și acizilor grași. De exemplu, la micromicete sub influența stresului hipotermic cantitatea de acid linolenic crește de 7-11 ori. Pe lângă aceasta se atestă și o creștere a cantității de trigliceride. Autorii consideră, că sub acțiunea factorilor stresanți scăderea temperaturii contribuie la lipidogeneză pentru asigurarea supraviețuirii tulpinii. Astfel, este cunoscut, că în condiții de hipotermie are loc stimularea lipidogenezei pentru asigurarea supraviețuirii tulpinilor de microorganisme. Se modifică compoziția fosfolipidelor, sterinelor și acizilor grași [60, 224].

Natura substanțelor lioprotectoare este foarte variată. Ca agenți protectori pot fi utilizați: aminoacizi (prolina, peptona); alcoolii (glicerol, adonitol, manitol, etilenglicol); săruri (glutamatul de sodiu, tiosulfatul de sodiu); zaharuri (zaharoza, glucoza, lactoza, trehaloza, maltodextrin, polizaharide, xantan); substanțe antioxidante (acid ascorbic, ascorbatperoxidaza); polimeri (dextran, polietilenglicolul, polivinilpirolidon); substanțe complexe (lapte degresat, serul, betaina, adrenalina, must de malț, heteroauxine). Substanțele protectoare după mecanismul de acțiune pot fi divizate în 2 clase: 1) formatori de sticlă amorfă (vitricatori) și 2) substanțe eutectice cristalizante [115, 200, 237, 242].

Formatori de sticlă amorfă sunt carbohidrații, proteinele și polimerii. Acestea sunt lichide suprasaturate și instabile din punct de vedere termodinamic. Aceste substanțe exercită un grad înalt de protecție pe parcursul liofilizării. Formarea structurii sticloase prevede o vâscozitate suficientă pentru imobilizarea moleculelor la maximum. Aceste substanțe au capacitatea de a lega metaboliții celulari care în concentrații mari influențează negativ membrana plasmatică pe parcursul păstrării [57, 64].

Microorganismele pe durata conservării și păstrării îndelungate de asemenea sunt supuse influenței diferitor factori de stres. Dintre acestea pot fi evidențiați: temperatura joasă; modificarea presiunii; deshidratarea și rehidratarea [165, 202]. De asemenea, au loc schimbări ale complexului enzimatic după liofilizare [58, 70].

Numeroși factori influențează asupra eficacității liofilizării microorganismelor: varietatea taxonomică a microorganismului, faza de dezvoltare, mediul și condițiile de cultivare, compoziția mediului lioprotector și titrul celulelor celule în el, temperatura și durata de păstrare, condițiile și mediul de rehidratare. Însă unul din cei mai importanți factori este compoziția mediului protector. Deși, au fost efectuate diferite tentative de liofilizare a microorganismelor (forme vegetative și spori) fără medii lioprotectoare, totuși a fost stabilit, că rata viabilității este cu mult mai înaltă cu aplicarea acestora. Descoperirea faptului, că în prezența glicerolului sau dimetilsulfoxidului viabilitatea microorganismelor conservate este mult mai înaltă, a marcat începutul unei etape noi în criobiologie [88, 92, 129].

Datorită capacității substanțelor eutectice de a lega apa liberă, se evită formarea cristalelor de gheață care pot leza celulele microbiene [77, 199, 259].

Substanțele lioprotective pot fi clasificate după mai multe criterii, dar cel mai răspândit este divizarea substanțelor după masă moleculară. O altă clasificare este gruparea substanțelor după capacitatea de a penetra membrana celulară (30 min.), cum ar fi: metanolul, etanolul, etilenglicolul, propilenglicolul, dimetilformamidul, metilacetamidul, dimetilsulfoxidul, glicerolul. Compușii nepenetranți sunt: mono-, di-, oligo-, polizaharidele, manitolul, sorbitolul, dextranul, amidonul hidroxietilic, celuloza metilică, albumina, gelatina, alte proteine, polivinilpirolidonul, polietilenglicolul, oxidul de polietilen și alcool polivinilic, care asigură protecția extracelulară în concentrație de 10,0 – 40,0%. Permeabilitatea unora dintre aceste soluții, de exemplu glicerolului, depinde în mare măsură de temperatură și structura membranei celulare. Mai mult ca atât, unele substanțe lioprotectoare au capacitatea să penetreze doar peretele celular și nu membrana citoplasmatică [64, 87, 209]. Din acest punct de vedere pot fi evidențiate trei categorii de lioprotectori:

1. capabili să penetreze atât peretele celular, cât și membrana citoplasmatică (dimetilsulfoxidul, glicerolul);

2. capabili să penetreze numai peretele celular (mono- și dizaharidele, aminoacizii, polimerii cu masă moleculară mică, polietilenglicolul-1000);

3. care nu sunt capabili să penetreze nici peretele celular și asigură protecția extracelulară (polimeri cu masă moleculară mare, așa ca proteinele, polizaharidele, oxidul de polietilen, polietilenglicolul-6000, dextranul, amidonul hidroxietilic, polivinilpirolidona) [64, 98].

După cum a fost menționat, substanțele crioprotectante pot fi împărțite în 5 grupe mari: sulfoxizii; alcoolii și derivații acestora; zaharidele și polizaharidele; aminoacizii și acizi carbonici; peptidele, proteinele și glicoproteinele [64].

În continuare este prezentată descrierea grupelor.

Sulfoxizii sunt tioeteri oxidați care conțin un atom de oxigen per moleculă și sunt solubili în apă (grupul S-O în molecula de sulfoxid este chimic inert) [64].

Cea mai utilizată substanță din acest grup este dimetilsulfoxidul, care este un lioprotector universal. Inițial a fost utilizat în calitate de lioprotector pentru conservarea eritrocitelor și a spermatozoizilor. Dimetilsulfoxidul se utilizează la crioconservarea virușilor, bacteriilor, micoplasmelor, chlamidiilor, cianobacteriilor, fungilor, levurilor și protozoarelor [64].

În literatura de specialitate sunt disponibile date cu privire la influența pozitivă a dimetilsulfoxidul capacității biosintetice a microorganismelor. Tulpinile de streptomicete cultivate în prezența concentrațiilor mici de dimetilsulfoxid (3,0%) prezintă modificări calitative și cantitative semnificative în producerea metaboliților secundari: creșterea de 3 ori a tetracenomicinei C și de 2 ori a tiostreptonei. Acest efect a fost observat pentru o serie de tulpini de streptomicete naturale și genetic modificate. Un efect similar a fost observat și la bacteriile *Bacillus circulans* – producători de antibiotice. Astfel, cantitatea de antibiotice sintetizată de *B. circulans* a crescut față de martor pe fundalul menținerii productivității de biomasă [36].

Cele mai recente studii poziționează dimetilsulfoxidul ca un lioprotector eficient. Astfel, dimetilsulfoxidul a fost cel mai eficient agent de protecție pentru liofilizarea și păstrarea tulpinii *S. zagrosensis*, viabilitatea căreia după 6 luni de păstrare în stare liofilizată constituia 99,3% din cea inițială [61].

Alcoolii și derivații acestora. Deși alcoolii și polialcoolii, în special glicerolul, metanolul și glicolul, sunt eficienți în calitate de lioprotectori, utilizarea lor este mai puțin frecventă datorită toxicității lor relative pentru mai multe sisteme biologice. Eficiența metanolului este aproximativ egală cu cea a dimetilsulfoxidului și de regulă se utilizează la crioconservarea levurilor, bacteriilor anaerobe, unor cianobacterii, alge și protozoare. Etanolul,

care este mai puțin toxic, se utilizează mai des și este eficient pentru conservarea microorganismelor procariote și eucariote [64].

Zăharurile și polizaharidele. În literatură sunt disponibile date cu privire la utilizarea diferitor zaharuri în componența mediilor de cultivare a microorganismelor, în special a streptomicetelor. Astfel, acestea îndeplinesc rolul de principala sursă de carbon [24]. În continuare sunt prezentate rezultatele cercetărilor savanților care au utilizat acești compuși în procesul de liofilizare.

În domeniul criobiologiei sunt utilizați astfel de compuși ca: glucoza, xiloza, zaharoza, lactoza, maltoza, trehaloza, rafinoza, dextranul, polizaharidele, inulina, metil celuloze, guma arabică, etc., care servesc în calitate de crioprotectori și lioprotectori eficienți [64, 210].

Glucoza și zaharoza cu succes se utilizează pentru liofilizarea *Streptomyces zagrosensis*, viabilitatea căreia în prezența acestor substanțe constituie în jur de 95,0% [61]. Rezultate similare au fost obținute și pentru alte specii de streptomicete.

În calitate de component al mediilor de protecție sunt des folosite amidonul de cartofi și polizaharidele, utilizat pentru liofilizarea tulpinii *Streptomyces aureofaciens* viabilitatea căreia după liofilizare constituia 65,0-78,0% [167]. Un alt exemplu de utilizare a polizaharidelor (de ginseng) în calitate de lioprotector este suplimentarea laptelui degresat cu acest component în concentrație de 5 % pentru liofilizarea lactobacililor [160].

Aminoacizi și acizi carbonici. Acidul glutamic sau glutamatul de sodiu în concentrație de 1,0 – 5,0%, de regulă în combinație cu alți compuși, cum ar fi glicerina sau laptele degresat, eficiente în calitate de crioprotectori pentru algele din genurile *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nitzschia* și *Phaeodactylum* [64].

Peptide, proteine și glicoproteine. Albuminele sunt utilizate în calitate de crioprotectori în concentrație de 0,1 – 4,0% pentru păstrare de lungă durată, în special a virusurilor și rickettsiilor [64, 196].

Serul sangvin inactivat obținut de la diverse manifere și păsări (vite, cai, oi, iepuri și pui) în concentrația de 10,0 – 20,0% a fost utilizat cu diferit succes pentru crioconservarea virusurilor, bacteriilor, micoplasmelor, cianobacteriilor, levurilor, fungilor filamentoși și protozoarelor. Pe lângă efect crioprotector, serul sangvin sau albumina serică protejează celulele microbiene contra toxicității glicerinei, dimetilsulfoxidului sau altor agenți crioprotectori în timpul congelării-decongelării [64, 197].

Gelatina este un lioprotector utilizat în special pentru a suplimenta alte substanțe lioprotectoare în mediile de protecție. Eficiența de protecție a gelatinei în concentrație de 0,5 – 15,0% a fost demonstrată pentru *E. coli*, *S. platensis* și *S. levoris* [38, 64].

Alt compus utilizat cu succes pentru liofilizare este peptona. În concentrație de 0,4 – 20,0% poate fi utilizată pentru protecția microorganismelor în timpul congelării-decongelării. De regulă, se utilizează peptonă bacteriologică sau microbiologică cu conținut scăzut de sare și cenușă <10,0% g/g. Ca și gelatina, peptona ca diluant pentru microorganisme, care urmează să fie congelate, se utilizează în combinație cu alți lioprotectori, pentru a oferi protecție suplimentară microorganismelor [64, 200].

În literatura de specialitate sunt disponibile date cu privire la utilizare în crioconservarea microorganismelor a proteinelor naturale antifreeze, sintetizate de diferite specii de pești, insecte și plante. Din cauza prețului înalt al acestor substanțe, ele practic nu au obținut utilizare largă [64, 94].

Încă o substanță care poate fi menționată în calitate de lioprotector este mucina, care este un glicoprotein, în care moleculele de polizaharide acide sunt atașate de lanțul polipeptidic. Mediul protector cu 5,0% mucină menține viabilitatea tulpinilor bacteriene [64].

La liofilizarea streptomicetelor este utilizat serul sanguin pentru menținerea de durată a viabilității [21, 61].

Ultima etapă importantă a liofilizării este rehidratarea. Sunt numeroase medii de rehidratare, dar influența acestora asupra viabilității diferă. Prin alegerea corectă a mediului de rehidratare, putem spori nu numai viabilitatea, dar și regenerarea celulelor lezate, datorită prezenței în el a substanțelor nutritive pentru restabilirea funcțiilor celulelor. Un rol important îl joacă și temperatura de rehidratare. Cele mai bune rezultate a viabilității au fost obținute la temperatura de 18-25°C, pentru drojdii se recomandă în jur de 30°C [25, 93]. Există mulți factori care pot afecta starea celulei deshidratate la adăugarea apei pentru rehidratare. În funcție de cultură, pentru rehidratarea streptomicetelor este preferabilă utilizarea unor soluții, dar nu a apei distilate [87].

În calitate de medii de rehidratare pot servi: apa, laptele degresat, zaharoza, soluțiile de săruri, glutamatul de sodiu, zaharoza, apa peptonată, tripton/pepton/extractul de carne [87, 167, 199].

Pentru liofilizarea tulpinilor de streptomicete, Kupletkaia și Netrusov au propus medii lioprotective în baza laptelui degresat și gelatinei: 1,0% gelatină + 10,0% zaharoză; lapte degresat + 7,0% glucoză; lapte degresat. Astfel pentru conservarea streptomicetelor, cele mai bune rezultate ale viabilității au fost obținute la utilizarea în calitate de protector al mediului 1,0% gelatină + 10% zaharoză [231]. Pentru a reduce costul mediului protector, unele protocoale de conservare admit glucoză, care este la fel de eficientă [249].

Pentru a majora eficiența mediilor protective, acestea, de regulă, sunt policomponente. Astfel, a fost stabilit, că viabilitatea lactobacililor și a bifidobacteriilor a fost semnificativ mai mare în prezența polizaharidelor și laptelui degresat concomitent, decât la aplicarea acestora separat [66, 160]. Una din principalele funcții ale exopolizaharidelor este cea de protecție. Acestea contribuie la protejarea celulei de factorii externi, în special la deshidratare [73, 82, 104, 117, 118, 121, 126]. Pe lângă acțiune de protecție exopolizaharidele au și alte funcții, ca antiinflamatorii și antitumorale [128].

Se consideră că, o simbioză eficientă în cadrul populației de ghețari, se formează între microorganismele hetero- și fototrofe. Heterotrofele remineralizează substratul, producând substanțe pentru ulterioara activitate a fototrofilor. La rândul său, cianobacteriile sintetizează mucusul polizaharidic care protejează celulele microorganismelor heterotrofe la congelare. Un rol important în activitatea psihrofilelor îl joacă proteinele lioprotectoare, care permit funcționarea normală a celulei [175].

Unii aminoacizi de asemenea, au demonstrat eficiența sa în calitate de crioprotectori. Un exemplu elocvent poate servi utilizarea hidroxiprolinei în concentrația de 12,0% pentru păstrarea viabilității *Lactobacillus rhamnosus*, care constituia 55,84% [84].

În calitate de sursă de aminoacizi și polizaharide, este rațională utilizarea cianobacteriei *Spirulina platensis*, cheltuielile pentru obținerea principiilor bioactive menționate sunt reduse [99, 123].

Savanții exprimă un interes tot mai înalt față de cianobacterii, care sunt foarte atractive după următoarele criterii: viteză mare de creștere, productivitate înaltă, compoziție biochimică valoroasă și metabolism sporit [123]. Cianobacteriile sunt producători de așa compuși ca: aminoacizi, polizaharide, lipide, antibiotice, hormoni, carotenoizi, hidrogenaze, alcooli, izoprenoizi ș.a. Producții menționați sunt pe larg utilizați în: zootehnie, fitotehnie, farmaceutică, industrie alimentară, cosmetologie, etc. [2, 19, 48, 53, 79, 85, 105, 112, 125, 205, 206].

Spirulina este un producător performant de proteine, antioxidanți și vitamine, care se utilizează ca aditivi alimentari și furageri în hrana omului și animalelor [246].

Cianobacteriile sunt o sursă ideală pentru obținerea diferitor substanțe biologice active pentru diverse domenii ale economiei. Polizaharidele cianobacteriene de asemenea se referă la acest tip de substanțe și reprezintă o clasă importantă de substanțe polimerice renovabile, de interes biotehnologic. Din punct de vedere structural, polizaharidele cianobacteriene sunt mai valoroase față de cele obținute din plantele superioare și macroalge, datorită prezenței grupurilor funcționale sulfatate [123].

În compoziția polizaharidelor cianobacteriene intră astfel de monomeri ca: galactoză, xiloza, fructoză, ramnoza, arabinoza, manoză, acizii galacturonic și glucuronic [148]. Substanțele enumerate se utilizează cu eficiență în procesul de liofilizare [64]. Cianobacteriile produc o mare varietate de oligopeptide bioactive, au un rol ecologic și fiziologic important, însă mecanismul de sinteză a acestora sub influența factorilor mediului înconjurător sunt puțin studiate [102, 103].

Cele expuse mai sus argumentează necesitatea și importanța investigațiilor ce țin de evaluarea posibilității de utilizare a extractelor de origine cianobacteriană la elaborarea mediilor protectoare pentru conservarea și păstrarea tulpinilor de interes practic și științific.

În calitate de substanțe crioprotectoare pot fi utilizate și cele cu proprietăți polifuncționale. Acestea sunt prezentate de dehidrinele din plante [62, 179]. O direcție nouă în cadrul criobiologiei este utilizarea principiilor de origine vegetală în calitate de componente a mediilor de protecție pentru liofilizare. Conform surselor literare, utilizarea substanțelor biologice active cum sunt glicozidele în tehnologiile moderne are o mare importanță practică și este determinată de mai multe proprietăți ale acestor substanțe: influențarea proceselor de creștere și dezvoltare a plantelor, acestea pot accelera semnificativ creșterea și productivitatea culturilor agricole, totodată determinând rezistența acestora la factorii de mediu nefavorabili (secetă sau umiditate în exces, temperatură mărită sau scăzută) și rezistența nespecifică a plantelor la un număr mare de agenți fitopatogeni [169, 180, 181].

Glicozidele steroidale vegetale sunt incluse în lista preparatelor aprobate pentru utilizare în Moldova, Rusia, Ucraina și alte țări europene. Acestea sunt utilizate cu succes ca reglatori de creștere a plantelor agricole. Însă disponibilitatea lor este destul de scăzută deoarece sursele de obținere sunt relativ limitate, ceea ce a determinat extinderea gamei reprezentanților florei sălbatice din Moldova utilizate ca sursă de glicozide [251-254].

Direcția de cercetare este relevantă deoarece substanțele biologice active de origine vegetală datorită accesului relativ la obținere, ușurința de utilizare, doze mici de aplicare și capacitate de protejare contra șocurilor termice poate fi atribuită elementelor din cadrul microbiologiei și criobiologiei [178, 238, 239, 252]. Este evident faptul că, acesta este un plus în cadrul cercetării liofilizării pentru a asigura păstrarea tulpinilor de microorganisme pe o perioadă îndelungă.

Conform analizei surselor literare, utilizarea metaboliților de origine cianobacteriană și vegetală în calitate de supliment la mediul de liofilizare utilizat în colecție (gelatină 2,5% + glucoză 7,5%) pentru păstrarea tulpinilor de streptomicete, reprezintă o oportunitate importantă de perfecționare a procesului de păstrare a tulpinilor de interes biotehnologic.

1.4. Concluzii la capitolul 1

1. Principalele metode de conservare și păstrare a tulpinilor de microorganisme de interes științific și practic sunt: transferul periodic; plasarea sub strat de ulei mineral; uscarea; conservarea și păstrarea la temperaturi joase și ultrajoase (crioconservarea și liofilizarea).

2. Tulpinile din genul *Streptomyces* produc numeroase substanțe biologice active, care sunt utilizate în cele mai diverse domenii. Deoarece aceste tulpini posedă un grad înalt de variabilitate, liofilizarea este metoda potrivită pentru conservarea acestui grup de microorganisme, ce permite reducerea la zero a numărului de reînsămânțări și păstrarea materialului biologic în stare de anabioză.

3. Liofilizarea, în special pentru streptomicete, oferă următoarele avantaje comparativ cu alte metode de păstrare: termenul de păstrare lung, comoditate în manipularea cu probele liofilizate, păstrarea la temperatura camerei sau frigider, reducerea riscului apariției mutațiilor genetice, diminuarea riscului scăderii sau pierderii activității biosintetice a tulpinii, iar selectarea corectă a mediilor de protecție și a parametrilor optimi face rentabil procesul din punct de vedere economic.

4. Principalele grupe de substanțe crioprotectoare (lioprotectoare) sunt: sulfoxizii; alcoolii și derivații acestora; zaharurile și polizaharidele; aminoacizii și acizii carbonici; proteinele, peptidele și glicoproteinele. Aceste substanțe au capacitatea de a lega apa liberă, evitând formarea cristalelor de gheață, de a reduce și egala presiunea osmotică, posedă efect de stabilizare a membranelor celulare și antioxidant ce oferă protecție față de radicalii liberi.

Analiza surselor bibliografice relevante la tema tezei a permis de a formula **problema de cercetare** care a fost pusă în fața acestei lucrări: necesitatea perfecționării metodelor de păstrare a tulpinilor de streptomicete din Colecția Națională de Microorganisme Napatogene prin utilizarea preparatelor naturale obținute din biomasa cianobacteriană și vegetală, în calitate de agenți lioprotectori în componența mediilor pentru liofilizarea culturii.

2. OBIECTUL DE STUDIU ȘI METODELE APLICATE ÎN CERCETARE

Investigațiile, rezultatele cărora sunt prezentate în această lucrare au fost realizate pe parcursul anilor 2015-2018, în cadrul Colecției Naționale de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie.

2.1. Obiectul de studiu

În studiu a fost utilizată tulpina *Streptomyces canosus* (Krasilnikov, 1970), depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a IMB, în calitate de producător valoros de metaboliți secundari, cu atribuirea cifrului *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02.

Poziția sistematică: Domeniul – *Bacteria*, Regnul – *Eubacteria*, Filumul – *Actinobacteria*, Clasa – *Actinobacteria*, Ordinul – *Actinomycetales*, Familia – *Streptomycetaceae*, Genul – *Streptomyces* (Waksman and Henrici, 1943).

Caracterele morfo-culturale ale tulpinii: Sporoforii sunt spiralați cu 3 – 5 bucle deschise, așezate monopodial, spori – de formă ovală, alungiți, cu mici butoni pe suprafață. Miceliul aerian de nuanță gri deschisă, cenușie. Miceliul de substrat – de culoare brună, brun deschis, galben-crem, pigmenți melanoizi nu formează.

Particularitățile fiziologice și biochimice ale tulpinii: Gram+. Coloniile și culoarea miceliului aerian și de substrat variază în dependență de mediile de cultivare. Slab lichefiază gelatina, peptonizează laptele, hidrolizează amidonul, reduce nitrații până la nitriți, nu formează H₂S, nu crește pe celuloză. Asimilează glucoza, manoză, fructoza, galactoză, maltoză, ramnoză, manitolul, inozitolul, xiloza, zaharoza, amidonul. Nu asimilează arabinoză, lactoză, rafinoză, sorbitolul, inulina, acetatul și citratul de natriu. Antagonist slab al bacteriilor Gram+ și Gram- și a unor fungi.

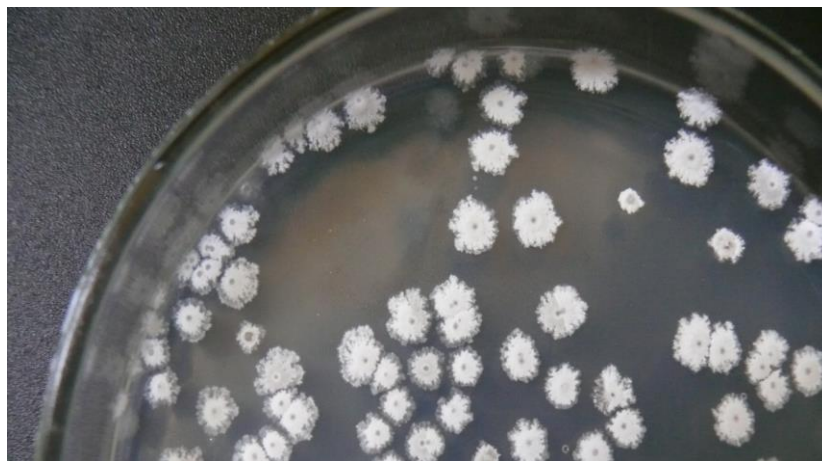


Fig. 2.1. Aspectul coloniilor tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02

Parametrii productivi ai tulpinii: Valorile acumulării BAU pe mediu M-I sunt cuprinse între 5,40 – 7,86 g/l; a lipidelor – 0,41 – 0,64 g/l; a fosfolipidelor – 11,9 – 12,8% față de lipidele comune; a sterinelor – 14,5 – 15,1% față de lipidele comune; a aminoacizilor – 38,28 mg/100mg, acizi grași nesaturați: C_{18:1} – 22,7%, C_{18:2} – 34,5%.

2.2. Medii, condiții și preparate pentru cultivarea și păstrarea tulpinii

Medii și condiții de cultivare

Conform literaturii de specialitate, continuă să se dezvolte o abordare științifică în ce privește pregătirea unor medii nutritive echilibrate, luând în considerație necesitățile individuale ale fiecărei dintre tulpinile studiate de microorganisme. Un mediu nutritiv echilibrat presupune o compoziție calitativă și cantitativă care satisface nevoile culturii, asigură o producție maximă de biomasă la o anumită rată cu concentrații minime de reziduri. Concentrația de azot în mediul nutritiv are un efect semnificativ asupra creșterii și dezvoltării celulei microbiene, scăderea cantității de azot duce la stimularea semnificativă a sintezei lipidelor de către microorganisme, dar reduce randamentul biomasei. Studiul influenței surselor de lipide exogene: soia, porumb, extracte vegetale asupra creșterii și acumulării biomasei și a lipidelor din ea a arătat că compoziția lipidelor totale este o reflectare a două procese: sinteza lipidică de novo și asimilarea exogenă a lipidelor, care trebuie luate în considerare la cultivarea microorganismelor. Se remarcă semnificația componentelor minerale ale mediului pentru cultivarea actinomicitelor și se crede că cea mai bună sursă de azot este (NH₄)₂SO₄, de potasiu – H₂PO₄; de calciu – CaCO₃; de sodiu – NaCl. Dintre mediile nutritive destinate cultivării actinomicitelor, sunt utilizate pe scară largă mediile Dulaney, Prus, Czapek cu glucoză sau medii organice complexe, în care sunt utilizate pe scară largă sursele de carbon - făină de soia, făină de porumb, etc, diferiți aditivi, melasă, drojdie de panificație și extract [182, 212].

Inoculul tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 a fost obținut la cultivare pe mediul Dulaney, în retorte Erlenmeyer (1 L) cu 200 ml mediu, timp de 3 zile, la temperatura de 28°C. Pentru acumularea biomasei, tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02 a fost cultivată în retorte Erlenmeyer (1 L) cu 200 ml mediu, timp de 5 zile, pe agitator, la temperatura de +28°C pe mediul M-I. Pentru studiul caracterelor morfologice a fost utilizat mediu Czapek, iar pentru păstrarea îndelungată pe medii solide – mediul cu ovăz. Componenta mediilor utilizate este prezentată în Fig. 2.2.

Mediul Dulaney (lichid) Glucoză – 20,0 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 7,5 g/l K_2HPO_4 – 2,0 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0 g/l NaCl – 5,0 g/l CaCl_2 – 0,4 g/l $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 g/l $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 g/l pH – 7,0		Mediul Czapek: Glucoză – 20,0 g/l NaNO_3 – 2,0 g/l K_2HPO_4 – 1,0 g/l MgSO_4 – 0,5 g/l KCl – 0,5 g/l FeSO_4 – 0,01 g/l Agar-agar – 20 g/l pH – 7,0-7,3
Mediul M-I (lichid): făină de porumb – 20,0 g/l CaCO_3 – 1,5 g/l drojdii de panificație – 5,0 g/l pH – 7,0		Mediul de ovăz: făină de ovăz – 40,0 g/l Agar-agar – 20,0 g/l pH – 7,0-7,3

Fig. 2.2. Componenta mediilor de cultură utilizate în studiul tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02

Mediul protector pentru liofilizare

Liofilizarea se bazează pe congelarea preliminară a materialului biologic în timpul căreia se formează cristale de gheață, care provoacă diverse leziuni ale celulelor vii. Pentru a minimiza acest prejudiciu de regulă sunt utilizate diverse substanțe protectoare. Dintre acestea fac parte alcoolii, carbohidrații, polizaharidele, aminoacizii, diverse substraturi de natură complexă, precum laptele degresat, mierea, extractul de drojdie.

Laptele degresat și zaharurile sunt lioprotectori tipici în cadrul colecțiilor și se utilizează la liofilizarea microorganismelor. Zaharurile și polizaharidele stabilizează membranele celulare printr-un mecanism de legare a apei și interacțiune cu fosfolipidele membranare. Laptele degresat este capabil de a preveni leziunile celulare prin formarea unui strat protector în jurul membranelor. În CNMN pentru liofilizarea streptomicetelor se utilizează medii de protecție în baza laptelui degresat sau gelatinei în îmbinare cu zaharoza sau glucoza.

Rehidratarea microorganismelor de asemenea reprezintă o etapă importantă în procesul liofilizării și servește pentru revitalizarea celulelor. Pentru rehidratare sunt utilizate apa distilată sau diverse soluții izotonice ale sărurilor minerale. Uneori combinarea mediului protector cu cel de rehidratare rezultă în majorarea semnificativă a viabilității microorganismelor.

Pentru păstrarea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 în stare liofilizată, în urma unui screening al mediilor uzuale, a fost selectat mediul protector de bază cu următoarea componență: H₂O distilată – 100 ml, gelatină – 2,5 g, glucoză – 7,5 g. Mediul este sterilizat timp de 20 min., la presiunea 0,5 atm.

Extracțele vegetale

În studiu au fost utilizate extracțe glicozidice vegetale, obținute în Laboratorul Bioreglatori Naturali al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor (dr. în chim., cerc. șt. coord. Mașcenco Natalia).

Glicozidele iridoidice au fost extrase din planta *Linaria genistifolia* L. Mill (partea aeriană), prin fierbere în soluție hidrometanolică [83].

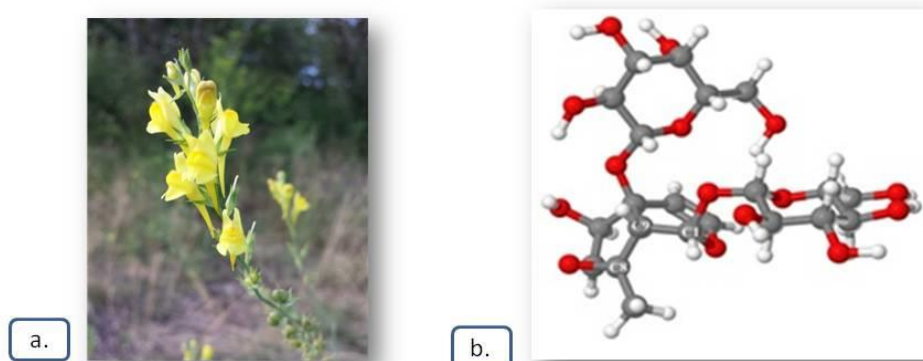


Fig. 2.3. *Linaria genistifolia* L. Mill: a – aspect extern al plantei, b – structura chimică a glicozidelor iridoidice

Flavonoidele au fost extrase din partea aeriană a plantei *Verbascum phlomoides* L., prin fierbere în soluție hidrometanolică [6].

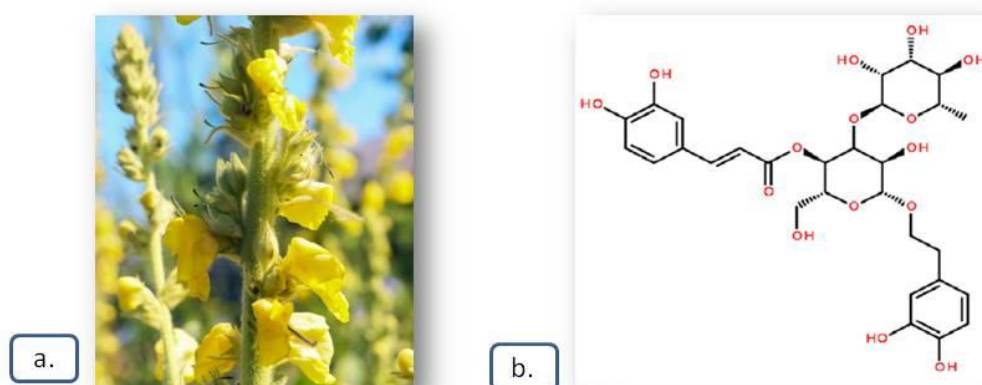


Fig. 2.4. *Verbascum phlomoides* L.: a – aspect extern al plantei, b – structura chimică a glicozidelor iridoidice

Extractele cianobacteriene

În studiu au fost utilizate preparatele BioR (complex de aminoacizi și peptide) și PSS_{Zn} (complex de polizaharide sulfatate cu zinc), obținute în Laboratorul Ficobiotehnologie al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie sub conducerea academicianului Rudic Valeriu. Preparatele au fost obținute prin procedee biotehnologice de extragere, fracționare și purificare a principiilor bioactive din biomasa tulpinii cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie. Extractele conțin, în raport cu tehnicile de procesare a biomasei, aminoacizi liberi și legați (oligopeptide și proteine), produși intermediari ai metabolismului glucidic și lipidic, macro- și microelemente esențiale [122-124].

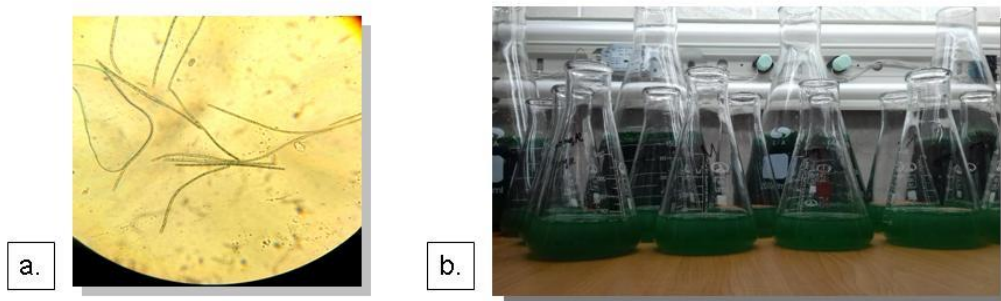


Fig. 2.5. Cianobacteria *Spirulina platensis* CNM-CB-02: a - aspect microscopic (MO, x 400); b - cultivare în condiții de laborator

2.3. Metodele de cercetare

Pentru realizarea cercetărilor au fost utilizate metode de determinare cantitativă a germenilor viabili și a biomasei de streptomicete, de studiu al proprietăților morfo-culturale ale tulpinilor de streptomicete, de separare, analiză cantitativă și calitativă a lipidelor, de liofilizare a biomasei de streptomicete, de analiză statistică a rezultatelor obținute.

Metoda calculului logaritmice al viabilității culturii studiate

Determinarea încărcăturii de germeni viabili prin însămânțarea pe medii de cultură solide, conform metodei Koch, se bazează pe faptul, că fiecare celulă viabilă determină formarea unei colonii atunci, când suspensia din materialul de analizat este etalată pe suprafața unui mediu solid specific. Celulele, care determină formarea de colonii, se numesc unități formatoare de colonii (UFC) și numărul lor este aproximativ egal cu numărul de celule microbiene din probă.

Determinarea viabilității conform acestei metode cuprinde 3 etape:

1. Prepararea diluțiilor succesive: pentru micșorarea densității celulelor de microorganisme se pregătesc diluții succesive conform schemei din Fig. 2.6. Numărul diluțiilor depinde de densitatea celulelor utilizate în suspensie.

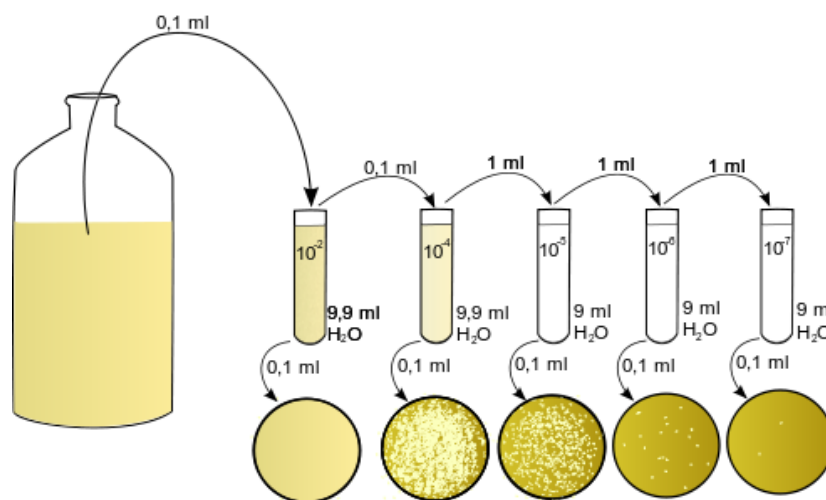


Fig. 2.6. Prepararea diluțiilor succesive pentru însămânțarea pe medii de cultură solide

2. Însămânțarea suspensiei pe mediu agarizat: în cutii Petri sterile se toarnă mediu nutritiv agarizat și se termostatează timp de 2 – 3 zile pentru înlăturarea umidității excesive. Însămânțarea în cazul tulpinilor din genul *Streptomyces* se efectuează pe suprafața mediului agarizat: 1,0 ml suspensie se repartizează cu ajutorul spatulei pe întreaga suprafață a mediului agarizat. Însămânțarea se efectuează din ultimele 3 diluții, în 2 – 4 repetări. După însămânțare cutiile Petri sunt plasate în termostată la $t^{\circ}=28^{\circ}\text{C}$.

3. Calculul numărului coloniilor formate și a viabilității tulpinii. Calculul numărului de colonii ale tulpinilor din genul *Streptomyces* se realizează după 7 – 14 zile de termostatare (în dependență de viteza de creștere a tulpinii studiate).

✓ Numărul de celule în 1 ml de suspensie se calculează după formula:

$$M = a \cdot 10^n / V, \quad (2.1)$$

unde: M – nr. de celule în 1 ml de suspensie; a – numărul mediu de colonii; V – volumul de suspensie luat pentru însămânțare, ml; 10^n – coeficientul de diluare [241].

✓ Viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 se calculează conform formulei:

$$\% \text{ Viabilitatea} = (\log DL / \log PL) \times 100, \quad (2.2)$$

unde: Viabilitatea – rata viabilității este raportul dintre logaritmul numărului de celule viabile DL (după liofilizare) și numărul de celule viabile PL (până la liofilizare) înmulțit cu 100% [89].

Metoda de determinare cantitativă a biomasei de streptomicete

Analiza cantitativă a biomasei de streptomicete a fost realizată prin metoda gravimetrică, ce presupune următoarele etape:

- separarea biomasei de lichidul cultural prin centrifugare la 5000 rot./min., timp de 20 min.;
- spălarea biomasei cu apă distilată și centrifugarea repetată;
- uscarea biomasei la temperatura +100°C până la obținerea unei mase constante;
- cântărirea la balanța analitică [78].

Studiul proprietăților morfo-culturale ale tulpinilor de streptomicete

Caracterele morfo-culturale ale tulpinilor de microorganisme se determină prin examinarea coloniilor de pe suprafața mediilor agarizate în cutii Petri. Acestea prezintă o mare diversitate, uneori cu particularități semnificative pentru identificarea unor genuri sau specii de bacterii. De obicei, examinarea coloniilor se face la culturi tinere, de 18 – 24 ore, însă ținând cont de particularitățile de dezvoltare ale speciilor din genul *Streptomyces*, coloniile pot fi studiate peste o perioadă de minimum 7 – 10 zile.

Studiul se efectuează conform următoarelor caractere ale coloniilor:

Mărimea se apreciază pentru coloniile bine dispersate, deoarece la o densitate mare, acestea se reduc în dimensiuni.

Clasificarea coloniilor după mărime:

- *colonii mari* cu diametrul de 4 – 6 mm;
- *colonii mijlocii* cu diametrul de 1 – 3 mm;
- *colonii mici* cu diametrul mai mic de 1 mm uneori cu aspect punctiform, abia vizibile cu ochiul liber.

Forma coloniilor poate fi de următoarele tipuri: punctiformă; circulară; lenticulară; neregulată; filamentoasă; filiformă; rizoidă; dendrică.

Relieful (profilul) coloniilor poate fi: plat; convex; bombat; ombilicat; acuminat; crateriform, papilat [55].

Marginea coloniilor poate avea următoarele tipuri: netedă; ondulată; lobată; zimțată; ciliată; filamentoasă, ondulat invazivă.

Culoarea coloniilor a fost descrisă după scara de culori adoptată de Bondarțev. Analiza a fost efectuată ținând cont atât de culoarea pigmentului nedifuzibil, care influențează culoarea coloniei, cât și a celui difuzibil, cu proprietatea de a colora mediul agarizat [55, 176, 234, 235].

Extragerea și determinarea cantitativă a lipidelor din biomasă

Lipidele din biomasa tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 au fost extrase după metoda Folch, modificată și descrisă în [26].

Metoda presupune următoarele etape:

- prelucrarea biomasei cu amestecul de cloroform : etanol (3:1), agitarea timp de 15 min.;
- prelucrarea biomasei cu cloroform curat, astfel ca raportul final de cloroform : etanol devine (2:1), agitarea timp de 15 min.;
- separarea prin hârtie de filtru a biomasei de soluția cloroform : etanol cu conținut de lipide;
- separarea cloroformului de alcool în pâlnia de separare, prin adăugarea apei (5 repetări);
- uscarea de apă a cloroformului cu lipide prin filtrarea acestuia prin Na₂SO₄ dehidratat;
- evaporarea cloroformului la rotor-evaporator, după care lipidele pot fi cântărite și folosite în scopurile necesare.

Identificarea fracțiilor lipidice

Compoziția calitativă și cantitativă a fracțiilor lipidelor sintetizate a fost determinată prin metoda cromatografiei în strat subțire.

- se realizează pe plăci de silufol 100x150 mm Sorbfil (Krasnodar, Federația Rusă);
- cu ajutorul capilarului pe linia de start se aplică picături în concentrații (proporții) egale a probelor de lipide de streptomicete dizolvate în cloroform cu ulterioara evaporare a cloroformului;
- în camera cromatografică se toarnă faza mobilă: sistemul hexan – eter dietilic – acid acetic glacial (73:25:5);
- placa cromatografică cu probele aplicate este plasată în camera cromatografică cu nivelul solventului mai jos de linia de start;
- după trecerea fazei mobile prin placa cromatografică până la linia de front (10 mm până la margine), placa se extrage din camera cromatografică și se usucă;
- pentru vizualizarea urmelor lăsate de fracțiile lipidice, placa este stropită cu ajutorul pulverizatorului cu o soluție de 10,0% de acid fosfomolibdenic dizolvat în etanol și uscată în dulapul de uscare la temperatura 70-75°C;
- pentru determinarea cantitativă, se măsoară densitatea optică a urmelor fracțiilor lipidice la densimetru DIO-1M, predestinat măsurării densităților optice în lumina reflectată a plăcilor alb-negre și colorate în diapazonul de 0,0-2,5 B (bel), recalculat pentru exprimare în % [26].

Liofilizarea și reactivarea streptomicetelor

Procesul cuprinde 3 etape, conform schemei prezentate în Figura 2.7.

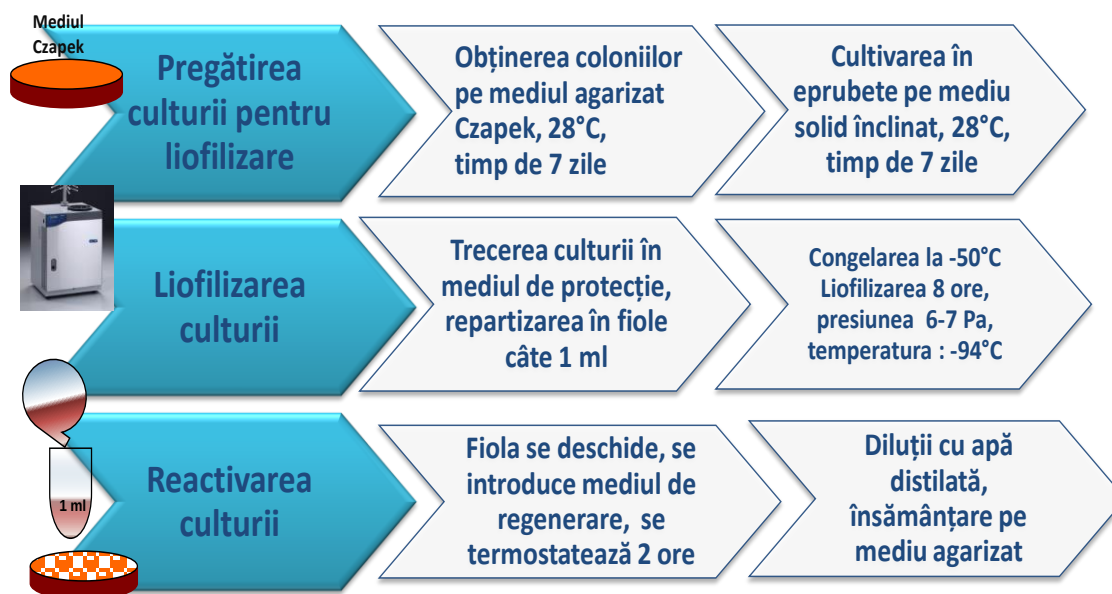


Fig. 2.7. Etapele respectate în procesul de liofilizare și reactivare a tulpinilor de streptomicete

1. Pregătirea culturii pentru liofilizare presupune următoarele lucrări:

- Însămânțarea streptomicetelor pe mediul agarizat Czapek (termostatarea la temperatura de +28°C, timp de 7 zile);
- După obținerea coloniilor izolate, acestea sunt însămânțate în eprubete cu mediul agarizat Czapek înclinat (termostatarea la temperatura de +28°C, timp de 7 zile);
- Ulterior, conținutul eprubetei se spală în mediul protector, iar soluția obținută, din retorta Erlenmeyer se repartizează în fiole a câte 1 ml, care se închid cu dop de cauciuc [166].

2. Liofilizarea

- Conținutul fiolelor se congelează la -50°C;
- Ulterior, fiolele sunt depuse în camera de vacuum a liofilizatorului Labconco 6 plus, liofilizarea are loc timp de 8 ore, la presiunea de 6-7 Pa și temperatura de -94°C;
- La sfârșitul procesului de liofilizare, fiolele sunt sigilate cu dopuri de metal [229].

3. Reactivarea culturii

- Fiola se deschide și treptat, picătură-cu-picătură se introduce mediul de regenerare (apă distilată), viteza de regenerare trebuie să fie ~o picătură/minut;
- Fiolele cu culturile rehidratate sunt puse în termostată pentru incubare timp de 2 ore;

- După incubare conținutul fiolei este introdus în eprubetă cu apă distilată, pentru efectuarea diluțiilor și însămânțarea în cutii Petri pe mediul agarizat Czapek [225, 241].

Analiza statistică a datelor

Rezultatele experimentale au fost supuse analizei statistice uzuale cu aplicarea instrumentelor statisticii descriptive (calculul mediilor aritmetice, abaterilor standart, coeficientului de variație) și statisticii inferențiale (testele de valabilitate și testele de semnificație). Calculul indicatorilor statistici a fost efectuat utilizând posibilitățile programului MS Excel 2010.

2.4. Concluzii la capitolul 2

1. În calitate de obiect de studiu în această lucrare a fost utilizată tulpina de colecție *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene, în calitate de producător valoros de metaboliți secundari cu posibilitate de aplicare în zootehnie și fitotehnie.

2. Pentru stimularea productivității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02, precum și pentru optimizarea procesului de păstrare a ei, au fost utilizate: 1) principii bioactive de origine cianobacteriană BioR și PSS_{Zn}, obținute din *Spirulina platensis* CNM-CB-02; 2) glicozide de origine vegetală, extrase din plantele *Linaria genistifolia* L. Mill și *Verbascum phlomoides* L.

3. Metodele microbiologice și biochimice de evaluare a parametrilor productivi ai tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 în prezența principiilor bioactive de origine vegetală și cianobacteriană sunt orientate spre obținerea de noi date referitor la metabolismul streptomicetelor sub influența stimulatoarelor.

4. Metodele clasice de studiu al proprietăților morfo-culturale ale tulpinii sunt aplicate pentru argumentarea oportunității utilizării principiilor de origine cianobacteriană și vegetală în procesul de liofilizare și reactivare a tulpinilor de streptomicete, păstrate în Colecțiile de Microorganisme.

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

Interesul și motivarea pentru studiul actinobacteriilor din genul *Streptomyces* sunt determinate de răspândirea lor largă, toleranța la diferite condiții de mediu și rolul acestor microorganisme în producerea metaboliților secundari valoroși. În acest context este importantă evidențierea noilor căi de stimulare a 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 [38].

Alegerea metodelor adecvate de conservare a fiecărui grup de microorganisme este una dintre principalele sarcini ale Colecțiilor de Microorganisme. Liofilizarea și crioconservarea sunt în prezent metodele cele mai des utilizate de către centrele de resurse microbiene pentru păstrarea pe termen lung a microorganismelor [87, 199, 209].

Liofilizarea, metoda cea mai utilizată pentru conservarea tulpinilor de streptomicete, și-a demonstrat eficacitatea în numeroase cercetări. Însă, de rând cu avantajele ce le oferă această metoda de păstrare, procesul de congelare și deshidratare rămân a fi un factor stresant pentru celulele vii. Reacția de răspuns a microorganismelor la factorii de stres presupune o serie de procese celulare distructive: creșterea permeabilității membranei citoplasmatică pentru compuși cu greutate moleculară mică, eliminarea proteinelor din celulă, lezarea ribozomilor, distrugerea acizilor nucleici, inhibarea proceselor catabolice, inactivarea enzimelor, acumularea formelor active de oxigen și a produselor oxidării lipidelor, pierderea proprietății de a crește și forma colonii pe medii agarizate, micșorarea vitezei de creștere și reducerea activității vitale [245].

Primul criteriu utilizat de către microbiologi pentru determinarea stării fiziologice a culturii supuse stresului este viabilitatea celulelor. Potrivit experților din domeniu, viabilitatea redusă a microorganismelor în timpul depozitării poate fi cauzată de formarea radicalilor liberi. Unii autori consideră, că apariția lor este determinată atât de schimbarea raportului dintre diferitele forme de apă din celulă, cât și prin distrugerea lanțurilor de polipeptide. Alți autori explică acest proces prin efectul nociv al reacțiilor de oxidare. Astfel, atât radicalii liberi, cât și produsele de oxidare ale lipidelor, prin interacțiunea cu componentele celulare, duc la leziuni, provocând moartea celulelor [20, 64, 87, 100, 101].

Microorganismele dezvoltă diverse sisteme de adaptare, inclusiv sinteza produselor de autoreglare extracelulare, responsabile de declanșarea răspunsului organismului la factorii de

stres [243]. Microorganismele solului, inclusiv streptomicetele, dezvoltă sisteme senzoriale complicate pentru detectarea factorilor de mediu și inițierea mecanismelor de răspuns adecvate [149].

Ținând cont de specificul fiecărui grup de microorganisme și reacțiile de răspuns ce le dezvoltă la acțiunea diverșilor factori, în procesul liofilizării culturii este necesară utilizarea mediilor de protecție corespunzătoare pentru a evita distrugerea celulei. Deși, nu există o formulă de aur pentru mediile de liofilizare, este știut faptul, că includerea în componența lor a unor componente adiționale minuțios selectate (săruri minerale, proteine, polizaharide, antioxidanți etc.) poate ameliora starea celulelor supuse congelării și dehidratării. Alegerea agenților de lioprotecție are un impact colosal asupra supraviețuirii culturilor sensibile de microorganisme în procesul liofilizării și asigurării viabilității și stabilității lor genetice.

O particularitate importantă a streptomicetelor este strategia lor de supraviețuire în condiții de stres fiziologic prin capacitatea de a produce spori. Exosporii hidrofobi ai streptomicetelor au nu numai funcția de păstrare a materialului genetic în anumite condiții nefavorabile, ci sunt adaptați și realizează procesul de dispersare în mediu.

Latența microorganismelor este considerată crucială în studiul mai multor aspecte din cadrul științelor biologice, cum ar fi: apariția formelor vii, determinarea criteriilor de materie vie, mutageneza adaptivă, heterogenitatea populației, care la rândul său are o importanță majoră pentru conservarea și păstrarea microorganismelor. În faza de latență, o importanță majoră o are echipamentul biochimic al sporilor și, în particular, compoziția peretelui celular. Astfel, în peretele celular au fost identificate substanțe care protejează sporul de diverși factori nefavorabili ai mediului: aminopolizaharide, glucani, proteine, lipide, etc. [146, 264].

În același timp, majoritatea macromoleculelor necesare pentru activitatea celulară sunt pre-sintetizate înainte de starea de dormanță a sporilor. În lipsa apei, aceste molecule se află în stare inactivă, însă stabilizarea și protejarea lor este asigurată de trehaloză – o dizaharidă nereducătoare, capabilă să substituie apa în condiții de desecare. Acest compus cu rol multiprotector se găsește în abundență în sporii streptomicetelor, asigurând supraviețuirea lor în condiții de congelare, deshidratare, radiație, stres oxidativ. În același timp, hidroliza trehalozei reprezintă o etapă importantă în procesul de germinare a sporilor, asigurând substratul energetic intern pentru reacțiile inițiale de restabilire a proceselor metabolice [5, 18, 65].

Tehnicile analitice moderne au permis detectarea compuşilor celulari autoregulatori, cu rol major în inhibarea sau stimularea germinării sporilor streptomicetelor. În calitate de inhibitori ai germinării sporilor au fost identificați germicidina A – un autoregulator interspecific și calcone – molecule de semnalizare importante în simbioza streptomicetelor cu plantele. A fost

demonstrat, că unele antibiotice ale streptomicetelor (streptomicina, actinorodina, neomicina) sunt produse în procesul de sporulare și eliminate în exterior în timpul germinării sporilor pentru a proteja sporul până la reactivarea proceselor metabolice interne [4]. Germinarea sporilor este însoțită și de sporirea cantității giberelinelor, conform cercetărilor raportate de specialiștii din domeniu [264].

În practica microbiologică este recomandată utilizarea stimulatoarelor pentru germinarea sporilor: aminoacizi, monozaharide, adenzin monofosfat ciclic, etc. Tendințele actuale de valorificare a resurselor naturale în toate ramurile activității umane înaintază pe primul plan cercetările legate de utilizarea stimulatoarelor de origine naturală în procesele biotehnologice. Un rol important în acest sens le revine preparatelor obținute în baza organismelor autotrofe, cum sunt de exemplu cianobacteriile sau plantele superioare.

În figura 3.1. este prezentată schema experiențelor realizate la acest capitol, în vederea evidențierii acțiunii unor astfel de preparate asupra viabilității tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 la utilizarea lor în componența mediilor de liofilizare și reactivare a culturii liofilizate.

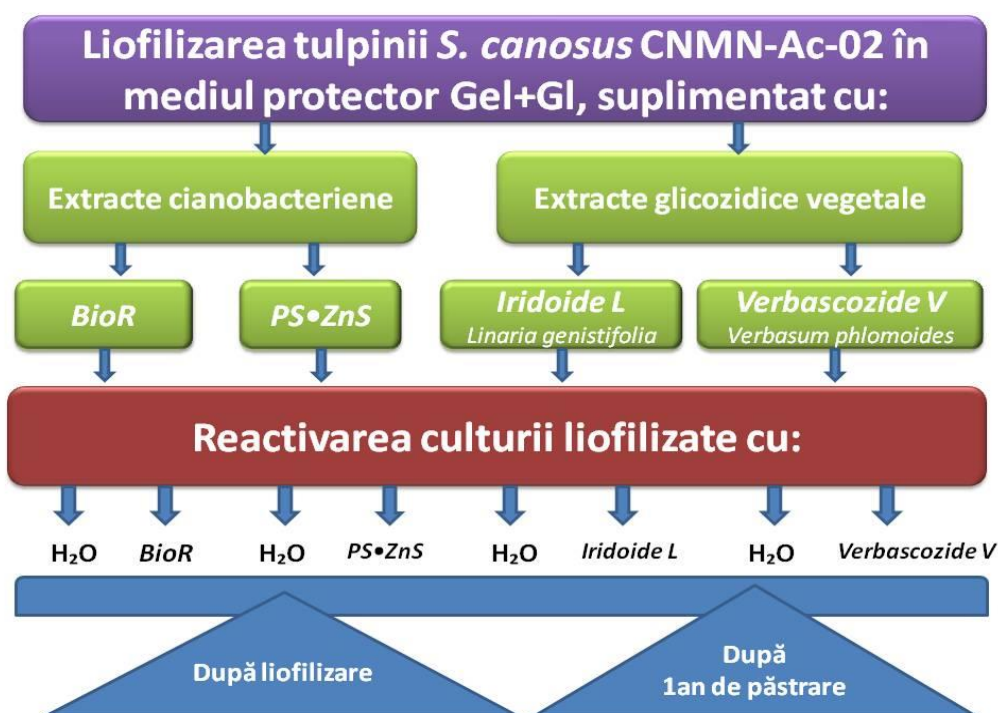


Fig. 3.1. Schema de realizare a experiențelor în vederea evidențierii acțiunii preparatelor de origine cianobacteriană și vegetală asupra viabilității tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 la liofilizare

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

Majoritatea microorganismelor vii posedă un mecanism bine dezvoltat de răspuns la stresul osmotic, producând protectanți care ajută citoplasma să mențină presiunea osmotică echivalentă cu cea a mediului extern. Astfel se cunoaște capacitatea algelor și cianobacteriilor de a produce substanțe de origine proteică (acvaporine) capabile să protejeze celulele proprii, precum și microorganismele simbiote de acțiunea temperaturilor joase. În această ordine de idei, un interes deosebit prezintă studiul influenței extractelor de origine cianobacteriană asupra viabilității microorganismelor după liofilizare. Actualmente în cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie sunt elaborate și studiate pe larg o serie de extracte de origine cianobacteriană cu activitate biologică înaltă. Printre acestea se evidențiază extractul de aminoacizi și oligopolipeptide din *Spirulina platensis* CNM-CB-02, utilizat în calitate de substanță activă a preparatului medical BioR, care posedă acțiune antioxidantă, de stabilizare a membranelor celulare și de stimulare a regenerării țesuturilor [14].

Pornind de la premiza, că preparatele obținute din *Spirulina platensis* au demonstrat acțiune antioxidantă, antiradicalică, stabilizatoare și de regenerare a membranelor celulare, ne-am propus scopul de a evalua potențialul lioprotector al acestor extracte. În continuare sunt prezentate rezultatele testării a două preparate obținute din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*: preparatele PSS_{Zn} (un complex de polizaharide sulfatate) și BioR (complex de aminoacizi și oligopeptide), în calitate de agenți lioprotectori în componența mediului de liofilizare, precum și în calitate de soluție de rehidratare a culturii după liofilizare și păstrare.

În figura 3.2. sunt prezentate rezultatele cercetărilor cu privire la influența principiilor de origine cianobacteriană BioR și PSS_{Zn} asupra viabilității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02, în calitate de supliment la mediul de liofilizare gelatină + glucoză (Gel+Gl). Rehidratarea culturii liofilizate în acest caz s-a efectuat cu apă distilată [41].

Astfel, în urma suplimentării mediului lioprotector cu BioR în concentrația de 0,1 – 10,0%, în toate probele experimentale a fost înregistrată o creștere a viabilității în comparație cu proba martor, dar și o viabilitate mai mare față de cultura înainte de liofilizare. Sporirea viabilității după liofilizare a tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 se explică prin faptul, că compuși de origine cianobacteriană, în calitate de activatori de creștere, contribuie la germinarea sporilor, care în condiții de cultivare standart nu germinează [14, 17, 199, 255-264].

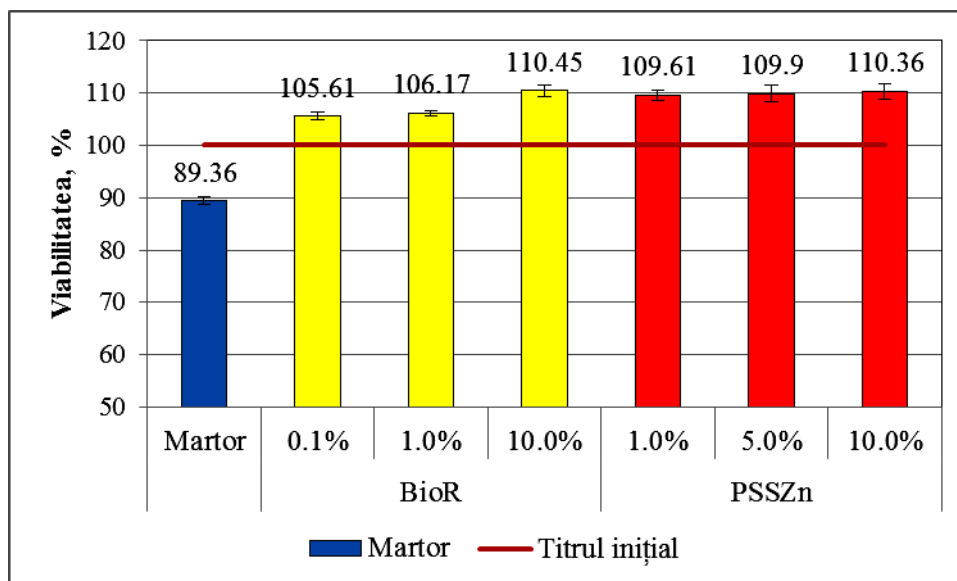


Fig. 3.2. Viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 în urma liofilizării, cu utilizarea mediului lioprotector Gel+Gl suplimentat cu principii de origine cianobacteriană și rehidratării cu apă distilată

În continuare, extractele din cianobacterii, de rând cu rolul lor de lioprotectori în componența mediilor de liofilizare, au fost testați și în calitate de soluții de rehidratare a culturilor liofilizate. Soluțiile utilizate pentru rehidratare reprezintă extractele cianobacteriene utilizate la liofilizare într-o concentrație de 10 ori mai mică.

În figura 3.3. sunt prezentate rezultatele cu referire la viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 în urma liofilizării cu utilizarea mediului lioprotector Gel+Gl suplimentat cu principii de origine cianobacteriană BioR și PSS_{Zn}, rehidratat cu soluții ale extractelor utilizate.

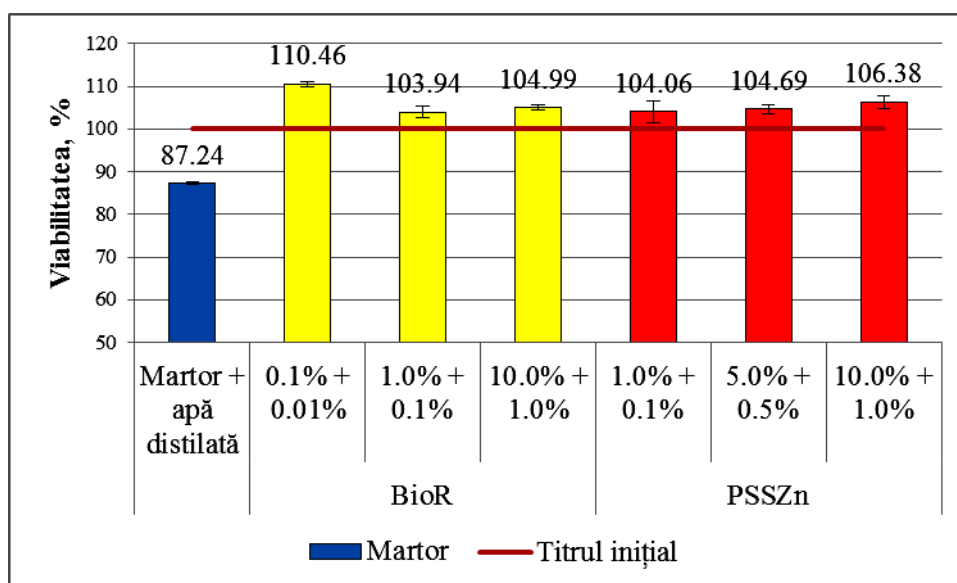


Fig. 3.3. Viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 sub influența extractelor de origine cianobacteriană, utilizate în componența mediilor de liofilizare și rehidratare

Astfel, în urma liofilizării tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 cu utilizarea Gel+Gl, suplimentat cu (0,1 – 10,0%) BioR și rehidratat cu soluții de BioR 0,1 – 1,0%, viabilitatea a sporit cu $16,7 \pm 1,40$ – $23,22 \pm 0,53\%$. Diferențele sunt înregistrate în dependență de concentrația preparatului BioR aplicat la mediul de protecție. În cazul probei de 0,1% BioR, viabilitatea după rehidratare cu apă distilată constituia $105,61 \pm 0,66\%$, iar în urma rehidratării cu soluție de BioR 0,01% – acest parametru a atins valoarea de $110,46 \pm 0,53\%$. În cazul probei cu 1,0% BioR rehidratată cu apă distilată viabilitatea constituia $106,17 \pm 0,48\%$, pe când la rehidratarea aceleiași probe cu BioR 0,1% a fost obținut un efect invers – o viabilitate în descreștere de $103,94 \pm 1,40\%$. Aceeași situație a fost constatată și în cazul probei liofilizate în mediul protector cu 10,0% BioR: o viabilitate de $110,45 \pm 1,15\%$ a tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 la rehidratare cu apă distilată față de $104,99 \pm 0,62\%$ viabilitate la rehidratare cu soluție BioR 1,0%.

Rezultate similare au fost înregistrate și la utilizarea preparatului PSS_{Zn} în calitate de supliment la mediul lioprotector Gel+Gl în concentrațiile de 1,0 – 10,0% și rehidratat cu soluții de PSS_{Zn} în concentrații 0,1 – 1,0%. Astfel, pentru cultura liofilizată în mediul protector suplimentat cu 1,0% PSS_{Zn} și rehidratată cu soluție de PSS_{Zn} 0,1%, viabilitatea constituia $104,06 \pm 2,58\%$, pe când pentru aceeași probă rehidratată cu apă distilată s-a înregistrat o viabilitate de $109,61 \pm 1,04\%$. La suplimentarea mediului lioprotector cu 5,0% PSS_{Zn} și rehidratarea culturii liofilizate cu 0,5% PSS_{Zn}, viabilitatea ei a crescut neesențial față de proba precedentă, constituind $104,69 \pm 0,98\%$. Rezultatul a fost mai bun în urma rehidratării probei cu apă distilată, proces ce asigură o viabilitate a culturii de $109,9 \pm 1,55\%$. Viabilitatea culturii liofilizate în mediul cu 10,0% PSS_{Zn} crește până la $106,38 \pm 1,52\%$ în urma rehidratării cu PSS_{Zn} 1,0%. Însă și în acest caz viabilitatea culturii este mai mică comparativ cu proba rehidratată cu apă distilată – $110,36 \pm 1,48\%$.

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

În cercetările ulterioare ne-am propus drept scop stabilirea concentrației minime a extractelor cianobacteriene în soluția de rehidratare pentru care se păstrează cea mai înaltă viabilitate a culturii (din experimentul precedent).

În figura 3.4. sunt prezentate datele cu privire la stabilirea limitelor efectului pozitiv al soluțiilor preparatelor de origine cianobacteriană la rehidratarea probelor liofilizate. În urma rehidratării cu soluția de BioR 0,001% a probei liofilizate în mediul protector suplimentat cu 0,1% BioR, viabilitatea culturii constituia $105,98 \pm 0,47\%$, mai puțin decât aceeași probă rehidratată cu BioR 0,01% (cu viabilitatea de $110,46 \pm 0,53\%$).

Valoarea maximală a viabilității tulpinii studiate prin suplimentarea mediului lioprotector și a celui rehidratat cu BioR, s-a înregistrat în cazul variantei 0,1% BioR (mediul protector) + 0,01% BioR (soluție de rehidratare), constituind $110,46 \pm 0,53\%$ (cu $23,22 \pm 1,52\%$ mai mult comparativ cu viabilitatea probei martor).

Analizând viabilitatea în urma liofilizării tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 cu utilizarea în calitate de supliment pentru mediul lioprotector a preparatului PSS_{Zn}, iar în calitate de rehidratant – a soluției de PSS_{Zn}, s-a stabilit că ea crește la utilizarea variantei de 10,0% PSS_{Zn} (mediul protector) + 5,0% PSS_{Zn} (soluție de rehidratare), constituind $110,56 \pm 0,51\%$, comparativ cu varianta 10,0% PSS_{Zn} (mediu protector) + 5,0% PSS_{Zn} (soluție de rehidratare), care asigura o viabilitate a tulpinii de $106,38 \pm 1,52\%$.

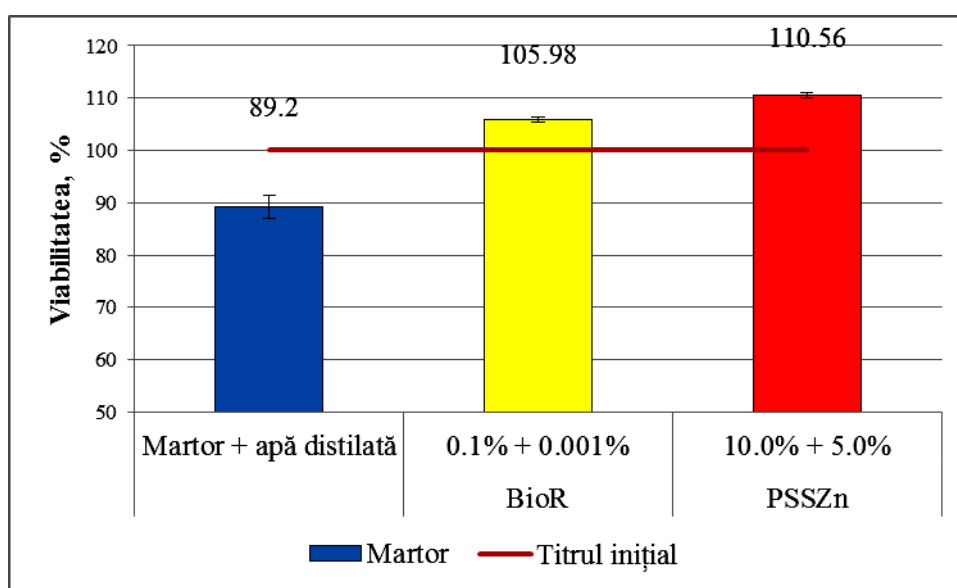


Fig. 3.4. Viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02, la utilizarea concentrațiilor optime ale preparatelor de origine cianobacteriană în componența mediului de liofilizare și a soluției de rehidratare a culturii liofilizate

Dacă în cazul utilizării preparatului BioR au fost determinate concentrațiile optime pentru atingerea valorii maxime a viabilității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02, aceasta fiind de 0,1% BioR (mediu protector) + BioR 0,01% (soluție de rehidratare), atunci la utilizarea preparatului PSS_{Zn} în calitate de lioprotector și rehidratant a fost înregistrată o creștere continuă.

Pentru a găsi raportul optim al compoziției mediului lioprotector și de rehidratare cu utilizarea preparatului PSS_{Zn}, a fost efectuată o serie de experiențe cu majorarea ponderii extractului PSS_{Zn} în componența mediului lioprotector clasic Gel + Gl. În calitate de medii de rehidratare au fost utilizate apa distilată și soluție de PSS_{Zn} 5,0%, care a manifestat efect de sporire a viabilității tulpinii studiate.

Astfel, în figura 3.5. sunt prezentate rezultatele experiențelor ce au vizat viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 în urma utilizării concentrațiilor sporite de PSS_{Zn} (20,0%, 30,0% și 50,0%) în componența mediilor de protecție și rehidratarea culturii după liofilizare cu apă distilată.

Analiza rezultatelor obținute, permite să afirmăm, că preparatul PSS_{Zn} în concentrații de 20,0% și 50,0% nu au influențat radical viabilitatea tulpinii comparativ cu proba martor, valorile fiind mai mari cu cca. $6,0 \pm 0,1$ – $9,0 \pm 1,53\%$. Schimbări majore au fost observate în urma suplimentării mediului lioprotector cu PSS_{Zn} în concentrație de 30,0%. În rezultat s-a înregistrat o viabilitate de $128,29 \pm 6,30\%$, cu cca. $30,0 \pm 5,27\%$ mai mult comparativ cu proba martor. Generalizând datele din fig. 3.2. – 3.5., este necesar de remarcat faptul, că acest rezultat este cel mai înalt dintre toate probele experimentale rehidratate cu apă distilată.

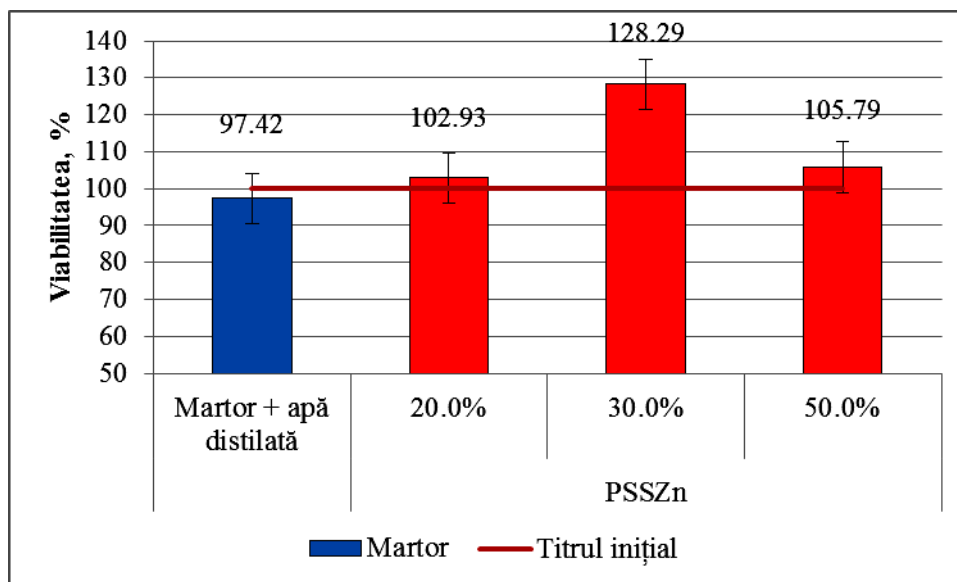


Fig. 3.5. Viabilitatea tulpinii liofilizate de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 în dependență de concentrația extractului PSS_{Zn} în componența mediului de protecție, la rehidratarea tulpinii cu apă distilată

La etapa următoare a cercetărilor a fost evaluată acțiunea mediului de rehidratare de PSS_{Zn} 5,0% pentru variantele experimentale de mai sus. În figura 3.6. poate fi observată viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 în urma utilizării preparatului PSS_{Zn} în concentrații de 20,0%, 30,0% și 50,0% în componența mediului lioprotector și rehidratării culturii liofilizate cu soluție de PSS_{Zn} 5,0%. În cazul probei martor mediul lioprotector a rămas Gel + Gl și proba a fost rehidratată cu apă distilată.

Comparând rezultatele prezentate în figura 3.5. cu cele din figura 3.6., constatăm că, diferența dintre probele martor în aceste 2 experiențe nu este semnificativă: $97,42 \pm 0,91\%$ vs $96,64 \pm 2,69\%$, indicând asupra veridicității datelor experimentale.

Viabilitatea *S. canosus* CNMN-Ac-02 în experiențele cu utilizarea a 20,0% PSS_{Zn} (mediu protector) + PSS_{Zn} 5,0% (soluție de rehidratare) crește nesemnificativ comparativ cu proba martor, constituind în final $97,3 \pm 1,19\%$. O ușoară creștere a viabilității ($105,47 \pm 1,00\%$) este înregistrată în varianta experimentală 50,0% PSS_{Zn} (mediu protector) + PSS_{Zn} 5,0% (soluție de rehidratare), depășind martorul cu cca. 10,0%.

Schimbări importante au fost înregistrate în cazul suplimentării mediului lioprotector cu 30,0% PSS_{Zn} și rehidratării culturii liofilizate cu PSS_{Zn} 5,0%. În rezultat, viabilitatea tulpinii a atins $139,51 \pm 1,23\%$, cu cca. 10,0% mai mult față de aceeași probă rehidratată cu apă distilată și cu cca. 30,0% mai mult comparativ cu proba martor. Comparând datele din fig. 3.4. și 3.5., observăm că, utilizarea preparatului PSS_{Zn} 5,0% pentru cultura liofilizată contribuia la majorarea viabilității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 în raport cu probele rehidratate cu apă distilată.

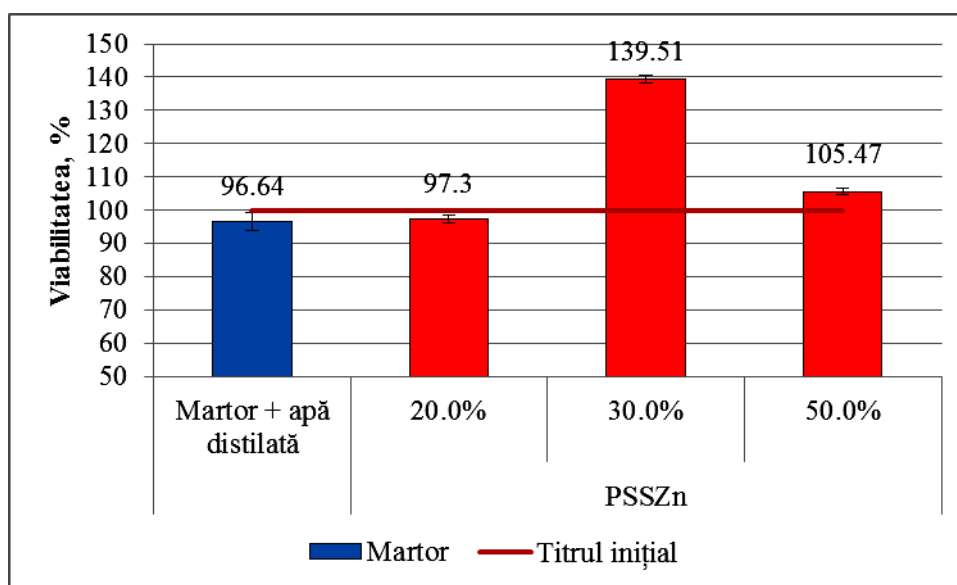


Fig. 3.6. Viabilitatea tulpinii liofilizate de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 în dependență de concentrația extractului PSS_{Zn} în componența mediului de protecție, la rehidratarea tulpinii cu soluție 5,0% PSS_{Zn}

Pe baza datelor de ansamblu prezentate în figurile 3.2. – 3.6., putem afirma faptul că, principiile de origine cianobacteriană BioR și PSS_{Zn} obținute din *Spirulina platensis* CNM-CB-02 se deosebesc după modul în care influențează viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 atunci, când sunt utilizate în calitate de agenți lioprotectori sau de rehidratare a culturii de streptomicete liofilizate. Important de semnalat, însă, este faptul că aceste extracte naturale, în

majoritatea variantelor experimentale analizate, sporesc viabilitatea tulpinii după liofilizare comparativ cu proba martor.

Eficiența liofilizării depinde de mai mulți factori, cum ar fi faza de dezvoltare a tulpinii supuse păstrării, componența mediului lioprotector și condițiilor de rehidratare, titrul inițial al culturii liofilizate, temperatura de congelare etc. În șirul acestor factori, un rol important DL are perioada de păstrare a tulpinii în stare liofilizată, primul an fiind considerat unul critic pentru majoritatea culturilor de microorganisme [43].

În continuare sunt prezentate rezultatele evaluării viabilității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după 1 an de păstrare în stare liofilizată cu aplicarea preparatelor de origine cianobacteriană în componența mediilor protectoare și de rehidratare.

În figura 3.6. poate fi urmărită viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 liofilizată în prezența extractelor de origine cianobacteriană BioR (0,1%, 1,0%, 10,0%) și PSS_{Zn} (1,0%, 5,0%, 10,0%), reactivată cu apă distilată peste 1 an de păstrare în frigider la +4°C.

Comparând datele prezentate în figura 3.7. cu cele din figura 3.2. (viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 imediat după liofilizare), constatăm că, în toate probele viabilitatea tulpinii a scăzut. Mai pronunțat acest fapt se observă la proba martor. Dacă imediat după liofilizare, valoarea viabilității constituia $89,36 \pm 0,73\%$, atunci după 1 an de păstrare aceasta era de $79,06 \pm 1,36\%$, deci viabilitatea tulpinii a scăzut cu mai mult de 10,0%. O scădere mai puțin pronunțată a viabilității culturii se observă la probele liofilizate în mediul protector suplimentat cu BioR și PSS_{Zn}.

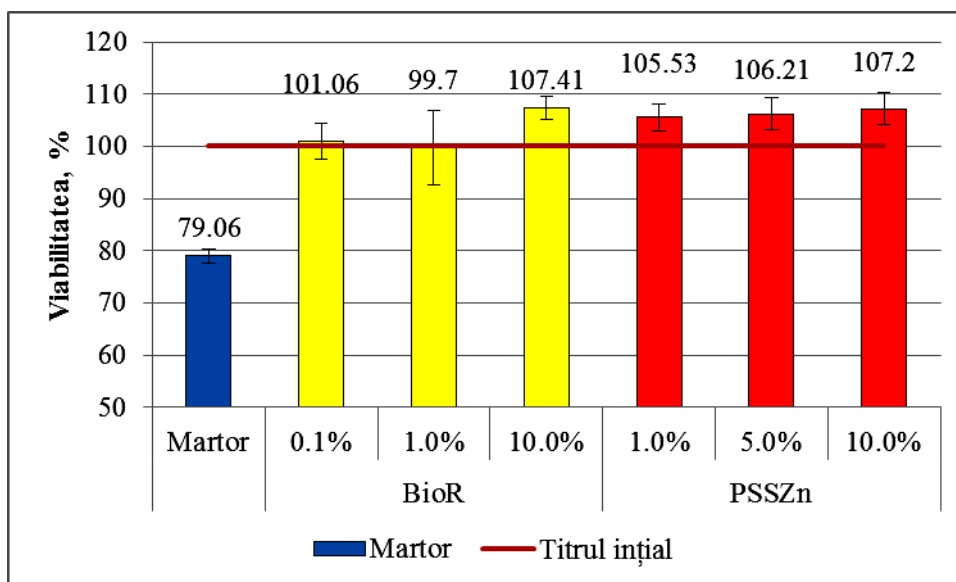


Fig. 3.7. Viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după un an de păstrare în stare liofilizată în mediul lioprotector Gel+Gl suplimentat cu extracte de origine cianobacteriană, reactivată cu apă distilată

Astfel, după 1 an de păstrare în stare liofilizată a variantelor experimentale în mediul protector suplimentat cu BioR, viabilitatea culturii a scăzut cu cca. $3,0 \pm 0,38 - 7,0 \pm 0,85\%$ comparativ cu cea inițială vs $10,0\%$ în cazul probei martor.

Cercetările au reliefat următoarea dinamică a viabilității culturii:

- $0,1\%$ BioR – de la $105,61 \pm 0,66\%$ la $101,06 \pm 3,42\%$;
- $1,0\%$ BioR – de la $106,17 \pm 0,48\%$ la $99,7 \pm 7,15\%$;
- $10,0\%$ BioR – de la $110,45 \pm 1,15\%$ la $107,41 \pm 2,28\%$.

Un efect similar a fost înregistrat la păstrarea timp de 1 an a tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 liofilizate în mediul protector suplimentat cu PSS_{Zn} , viabilitatea culturii în acest caz fiind redusă cu cca. $3,0 \pm 0,22 - 5,0 \pm 0,46\%$. În rezultatul reactivării culturilor liofilizate a fost înregistrată următoarea dinamică a viabilității:

- $1,0\%$ PSS_{Zn} – de la $109,61 \pm 1,04\%$ la $105,53 \pm 2,64\%$;
- $5,0\%$ PSS_{Zn} – de la $109,9 \pm 1,55\%$ la $106,21 \pm 3,02\%$;
- $10,0\%$ PSS_{Zn} – de la $110,36 \pm 1,48\%$ la $107,2 \pm 3,01\%$.

Rezultatele obținute atestă o acțiune pozitivă a extractelor studiate asupra ratei de supraviețuire a tulpinii de streptomicete păstrate timp de 1 an în stare liofilizată pe medii de protecție suplimentate cu preparate cianobacteriene.

În continuare, a fost apreciată viabilitatea tulpinii în aceleași condiții de păstrare, utilizând soluțiile de BioR și PSS_{Zn} pentru reactivarea culturii.

Din datele prezentate în figura 3.8. se observă viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 în urma păstrării timp de 1 an sub formă liofilizată, în prezența principiilor de origine cianobacteriană și rehidratată cu soluții de BioR și PSS_{Zn} .

Pentru proba martor, variabilitatea după 1 an de păstrare în stare liofilizată scade cu cca. $11,0 \pm 1,37\%$ față de valoarea inițială. În cazul culturii liofilizate în mediu protector cu BioR și rehidratate cu soluții de BioR, a fost înregistrată următoarea dinamică a viabilității:

- $0,1\%$ BioR (mediu protector) + BioR $0,01\%$ (soluție de rehidratare) – de la $110,46 \pm 0,53\%$ la $108,55 \pm 1,26\%$;
- $1,0\%$ BioR (mediu protector) + BioR $0,1\%$ (soluție de rehidratare) – de la $103,94 \pm 1,40\%$ la $101,46 \pm 1,83\%$;
- $10,0\%$ BioR (mediu protector) + BioR $1,0\%$ (soluție de rehidratare) – de la $104,99 \pm 0,62\%$ la $102,21 \pm 0,84\%$.

Astfel, viabilitatea culturii peste 1 an de păstrare în stare liofilizată în mediu cu BioR a scăzut cu cca. $2,0 \pm 0,07\%$ comparativ cu cea inițială, mai puțin comparativ cu proba martor.

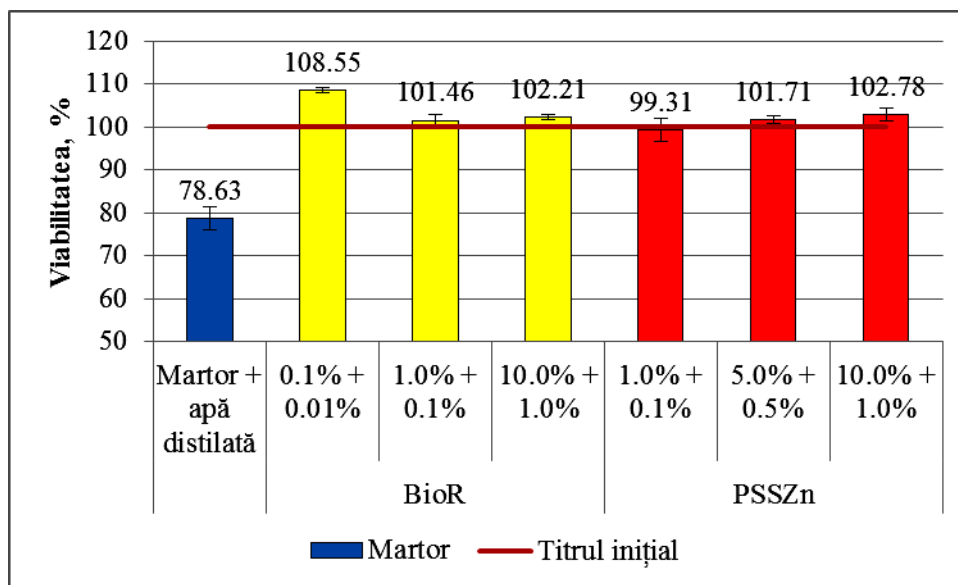


Fig. 3.8. Viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după 1 an de păstrare în stare liofilizată în mediul lioprotector Gel+Gl suplimentat cu BioR și PSS_{Zn}, reactivată cu soluții respective de extracte de origine cianobacteriană

În urma reactivării culturii cu soluții de PSS_{Zn}, din stare liofilizată în mediul lioprotector suplimentat cu PSS_{Zn} în diferite concentrații, a fost înregistrată următoarea dinamică a viabilității după 1 an de păstrare:

- 1,0% PSS_{Zn} (mediu protector) + PSS_{Zn} 0,1% (soluție de rehidratare) – de la 104,06±2,58% la 99,31±3,73%;
- 5,0% PSS_{Zn} (mediu protector) + PSS_{Zn} 0,5% (soluție de rehidratare) – de la 104,69±0,98% la 101,71±0,64%;
- 10,0% PSS_{Zn} (mediu protector) + PSS_{Zn} 1,0% (soluție de rehidratare) – de la 106,38±1,52% la 102,78±1,37%.

Deci, peste 1 an de păstrare sub formă liofilizată, viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 scade cu cca. 4,0±0,36-5,0±0,51% în cazul utilizării extractului PSS_{Zn}, de 2 ori mai puțin decât la proba martor.

În continuare, a fost evaluată viabilitatea culturii peste un an de păstrare sub formă liofilizată în mediul lioprotector suplimentat cu PSS_{Zn} în concentrații majorate, probele experimentale fiind rehidratate cu apă distilată.

Din datele prezentate în figura 3.9., se observă o scădere cu cca. 8,0±1,32% a viabilității culturii din proba martor după 1 an de păstrare în stare liofilizată. Pe când, în probele liofilizate în mediul lioprotector suplimentat cu PSS_{Zn}, a fost înregistrată următoarea rată de scădere a viabilității culturii:

- 20,0% PSS_{Zn} – de la 102, 93±0,1% la 99,58±1,65%;
- 30,0% PSS_{Zn} – de la 128,29±6,30% la 118,00±5,65%;
- 50,0% PSS_{Zn} – de la 105,79±1,53% la 102,98±0,36%.

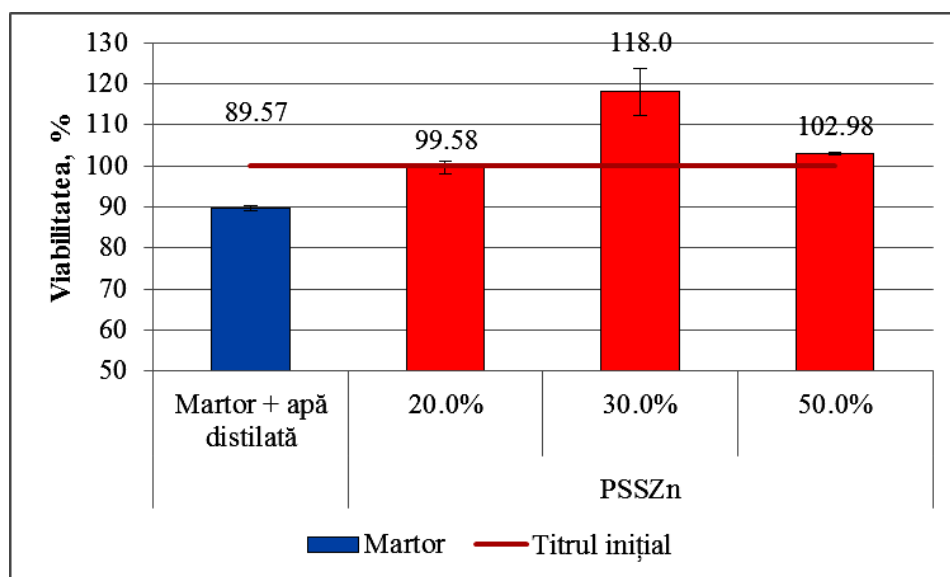


Fig. 3.9. Viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după 1 an de păstrare în stare liofilizată în mediul lioprotector Gel+Gl suplimentat cu PSS_{Zn} în concentrații sporite, reactivată cu apă distilată

Astfel, dacă în cazul suplimentării mediului protector cu PSS_{Zn} în concentrație de 20,0% și 50,0%, viabilitatea culturii liofilizate după 1 an de păstrare scade cu cca. 2 – 3%, atunci la suplimentarea mediului de protecție cu PSS_{Zn} în concentrație de 30,0%, viabilitatea scade cu cca. 10%. Dar și în aceste circumstanțe, cea din urmă variantă înregistrează cel mai înalt nivel al viabilității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 la păstrare în stare liofilizată timp de 1 an.

În continuare, pentru reactivarea culturii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după 1 an de păstrare în stare liofilizată în mediul protector suplimentat cu PSS_{Zn} în concentrație de 20,0%, 30,0% și 50,0%, a fost utilizată soluția de PSS_{Zn} 5,0%.

Din datele prezentate în figurile 3.6. și 3.10., se observă că viabilitatea culturii din proba martor scade cu cca. 6,0±0,75% după 1 an de păstrare, iar în urma utilizării concentrațiilor corespunzătoare de PSS_{Zn} în calitate de supliment la mediul lioprotector și prin revitalizare cu soluție de PSS_{Zn} 5,0%, a fost observată următoarea tendință de scădere a viabilității culturii:

- 20,0% PSS_{Zn} – de la 97,30±1,19% la 95,34±0,54%;
- 30,0% PSS_{Zn} – de la 139,51±1,23% la 136,70±1,94%;
- 50,0% PSS_{Zn} – de la 105,47±1,00% la 99,49±0,13%.

Astfel, în cazul rehidratării cu soluție de PSS_{Zn} 5,0% a probelor liofilizate în medii lioprotectoare suplimentate cu PSS_{Zn} în concentrație de 20,0%, 30,0% și 50,0%, viabilitatea tulpinii cercetate scade nesemnificativ după 1 an de păstrare.

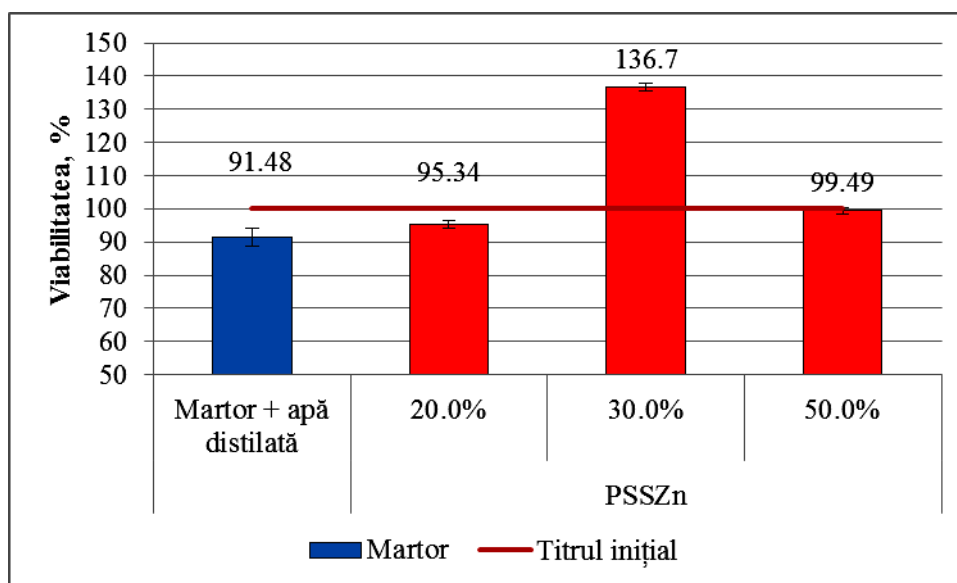


Fig. 3.10. Viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după 1 an de păstrare în stare liofilizată în mediul lioprotector Gel+Gl suplimentat cu PSS_{Zn} în concentrații sporite, reactivată cu soluție de PSS_{Zn} 5,0%

Analizând datele din figura 3.10., se constată, că în cazul probei (PSS_{Zn} de 50,0%) cu o rată de scădere a viabilității comparabilă cu cea din proba martor, viabilitatea în varianta experimentală este cu $8,0 \pm 0,58\%$ mai mare comparativ cu martorul.

Cel mai bun rezultat a fost obținut în urma reactivării cu soluție de PSS_{Zn} de 5,0% a culturii de *S. canosus* CNMN-Ac-02 păstrate în stare liofilizată în mediul lioprotector suplimentat cu PSS_{Zn} în concentrație de 30,0%, viabilitatea culturii din proba experimentală depășind cu mai bine de $45,0 \pm 1,94\%$ 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 PSS_{Zn} în concentrație de 30,0%, iar pentru reactivarea culturii după liofilizare cea mai potrivită este soluția PSS_{Zn} 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 stimulative [240].

În cercetările noastre au fost utilizate extractele glicozidice vegetale: extractul **LG** (iridoide obținute din *Linaria genistifolia*) și extractul **VP** (flavonoide obținute din *Verbascum phlomoides*).

Conform surselor literare, glicozidele sunt compuși cu o activitate foarte înaltă, ceea ce determină utilizarea lor în cantități foarte mici. De exemplu, în cercetările cu privire la influența glicozidelor asupra culturilor agricole au fost utilizate concentrații de 10^{-2} – $10^{-5}\%$, cu o expoziție de 0,5 – 24 ore [169, 251]. Reieșind din aceste considerente, extractele glicozidice au fost utilizate în concentrații de 0,05%, 0,005% și 0,0005% din volumul mediului de liofilizare a tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02.

Pentru început, a fost verificată eficiența glicozidelor din *Linaria genistifolia* și *Verbascum phlomoides* în calitate de lioprotectori utilizați în componența mediului de liofilizare a tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02.

În figura 3.11. 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 probelor liofilizate cu apă distilată.

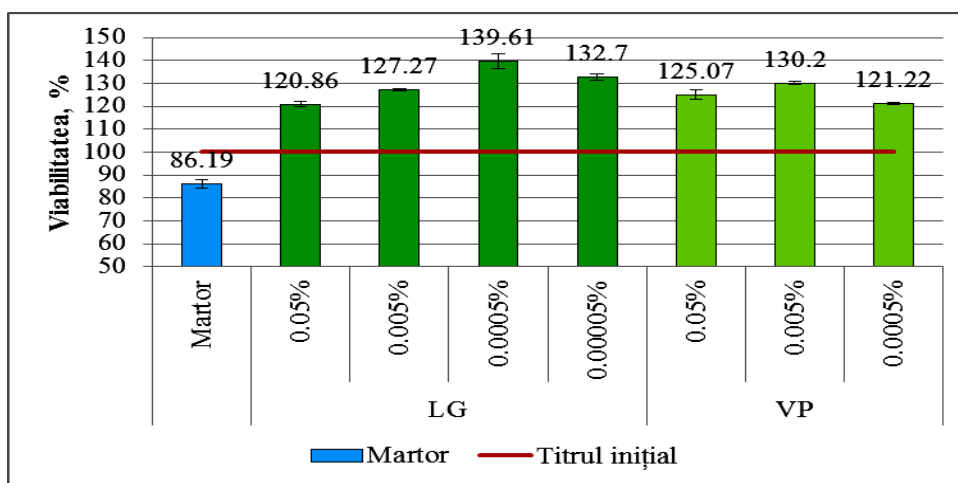


Fig. 3.11. Viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 în urma liofilizării, cu utilizarea mediului lioprotector Gel+Gl suplimentat cu glicozide, la reactivare cu apă distilată

Din datele prezentate în figură, se observă o viabilitate scăzută a culturii din proba martor – $86,19 \pm 1,89\%$ și o viabilitate mult mai mare a culturii liofilizate în prezența glicozidelor vegetale adăugate la mediul lioprotector.

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, acestea fiind cuprinse 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% [39, 40].

Este necesar de a menționa că glicozidele vegetale, indiferent de concentrația aplicată, au asigurat o viabilitate mai mare a streptomicetelor după liofilizare față de proba martor.

În continuarea cercetărilor la acest compartiment, a fost evaluată eficacitatea glicozidelor vegetale în calitate de soluție de reactivare a streptomicetei după liofilizare. Astfel, în figura 3.12. sunt prezentate rezultatele experienței cu privire la viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare, cu utilizarea mediului lioprotector Gel+Gl, suplimentat cu glicozide din plante sălbatice de *Linaria genistifolia* și *Verbascum phlomoides*, și resuspendat cu soluții de principii menționate, a căror concentrație a fost micșorată de 10 ori în raport cu cantitatea de principiu utilizată pentru liofilizare.

Deoarece experiența a avut loc în paralel cu probele rehidratate cu apă, pentru comparare a fost utilizată aceeași probă martor care constituia $86,19 \pm 1,89\%$.

În urma utilizării în calitate de rehidrant a soluțiilor de iridoide, au fost obținute următoarele valori ale viabilității:

- **LG** 0,05% (mediu protector) + **LG** 0,005% (mediu de rehidratare) – $121,86 \pm 1,34\%$;
- **LG** 0,005% (mediu protector) + **LG** 0,0005% (mediu de rehidratare) – $127,83 \pm 0,59\%$;
- **LG** 0,0005% (mediu protector) + **LG** 0,00005% (mediu de rehidratare) – $140,09 \pm 3,23\%$;

- **LG** 0,00005% (mediu protector) + **LG** 0,000005% (mediu de rehidratare) – 133,75±1,23%.

În rezultat viabilitatea probelor de *S. canosus* CNMN-Ac-02 rehidratate cu soluții de glicozide de *Linaria genistifolia* a constituit cu 35,67±1,72 – 53,90±2,11% mai mult comparativ cu proba martor.

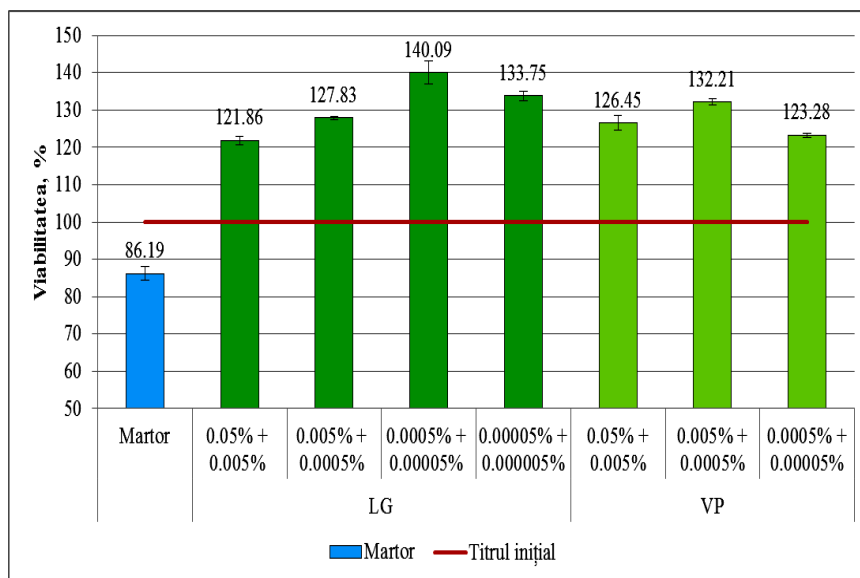


Fig. 3.12. Viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 în urma liofilizării și reactivării în medii cu extracte glicozidice

Efectuând rehidratarea probelor liofilizate cu soluții de flavonoide **VP**, au fost obținute următoarele rezultate a viabilității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02:

- **VP** 0,05% (mediu protector) + **VP** 0,005% (mediu de rehidratare) – 126,45±2,51%;
- **VP** 0,005% (mediu protector) + **VP** 0,0005% (mediu de rehidratare) – 132,21±2,86%;
- **VP** 0,0005% (mediu protector) + **VP** 0,00005% (mediu de rehidratare) – 123,28±3,28%.

A fost stabilit, că în dependență de mediul de rehidratare utilizat, viabilitatea a depășit proba martor cu 37,09±2,53 – 46,02±4,16%.

Analiza comparativă a rezultatelor prezentate în figurile 3.11 și 3.12 indică o influență pozitivă nesemnificativă (0,5±0,06 – 2,0±0,37% față de proba martor) a extractelor glicozidice din componența mediilor de rehidratare asupra viabilității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02.

Pentru a verifica stabilitatea în timp a acțiunii extractelor glicozidice vegetale obținute din *Linaria genistifolia* și *Verbasum phlomoides* asupra viabilității streptomicetelor, a fost

verificată viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 peste 1 an de păstrare în stare liofilizată în medii suplimentate cu extracte glicozidice.

În figura 3.13. sunt prezentate rezultatele evaluării viabilității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 în urma liofilizării în mediul lioprotector Gel+Gl, suplimentat cu extractele naturale **LG** și **VP** în diverse concentrații și rehidratării probelor liofilizate cu apă distilată peste 1 an de păstrare a tulpinii.

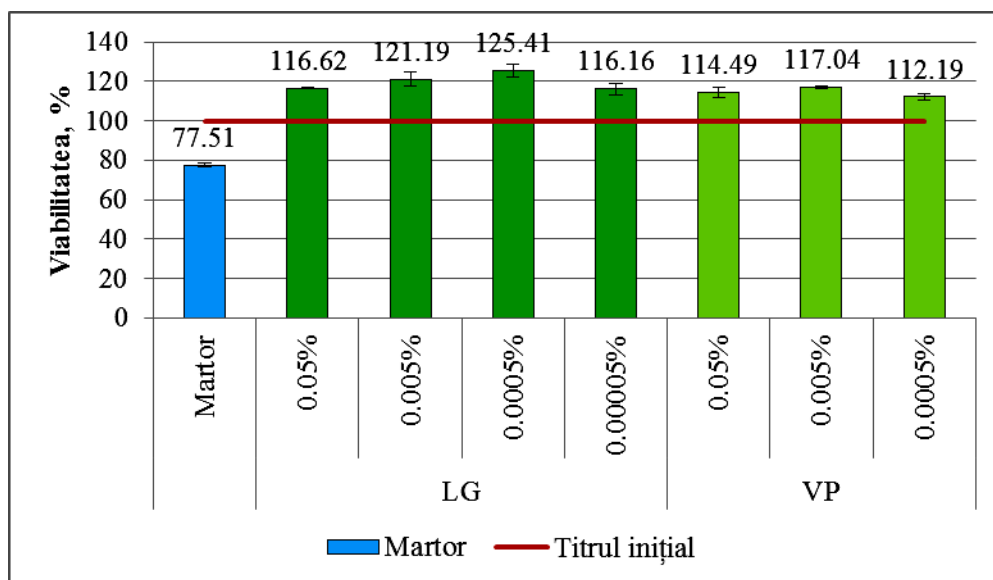


Fig. 3.13. Viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după 1 an de păstrare în stare liofilizată în mediul lioprotector Gel+Gl suplimentat cu glicozide, reactivată cu apă distilată

Din datele prezentate în figură se observă o scădere a viabilității culturii din proba martor după 1 an de păstrare în stare liofilizată până la $77,51 \pm 0,95\%$ (cu cca. $9,0 \pm 0,38\%$). Pe când, în probele liofilizate în mediul lioprotector suplimentat cu glicozide **LG**, a fost înregistrată următoarea rată de scădere a viabilității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02:

- 0,05% **LG** – de la $121,86 \pm 1,34\%$ la $116,62 \pm 0,59\%$ – cu 5,24%;
- 0,005% **LG** – de la $127,27 \pm 0,59\%$ la $121,19 \pm 3,54\%$ – cu 6,08%;
- 0,0005% **LG** – de la $140,09 \pm 3,23\%$ la $125,41 \pm 3,11\%$ – cu 14,68%;
- 0,00005% **LG** – de la $133,75 \pm 1,23\%$ la $116,16 \pm 2,91\%$ – cu 17,59%.

În probele liofilizate în mediul lioprotector suplimentat cu glicozide **VP**, a fost înregistrată următoarea rată de scădere a viabilității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după 1 an de păstrare în stare liofilizată:

- 0,05% **VP** – de la $125,07 \pm 1,98\%$ la $114,49 \pm 2,67\%$ – cu 10,58%;
- 0,005% **VP** – de la $130,20 \pm 0,80\%$ la $117,04 \pm 0,61\%$ – cu 13,16%;

- 0,0005% **VP** – de la 121,22±0,60 la 112,19±1,59% – cu 9,03%.

Deci, după 1 an de păstrare a tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 în medii de liofilizare suplimentate cu iridoide **LG** (0,05 – 0,00005%), viabilitatea culturii a scăzut cu 4,24±0,39 – 17,59±2,18%, iar la suplimentarea mediului protector cu flavonoide **VP** (0,05 – 0,0005%) – viabilitatea a scăzut cu 9,03±1,26 – 13,16±4,40%. Deși rata de scădere a viabilității culturii de streptomicete, peste 1 an de păstrare, este mai mare în probele liofilizate în medii suplimentate cu glicozide față de proba martor, totuși viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 rămâne la un nivel superior la păstrarea pe aceste medii: cu cca. 38,65±3,47 – 48,0±6,38% la suplimentarea mediului protector cu glicozide **LG** și cu cca. 34,68±1,66 – 39,53±4,26% la suplimentarea mediului protector cu glicozide **VP**.

În continuare, a fost apreciată viabilitatea tulpinii în aceleași condiții de păstrare, utilizând soluțiile de glicozide vegetale pentru reactivarea culturii.

Din datele prezentate în figura 3.14. se observă viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 rehidratate cu soluții ale extractelor **LG** și **VP** după 1 an de păstrare în formă liofilizată în prezența glicozidelor vegetale.

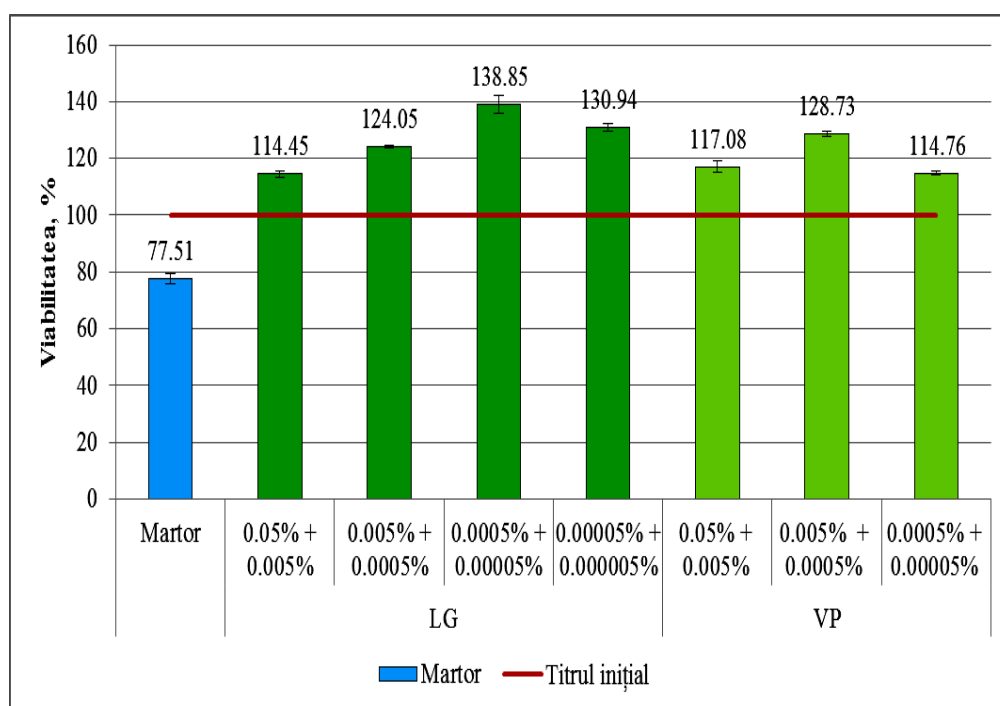


Fig. 3.14. Viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după 1 an de păstrare în stare liofilizată în mediul lioprotector Gel+Gl suplimentat cu glicozide, reactivat în medii cu extracte glicozidice

Analiza rezultatelor prezentate în figurile 3.13. și 3.14. a evidențiat 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 $2,86 - 13,44 \pm 3,11\%$ aceleași variante experimentale rehidratate cu apă distilată, și cu $2,57 \pm 0,42 - 11,69 \pm 0,61\%$ în cazul utilizării pentru reactivare a extractului **VP**.

Și în acest caz, s-a observat scăderea viabilității culturii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după 1 an de păstrare cu $3,0 \pm 0,56 - 7,0 \pm 1,12\%$ pentru probele liofilizate pe medii suplimentate cu iridoide **LG** și cu $3,0 \pm 0,24 - 12,0 \pm 0,95\%$ în cazul mediilor suplimentate cu flavonoide **VP**.

Cu toate acestea, viabilitatea tulpinii de streptomicete este mai mare 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**.

Pe baza rezultatelor de ansamblu, putem constata influența pozitivă a extractelor glicozidice obținute din *Linaria genistifolia* și *Verbascum phlomoides* asupra viabilității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 la liofilizare și conservare pentru o perioadă îndelungată în colecțiile de microorganisme.

3.3. Concluzii la capitolul 3

1. Utilizarea extractelor cianobacteriene și vegetale în calitate de agenți lioprotectori, asigură o rată de supraviețuire sporită a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 în procesul liofilizării.

2. Sporirea numărului de celule viabile după liofilizare ($105,0\% - 110,0\%$ față de proba inițială), în prezența în mediul lioprotector al extractelor BioR, PSS_{Zn}, iridoide **LG** și flavonoide **VP**, se explică prin acțiunea stimulatorie a extractelor naturale asupra germinării sporilor streptomicetei, care se aflau în stare de latență.

3. Cel mai bun efect lioprotector al extractelor cianobacteriene a fost înregistrat la utilizarea extractului de PSS_{Zn} în concentrație de $30,0\%$ în componența mediului lioprotector gelatină $2,5\% +$ glucoză $7,5\%$.

4. Glicozidele vegetale obținute din *Linaria genistifolia* și *Verbascum phlomoides* au manifestat o acțiune lioprotectoare mai pronunțată comparativ cu extractele de origine cianobacteriană.

5. Cel mai bun efect lioprotector al extractelor vegetale a fost înregistrat la suplimentarea mediului lioprotector gelatină $2,5\% +$ glucoză $7,5\%$ cu iridoide din *Linaria genistifolia* în concentrație de $0,0005\%$.

6. Utilizarea extractelor cianobacteriene și vegetale în calitate de soluții de reactivare a culturii după păstrare în stare liofilizată a stimulat nesemnificativ viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02, în comparație cu apa distilată.

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 [236]. 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 [61, 108, 114].

Conform specialiștilor în domeniu, acest grad înalt de variabilitate se explică prin următoarele caracteristici ale acestui grup de microorganisme:

- Abilitatea de formare a sporilor și miceliului aerian;
- Fragmentarea miceliului vegetativ;
- Colorarea miceliului aerian și a celui de substrat;
- Sinteza pigmentilor difuzați în mediu solid;
- Activitatea antimicrobiană [19].

Pe parcursul ciclului vital actinomicetele, și, în special, streptomicetele, formează două tipuri diferite de miceliu: miceliul de substrat, care crește în și pe mediul de cultură solid și miceliul aerian, care crește pe primul și pe care se formează sporii (Figura 4.1.) [163].

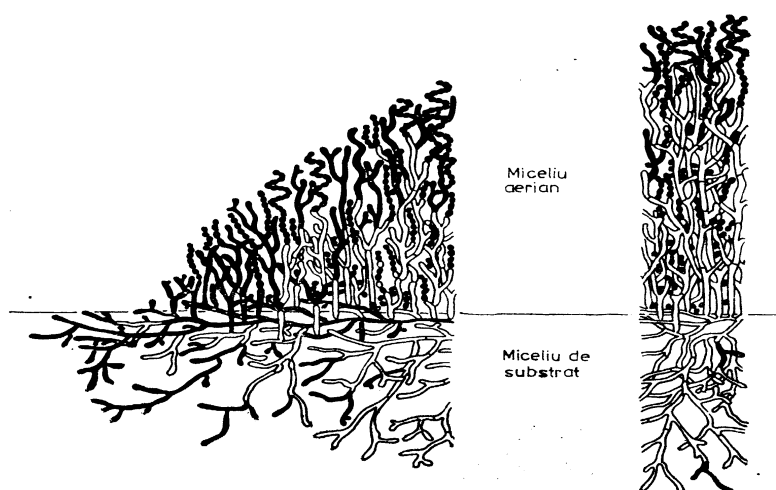


Fig. 4.1. Reprezentarea schematică a celor două tipuri de miceliu caracteristic actinobacteriilor [163]

Ciclul vital complex al acestor microorganisme (Figura 4.2) începe cu germinarea sporilor în condiții favorabile. Germinarea nu include fisiunea binară, ci elongarea tuburilor de germinare. În urma acestui proces se formează miceliul vegetativ (de substrat). În continuare, începe diferențierea miceliului din centrul coloniei, cu formarea sporoforilor (miceliul aerian). Urmează spiralizarea hifelor aeriene, apoi dividerea sincronă a celulelor și formarea compartimentelor monoploide, din care se vor forma spori de rezistență. Sporii se formează prin fragmentarea filamentelor și sunt aranjați în lanțuri de formă dreaptă, ondulată sau elicoidală. Suprafața sporilor poate fi netedă, rugoasă, acoperită cu ghimpi sau perișori [8, 114, 212].

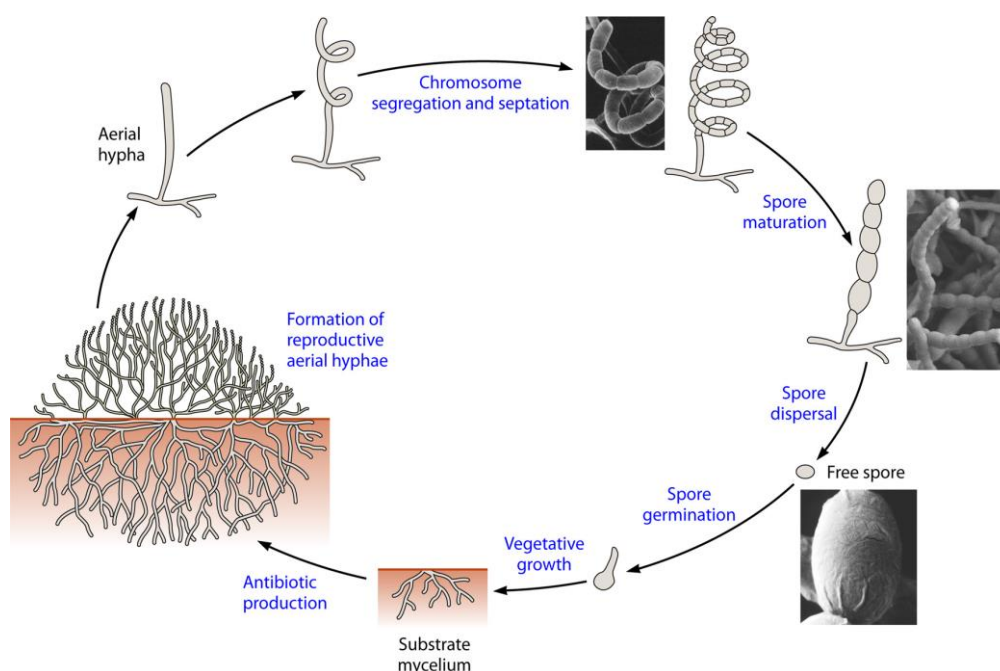


Fig. 4.2. Reprezentarea schematică a ciclului vital al actinomicetelor [8]

La început coloniile sunt lucioase, dar odată cu dezvoltarea miceliului aerian pot căpăta aspect granular, pufos sau catifelat [13, 30].

O caracteristică importantă a streptomicetelor este producerea unei varietăți mari de pigmenți – manifestare vizuală a sintezei metaboliților secundari. Pigmenții, responsabili de culoarea miceliului și a substratului, indică sinteza diferitor grupuri de compuși chimici. În scopuri practice, metaboliții sunt clasificați după culori, unele exemple din diverse surse bibliografice fiind prezentate în Figura 4.3. [51, 182, 208, 226].

Pigmenții melanoizi nu sunt esențiali pentru creșterea și dezvoltarea microorganismelor, dar au un rol crucial în îmbunătățirea capacității de supraviețuire și competitivitate a lor [8].

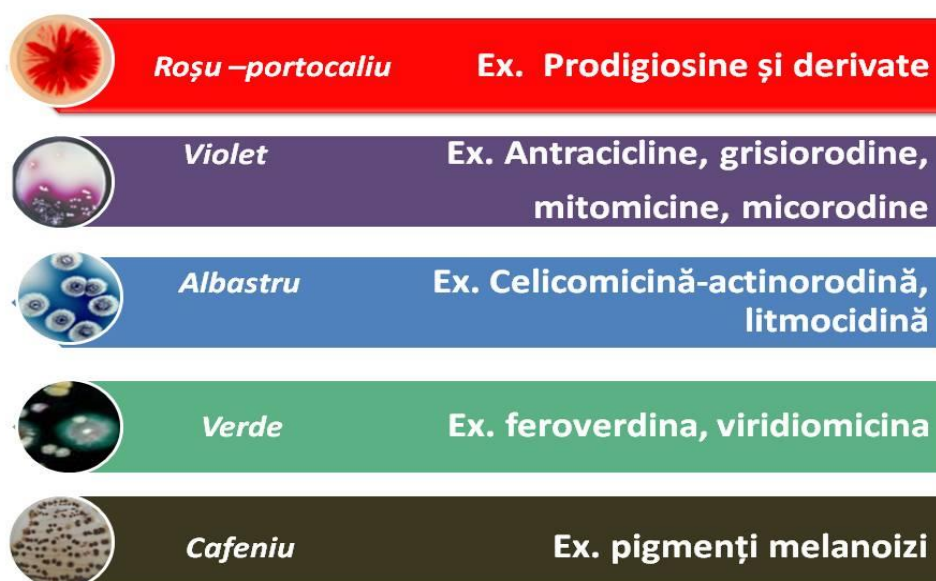


Fig. 4.3. Exemple de pigmenții produși de streptomicete

Pornind de la necesitatea selectării condițiilor optime pentru conservarea pe termen lung a microorganismelor, care să asigure protejarea celulelor microbiene de deteriorările ce apar în timpul depozitării și ținând cont de instabilitatea genetică a actinobacteriilor, cercetătorii au stabilit în calitate de indicatori ai crio-eficacității procesului de conservare gradul de supraviețuire și modificările compoziției populației microbiene.

În vederea optimizării mediilor de protecție pentru depozitarea actinomicetelor, Filippova și co-autorii au studiat efectul diferitor medii de protecție asupra variabilității populației de streptomicete. S-a stabilit că stabilitatea spectrului disociativ al *Streptomyces ruber* K-3946 a fost mai mare atunci când a fost păstrată în glicerină 15% sau mediu cu dimetilsulfoxid 3% și hexilrezorcinol 0,1% sau 0,005%. În același timp, populația streptomicetei și-a păstrat omogenitatea, fiind compusă de colonii de tip dominant. O creștere semnificativă a variabilității populației acestei tulpini a fost observată în urma păstrării în D₂O de 20% [267].

Populația tulpinii *Mycobacterium phlei* K-4041 a fost reprezentată de trei tipuri morfologice coloniale. Tipul dominant a avut o colonie de formă convexă, cu o margine neregulată, încrețită, de culoare galbenă. Tipul de pigmentare a fost caracterizat de colonii mai mici, cu o parte centrală incoloră. Tipul pitic (tipul 3) a avut colonii mici (cu diametrul de aproximativ 2 mm). În populația de *Rhodococcus rhodochrous* K-3285, au fost identificate două tipuri de colonii: tipul dominant cu suprafață și margine netede, de culoare roză și tipul pitic reprezentat de mici colonii de culoare palidă. Astfel, cercetările indică asupra selectivității

efectului crioprotector al mediilor protectoare asupra diverselor tulpini de actinomicete în timpul depozitării. A fost stabilit, că efectul stabilizator asupra conservării viabilității celulare și gradului de variabilitate a populației în timpul depozitării este asigurat de medii specifice: pentru *S. rubber* K-3946 – mediul cu 5% glicerol și mediul pe bază de 3% DMSO suplimentat cu 0,005% 4-n-hexilrezorcină; pentru *M. plhei* K-4041 – mediul cu 10% DMSO și pentru *R. rhodochrous* K-3285 – mediul cu 20% D₂O [267].

Experimentele efectuate de microbiologii ruși au confirmat importanța și necesitatea de a studia schimbările caracterelor morfologice și culturale ale *S. canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare și depozitare pe medii lioprotectoare [267].

Examinarea coloniilor de pe suprafața mediilor agarizate în cutii Petri permite determinarea caracterelor morfo-culturale, deseori cu semnificație importantă în aprecierea stării culturii și activității sale biologice, iar uneori și cu semnificație sistematică.

Structura populației de streptomicete și stabilitatea ei a fost luată în calcul și la etapa de selectare a regimului de congelare a tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 înainte de liofilizare. Astfel, pentru tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02 au fost testate trei regimuri de congelare: -20°C; -50°C și -80°C. Populația acestei tulpini păstrată în colecție (martor) este reprezentată de 2 tipuri de colonii, cu miceliu alb și gri. După liofilizare și congelare la -20°C, s-au observat trei tipuri de colonii ale miceliului aerian: 79,3% de culoare albă (4 – 6 mm), 14,4% culoare gri (7,4 mm) și 6,3% culoare albă (1 mm), iar miceliul substratului, respectiv: incolor, gri și albi. După liofilizare și congelare la -50°C, 89,5% din colonii au fost cu miceliu aerian și miceliu de substrat de culoare albă și 10,5% colonii - cu miceliu aerian și de substrat gri, dimensiunile fiind de 4,7 și, respectiv, 4,6 mm. În cazul aplicării regimului de congelare de -80°C, a apărut un tip nou de colonii - cu miceliul de substrat gălbui.

Astfel, pentru o mai bună conservare a streptomicetelor și menținerea stabilității populației prin aplicarea metodelor individuale de liofilizare, a fost ales regimul optim de înghețare înainte de liofilizare a tulpinilor studiate: -50°C [31].

Având în vedere particularitățile de dezvoltare ale streptomicetelor, am optat pentru verificarea stabilității tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 în procesul liofilizării, prin analiza caracterelor morfologice ale coloniilor formate pe medii solide specifice, conform schemei din Figura 4.4.

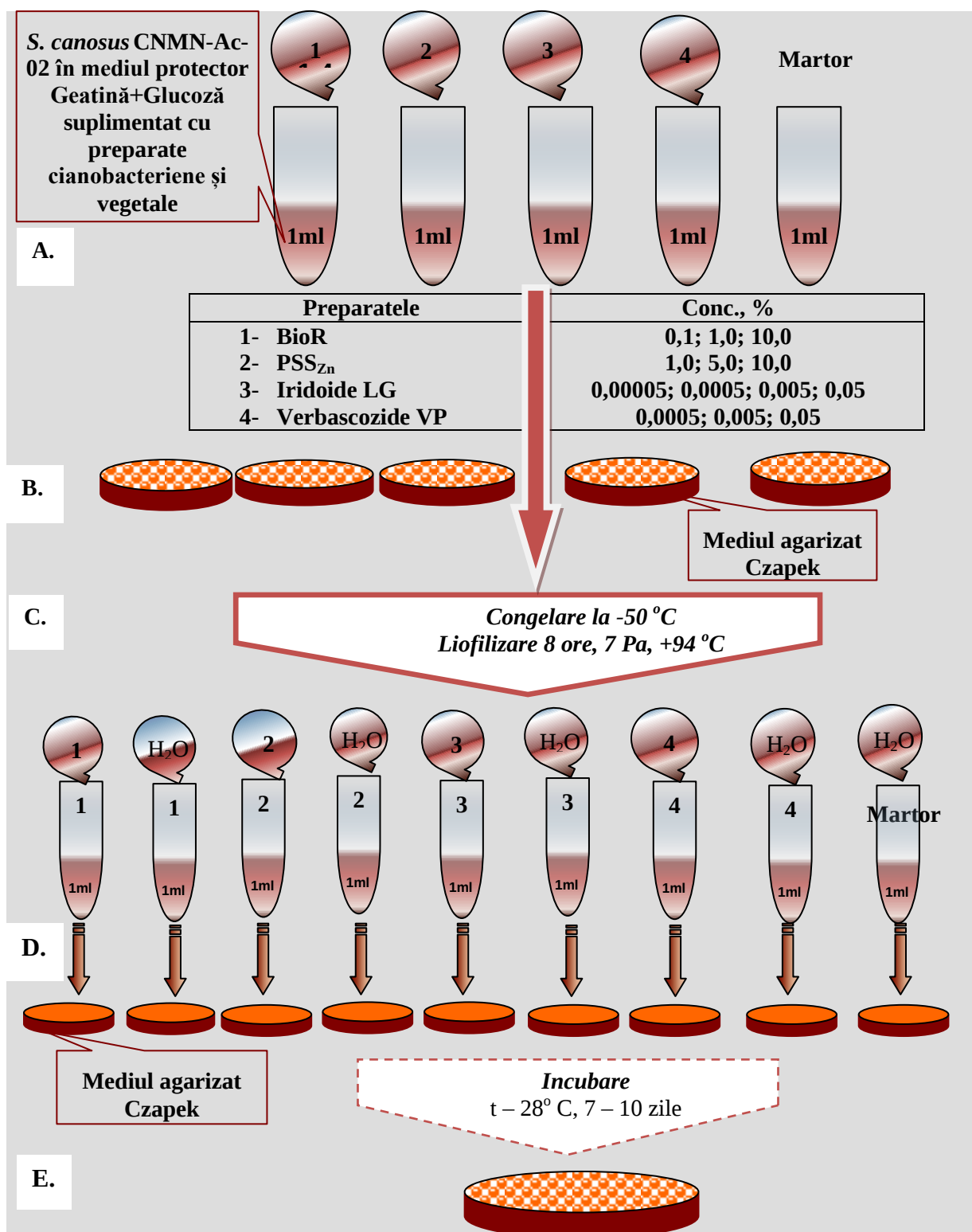


Fig. 4.4. Etapele studiului stabilității morfologice a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 la păstrare în stare liofilizată: A – prepararea mediilor protectoare, B – determinarea numărului de celule viabile și caracterelor morfologice ale coloniilor, C – liofilizarea culturii, D – revitalizarea culturii și însămânțarea pe mediul agarizat, E – studiul caracterelor morfologice ale coloniilor după liofilizare

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

Pornind de la premiza, că există o dependență între tipul morfologic al coloniei și activitatea sa, ne-am propus obiectivul de a studia evoluția coloniilor tipice ale tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 sub influența extractelor de origine cianobacteriană, utilizate în mediile de suspendare a sporilor streptomicetei înainte de liofilizare și în mediile de reactivare a culturii după păstrare în stare liofilizată [192, 193].

Cele 2 preparate obținute din cianobacteria *Spirulina platensis* au manifestat o acțiune diferită asupra proprietăților morfologice și de cultură ale tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 (Figura 4.5., Tabelul 4.1).

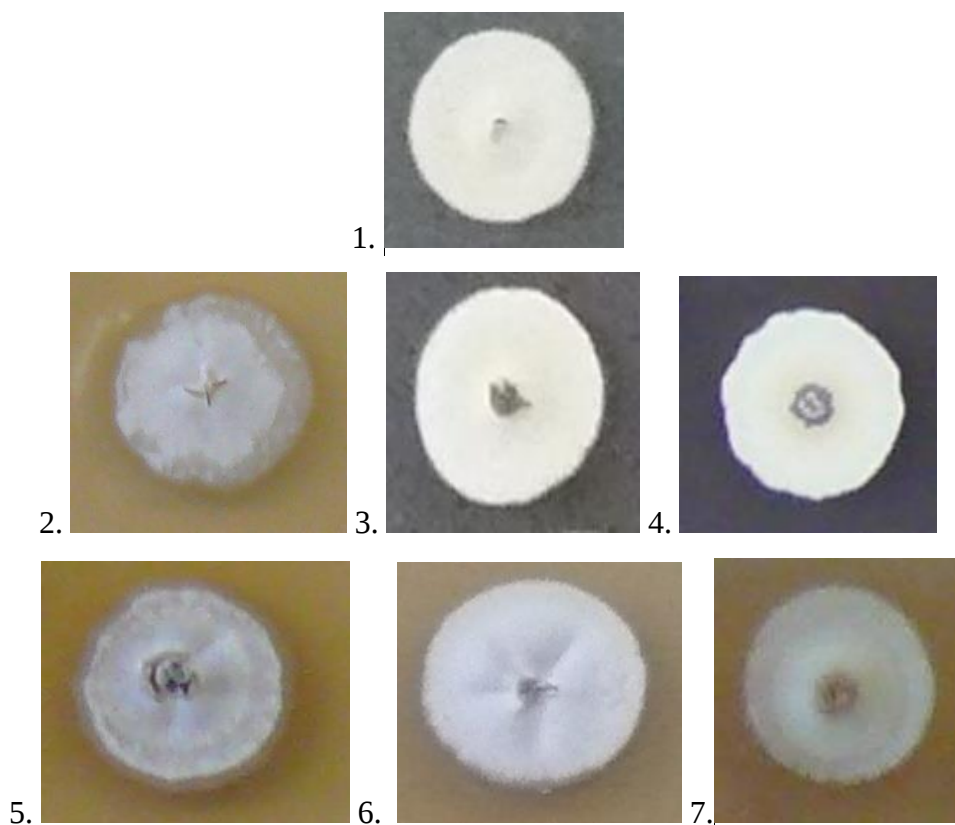


Fig. 4.5. Aspectul coloniilor de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL (martor) și DL (probe experimentale) în prezența compușilor de origine cianobacteriană:

**1 – Martor; 2 – 0,1% BioR; 3 – 1,0% BioR; 4 – 10,0% BioR; 5 – 1,0% PSS_{Zn};
6 – 5,0% PSS_{Zn}; 7 – 10,0% PSS_{Zn}**

Tabelul 4.1. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL și DL în prezența preparatelor de origine cianobacteriană, rehidratată cu apă distilată

Varianta	Diametrul coloniilor, mm		Culoarea miceliului				Culoarea mediului		Forma		Marginea		Profilul	
	PL	DL	Aerian		Substrat		PL	DL	PL	DL	PL	DL	PL	DL
			PL	DL	PL	DL								
Martor	3,0 – 5,0	3,0 – 5,0	Alb-gri	Verde-gri	Incolor	Alb de cretă	—	—	Tip L	Tip L	Netedă	Netedă	Bombat	Bombat
0,1% BioR	3,5 – 5,0	3,5 – 5,0	Alb-gri	Galben-marou	Incolor	Samoa	—	—	Tip L	Filiformă	Netedă	Zimțată	Bombat	Plat
1,0% BioR	4,0 – 5,0	4,0 – 5,0	Alb-gri	1. Crem 2. Gri	Incolor	Incarnat închis	—	Roz-palid	Tip L	Concentrică Tip L	Netedă	1. Zimțată 2. Zimțată	Bombat	1. Plat 2. Ombilicat
10,0% BioR	4,0 – 5,0	4,0 – 5,0	Alb-gri	Crem Gri	Incolor	Gri palid	—	Roz-palid	Tip L	Tip L Tip L	Netedă	Zimțată Zimțată	Bombat	Plat Ombilicat
1,0% PSS_{Zn}	4,5 – 5,0	4,5 – 5,0	Bej	Bej	Galben-cafeniu	Galben-cafeniu	—	—	Cutată	Cutată	Ondulată	Ondulată	Neregulat	Neregulat
5,0% PSS_{Zn}	4,5 – 5,0	4,5 – 5,0	Albui	Albui	Galben-cafeniu	Galben-cafeniu	—	—	Filiformă	Filiformă	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat
10,0% PSS_{Zn}	4,5 – 5,0	4,5 – 5,0	Verde-albăstrui	Verde-albăstrui	Cafeniu	Cafeniu	—	—	Tipul L	Tipul L	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat

În ceea ce privește culoarea miceliului aerian, modificarea acesteia a fost observată la tulpina studiată înainte de liofilizare, numai în cazul suspendării culturii în mediul lioprotector suplimentat cu extract PSS_{Zn}, în concentrație de 1,0 – 10,0%. Însă, după liofilizare, modificarea culorii miceliului aerian a fost observată la toate variantele experimentale [14].

Modificarea culorii miceliului de substrat comparativ cu proba martor de asemenea a fost observată în urma suplimentării mediului lioprotector cu preparatul PSS_{Zn}, iar după liofilizare aceste schimbări au fost atestate și la martor. O modificare analogică a culorii miceliului de substrat a fost observată și în urma utilizării în componența mediului de liofilizare a extractului BioR.

Culoarea miceliului de substrat nu a suferit schimbări în cazul utilizării în mediul de liofilizare a preparatului PSS_{Zn}. La însămânțarea culturii liofilizate în prezența preparatului BioR în concentrațiile de 1,0 și 10,0%, a fost observată eliminarea în mediul agarizat Czapek a pigmentului roz-palid.

Forma coloniilor nu a suferit schimbări majore după liofilizare, predominând coloniile de tipul-L, dar în prezența extractului PSS_{Zn}, acestea au devenit filiforme sau cutate.

Marginea coloniilor până și după liofilizare a fost practic identică, cu excepția variantei cu adaos de BioR (0,1 și 10,0%). În aceste variante a fost depistată și modificarea profilului coloniilor.

În Tabelul 4.2. și Figura 4.6. sunt prezentate datele comparative ale proprietăților morfo-culturale ale tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 până și după liofilizare și reactivare a culturii cu extractele BioR și PSS_{Zn}.

Culoarea miceliului aerian după liofilizare practic nu s-a schimbat, modificarea fiind observată doar la nivel de nuanță a culorii, spre exemplu acestea fiind albei sau alb-gri.

Modificări mai importante au fost observate la toate variantele experimentale comparativ cu proba 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-palid a fost înregistrată la probele liofilizate și reactivate în prezența extractului PSS_{Zn}.

În ceea ce privește particularitățile formei, marginii și profilului coloniilor caracteristice probelor 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.

Tabelul 4.2. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL și DL și reactivare în prezența extractelor de origine cianobacteriană

Varianta	Diametrul coloniilor, mm		Culoarea miceliului				Culoarea mediului		Forma		Marginea		Profilul	
	PL	DL	Aerian		Substrat		PL	DL	PL	DL	PL	DL	PL	DL
			PL	DL	PL	DL								
Martor	3,5 – 5,0	3,0 – 5,0	Alb-gri	Verde-gri	Albui	Alb de cretă	—	—	Tip-L	Tip-L	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat
0,1% BioR + BioR 0,01%	4,0 – 5,5	4,0 – 5,5	Alb-gri	Alb-gri	Galben pal	Alb de cretă	—	—	Tip-L	Tip-L	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat
1,0% BioR + BioR 0,1%	4,5 – 5,0	4,5 – 5,0	Albui	Alb	Galben pal	Albui	—	—	Tip-L	Tip-L	Netedă	Netedă	Neregulat	Neregulat
10,0% BioR + BioR 1,0%	4,5 – 5,0	4,5 – 5,0	Alb	Alb de cretă	Albui	Auriu	—	—	Filiformă	Filiformă	Lobată	Lobată	Ombilicat	Ombilicat
1,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 0,1%	4,5 – 5,0	4,5 – 5,0	Cenușiu	Cenușiu	Roz de marmură	Fumo	Roz-palid	Roz-palid	Circulară	Circulară	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat
5,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 0,5%	4,5 – 5,0	4,5 – 5,0	Cenușiu	Cenușiu	Roz	Fumo închis	Roz-palid	Roz-palid	Tip-L	Tip-L	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat
10,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 1,0%	4,5 – 5,0	4,5 – 5,0	Gălbui	Galben-gri	Roz închis	Fumo închis	—	—	Filiformă	Filiformă	Lobată	Lobată	Ombilicat	Ombilicat

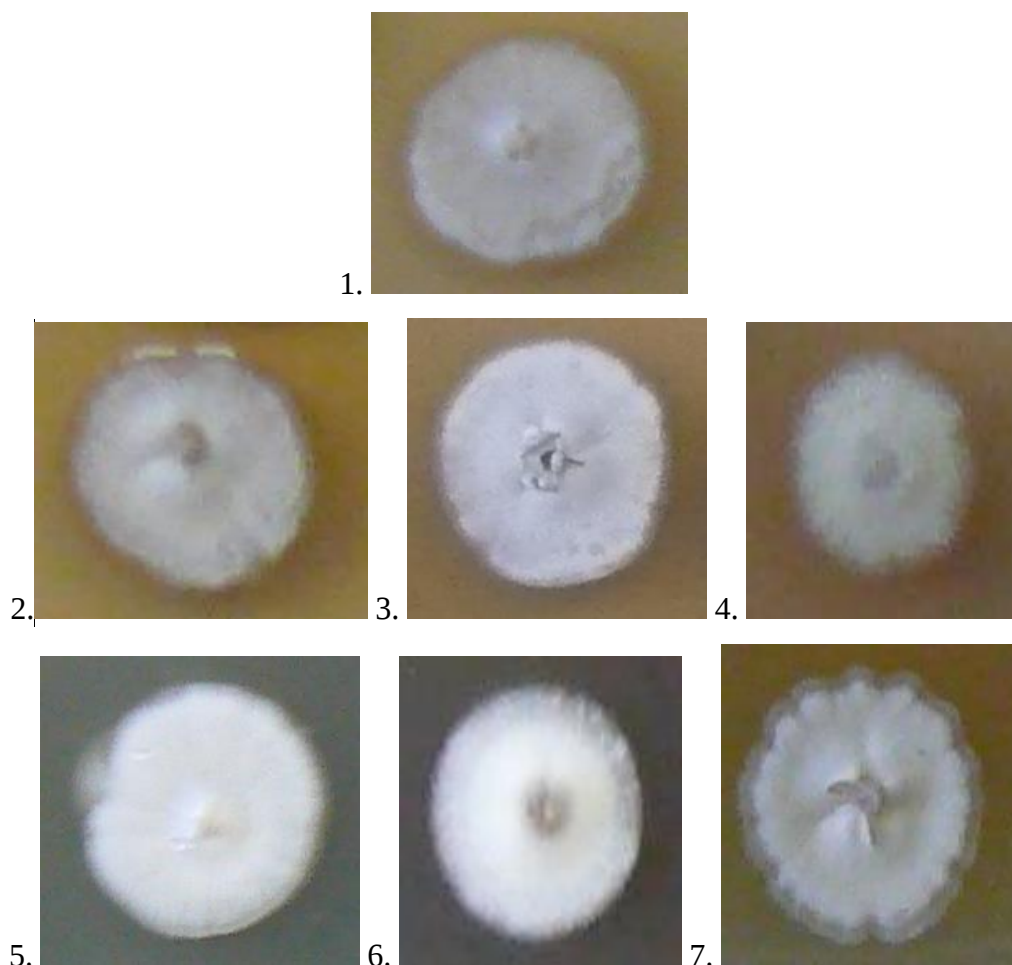


Fig. 4.6. Aspectul coloniilor de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL (martor) și DL (probe experimentale) și reactivare în prezența extractelor de origine cianobacteriană: 1 – Martor; 2 – 0,1% BioR + BioR 0,01%; 3 – 1,0% BioR + BioR 0,1%; 4 – 10,0% BioR + BioR 1,0%; 5 – 1,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 0,1%; 6 – 5,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 0,5%; 7 – 10,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 1,0%

În continuare, a fost verificată stabilitatea culturii de streptomicete în procesul de stabilire a limitelor efectului pozitiv al extractelor cianobacteriene asupra ratei de supraviețuire a tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 în procesul liofilizării, iar rezultatele sunt prezentate în Tabelul 4.3. și Figura 4.7.

În acest caz a fost înregistrată o schimbare evidentă în ce privește capacitatea de a produce pigmenți solubili și colorare a mediului agarizat în culoare galben – portocaliu în cazul suplimentării mediului lioprotector cu extract de PSS_{Zn} în concentrație de 10,0% și utilizarea soluției de 5,0% de PSS_{Zn} pentru regenerarea streptomicetelor după liofilizare.

Tabelul 4.3. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL și DL și rehidratate în prezența compușilor de origine cianobacteriană (stabilirea limitelor efectului pozitiv)

Varianta	Diametrul coloniilor, mm		Miceliul				Culoarea mediului		Forma		Marginea		Profilul	
	PL	DL	Aerian		Substrat		PL	DL	PL	DL	PL	DL	PL	DL
			PL	DL	PL	DL								
Martor	3,0 – 4,0	3,0 – 4,0	Alb-sgri	Gri	Alb de cretă	Alb de cretă	—	—	Tip-L	Tip-L	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat
0,1% BioR + BioR 0,001%	3,5 – 4,0	4,0 – 4,5	Verde-albăstrui	Albastru-gri	Albui	Albui	—	—	Tip-L	Tip-L	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat
10,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 5,0%	4,0 – 4,5	4,5 – 5,0	Crem	Crem	Galben-cafeniu	Galben-cafeniu	Galben	Galben-oranj	Neregulată întinsă	Neregulată întinsă	Lobată	Lobată	Ombilicat	Ombilicat

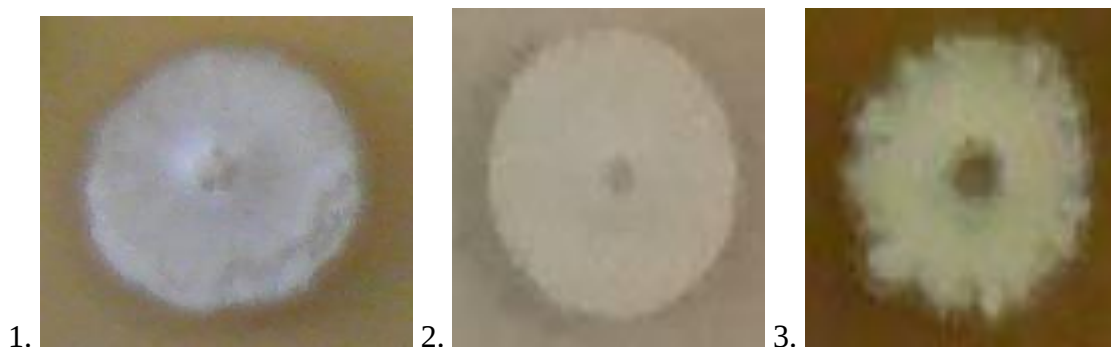


Fig. 4.7. Aspectul coloniilor de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL (martor) și DL (probe experimentale) și reactivare în prezența extractelor de origine cianobacteriană, în cadrul stabilirii limitelor efectului lor pozitiv:

1 – Martor; 2 – 0,1% BioR + BioR 0,001%; 3 – 10,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 5,0%

În Tabelul 4.4. și Figura 4.8. sunt prezentate rezultatele acțiunii preparatului PSS_{Zn} din spirulina, utilizat în componența mediului lioprotector în concentrații mari (20,0% – 50,0%), asupra proprietăților morfo-culturale ale tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02, rehidratate cu apă distilată.

Tabelul 4.4. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL și DL în prezența concentrațiilor sporite ale preparatului PSS_{Zn}, rehidratată cu apă distilată

Varianta	Diametrul coloniilor, mm		Miceliul				Culoarea mediului		Forma		Marginea		Profilul	
	PL	DL	Aerian		Substrat		PL	DL	PL	DL	PL	DL	PL	DL
			PL	DL	PL	DL								
Martor	2,5 – 4,0	2,5 – 3,5	Albui	Alb de cretă	Palid	Palid	Cafeniu intens	Cafeniu intens	Circulară	Circulară	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat
20,0% PSS_{Zn}	3,5 – 4,5	3,5 – 4,5	Galben-palid	Galben-palid	Galben de miere	Galben de miere	Violet închis	Violet închis	Circulară	Circulară	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat
30,0% PSS_{Zn}	4,0 – 5,0	4,0 – 5,0	Galben-paie	Galben închis	Samoa	Samoa	—	—	Neregulată întinsă	Neregulată întinsă	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat
50,0% PSS_{Zn}	3,0 – 4,0	3,0 – 4,0	Gri	Azuriu-gri	Bej	Bej	Roz de marmură	Roz de marmură	Circulară cu margini bombate	Circulară cu margini bombate	Lobată	Lobată	Ombilicat	Ombilicat

Analiza datelor prezentate în Tabelul 4.4., ne permite să observăm colonii cu dimensiuni mai mari în cazul utilizării în mediul lioprotector a extractului de polizaharide sulfatate în concentrație de 30,0%.

Unele modificări ale culorilor și nuanțelor miceliului aerian au fost observate atât la proba martor, cât și la variantele experimentale, deosebirile fiind în dependență de concentrația de PSS_{Zn}.

După liofilizarea și rehidratarea tulpinii cu utilizarea în componența mediului lioprotector a extractului PSS_{Zn} în diferite concentrații, nu au fost observate schimbări ale miceliului de substrat.

Utilizarea PSS_{Zn} din spirulină în concentrație de 20,0% a adus la modificarea culorii mediului de cultivare în violet închis și în concentrație de 50,0% – în roz de marmură.

Modificări esențiale în ceea ce privește forma, marginea și profilul coloniei la tulpina studiată după liofilizare în prezența PSS_{Zn} în concentrațiile menționate de mai sus, nu au fost înregistrate.

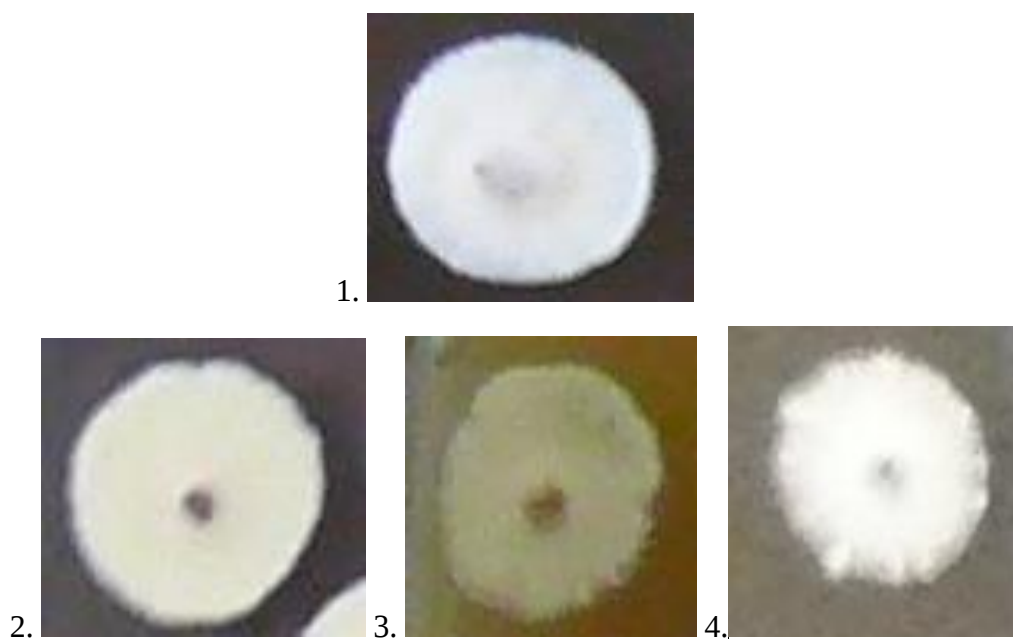


Fig. 4.8. Aspectul coloniilor de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL (martor) și DL (probe experimentale) în prezența polizaharidelor sulfatate cu zinc, rehidratată cu apă distilată: 1 – Martor; 2 – 20,0% PSS_{Zn}; 3 – 30,0% PSS_{Zn}; 4 – 50,0% PSS_{Zn}

După cum se observă în Tabelul 4.5. și Figura 4.9., înlocuirea apei distilate cu soluție de PSS_{Zn} în concentrație de 5,0% pentru reactivarea culturii liofilizate în medii cu conținut de 20,0%, 30,0% și 50,0% PSS_{Zn}, a dus la un șir de modificări minore, cum ar fi de exemplu majorarea diametrului coloniilor la varianta liofilizată pe mediul suplimentat cu 30,0% PSS_{Zn} (4,5 – 5,5 mm).

Culoarea miceliului aerian și de substrat a rămas neschimbată. De asemenea, nu a fost observat pigmentul solubil în mediul de cultivare capabil să modifice culoarea acestuia după liofilizare și rehidratare cu soluții de PSS_{Zn}. La utilizarea soluției de PSS_{Zn} în calitate de rehidratant nu au fost observate modificări ale formei, marginii și profilului coloniilor.

În concluzie, putem afirma, că înlocuirea apei distilate cu soluție de PSS_{Zn} în calitate de rehidratant nu are o influență majoră asupra proprietăților morfo-culturale ale tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 studiate.

Tabelul 4.5. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL și DL și rehidratate în prezența extractului PSS_{Zn}

Varianta	Diametrul coloniilor, mm		Miceliul				Culoarea mediului		Forma		Marginea		Profilul	
	PL	DL	Aerian		Substrat		PL	DL	PL	DL	PL	DL	PL	DL
			PL	DL	PL	DL								
Martor	2,5 – 4,0	2,5 – 3,5	Alb-gri	Alb-gri	Albui	Albui	—	—	Circulară cu margini bombate	Circulară cu margini bombate	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat
20,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 5,0%	3,5 – 4,0	3,5 – 4,0	Alb-gri	Alb-gri	Albastru-verzui	Albastru-verzui	—	—	Concentrică	Concentrică	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat
30,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 5,0%	4,5 – 5,5	4,5 – 5,5	Alb-gri	Alb-gri	Galben de măsline	Galben de măsline	—	—	Circulară cu margini bombate	Circulară cu margini bombate	Ondulată	Ondulată	Neregulat	Neregulat
50,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 5,0%	3,0 – 4,0	3,0 – 4,0	Alb-gri	Alb-gri	Albastru-verzui	Albastru-verzui	—	—	Cutată	Cutată	Lobată	Lobată	Ombilicat	Ombilicat

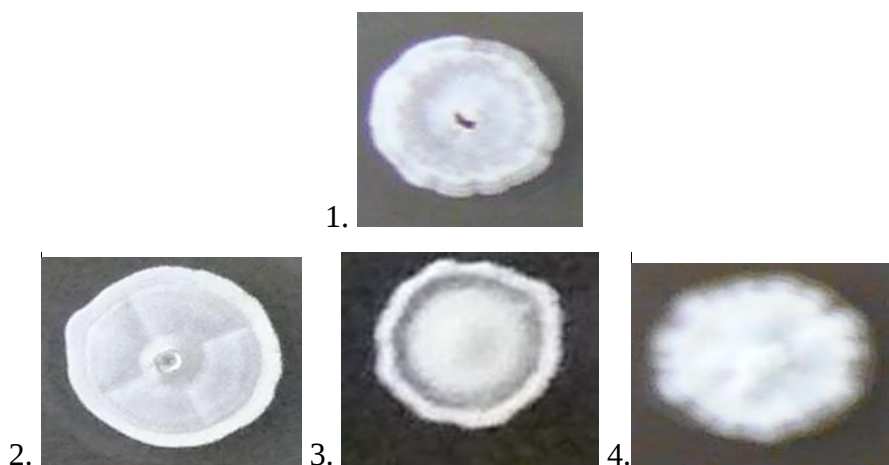


Fig. 4.9. Coloniile tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL (martor) și DL (probe experimentale) în prezența polizaharidelor sulfatate cu zinc, rehidratate cu soluții de principii utilizate: 1 – Martor; 2 – 20,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 5,0%; 3 – 30,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 5,0%; 4 – 50,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 5,0%

Tabelul 4.6. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02, PL și după 1 an de păstrare în stare liofilizată în prezența compușilor de origine cianobacteriană, rehidratată cu apă distilată

Varianta	Diametrul coloniilor, mm		Miceliul				Culoarea mediului		Forma		Marginea		Profilul	
	PL	1 an	Aerian		Substrat		PL	1 an	PL	1 an	PL	1 an	PL	1 an
			PL	1 an	PL	1 an								
Martor	3,0 – 5,0	3,0 – 5,0	Alb-gri	Verde-gri	Incolor	Alb de cretă	—	—	Tip L	Tip L	Netedă	Netedă	Bombat	Bombat
0,1% BioR	4,0 – 5,5	4,0 – 5,0	Gri	Gri	Galben pal	Galben pal	—	—	Circulară	Circulară	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat
1,0% BioR	4,5 – 5,0	4,5 – 5,0	Galben de lămâie	Galben de lămâie	Maro	Maro	Roz-palid	Roz-palid	Circulară	Circulară	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat
10,0% BioR	4,5 – 5,0	4,0 – 5,0	Galben de lămâie	Galben de lămâie	Verzui	Verzui închis	Roz-palid	Roz-palid	Concentrică	Concentrică	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat
1,0% PSS_{Zn}	4,5 – 5,0	4,5 – 5,0	Crem	Crem	Galben pal	Gri	Roz-palid	Roz-palid	Circulară	Circulară	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat
5,0% PSS_{Zn}	4,5 – 5,0	4,0 – 5,0	Crem	Crem	Cafeniu-închis	Cafeniu	—	—	Neregulată întinsă	Neregulată întinsă	Lobată	Lobată	Ombilicat	Ombilicat
10,0% PSS_{Zn}	4,5 – 5,0	4,5 – 5,0	Alb de cretă	Alb de cretă	Fumo	Fumo	—	—	Circulară	Circulară	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat

Analiza proprietăților morfo-culturale ale tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02, după 1 an de păstrare în stare liofilizată a relevat mai multe modificări fenotipice. În tabelul 4.6. și figura 4.10. este prezentată morfologia coloniilor culturii studiate, în cazul păstrării timp de 1 an pe mediul lioprotector suplimentat cu preparate cianobacteriene și reactivării culturii cu apă distilată.

Modificări ale culorii miceliului de substrat au fost înregistrate atât în varianta martor, cât și cele experimentale. Capacitatea de sinteză a pigmentului solubil, care colorează mediul agarizat, s-a manifestat mai exprimat în cazul suplimentării mediului lioprotector cu extractul BioR.

Forma și profilul coloniilor de *S. canosus* CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek după păstrare timp de 1 an pe mediul protector suplimentat cu extracte din spirulina, nu diferă esențial de proba martor.

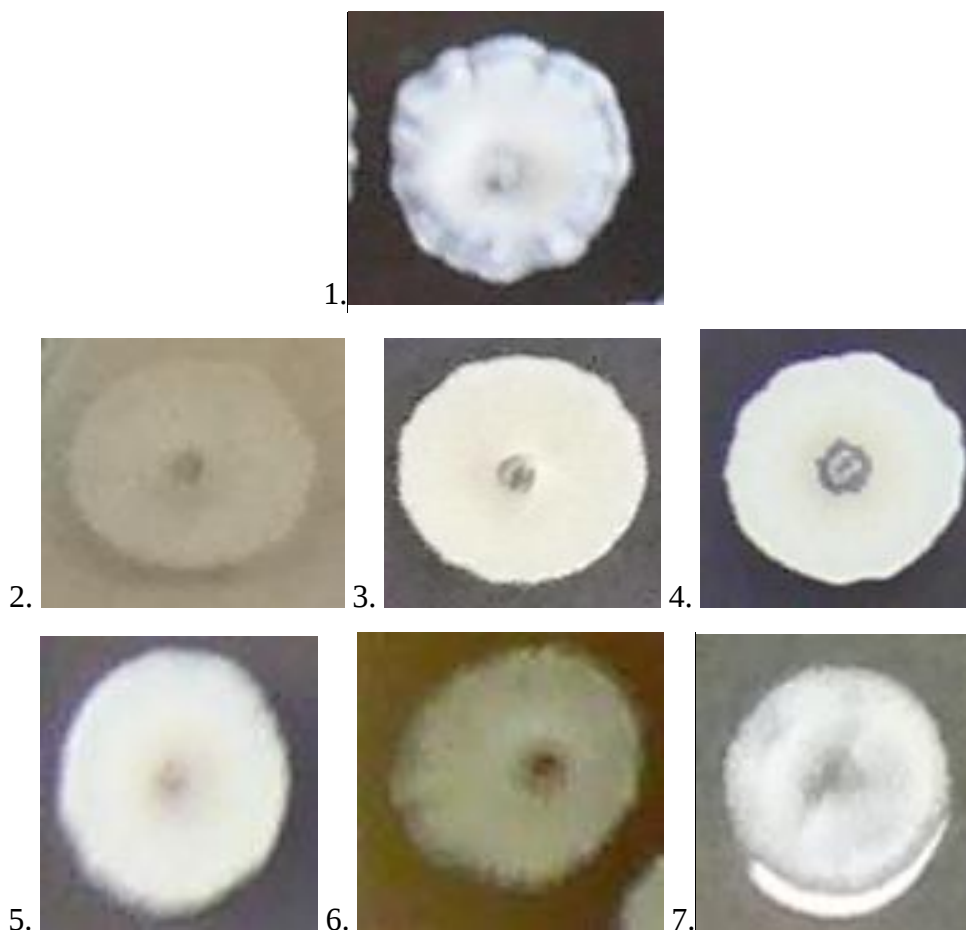


Fig. 4.10. Aspectul coloniilor de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL (martor) și după 1 an de păstrare în stare liofilizată (probe experimentale) în prezența compușilor de origine cianobacteriană, la rehidratare cu apă distilată:

1 – Martor; 2 – 0,1% BioR; 3 – 1,0% BioR; 4 – 10,0% BioR; 5 – 1,0% PSS_{Zn};

6 – 5,0% PSS_{Zn}; 7 – 10,0% PSS_{Zn}

În continuare, extractele cianobacteriene au fost utilizate și la reactivarea tulpinii după 1 an de păstrare în stare liofilizată. În tabelul 4.7. și figura 4.11. sunt prezentate rezultatele studiului proprietăților morfo-culturale ale tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 sub acțiunea preparatelor BioR și PSS_{Zn}, utilizate în calitate de supliment al mediului de liofilizare, precum și de soluție de reactivare după 1 an de păstrare.

Tabelul 4.7. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL și după 1 an de păstrare în stare liofilizată, rehidratate în prezența compușilor de origine cianobacteriană

Varianta	Diametrul coloniilor, mm		Miceliul				Culoarea mediului		Forma		Marginea		Profilul	
	PL	1 an	Aerian		Substrat		PL	1 an	PL	1 an	PL	1 an	PL	1 an
			PL	1 an	PL	1 an								
Martor	3,0 – 5,0	3,0 – 5,0	Alb-gri	Verde-gri	Incolor	Alb de cretă	—	—	Tip L	Tip L	Netedă	Netedă	Bombat	Bombat
0,1% BioR + BioR 0,01%	4,0 – 5,5	4,5 – 5,5	Albui	Albui	Gri	Gri	—	—	Circulară	Circulară	Netedă	Netedă	Înalt	Înalt
1,0% BioR + BioR 0,1%	4,5 – 5,0	4,5 – 5,0	Șamua	Șamua	Galben-cafeniu	Galben-cafeniu	—	—	Circulară	Circulară	Netedă	Netedă	Înalt	Înalt
10,0% BioR + BioR 1,0%	4,5 – 5,0	4,5 – 5,0	Gălbui	Galben de lămâie	Incolor	Albui	Roz-palid	Roz-palid	Circulară	Circulară	Netedă	Netedă	Înalt	Înalt
1,0% PSS _{Zn} + PSS _{Zn} 0,1%	4,5 – 5,0	4,5 – 5,0	Galben-palid	Galben-palid	Bej	Bej	—	—	Circulară	Circulară	Netedă	Netedă	Înalt	Înalt
5,0% PSS _{Zn} + PSS _{Zn} 0,5%	4,5 – 5,0	4,5 – 5,0	Cremos	Cremos	Galben-cafeniu	Galben-cafeniu	—	—	Circulară	Circulară	Netedă	Netedă	Înalt	Înalt
10,0% PSS _{Zn} + PSS _{Zn} 1,0%	4,5 – 5,0	4,5 – 5,0	Gălbui	Galben de lămâie	Galben-cafeniu	Galben-cafeniu	—	—	Circulară	Circulară	Netedă	Netedă	Înalt	Înalt

După cum se poate constata din datele prezentate, schimbările intervenite în aspectul, forma, profilul coloniilor după 1 an de păstrare în stare liofilizată și reactivare cu soluții ale extractelor cianobacteriene, sunt minore. Capacitatea de a sintetiza pigmentul solubil, influențând culoarea mediului agarizat de cultivare Czapek a fost observată doar la varianta

experimentală cu utilizarea în calitate de supliment la mediul lioprotector a extractului BioR în concentrație de 10,0% și a soluției de rehidratare BioR 1,0%.

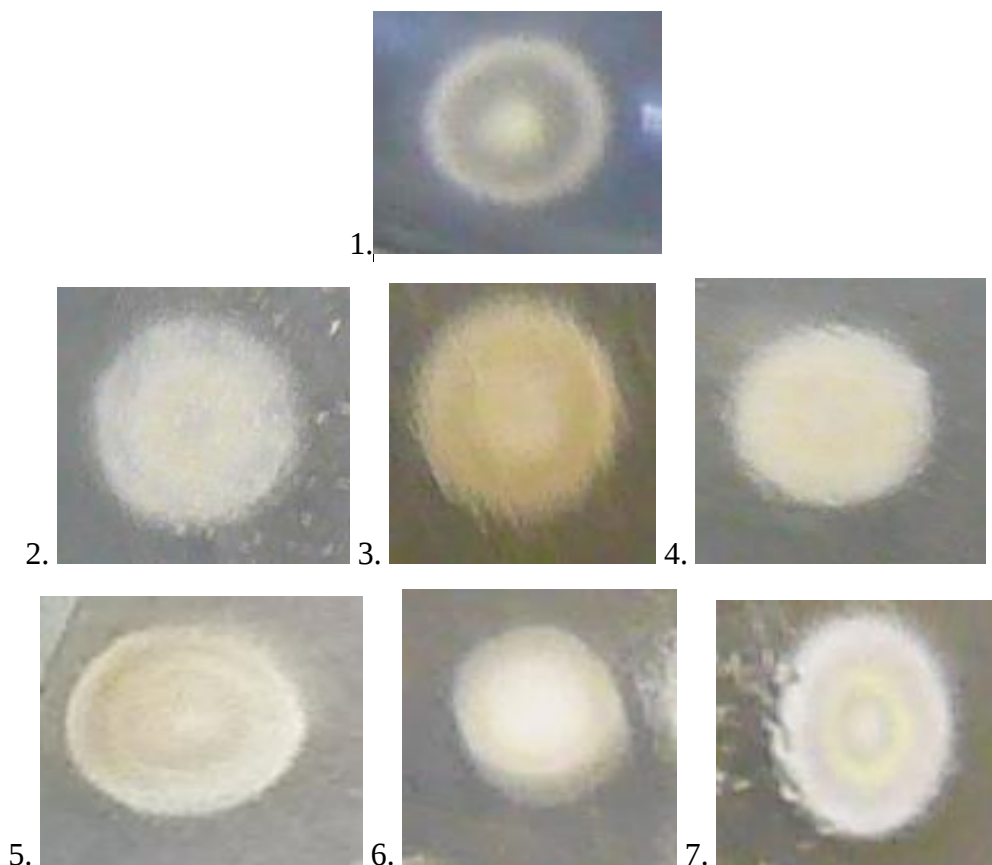


Fig. 4.11. Coloniile tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL (martor) și după 1 an de păstrare în stare liofilizată (probele experimentale) în prezența compușilor de origine cianobacteriană, rehidratat cu soluții de principii utilizate:

1 – Martor; 2 – 0,1% BioR + BioR 0,01%; 3 – 1,0% BioR + BioR 0,1%; 4 – 10,0% BioR + BioR 1,0%; 5 – 1,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 0,1%; 6 – 5,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 0,5%; 7 – 10,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 1,0%

În continuare, a fost verificată stabilitatea tulpinii liofilizate după 1 an de păstrare în cadrul stabilirii limitelor efectului pozitiv al extractelor cianobacteriene.

Rezultatele acestor experimente sunt prezentate în tabelul 4.8. și figura 4.12, din care se observă o stabilitate mai pronunțată a tulpinii de streptomicete studiată în cazul utilizării extractului de polizaharide sulfatate cu zinc în calitate de supliment la mediul de liofilizare și soluție de rehidratare.

Tabelul 4.8. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL și după 1 an de păstrare în stare liofilizată și rehidratate în prezența compușilor de origine cianobacteriană, în cadrul stabilirii limitelor efectului pozitiv

Varianta	Diametrul coloniilor, mm		Culoarea miceliului				Culoarea mediului		Forma		Marginea		Profilul	
	PL	1 an	Aerian		Substrat		PL	1 an	PL	1 an	PL	1 an	PL	1 an
Martor	3,0 – 5,0	3,0 – 5,0	Alb-gri	Verde-gri	Incolor	Alb de cretă	—	—	Tip L	Tip L	Netedă	Netedă	Bombat	Bombat
0,1% BioR + BioR 0,001%	3,5 – 4,0	4,0 – 4,5	Verde-albăstrui	Gri	Albui	Albui-gri	—	—	Filamentoasă	Filamentoasă	Lobată	Lobată	Neregulat	Neregulat
10,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 5,0%	4,0 – 4,5	4,5 – 5,0	Crem	Crem	Galben-cafeniu	Galben-cafeniu	Roz-palid	Roz-palid	Circulară	Circulară	Netedă	Netedă	Neregulat	Neregulat



Fig. 4.12. Coloniile tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL (martor) și după 1 an de păstrare în stare liofilizată (probele experimentale) și rehidratate în prezența compușilor de origine cianobacteriană, în cadrul stabilirii limitelor efectului pozitiv: 1 – Martor; 2 – 0,1% BioR + BioR 0,001%; 3 – 10,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 5,0%

La următoarea etapă a cercetărilor, a fost studiată stabilitatea culturii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după păstrare timp de 1 an în stare liofilizată în mediul Gel+Gl suplimentat cu PSS_{Zn} în

concentrații majorate și rehidratate cu apă distilată. Tabelul 4.9. și figura 4.13. prezintă rezultatele verificării caracterelor morfologice ale coloniilor.

Tabelul 4.9. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 pe mediul agarizat Czapek, PL și după 1 an de păstrare în stare liofilizată în prezența PSS_{Zn}, rehidratate cu apă distilată

Varianta	Diametrul coloniilor, mm		Miceliul				Culoarea mediului		Forma		Marginea		Profilul	
	PL	1 an	Aerian		Substrat		PL	1 an	PL	1 an	PL	1 an	PL	1 an
			PL	1 an	PL	1 an								
Martor	3,0 – 5,0	3,0 – 5,0	Alb-gri	Verde-gri	Incolor	Alb de cretă	—	—	Tip L	Tip L	Netedă	Netedă	Bombat	Bombat
20,0% PSS _{Zn}	3,5 – 4,5	3,5 – 5,0	Galben-palid	Galben-palid	Galben de miere	Galben de miere	Violet închis	Violet închis	Circulară cu margini bombate	Circulară cu margini bombate	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat
30,0% PSS _{Zn}	4,0 – 5,0	3,0 – 4,5	Galben-paie	Albui-gri	Samoa	Samoa	—	Roz de marmură	Circulară	Circulară	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat
50,0% PSS _{Zn}	3,0 – 4,0	3,0 – 4,0	Gri	Albui	Bej	Bej	Roz de marmură	—	Circulară	Circulară	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat

Datele prezentate indică colonii mai mari ale culturii din probele experimentale, comparativ cu proba martor. Culoarea miceliului aerian a suferit schimbări în toate variantele prezentate, atât până, cât și după liofilizare. Pe când miceliul de substrat a înregistrat schimbări ale culorii până la liofilizare, rămânând neschimbat după liofilizare. Capacitatea de sinteză a pigmentului solubil la fel a variat la toate probele experimentale.

Au suferit schimbări forma și marginea coloniilor de *S. canosus* CNMN-Ac-02, pe când profilul coloniilor în toate variantele a rămas neschimbat.

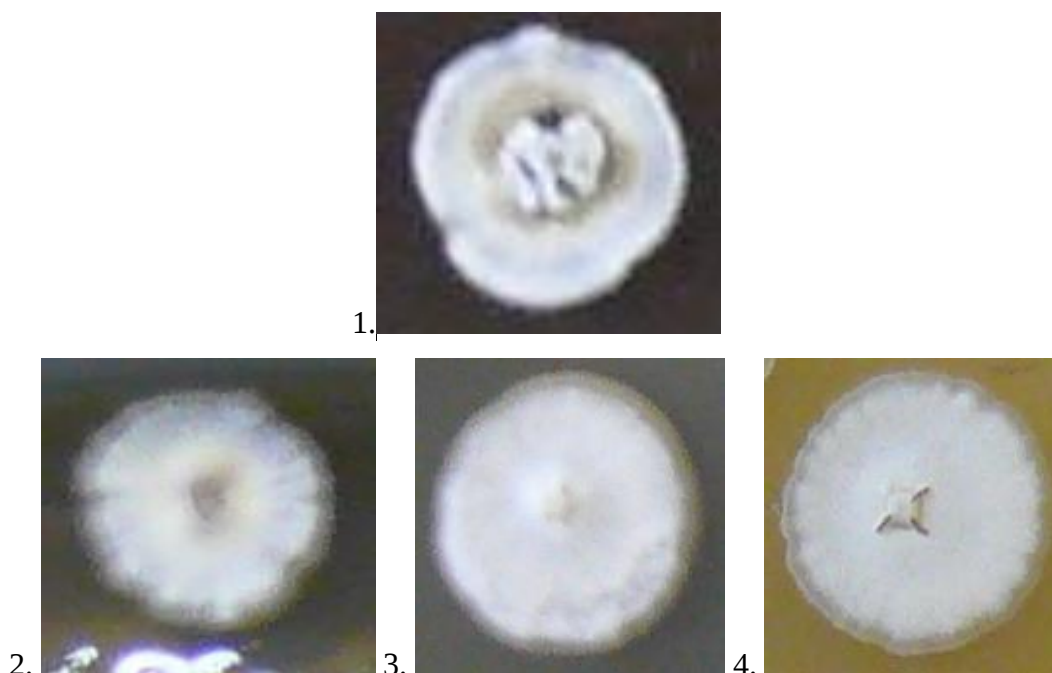


Fig. 4.13. Aspectul coloniilor de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 pe mediul Czapek, PL (martor) și după 1 an de păstrare în stare liofilizată (probele experimentale) în prezența polizaharidelor sulfatate cu zinc, la rehidratare cu apă distilată: 1 – Martor;

2 – 20,0% PSS_{Zn}; 3 – 30,0% PSS_{Zn}; 4 – 50,0% PSS_{Zn}

În tabelul 4.10. și figura 4.14. sunt prezentate rezultatele acțiunii extractului PSS_{Zn} în concentrație de 20,0%, 30,0% și 50,0%, prezent în mediul de liofilizare și a soluției de rehidratate de PSS_{Zn} 5,0% asupra proprietăților morfo-culturale ale tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02, după 1 an de păstrare. Astfel, dimensiunile coloniilor în probe experimentale s-au evidențiat prin mărimi mai mari decât cele ale probei martor, cu o influență vădită a extractului de 30,0% PSS_{Zn}. Culoarea miceliului aerian în toate probele studiate a fost identică și nu a suferit schimbări în procesul liofilizării. Diferențe au fost observate înainte de liofilizare la miceliul de substrat al coloniilor în prezența diferitor concentrații ale extractului PSS_{Zn}, dar care nu a suferit schimbări după liofilizare.

Astfel, prezența în mediul de liofilizare a concentrațiilor sporite de polizaharide sulfatate, obținute din biomasa spirulinei, determină schimbări ale culorii miceliului de substrat chiar la suspendarea culturii *S. canosus* CNMN-Ac-02 înainte de liofilizare.

Tabelul 4.10. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 pe mediul Czapek, PL și după 1 an de păstrare în stare liofilizată și rehidratare în prezența polizaharidelor sulfatate cu zinc

Varianta	Diametrul coloniilor, mm		Miceliul				Culoarea mediului		Forma		Marginea		Profilul	
	PL	1 an	Aerian		Substrat		PL	1 an	PL	1 an	PL	1 an	PL	1 an
			PL	1 an	PL	1 an								
Martor	3,0 – 5,0	3,0 – 5,0	Alb-gri	Verde-gri	Incolor	Alb de cretă	—	—	Tip L	Tip L	Netedă	Netedă	Bombat	Bombat
20,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 5,0%	3,5 – 4,0	3,5 – 4,5	Alb-gri	Alb-gri	Albastru-verzui	Albastru-verzui	—	—	Neregulată întinsă	Neregulată întinsă	Lobată	Lobată	Ombilicat	Ombilicat
30,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 5,0%	4,5 – 5,5	3,0 – 4,5	Alb-gri	Alb-gri	Galben de măsline	Galben de măsline	Roz-palid	Roz-palid	Neregulată întinsă	Neregulată întinsă	Lobată	Lobată	Înalt	Înalt
50,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 5,0%	3,0 – 4,0	3,0 – 4,5	Alb-gri	Alb de cretă	Albastru-verzui	Albastru-verzui	—	—	Circulară	Circulară	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat

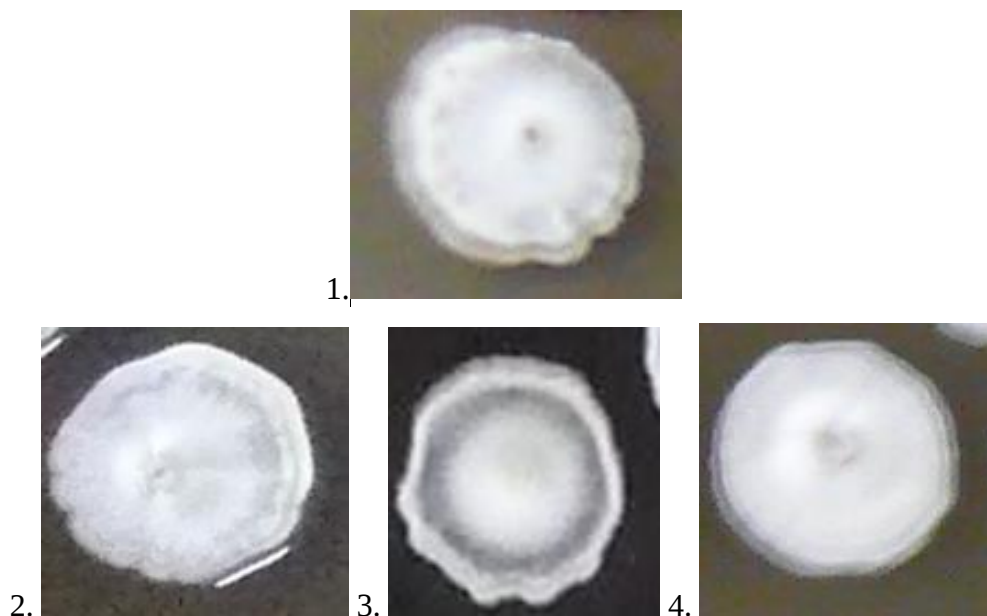


Fig. 4.14. Aspectul coloniilor tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 pe mediul Czapek, PL (martor) și după 1 an de păstrare în stare liofilizată (probele experimentale) și rehidratare în prezența polizaharidelor sulfatate cu zinc: 1 – Martor; 2 – 20,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 5,0%; 3 – 30,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 5,0%; 4 – 50,0% PSS_{Zn} + PSS_{Zn} 5,0%

Culoarea albuie a culturii în lipsa extractului cianobacterian, capătă nuanțe albastru-verzui la concentrațiile 20,0% și 50,0% ale PSS_{Zn} și galben-măslinie la concentrația extractului de 30,0% în mediul de liofilizare. Miceliul de substrat își păstrează aceste nuanțe de culori și după reactivarea culturii păstrate timp de 1 an în prezența extractului de polizaharide sulfatate. Capacitatea de a produce pigmenți solubili capabili să coloreze mediul agarizat în roz-palid a fost observată numai la varianta experimentală a mediului lioprotector suplimentat cu PSS_{Zn} în concentrație de 30,0% și utilizarea soluției de reactivare a culturii de PSS_{Zn} 5,0%.

Forma și marginea coloniilor a fost identică la proba martor și variantele experimentale, cu excepția variantei mediului lioprotector suplimentat cu PSS_{Zn} în concentrație de 50,0% și rehidratării culturii cu soluție de PSS_{Zn} 5,0 %. În acest caz coloniile au avut un aspect circular cu margine netedă, față de forma neregulată și marginea lobată la celelalte probe studiate.

Astfel, studiul variabilității morfologice a tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 la păstrare și reactivare a culturii cu utilizarea extractelor cianobacteriene, indică o stabilitate a caracterelor morfo-culturale ale tulpinii în procesul liofilizării, mai cu seamă a aspectului coloniilor și culorii miceliului aerian.

4.2. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 până la și după liofilizare în prezența substanțelor biologice 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 rehidranți 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.

În tabelul 4.11. și figura 4.15. sunt prezentate modificările proprietăților morfo-culturale ale tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 sub influența preparatelor glicozidice, prin rehidratarea probelor cu apă distilată.

Rezultatele indică colonii de dimensiuni mai mari ale culturii din probele experimentale față de proba 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%.

Tabelul 4.11. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 pe mediul Czapek, PL și DL în prezența glicozidelor de origine vegetală, la rehidratare cu apă distilată

Varianta	Diametrul coloniilor, mm		Culoarea miceliului				Culoarea mediului		Forma		Marginea		Profilul	
	PL	DL	Aerian		Substrat		PL	DL	PL	DL	PL	DL	PL	DL
			PL	DL	PL	DL								
Martor	3,0 – 5,0	3,0 – 5,0	Alb-gri	Verde-gri	Incolor	Alb de cretă	—	—	Tip L	Tip L	Netedă	Netedă	Bombat	Bombat
0,05% LG	4,5 – 6,5	4,5 – 6,5	Albui	Albui	Galben de măsline	Galben de măsline	Roz-pal	Roz-pal	Concentrică	Concentrică	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat
0,005% LG	4,5 – 6,5	4,5 – 6,5	Crem	Crem	Samoa	Samoa	—	—	Concentrică	Concentrică	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat
0,0005% LG	5,0 – 7,0	4,5 – 7,0	Alb de cretă	Alb de cretă	Galben de măsline	Galben de măsline	Roz-pal	Roz-pal	Cicirculară	Cicirculară	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat
0,00005% LG	4,0 – 6,5	4,0 – 6,5	Albui	Albui	Galben de măsline	Galben de măsline	Roz-pal	Roz-pal	Concentrică	Concentrică	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat
0,05% VP	4,0 – 6,5	4,0 – 6,5	Alb-gri	Alb-gri	Cafeniu	Cafeniu	Roz-pal	Roz-pal	Tip-L	Tip-L	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat
0,005% VP	4,5 – 7,5	4,5 – 7,5	Alb-gri	Alb-gri	Galben-verzui	Galben-verzui	Roz-pal	Roz-pal	Tip-L	Tip-L	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat
0,0005% VP	3,5 – 6,5	3,5 – 6,5	Alb-gri	Alb-gri	Cafeniu	Cafeniu	Roz-pal	Roz-pal	Tip-L	Tip-L	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat

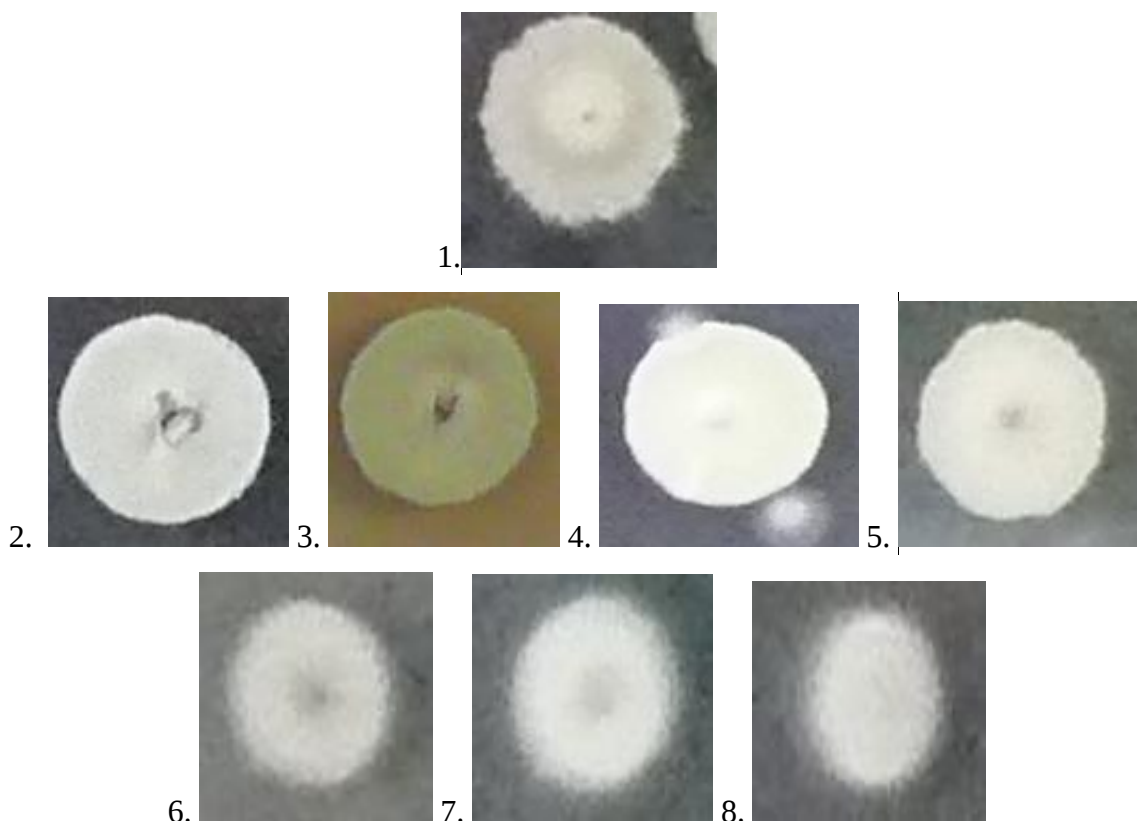


Fig. 4.15. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 pe mediul Czapek, PL (martor) și DL (probele experimentale) în prezența glicozidelor de origine vegetală, la rehidratare cu apă distilată: 1 – Martor; 2 – 0,05% LG; 3 – 0,005% LG; 4 – 0,0005% LG; 5 – 0,00005% LG; 6 – 0,05% VP; 7 – 0,005% VP; 8 – 0,0005% VP

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 de tipul și concentrația extractului utilizat, o varietate de culori: gri, galben-verzui, samoa, cafeniu.

Toate variantele studiate au manifestat proprietatea de a sintetiza pigmentul solubil de culoare roz-pal capabil să influențeze culoarea mediului. Forma coloniilor a fost practic identică la toate variantele studiate, fără schimbări în urma procesului de liofilizare. Marginile coloniilor *S. canosus* CNMN-Ac-02 preponderent ondulate; au fost netede la cultura din probele suspendate în mediu cu glicozide **LG**. Profilul coloniilor la toate variantele în studiu a fost ombilicat, fără schimbări după liofilizare.

În tabelul 4.12. și figura 4.16. sunt prezentate caracterele morfo-culturale ale tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 până la și după liofilizare, cu utilizarea în calitate de substanțe lioprotectoare și medii de rehidratare a glicozidelor vegetale.

Tabelul 4.12. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 pe mediul Czapek, PL și DL și rehidratate în prezența glicozidelor de origine vegetală

Varianta	Diametrul coloniilor, mm		Culoarea miceliului				Culoarea mediului		Forma		Marginea		Profilul	
	PL	DL	Aerian		Substrat		PL	DL	PL	DL	PL	DL	PL	DL
			PL	DL	PL	DL								
Martor	3,0 – 5,0	3,0 – 5,0	Alb-gri	Verde-gri	Incolor	Alb de cretă	—	—	Tip L	Tip L	Netedă	Netedă	Bombat	Bombat
0,05% LG + LG 0,005%	4,5 – 6,5	4,5 – 6,5	Suriu	Gri	Samoa	Samoa	Roz-pal	Roz-pal	Circulară	Circulară	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat
0,005% LG+ LG 0,0005%	4,5 – 6,5	4,5 – 6,5	Alb-gri	Alb-gri	Gri-închis	Gri-închis	Roz-pal	Roz-pal	Circulară	Circulară	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat
0,0005% LG + LG 0,00005%	5,0 – 7,0	4,5 – 7,0	Gri	Gri	Samoa	Samoa	Roz-pal	Roz-pal	Circulară	Circulară	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat
0,00005% LG+ LG 0,000005%	4,0 – 6,5	4,0 – 6,5	Alb-gri	Alb-gri	Sur-închis	Gri-închis	Roz-pal	Roz-pal	Circulară	Circulară	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat
0,05% VP+ VP 0,005%	4,0 – 6,0	4,0 – 6,0	Gri	Gri	Samoa	Samoa	Roz-pal	Roz-pal	Circulară	Circulară	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat
0,005% VP+ VP 0,0005%	4,5 – 7,0	4,5 – 7,0	Alb-gri	Alb-gri	Gri-închis	Gri-închis	Roz-pal	Roz-pal	Circulară	Circulară	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat
0,0005 % VP + VP 0,00005%	3,5 – 6,5	3,5 – 6,5	Gri	Gri	Samoa	Samoa	Roz-pal	Roz-pal	Circulară	Circulară	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat

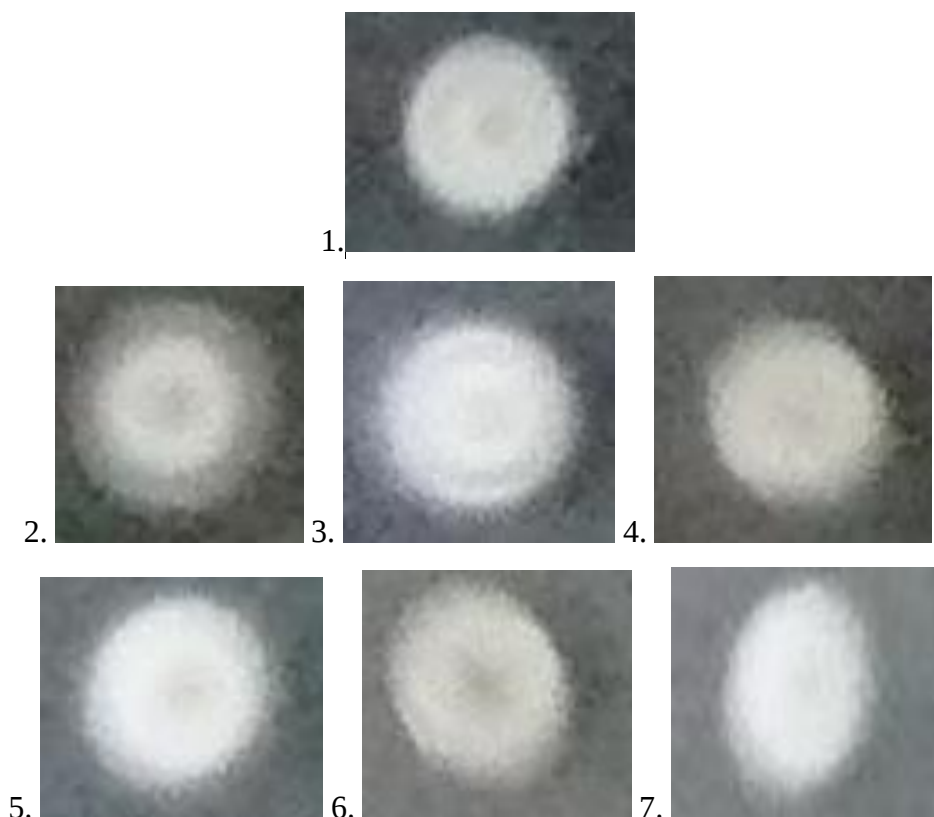


Fig. 4.16. Aspectul coloniilor de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 pe mediul Czapek, PL (martor) și DL (probele experimentale) și rehidratate în prezența glicozidelor de origine vegetală:

1 – Martor; 2 – 0,05% LG + LG 0,005%; 3 – 0,005% LG + LG 0,0005%; 4 – 0,0005% LG + LG 0,00005%; 5 – 0,00005% LG + LG 0,000005%; 6 – 0,05% VP + VP 0,005%; 7 – 0,005% VP + VP 0,0005%; 8 – 0,0005% VP + VP 0,00005%

În prezența glicozidelor vegetale în mediul de liofilizare și rehidratare a tulpinii de streptomicete au fost observat diametrul mai mare al coloniilor față de proba martor, cu cele mai mari dimensiuni înregistrate în cazul utilizării glicozidelor **LG** în concentrație de 0,0005% în mediu de liofilizare și 0,00005% în mediul de rehidratare.

Culoare miceliului aerian și de substrat nu a fost influențată de prezența glicozidelor în mediile de liofilizare și rehidratare a streptomicetei și nu a suferit schimbări în procesul liofilizării culturii *S. canosus* CNMN-Ac-02. Proprietatea de sintetiza pigmentul solubil în mediul de cultivare a fost constatată la toate variantele studiate, forma, marginea și profilul coloniei nu au suferit modificări pe parcursul liofilizării și rehidratării tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 cu utilizarea glicozidelor vegetale.

În continuare, au fost studiate proprietăților morfo-culturale ale tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după 1 an de păstrare în stare liofilizată (Tabelul 4.13., Figura 4.17). Tulpina a

fost liofilizată în prezența glicozidelor **LG** și **VP**, iar în calitate de mediu de reactivare a servit apa distilată.

Tabelul 4.13. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 pe mediul Czapek, PL și după 1 an de păstrare în stare liofilizată în prezența glicozidelor de origine vegetală

Varianta	Diametrul coloniilor, mm		Culoarea miceliului				Culoarea mediului		Forma		Marginea		Profilul	
	PL	1 an	Aerian		Substrat		PL	1 an	PL	1 an	PL	1 an	PL	1 an
			PL	1 an	PL	1 an								
Martor	3,0 – 5,0	3,0 – 5,0	Alb-gri	Verde-gri	Incolor	Alb de cretă	—	—	Tip L	Tip L	Netedă	Netedă	Bombat	Bombat
0,05% LG	4,5 – 6,5	4,5 – 6,0	Albui	Crem	Galben de măsline	Galben de măsline	—	—	Circulară cu margini bombate	Circulară cu margini bombate	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat
0,005% LG	4,5 – 6,5	4,0 – 6,0	Crem	Crem	Șamua	Șamua	Roz-pal	Roz-pal	Neregulat ă întinsă	Neregulat ă întinsă	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat
0,0005% LG	5,0 – 7,0	4,5 – 6,5	Alb de cretă	Alb de cretă	Galben de măsline	Galben de măsline	Roz-pal	Roz-pal	Neregulat ă întinsă	Neregulat ă întinsă	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat
0,00005% LG	4,0 – 6,5	4,0 – 6,5	Albui	Albui	Galben de măsline	Galben de măsline	Roz-pal	Roz-pal	Concentrică	Concentrică	Ondulată	Ondulată	Înalt	Înalt
0,05% VP	4,0 – 6,5	4,0 – 6,5	Alb-gri	Alb-gri	Cafeniu	Cafeniu	Roz-pal	Roz-pal	Neregulat ă întinsă	Neregulat ă întinsă	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat
0,005% VP	4,5 – 7,5	4,5 – 7,5	Alb-gri	Gri	Galben-verzui	Galben-verzui	Roz-pal	Roz-pal	Cutată	Cutată	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat
0,0005% VP	3,5 – 6,5	3,5 – 6,5	Alb-gri	Albui	Cafeniu	Cafeniu	Roz-pal	Roz-pal	Cutată	Cutată	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat

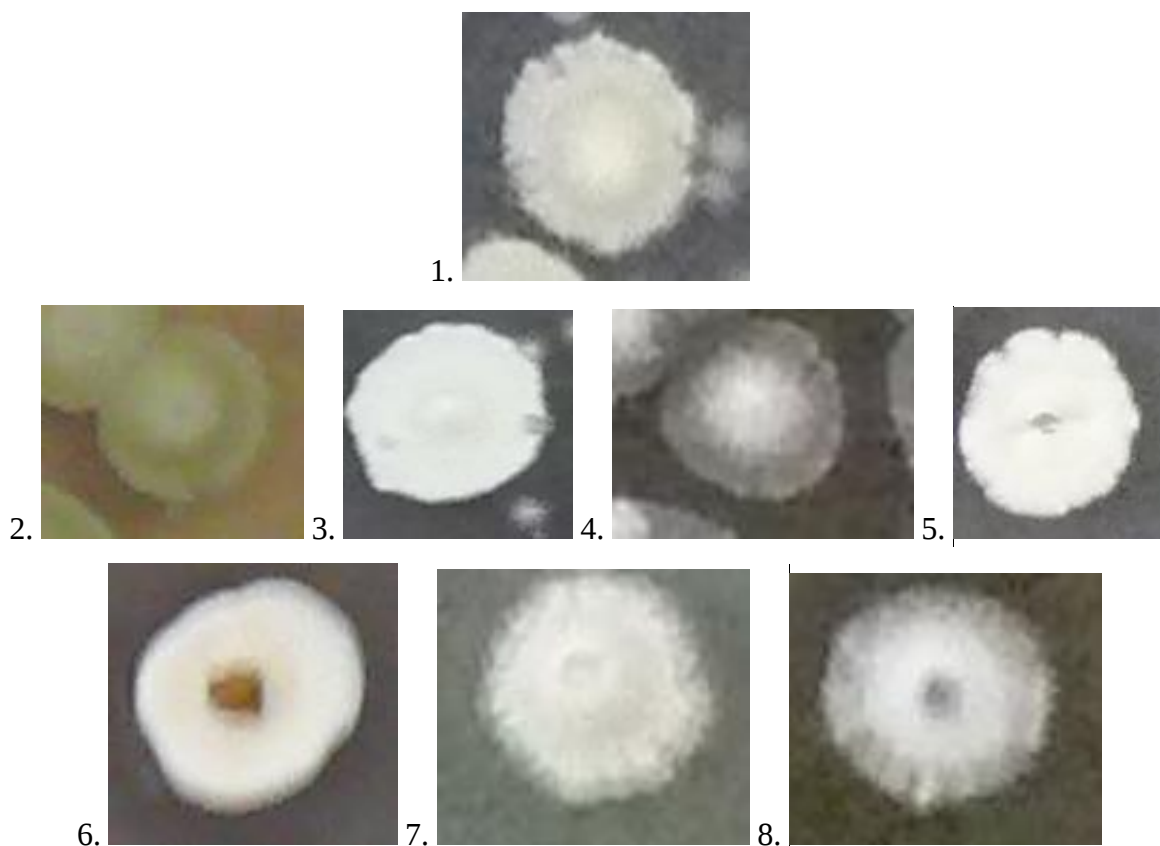


Fig. 4.17. Aspectul coloniilor de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 pe mediul Czapek, PL (martor) și după 1 an de păstrare în stare liofilizată (probele experimentale) în prezența glicozidelor de origine vegetală, la rehidratare cu apă distilată: 1 – Martor; 2 – 0,05% LG; 3 – 0,005% LG; 4 – 0,0005% LG; 5 – 0,00005% LG; 6 – 0,05% VP; 7 – 0,005% VP; 8 – 0,0005% VP

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 concentrației de 0,0005% a iridoidelor **LG** și de 0,005% a flavonoidelor **VP**.

Culoarea miceliul aerian atât la proba martor, cât și la probele 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 proba martor și cafeniu, galben-verzui și samoa la probele 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 liofilizare. 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 proba 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 prezentate în tabelul 4.14. și figura 4.18, ne permite să constatăm, că după 1 an de păstrare a tulpinii de streptomicete, 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 probei martor. Această afirmație corespunde mai ales variantei cu mediul de liofilizare suplimentat cu iridoide **LG** în concentrație de 0,0005%, și rehidratarea probei cu soluție de extract **LG** de 0,00005%. În cazul utilizării flavonoidelor **VP**, cele mai bune rezultate au fost obținute la probele păstrate în mediul lioprotector suplimentat cu extract **VP** în concentrație de 0,005% și rehidratate soluție de 0,0005% ale aceluiași extract.

Nu au fost observate deosebiri majore între proba martor și cele experimentale în ce privește culoarea miceliului aerian, cu o gamă de culori variind în diapazonul alb-gri – gri – albui – alb de cretă.

O gamă de culori și mai îngustă a fost observată la miceliul de substrat, de culoare gri-închis la proba martor și culoare samoa sau gri-închis la probele 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 a înregistrat schimbări 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.

Tabelul 4.14. Proprietățile morfo-culturale ale tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 cultivate pe mediul Czapek, PL și după 1 an de păstrare în stare liofilizată și rehidratate în prezența glicozidelor de origine vegetală

Varianta	Diametrul coloniilor, mm		Culoarea miceliului				Culoarea mediului		Forma		Marginea		Profilul	
	PL	1 an	Aerian		Substrat		PL	1 an	PL	1 an	PL	1 an	PL	1 an
			PL	1 an	PL	1 an								
Martor														
	3,0 – 5,0	3,0 – 5,0	Alb-gri	Verde-gri	Incolor	Alb de cretă	—	—	Tip L	Tip L	Netedă	Netedă	Bombat	Bombat
0,05% LG + LG 0,005%	4,5 – 6,5	4,0 – 6,0	Cenușiu	Albui	Samoa	Samoa	Roz-pal	Roz-pal	Circulară margini bombate	Circulară margini bombate	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat
0,005% LG + LG 0,0005%	4,5 – 6,5	4,5 – 6,5	Alb-gri	Alb-gri	Cenușiu - închis	Cenușiu - închis	Roz-pal	Roz-pal	Circulară margini bombate	Circulară margini bombate	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat
0,0005% GL + LG 0,00005%	5,0 – 7,0	4,5 – 7,0	Cenușiu	Cenușiu	Samoa	Samoa	Roz-pal	Roz-pal	Circulară margini bombate	Circulară margini bombate	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat
0,00005% LG + LG 0,000005%	4,0 – 6,5	4,0 – 6,5	Alb-gri	Alb de cretă	Cenușiu - închis	Cenușiu - închis	Roz-pal	Roz-pal	Circulară margini bombate	Circulară margini bombate	Ondulată	Ondulată	Ombilicat	Ombilicat
0,05% VP + VP 0,005%	4,0 – 6,0	3,5 – 6,0	Cenușiu	Cenușiu	Samoa	Samoa	Roz-pal	Roz-pal	Circulară margini bombate	Circulară margini bombate	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat
0,005% VP + VP 0,0005%	4,5 – 7,0	4,5 – 6,5	Alb-gri	Alb-gri	Sur-închis	Cenușiu - închis	Roz-pal	Roz-pal	Circulară margini bombate	Circulară margini bombate	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat
0,0005% VP + VP 0,00005%	3,5 – 6,5	3,0 – 6,0	Cenușiu	Alb de cretă	Samoa	Samoa	Roz-pal	Roz-pal	Circulară margini bombate	Circulară margini bombate	Netedă	Netedă	Ombilicat	Ombilicat



Fig. 4.18. Aspectul coloniilor la *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 pe mediul Czapek, PL (martor) și după 1 an de păstrare în stare liofilizată (probele experimentale) și rehidratate în prezența glicozidelor de origine vegetală: 1 – Martor; 2 – 0,05% LG + LG 0,005%; 3 – 0,005% LG + LG 0,0005%; 4 – 0,0005% LG + LG 0,00005%; 5 – 0,00005% LG + LG 0,000005%; 6 – 0,05% VP + VP 0,005%; 7 – 0,005% VP + VP 0,0005%; 8 – 0,0005% VP + VP 0,00005%

La finalul cercetărilor efectuate în vederea evidențierii acțiunii glicozidelor vegetale asupra caracterelor morfo-culturale ale tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02, putem conclud, că extractele vegetale studiate nu induc o variabilitate morfologică evidentă a populației de streptomicete în procesul de păstrare în stare liofilizată. 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.

4.3. Concluzii la capitolul 4

Studiul acțiunii extractelor cianobacteriene și vegetale asupra proprietăților morfo-culturale ale tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 în procesul păstrării în stare liofilizată indică asupra următoarelor concluzii:

1. Extractele cianobacteriene (BioR și PSS_{Zn}) și glicozidele vegetale (iridoide și flavonoide) utilizate în calitate de lioprotectori în componența mediului Gelatină + Glucoză la liofilizarea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 au asigurat o stabilitate morfologică a culturii, caracterizată de păstrarea caracterelor fenotipice după 1 an de conservare a tulpinii.
2. Dintre caracterele morfo-culturale studiate, cea mai scăzută variabilitate a manifestat-o culoarea miceliului aerian, forma, profilul și marginea coloniilor.
3. O variabilitate relativă a fost înregistrată în ce privește culoarea miceliului de substrat, deosebirile față de proba martor fiind atestate chiar de la etapa de suspendare a culturii în mediul lioprotector, păstrându-se în urma procesului de liofilizare.
4. Caracterul de formare a pigmentului solubil de culoare roz-pal, apărut în urma suspendării culturii în mediul lioprotector suplimentat cu extracte glicozidice vegetale, indică capacitatea de adaptare a tulpinii studiate la factorii de stres și creare a condițiilor de germinare a sporilor după liofilizare.
5. Utilizarea soluțiilor de glicozide vegetale contribuie la accelerarea vitezei de germinare a sporilor streptomicetei cu 48 ore.
6. Menținerea tipului morfologic al coloniilor specifice pentru tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02, asigurarea unei creșteri mai rapide și mai intense, manifestată prin mărimile coloniilor obținute în procesul 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 streptomicetei în procesul de conservare.

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

Structura micelială a actinomicetelor asigură posibilitatea exprimării diferențiate a genomurilor în procesul de creștere și ca răspuns la condițiile permanent schimbătoare ale mediului de trai. O urmare a structurii lor complexe sunt și proprietățile adaptive importante ale acestor microorganisme, determinate de capacitatea de a sintetiza un număr mare de metaboliți secundari.

Streptomicetele prezintă un interes practic major, datorită ciclului vital unic pentru procariote, precum și abilității lor de a produce metaboliți secundari: antibiotice, enzime, erbicide, remedii anti-cancer, vitamine, imunomodulatori, lipide, factori de creștere a plantelor [63, 220, 221, 228, 248].

Conform unui studiu a circa 20100 publicații științifice despre streptomicete, publicate în anii 2000-2017, aceste microorganisme sunt cele mai bogate surse cunoscute de substanțe bioactive. De rând cu aceasta, datorită metabolismului lor versatil, aceste bacterii sunt astăzi cei mai importanți furnizori de echipament biocatalitic cu aplicații avansate în biotehnologie [139].

Nu mai puțin important este și rolul tulpinilor producătoare de lipide. Conform caracteristicilor generale, streptomicetele nu conțin acizi micolitici, dar conțin cantități considerabile de acizi grași polinesaturați și lipide polare complexe cu conținut tipic de difosfatidil glicerol, fosfatidil etanolamină, fosfatidil inozitol [139].

Rolul lipidelor este foarte important și în procesul de conservare a microorganismelor, care presupune 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 [258].

Condițiile de cultivare și componența mediului nutritiv au un efect semnificativ asupra lipogenezei microorganismelor. Un factor important pentru procesul de lipogeneză este considerată sursa de carbon utilizată. Experimentele privind influența compoziției mediului nutritiv asupra biosintezei lipidelor și a fracțiilor lipidice individuale în tulpina de colecție *S. canosus* 89 au indicat asupra acumulării sporite de lipide în biomasa acestei tulpini la cultivare

pe mediu M-I cu diferiți aditivi. Cel mai bun efect a fost obținut prin adăugarea de uleiuri vegetale, în special ulei de măsline sau muștar. Înlocuirea a jumătate din cantitatea de făină de porumb cu amidon a condus la o creștere a randamentului biomasei la 13,16 g/l și la 11,14 g/l în proba martor. Folosirea făinii de soia în loc de făină de porumb pentru cultivarea submersă a contribuit la creșterea procentului de lipide, iar adăugarea uleiului de măsline în acest mediu a influențat în mod semnificativ lipidogeneza, asigurând o cantitate de lipide în biomasă 22,16%. Pentru tulpină *S. massasporeus* 36, un efect stimulator a fost obținut la utilizarea mediului M10 (unde 40 g/l făină de porumb sunt înlocuite cu 10 g/l cu făină de soia). Cel mai mare procent de lipide în biomasă (13,56%) a fost obținut prin creșterea acestei tulpini pe mediu de soia cu adăugarea de ulei de măsline 0,1% [182].

Componentele de bază ale membranelor biologice sunt fosfolipidele. La bacterii, această fracție lipidică posedă aceeași configurare bistratificată, ca și la stucturile membranare ale eucariotelor. Menținerea acestei configurații este asigurată de transformările fazice ale lipidelor membranare în corespundere cu parametrii fizici ai mediului, ceea ce reprezintă un factor reglator în procesul de supraviețuire a microorganismelor [171, 173, 189].

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 deshidratare sau temperaturi joase [266].

Fracțiile fosfolipidice ale actinobacteriilor pot avea organizare structurală diferită, în dependență de condițiile de temperatură și hidratare. *Streptomyces canosus* este recunoscut în calitate de producător valoros de fosfolipide, cu rol important în diverse procese fiziologice [50].

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 [52, 112, 204].

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.

Acest studiu vine să completeze, să argumenteze și să explice rezultatele cercetărilor efectuate la capitolele precedente, în vederea alegerii unor metode specifice de conservare a tulpinilor de streptomicete din Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene.

Cercetările la acest capitol au fost realizate conform următoarelor etape:

1. Studiul influenței preparatelor cianobacteriene asupra dezvoltării și activității biosintetice a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02;
2. Studiul influenței glicozidelor vegetale asupra dezvoltării și activității biosintetice a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02.

În scopul studierii influenței preparatelor naturale asupra dezvoltării și activității biosintetice a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02, a fost montată o serie de experiențe conform schemei din Figura 5.1.

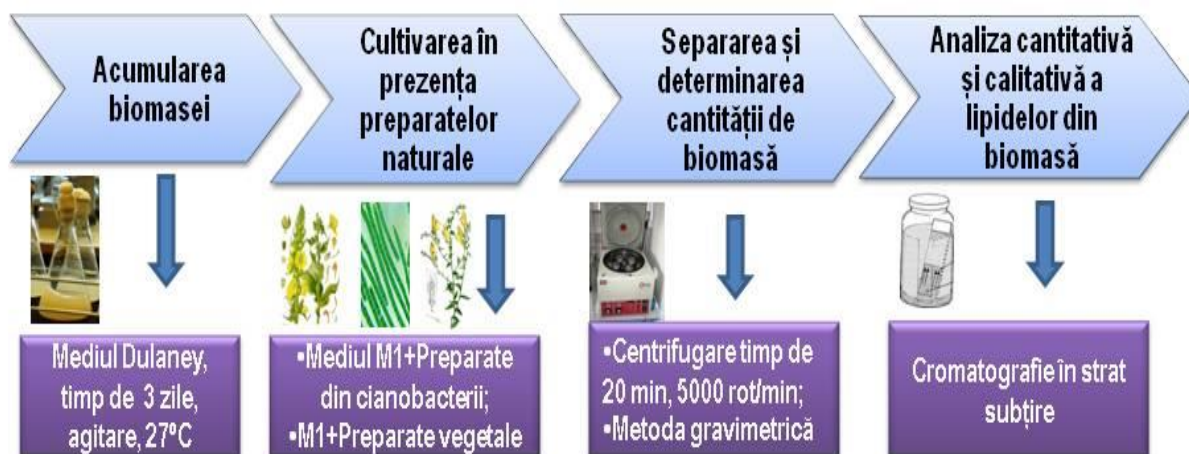


Fig. 5.1. Etapele de realizare a studului de evidențiere a efectului preparatelor naturale asupra dezvoltării și activității biosintetice a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02

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

Preparatele de origine cianobacteriană sunt de perspectivă datorită faptului, că și-au manifestat efectul benefic asupra diferitor procese metabolice din celulele organismelor vii. Am considerat oportun de a realiza un studiu al particularităților de acțiune a unor astfel de preparate asupra tulpinii *Streptomyces canosus*, în calitate de producător de lipide [75, 80].

În continuare sunt prezentate rezultatele testării a două preparate obținute din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*: preparatul PSS_{Zn} (un complex de polizaharide sulfatate cu zinc) și BioR (complex de aminoacizi și oligopeptide). Preparatele menționate au fost utilizate

pentru suplimentarea mediului M-I de cultivare a *Streptomyces canosus* în următoarele concentrații:

- preparatul BioR în concentrațiile 0,1%; 1,0%; 5,0%; 10,0%; 20,0%; 30,0%.
- preparatul PSS_{Zn} în concentrațiile 1,0%; 5,0%; 10,0%; 20,0%; 30,0%; 40,0%.

Pentru început a fost studiată influența preparatelor BioR și PSS_{Zn} asupra numărului de celule viabile de streptomicete, exprimate în unități formatoare de colonii UFC ml⁻¹, la cultivarea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 pe mediul complex lichid M-I [170].

Rezultatele prezentate în tabelul 5.1. indică o influență pozitivă a preparatului BioR în concentrație de 1,0% și 20,0%, care contribuie la formarea unei cantități mai mari de celule active capabile să germineze în urma însămânțării pe mediul agarizat Czapek [164, 247, 256, 257].

Tabelul 5.1. Numărul de UFC ml⁻¹ a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 în urma cultivării pe mediul M-I suplimentat cu principii de origine cianobacteriană

Varianta	Titlul inițial, UFC ml ⁻¹	Titlul final, UFC ml ⁻¹	Titlul UFC ml ⁻¹ , (%)	% Martor
Martor (M-I)	22,7*10 ¹ ±5,7	147,0*10 ¹² ±18,9	325,87±7,76	100,00±0,05
M-I + BioR 0,1%	39,3*10 ³ ±3,5	155,0*10 ¹³ ±11,1	330,67±3,46	101,47±3,17
M-I + BioR 1,0%	32,3*10 ³ ±2,8	284,7*10 ¹³ ±18,8	342,76±2,65	105,18±3,30
M-I + BioR 5,0%	47,0*10 ³ ±5,2	172,0*10 ¹³ ±10,2	326,20±2,88	100,10±2,81
M-I + BioR 10,0%	53,3*10 ³ ±2,8	221,7*10 ¹³ ±28,9	324,62±1,57	99,61±2,13
M-I + BioR 20,0%	40,6*10 ³ ±14,8	312,7*10 ¹⁴ ±25,8	359,38±13,73	110,28±4,56
M-I + BioR 30,0%	56,0*10 ³ ±4,1	247,7*10 ¹³ ±22,1	324,23±1,83	99,49±1,97
M-I + PSS _{Zn} 1,0%	34,7*10 ³ ±4,6	172,0*10 ¹³ ±14,2	335,75±4,51	103,03±3,38
M-I + PSS _{Zn} 5,0%	53,7*10 ³ ±5,3	206,7*10 ¹³ ±5,8	323,90±2,79	99,39±1,85
M-I + PSS _{Zn} 10,0%	56,0*10 ³ ±7,1	222,7*10 ¹³ ±4,7	323,38±3,87	99,23±2,56
M-I + PSS _{Zn} 20,0%	58,7*10 ³ ±8,0	240,3*10 ¹³ ±10,5	322,73±3,79	99,03±2,31
M-I + PSS _{Zn} 30,0%	62,3*10 ³ ±9,8	186,7*10 ¹⁴ ±7,4	341,41±4,00	104,76±2,53
M-I + PSS _{Zn} 40,0%	52,7*10 ³ ±4,6	251,7*10 ¹³ ±4,0	326,25±2,44	100,11±2,69

P=0,05

Astfel, numărul de UFC în urma cultivării tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 pe mediul M-I suplimentat cu BioR în concentrația de 1,0% depășea proba martor cu 5,18±3,30%. Iar cel mai mare număr de UFC a fost înregistrat în urma cultivării streptomicetei pe mediul suplimentat cu BioR în concentrația de 20,0%, valoarea fiind mai mare față de proba martor cu 10,28±4,56%.

Un efect similar a fost observat și la utilizarea preparatului PSS_{Zn}. O influență pozitivă asupra numărului de germeni formatori de colonii a fost atestată doar la utilizarea preparatului PSS_{Zn} în concentrațiile de 1,0% și 30,0%.

În continuare a fost studiată influența preparatelor cianobacteriene asupra cantității de biomasă și conținutului de lipide totale a tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 (Tabelul 5.2.)

Datele din tabel indică o influență stimulatorie a preparatului BioR asupra creșterii cantității de biomasă, acest efect fiind direct proporțional cu concentrația preparatului în mediu și 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. O stimulare maximală a productivității a fost înregistrată la concentrația de 20,0% de BioR în mediu, iar odată cu depășirea acestei concentrații optime, se observă tendința de scădere a efectului stimulator [29].

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 concentrația de 30,0% a preparatului PSS_{Zn}, cu tendința de scădere a efectului stimulator la mărirea ulterioară a concentrației preparatului [28, 186].

Tabelul 5.2. Cantitatea de biomasă și conținutul de lipide totale ale tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 la cultivare pe mediul M-I suplimentat cu preparate de origine cianobacteriană

Varianta	BAU (g/l)	BAU (% martor)	Lipide totale (% din BAU)	Lipide totale (% martor)
Martor (M-I)	$5,38 \pm 0,23$	$100,00 \pm 0,05$	$15,14 \pm 0,43$	$100,00 \pm 0,05$
M-I + BioR 0,1%	$5,93 \pm 0,04$	$110,09 \pm 2,26$	$20,95 \pm 0,49$	$138,36 \pm 0,49$
M-I + BioR 1,0%	$6,37 \pm 0,17$	$118,24 \pm 2,98$	$15,79 \pm 0,35$	$104,28 \pm 3,49$
M-I + BioR 5,0%	$6,55 \pm 0,14$	$121,61 \pm 2,60$	$13,55 \pm 0,38$	$89,49 \pm 2,15$
M-I + BioR 10,0%	$6,84 \pm 0,31$	$127,01 \pm 9,80$	$11,82 \pm 0,56$	$78,05 \pm 5,83$
M-I + BioR 20,0%	$9,77 \pm 0,29$	$181,38 \pm 3,86$	$10,69 \pm 0,59$	$70,62 \pm 5,97$
M-I + BioR 30,0%	$7,90 \pm 0,33$	$146,66 \pm 10,81$	$10,52 \pm 0,53$	$69,50 \pm 4,23$
M-I + PSS _{Zn} 1,0%	$6,07 \pm 0,35$	$112,75 \pm 1,52$	$14,51 \pm 0,89$	$95,82 \pm 5,99$
M-I + PSS _{Zn} 5,0%	$7,00 \pm 0,14$	$129,93 \pm 1,75$	$9,33 \pm 0,31$	$61,64 \pm 3,78$
M-I + PSS _{Zn} 10,0%	$7,59 \pm 0,04$	$141,01 \pm 7,62$	$9,78 \pm 0,49$	$64,60 \pm 3,97$
M-I + PSS _{Zn} 20,0%	$7,89 \pm 0,15$	$146,59 \pm 6,50$	$10,83 \pm 0,71$	$71,54 \pm 5,36$
M-I + PSS _{Zn} 30,0%	$8,83 \pm 0,15$	$163,91 \pm 4,07$	$11,59 \pm 1,62$	$76,52 \pm 10,96$
M-I + PSS _{Zn} 40,0%	$7,80 \pm 0,73$	$144,81 \pm 16,90$	$10,62 \pm 0,80$	$70,13 \pm 3,70$

P=0,05

Analiza rezultatelor prezentate în tabelul 5.2. 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%. În acest context, ținem să remarcăm predominanța coloniilor tipice ale culturii de culoare albuie în toate probele studiate.

Efectul inhibitor al preparatelor studiate asupra lipidogenezei se compensează prin stimularea producției de biomasă, de aceea producția de lipide totale calculată la 1 L mediu de cultivare depășește martorul cu $52,34 \pm 2,44\%$, rezultatul final fiind obținerea unei cantități sporite de lipide (Figura 5.2).

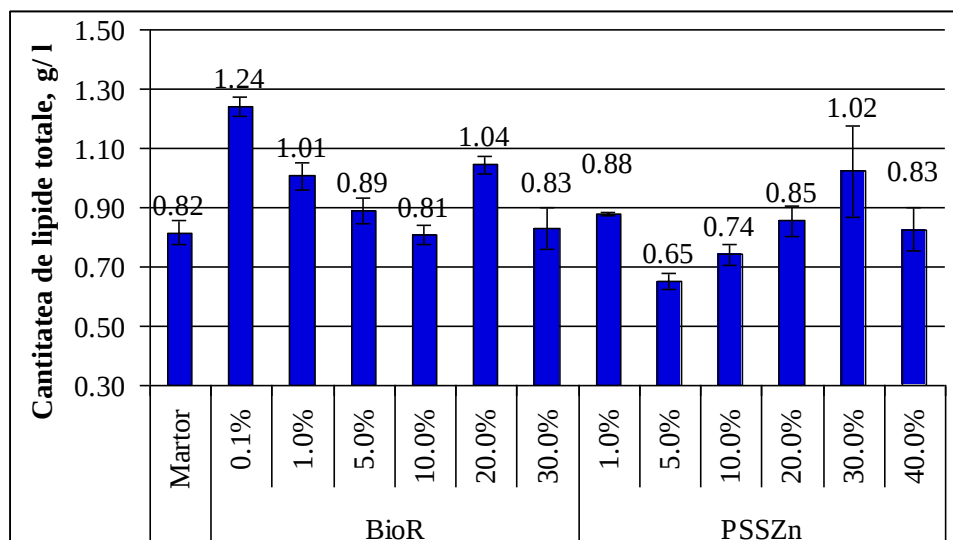


Fig. 5.2. Cantitatea de lipide totale obținute la 1 litru mediu de cultivare a *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 în prezența preparatelor cianobacteriene

Astfel, cercetările efectuate au confirmat acțiunea stimuloare a preparatelor de origine cianobacteriană asupra acumulării de biomasă la streptomicete, astfel lărgindu-se spectrul de utilizare a acestor principii bioactive în calitate de stimulatori de creștere. Efectul preponderent inhibitor al preparatelor studiate asupra lipidogenezei, se deosebește de rezultatele obținute anterior de Burțeva S., care a constatat efectul stimulator al preparatelor native din *Porphyridium cruentum* și *Spirulina platensis* în concentrații 0,1 – 1,0 mg/l asupra lipidogenezei tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 (106,1 – 164,3% și respectiv 104,8 – 131,9% față de martor) [28, 182].

Diferența dintre aceste rezultate poate fi explicată prin condițiile de cultivare diferite. Sinteza lipidelor – substanțe cu rol protector pentru celule, poate fi inhibată la cultivarea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 în condiții favorabile [90].

În continuare a fost realizat studiul cu privire la influența principiilor de origine cianobacteriană BioR și PSS_{Zn} asupra raportului cantitativ al fracțiilor lipidice obținute din biomasa *S. canosus* CNMN-Ac-02, în urma cultivării acesteia pe mediul M-I.

În figura 5.3. sunt prezentate rezultatele evaluării cantitative a fracțiilor lipidice principale (fosfolipide, sterine, trigliceride) la tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02 cultivată pe mediul lichid M-I care a fost suplimentat cu BioR în concentrație 0,1 – 30,0%. Analizând cantitatea de

fosfolipide din proba martor și probele experimentale, s-a constatat un efect pozitiv al preparatului BioR asupra ponderii fracției menționate. Cele mai bune rezultate au fost înregistrate la prezența în mediul M-I a concentrațiilor de 0,1% și 1,0% BioR, sporul pozitiv constituind $18,2 \pm 0,54\%$ și respectiv cu $25,39 \pm 0,07\%$ față de proba martor.

Preparatul BioR nu a manifestat o influență evidentă asupra sintezei sterinelor la streptomicete și a avut o influență ușor inhibitoare asupra sintezei trigliceridelor.

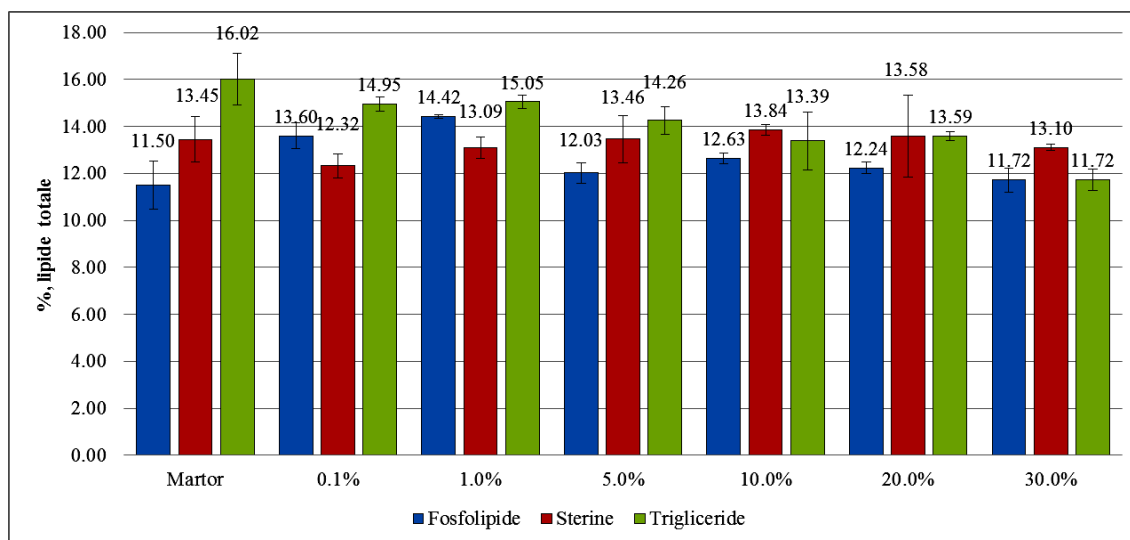


Fig. 5.3. Raportul cantitativ al fracțiilor lipidice principale în biomasa de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 sub influența preparatului BioR

În figura 5.4. sunt prezentate rezultatele acțiunii preparatului PSS_{Zn} asupra acumulării fracțiilor lipidice principale în biomasa *S. canosus* CNMN-Ac-02.

O tendință stimulatorie, similar preparatului BioR, a fost observată în cazul sintezei fosfolipidelor. Dar acest efect stimulator a fost mult mai pronunțat în acest caz, o stimulare maximală a sintezei fosfolipidelor, fiind obținută în urma suplimentării mediului de cultivare M-I cu PSS_{Zn} 1,0%, ce asigură o sporire a raportului de fosfolipide cu circa $40,0 \pm 0,28\%$.

Spre deosebire de preparatul BioR, care a inhibat producerea fracției sterinice, utilizarea preparatului PSS_{Zn} a favorizat sinteza acestei fracții pentru toate concentrațiile aplicate. Astfel, ponderea fracției sterinice față de proba martor a fost mai mare cu cca. $1,0 \pm 0,23 - 17,0 \pm 0,28\%$.

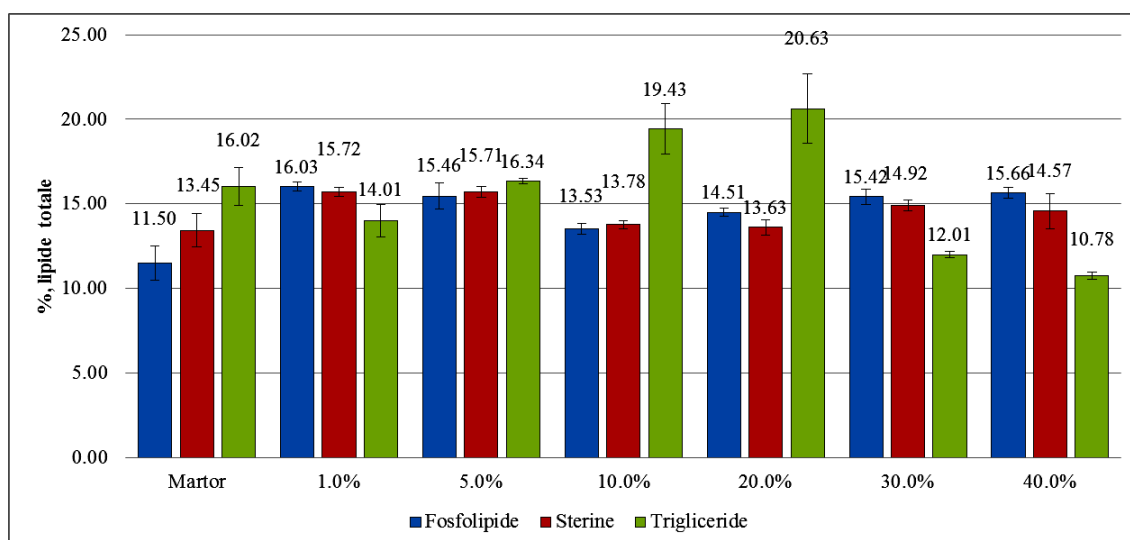


Fig. 5.4. Raportul cantitativ al fracțiilor lipidice principale în biomasa de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 sub influența preparatului PSS_{Zn}

Cel mai bun rezultat a fost înregistrat în urma suplimentării mediului de cultivare M-I cu PSS_{Zn} 1,0% și a constituit $15,72 \pm 1,00\%$, față de $13,45 \pm 0,36\%$ în cazul probei martor.

La fel și în cazul trigliceridelor preparatul PSS_{Zn} a avut un efect stimulator, deosebindu-se de preparatul BioR cu efect inhibitor.

Efectul stimulator al preparatului PSS_{Zn} s-a manifestat la concentrațiile sale de 5,0%, 10,0% și 20,0%, cu valorile maxime de cca. $29,0 \pm 2,03\%$ față de proba martor.

În continuare au fost analizate fracțiile lipidice secundare: mono- și digliceridele, esterii sterolici și ceridele în biomasa de streptomicete cultivate în prezența preparatelor cianobacteriene (Figurile 5.5. și 5.6.).

În cazul preparatului BioR, cantitatea de mono- și digliceride nu a suferit schimbări majore, prezentând valori apropiate de martor, iar ponderea ceridelor în fracția lipidică s-a micșorat cu cca. $5,0 \pm 0,60 - 27,0 \pm 0,52\%$, comparativ cu proba martor. Pe când, analiza fracției de esterii sterolici a relevat o creștere continuă a acestora, odată cu majorarea concentrației preparatului BioR în mediul de cultivare M-I, efectul stimulator maximal de $29,0 \pm 1,71\%$ față de proba martor înregistrându-se la concentrația 30,0% BioR.

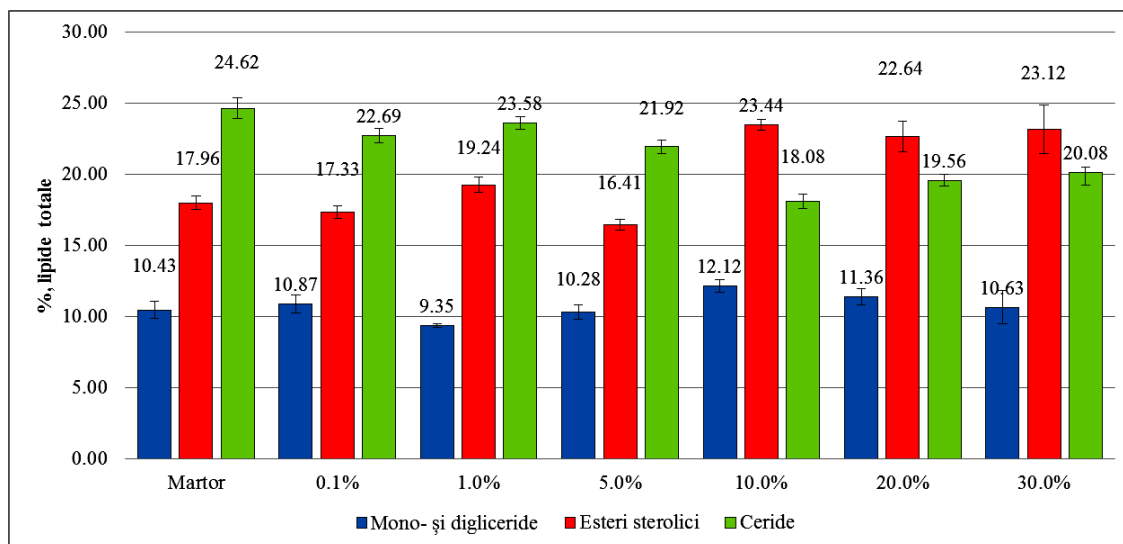


Fig. 5.5. Raportul cantitativ al fracțiilor lipidice secundare în biomasa de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 în urma cultivării pe mediul M-I suplimentat cu BioR

În continuare sunt prezentate și analizate rezultatele studiului acțiunii preparatului PSS_{Zn}, asupra raportului cantitativ al fracțiilor lipidice secundare la tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02 cultivată pe mediul lichid complex M-I (Figura 5.6.).

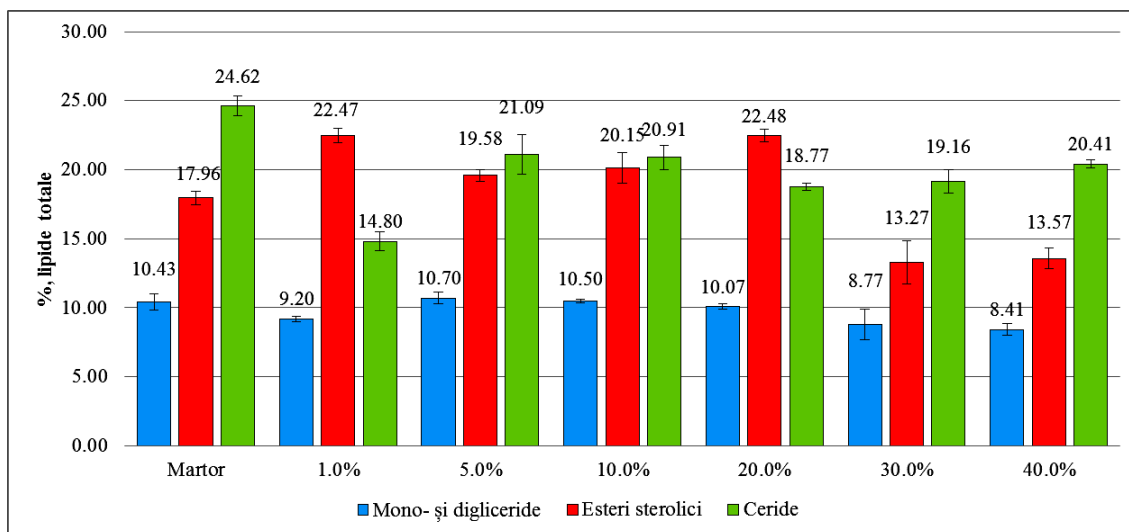


Fig. 5.6. Raportul cantitativ al fracțiilor lipidice secundare în biomasa de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 în urma cultivării pe mediul M-I suplimentat cu PSS_{Zn}

Analizând datele obținute pentru fracția de mono- și digliceride, poate fi constatat faptul că preparatul PSS_{Zn} practic nu influențează sinteza acestei fracții, iar în unele cazuri chiar o inhibă.

În ce privește acțiunea preparatului PSS_{Zn} asupra sintezei esterilor sterolici, se observă o legitate diferită de cea observată în cazul preparatului BioR. Dacă în cazul utilizării BioR-ului,

ponderea acestei fracții a crescut la aplicarea concentrațiilor mari, în cazul PSS_{Zn} efectul stimulator a fost remarcat la utilizarea concentrațiilor mici și medii. Un efect stimulator de circa 26,0±0,44% față martor a fost înregistrat în diapazonul concentrațiilor preparatului cianobacterian cuprins între 1,0 – 20,0%.

O influență inhibitoare, similară acțiunii BioR-ului, se observă în cazul fracției de ceride în biomasa obținută la cultivarea streptomicetelor în prezența preparatului PSS_{Zn}.

Astfel, dacă în proba martor ponderea de ceride constituia 24,62±1,55%, în urma suplimentării mediului de cultivare M-I cu PSS_{Zn} în concentrații de 1,0 – 40,0% s-a observat o scădere cantitativă a acestei fracții până la 14,8±2,07 – 21,09±3,84%, ceea ce reprezintă o inhibare a sintezei cu cca. 15,0±1,43 – 34,0±4,54% comparativ cu proba martor [190].

Dacă e să ne referim la cercetările anterioare efectuate de Burțeva S. cu scopul evidențierii modificărilor în compoziția fracționară a lipidelor la tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02 sub influența principiilor bioactive obținute din microalge și cianobacterii, putem afirma că ele au evidențiat o acțiune selectivă a preparatelor. Preparatele microalgale în cantitate de 1 mg/l au asigurat acumularea maximă de lipide în biomasa streptomicetei. A fost determinat intervalul optim de stimulare a lipogenezei pentru preparatul biologic PC: 0,1 – 10 mg/l. Ipoteza ce explică acest efect afirmă rolul acestor preparate în activarea enzimelor care reglează sinteza lipidelor din celula microbiană [182]

Astfel, prin adăugarea preparatelor din microalga roșie *Porphyridium cruentum*, ponderea cantitativă a fracțiilor lipidice polare, în special a fosfolipidelor scade, cantitatea de sterine practic rămâne la nivelul probei martor, iar în ce privește fracțiile de ester sterolici și ceride se observă o majorare de până la 131,4% comparativ cu proba martor.

În cazul utilizării preparatelor din *Spirulina platensis* s-a observat o creștere a cantității fosfolipidelor cu cca. 115,8% comparativ cu proba martor.

Stimularea sintezei sterinelor, a avut loc numai în prezența extractelor din cianobacteria *Nostoc linckia*: 115,2% comparativ cu proba martor, la utilizarea concentrației extractului de 10,0 mg/l [182].

Un aspect pozitiv este că aceste extracte au capacitatea de a stimula atât acumularea de biomasă, cât și sinteza lipidelor și a fracțiilor individuale de lipide.

Astfel, atât datele din literatură, cât și rezultatele obținute la acest compartiment confirmă acțiunea stimulatorie a preparatelor de origine cianobacteriană asupra creșterii, dezvoltării și activității biosintetice la diferite grupe de microorganisme, inclusiv tulpina de streptomicete *S. canosus* CNMN-Ac-02. Mai mult ca atât, rezultatele obținute demonstrează, că principiile de origine cianobacteriană pot influența compoziția fracționară a lipidelor la streptomicete.

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

A fost studiată influența extractelor glicozidice **LG** (din *Linaria genistifolia*) și **VP** (din *Verbascum phlomoides*) asupra numărului de celule viabile de streptomicete, exprimate în unități formatoare de colonii UFC ml⁻¹. Chae și co-autorii (2009) au efectuat experiențe similare [33].

După cum se vede din tabelul 5.3., în toate probele experimentale titrul UFC depășește probele martor, ceea ce atestă o activitate înaltă a extractelor glicozidice.

Astfel, în prezența în mediul de cultură a iridoidelor **LG** în concentrații de 0,05 – 0,0005%, numărul UFC a crescut cu 5,7±4,39 – 10,85±2,49% în comparație cu proba martor, cel mai bun rezultat fiind asigurat de concentrația 0,05% a extractului.

Rezultate și mai bune au fost obținute la utilizarea flavonoidelor **VP** în concentrație de 0,0005%, unde numărul UFC în proba experimentală a depășit cu 17,62±9,47% proba martor.

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.

Tabelul 5.3. Numărul UFC ml⁻¹ a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 în urma cultivării pe mediul M-I suplimentat cu extracte de origine vegetală

Varianta	Titru inițial, UFC ml ⁻¹	Titru final, UFC ml ⁻¹	Titru, (%)	% Martor
Martor (M-I)	48,0*10 ¹ ±10,7	92,0*10 ⁸ ±10,8	372,62±14,71	100,00±0,05
M-I + LG 0,05%	85,3*10 ¹ ±10,2	126,0*10 ¹⁰ ±11,1	413,08±6,98	110,85±2,49
M-I + LG 0,005%	136,0*10 ¹ ±9,0	219,3*10 ¹⁰ ±18,2	393,89±3,25	105,70±4,39
M-I + LG 0,0005%	115,0*10 ¹ ±9,0	168,0*10 ¹⁰ ±22,1	399,48±5,58	107,20±5,42
M-I + VP 0,05%	154,3*10 ¹ ±31,2	125,0*10 ¹⁰ ±19,9	379,98±8,27	101,97±2,17
M-I + VP 0,005%	165,7*10 ¹ ±23,8	164,7*10 ¹⁰ ±10,3	379,82±7,26	101,93±3,42
M-I + VP 0,0005%	65,7*10 ¹ ±22,4	188,0*10 ¹⁰ ±18,1	438,30±24,28	117,62±9,47

P=0,05

În tabelul 5.4. 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. Analizând acțiunea extractului **LG** asupra creșterii streptomicetelor, a fost constatat că numai la concentrația de 0,05% a avut un impact pozitiv asupra acumulării biomasei, proba experimentală fiind mai mare cu 134,17±4,49% față de martor. Odată cu micșorarea concentrației extractului **LG** scade și cantitatea de biomasă. Aici ar trebui să menționăm și faptul că din cele 2 tipuri de colonii caracteristice tulpinii studiate, s-a observat predominarea coloniilor de culoare gri, fapt ce explică diferența față de rezultatele obținute în seria experimentală precedentă în ceea ce privește conținutul de lipide în proba martor. Extractul **VP** a demonstrat o influență inhibitoare asupra

creșterii tulpinii *S.canosus* CNMN-Ac-02. Utilizând flavonoidele în concentrație de 0,05% și 0,005%, cantitatea de biomasă a scăzut cu cca. $34,0 \pm 0,85 - 35,0 \pm 1,43\%$, iar pentru concentrația de 0,005%, efectul inhibitor este minimal.

Tabelul 5.4. Cantitatea de biomasă și conținutul de lipide totale la tulpina *Streptomyces 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)	$8,15 \pm 0,50$	$100,00 \pm 0,05$	$6,40 \pm 0,27$	$100,00 \pm 0,05$
M-I + glicozide LG 0,05%	$10,94 \pm 0,60$	$134,17 \pm 4,49$	$3,81 \pm 0,35$	$59,52 \pm 3,37$
M-I + glicozide LG 0,005%	$7,05 \pm 0,59$	$86,44 \pm 4,63$	$4,89 \pm 0,47$	$76,36 \pm 7,92$
M-I + glicozide LG 0,0005%	$5,55 \pm 0,62$	$68,14 \pm 8,52$	$10,16 \pm 1,65$	$158,67 \pm 24,01$
M-I + glicozide VP 0,05%	$5,38 \pm 0,53$	$65,96 \pm 4,44$	$12,88 \pm 0,12$	$201,14 \pm 9,79$
M-I + glicozide VP 0,005%	$5,42 \pm 0,52$	$66,52 \pm 2,34$	$10,21 \pm 0,41$	$159,45 \pm 1,82$
M-I + glicozide VP 0,0005%	$7,64 \pm 0,50$	$93,74 \pm 3,35$	$11,38 \pm 0,68$	$177,78 \pm 4,79$

P=0,05

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

Acest studiu a pus în evidență dependența invers proporțională dintre acumularea de biomasă și sinteza lipidelor la *S. canosus* CNMN-Ac-02 la cultivare în prezența glicozidelor vegetale. În cazul când extractul vegetal are un efect stimulator asupra creșterii tulpinii, se observă inhibarea lipidogenezei și viceversa.

Prin urmare, după cum se vede din Figura 5.7, efectul cumulativ al extractelor vegetale, exprimat prin cantitatea de lipide obținute la 1 litru de mediu, este negativ pentru glicozidele **LG** în concentrație 0,05% și 0,005% și pozitiv la concentrația de 0,0005%. Acțiunea stimulatorie a flavonoidelor este mult mai exprimată, efectul maximal fiind înregistrat la o concentrație de 0,0005% a preparatului VP.

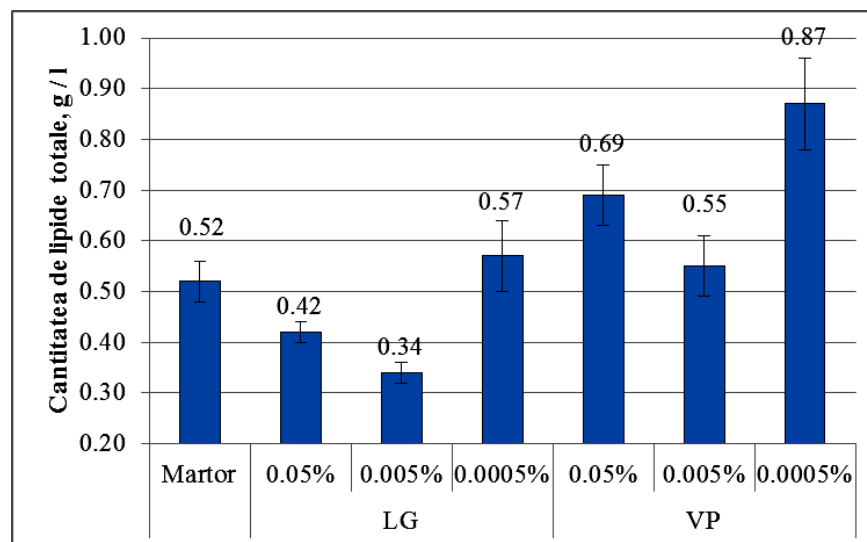


Fig. 5.7. Acțiunea extractelor vegetale asupra cantității totale de lipide (g/l) în biomasa de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02

În continuare sunt prezentate și analizate rezultatele studiului acțiunii glicozidelor din *Linaria genistifolia* și *Verbascum phlomoides* asupra modificării compoziției fracționale a lipidelor din biomasa tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 la cultivare pe mediu complex lichid M-I. În Figura 5.8. este prezentat raportul cantitativ al fracțiilor lipidice principale din biomasa *S. canosus* CNMN-Ac-02, care au suportat modificări sub influența glicozidelor iridoide **LG**. Astfel, pentru proba martor a fost înregistrat următorul raport: fosfolipide – $15,78 \pm 1,28\%$; sterine – $6,42 \pm 1,48\%$; trigliceride – $18,57 \pm 0,26\%$.

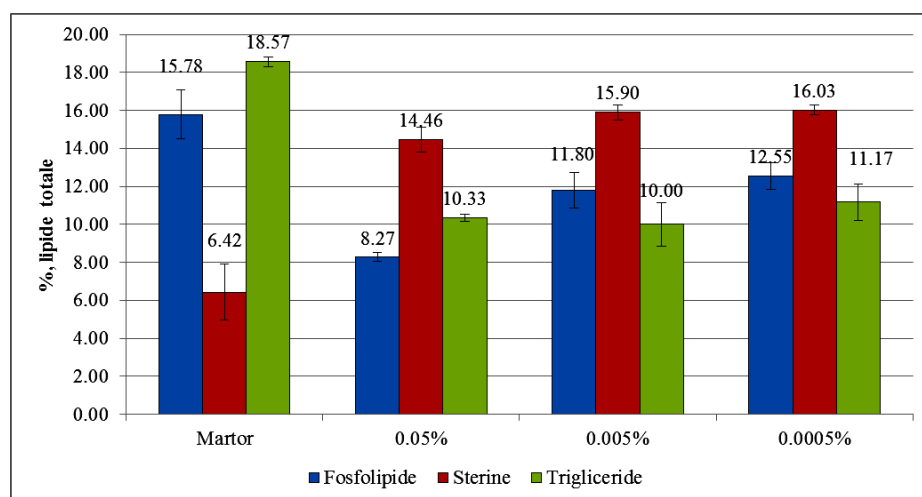


Fig. 5.8. Influența glicozidelor LG asupra raportului cantitativ al fracțiilor principale de lipide la tulpina *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02

Analizând modificările conținutului fracției de fosfolipide în probele experimentale, se observă un conținut procentual redus al acestei fracții față de proba martor. Aceeași situație se observă și pentru fracția trigliceridelor. Astfel, glicozidele obținute din **LG** inhibă sinteza fracțiilor de fosfolipide și trigliceride, efectul inhibitor exprimându-se în cazul tuturor concentrațiilor aplicate ale preparatului.

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 – $16,03 \pm 0,26\%$ (cu cca. 150,0% mai mult comparativ cu martorul) este asigurată de suplimentarea mediului de cultivare M-I cu glicozide **LG** în concentrația 0,0005%. Astfel, extractele glicozidice **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 proba martor.

În continuare sunt prezentate modificările fracțiilor lipidice secundare (mono- și digliceride, ester sterolici, ceride) din biomasa de *S. canosus* CNMN-Ac-02 la cultivare pe mediul lichid complex M-I, suplimentat cu glicozide **LG** în diferite concentrații (Figura 5.9.).

Analizând rezultatele obținute, putem afirma, că preparatul **LG** a influențat pozitiv raportul cantitativ al fracției mono- și digliceridelor din biomasa *S. canosus* CNMN-Ac-02, contribuind la sporirea cantității de mono- și digliceride cu cca. $43,0 \pm 0,64$ – $62,0 \pm 4,68\%$ în comparație cu proba martor. Modificări neesențiale au fost înregistrate pentru fracția de ester sterolici la suplimentarea mediului de cultură cu preparatul **LG**. Iar efectul glicozidelor din *Linaria* asupra fracției de ceride poate fi calificat drept unul dependent de concentrația glicozidelor, fiind inhibitor la concentrațiile 0,005 – 0,0005% și stimulator la concentrația preparatului de 0,05%.

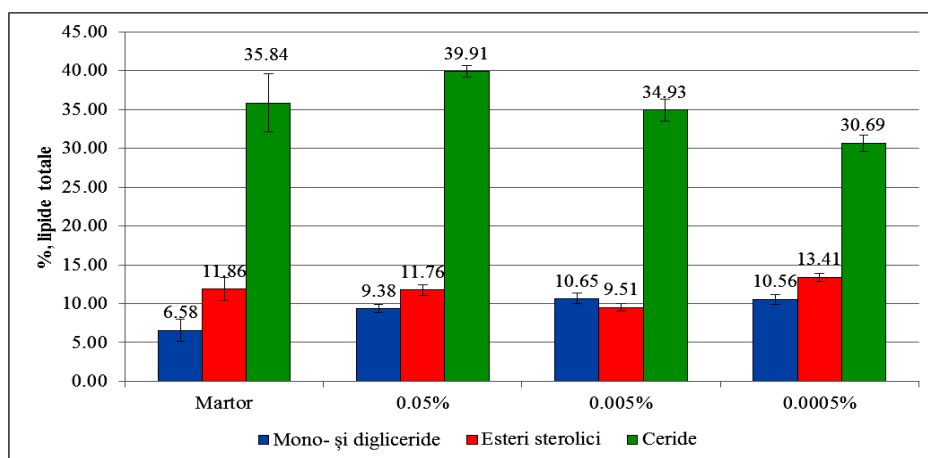


Fig. 5.9. Influența glicozidelor LG asupra raportului cantitativ al fracțiilor secundare de lipide la tulpina *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02

În continuare a fost studiată acțiunea flavonoidelor **VP** (obținute din *Verbascum phlomoides*) asupra compoziției fracționare a lipidelor din biomasa tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02.

Analizând modificările fracțiilor lipidice principale (Figura 5.10.), trebuie de remarcat faptul, că influența glicozidelor **VP** asupra fosfolipidelor, sterinelor și trigliceridelor este similară glicozidelor **LG**. Acestea duc la scăderea cantității de fosfolipide și trigliceride raportate la cantitatea de lipide totale, iar cantitatea de sterine crește semnificativ în comparație cu proba martor.

Pornind de la o cantitate de fosfolipide în proba martor de $15,78 \pm 1,28\%$, observăm diminuarea acestei fracții cu circa $30,0 \pm 0,69 - 38,0 \pm 0,23\%$ în prezența concentrațiilor studiate ale preparatului **VP**. 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 probele experimentale suplimentate cu glicozide **VP**. Cel mai puternic efect stimulator s-a manifestat la concentrația de 0,0005% a preparatului **VP**, cantitatea de sterine fiind de aproape 3 ori mai mare comparativ cu proba martor.

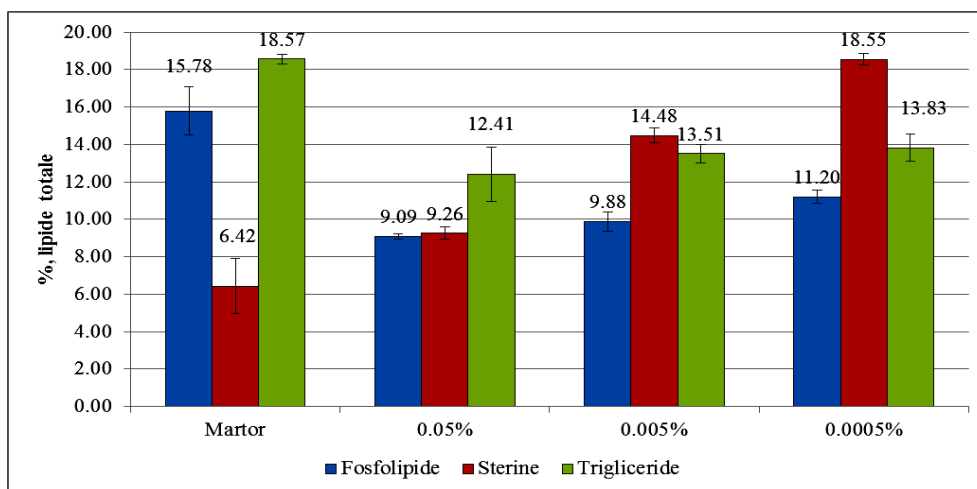


Fig. 5.10. Influența glicozidelor VP asupra raportului cantitativ al fracțiilor principale de lipide la tulpina *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02

În continuare sunt prezentate modificările observate în compoziția fracțiilor lipidice secundare la tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02 sub influența flavonoidelor (Figura 5.11.).

Astfel, prezența flavonoidelor **VP** în mediul de cultură duce la sporirea cantității fracțiilor mono-, digliceridelor și esterilor sterolici la tulpina studiată de streptomicete.

Analizând fracția mono- și digliceridelor, putem constată o dependență invers proporțională dintre concentrația preparatului **VP** și efectul său stimulator. Pornind de la o

stimulare de $33,0 \pm 3,29\%$ față de martor pentru concentrația preparatului **VP** de 0,05%, se obține o cantitate de mono- și digliceride cu cca. $85,0 \pm 5,37\%$ mai mare față de proba martor pentru concentrația de 0,0005% a preparatului glicozidic **VP**.

Fracția esterilor sterolici a suferit modificări mai puțin importante sub influența preparatului **VP**. În cazul utilizării glicozidelor **VP** în concentrațiile de 0,05% și 0,0005%, cantitatea de esteri sterolici constituia $14,69 \pm 0,90\%$ și $14,26 \pm 0,61\%$, respectiv (cu cca. $20,0 \pm 2,63 - 24,0 \pm 3,97\%$ mai mult în comparație cu proba martor).

O dependență diferită dintre concentrația și acțiunea extractului **VP** (*Verbascum*) a fost observată în cazul fracției de ceride. Pornind de la un efect stimulator de cca. $16,0 \pm 1,42\%$ față de proba martor la utilizarea unei concentrații de 0,05% a preparatului **VP**, odată cu micșorarea concentrației extractului glicozidic scade esențial și cantitatea de ceride (cu cca. $6,0 \pm 0,76 - 25,0 \pm 3,81\%$ mai puțin față de proba martor).

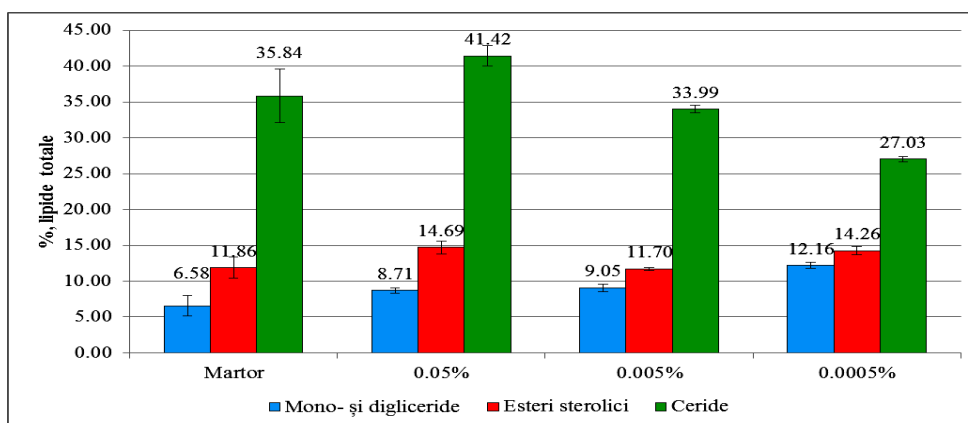


Fig. 5.11. Influența glicozidelor VP asupra raportului cantitativ al fracțiilor secundare de lipide la tulpina *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02

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 *S. canosus* CNMN-Ac-02.

5.3. Concluzii la capitolul 5

Studiul acțiunii preparatelor de origine cianobacteriană și vegetală asupra creșterii, dezvoltării și activității biosintetice a tulpinii de streptomicete *S. canosus* CNMN-Ac-02 a permis evidențierea următoarelor concluzii:

1. Extractele de origine cianobacteriană (BioR și PSS_{Zn}) influențează pozitiv procesul de acumulare a biomasei la cultivarea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 pe mediul complex lichid M-I, înregistrând un efect stimulator maximal de $181,38 \pm 3,86\%$ în raport cu proba martor în cazul utilizării preparatului BioR și $163,91 \pm 4,07\%$ în cazul utilizării preparatului de expolizaharide sulfatate.
2. Lipidogeneza este influențată pozitiv de flavonoide (cu un efect maximal de stimulare de $201,14 \pm 9,79\%$ în raport cu proba martor), pe fonul inhibării procesului de acumulare a biomasei la *S. canosus* CNMN-Ac-02.
3. Extractele naturale studiate influențează compoziția fracționară a lipidelor la streptomicete, mai cu seamă raportul fracțiilor de bază.
4. Extractele de origine cianobacteriană BioR și PSS_{Zn} sporesc cu circa 30,0% cantitatea de fosfolipide produse de tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02 la cultivare pe mediul complex lichid M-I.
5. Extractele de origine vegetală (glicozide din *Linaria genistifolia* și *Verbascum phlomoides*) sporesc de 2 – 3 ori cantitatea de sterine produse de tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02 pe mediul complex lichid M-I.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Rezultatele obținute în corelație cu ipotezele emise, scopul și obiectivele formulate în cadrul tezei de doctor „**Viabilitatea și variabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare în prezența compușilor de origine cianobacteriană și vegetală**”, au condus la formularea următoarelor concluzii generale:

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 [17, 39-41].
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 [41].
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% [39].
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 [28, 29].
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.

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.

Rezultatele științifice principale, care au contribuit la soluționarea problemei științifice importante puse în fața acestei lucrări (*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), sunt următoarele:

- Eficiența preparatelor de origine cianobacteriană și vegetală în calitate de agenți lioprotectori este confirmată de rata 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 stabilitatea morfologică a culturii după 1 an de păstrare.
- Acțiunea protectoare a preparatelor obținute din biomasa de spirulină este confirmată și de efectul lor stimulator (cu circa 30,0%) asupra fracției fosfolipidice a membranelor celulare la tulpina *S. canosus* CNMN-Ac-02.

În aspect teoretic, rezultatele lucrării au adus 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.

În aspect aplicativ, 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 reglare a raportului fracțiilor lipidice la tulpina *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02.

Rezultatele științifice obținute în lucrare au fost aprobate la următoarele foruri științifice naționale și internaționale: 19-я Международная пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология – Наука XXI века», (Пушино, 2015); 5-й Всероссийский симпозиум с международным участием "Автотрофные микроорганизмы", Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова. Биологический факультет, (Москва, 2015); II Международная научно-практическая конференция, посвященная 105-летию со дня рождения профессора Эмилии Адрияновны Штиной, (Киров, 2015); III Международный Микологический Форум, (Москва, 2015); 3rd International Conference on Microbial Biotechnology, (Chișinău, 2016); Conferința Științifică Internațională a Doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”. Ediția a V-a, (Chișinău, 2016); XII International Scientific Conference for students and PhD students „Youth and progress of biology”. (Lviv, 2016); 20-я Международная пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология – Наука XXI века», (Пушино, 2016); 21-я Международная пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология – Наука XXI века», (Пушино, 2016); EuroInvent 2017. The 9th Edition of Euroinvent European Exhibition of Creativity and Innovation, (Iași, 2017); InfoInvent 2017. Expoziția internațională (Ediția a XV-a), (Chișinău, 2017).

Rezultatele științifice obținute în lucrare sunt publicate în 25 lucrări științifice (6 în monoatutorat), dintre care: 5 articole în reviste științifice recenzate (2 în reviste din baza de date

Scopus, 1 în reviste din străinătate recunoscute, 2 din registrul național al revistelor de profil categoria B); 5 articole în culegeri științifice; 9 teze în culegeri științifice; 4 brevete și 2 materiale la saloanele de invenții.

Rezultatele științifice obținute în teză au fost implementate în cadrul Colecției Naționale de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie (Anexele 5 – 8).

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

1. ADAMS, J. The principles of freeze-drying. In: *Methods in Molecular Biology*. 2007, nr. 368, pp. 15-38. ISSN 1064-3745.
2. AL-HAJ, L., LUI, Y.T., ABED, R.M.M., GOMAA, M.A., PURTON, S. Cyanobacteria as chassis for Industrial Biotechnology: Progress and Prospects. In: *Life (Basel)*. 2016, nr. 6(4), pp. 1-17. ISSN 2075-1729.
3. ALMAGAMBETOV, K.K., ZAKARYA, K.D., DINKAEVA, K.A., ESKARAEVA, A.A., ERGEBAEVA, R.K., SHUMENOVA, N.J. Optimization of microorganisms storage methods by pin-sorption method on a sorbent. In: *Eastern European Scientific Journal*. 2014, nr. 2(6), pp. 30-33. ISSN 2199-7977.
4. ÁLVAREZ-ÁLVAREZ, R., BOTAS, A., ALBILLOS, S.M., RUMBERO, A., MARTÍN, J.F., LIRAS, P. Molecular genetics of naringenin biosynthesis, a typical plant secondary metabolite produced by *Streptomyces clavuligerus*. In: *Microbial Cell Factories*. 2015, nr. 14, pp. 1-12. ISSN 1475-2859.
5. AMEERAH, A.H., SUHAIDI, A., SHARIFAH, A.S.M. Identification and optimal growth conditions of actinomycetes isolated from mangrove environment. In: *Malaysian Journal of Analytical Sciences*. 2015, nr. 19(4), pp. 904-910. ISSN 1394-2506.
6. ARMATU, A., BODIRLAU, R., NECHITA, C.B., NICULAU, M., TEACA, C.A., ICHIM, M., SPIRIDON, I. Characterization of biological active compounds from *Verbascum phlomoides* by chromatography techniques. I. Gas chromatography. In: *Romanian Biotechnological Letters*. 2011, nr. 16(4), pp. 6297-6304. ISSN 1224-5984.
7. BARBOSA, J., BORGES, S., TEIXEIRA, P. Effect of different conditions of growth and storage on the cell counts of two lactic acid bacteria after spray drying in orange juice. In: *Beverages*. 2016, nr. 2(2), pp. 1-12. ISSN 2306-5710.
8. BARKA, E.A., VATSA, P., SANCHEZ, L., GAVEAU-VAILLANT, N., JACQUARD, C., KLENK, H.-P., CLÉMENT, C., OUHDOUCH, Y., WEZEL, G.P. Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2016, nr. 80(1), pp. 1-43. ISSN 1092-2172.
9. BASU, S., BOSE, C., OJHA, N., DAS, N., DAS, J., PAL, M., KHURANA, S. Evolution of bacterial and fungal growth media. In: *Bioinformation*. 2015, nr. 11(4), pp. 182-184. ISSN 0973-2063.
10. BELLOU, S., TRIANTAPHYLLOIDOU, I.-E., AGGELI, D., ELAZZAZY, A.M., BAESHEN, M.N., AGGELIS, G. Microbial oils as food additives: recent approaches for

improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. In: *Current Opinion in Biotechnology*. 2016, nr. 37, pp. 24-35. ISSN 0958-1669.

11. BERGEY, D.H. et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria*. 2nd ed. London: Springer New York Dordrecht Heidelber, 2012. 1750 p. ISBN 978-0-387-95043-3.

12. BHOWMIK, D., DUBEY, J., MEHRA, S. Probiotic efficiency of *Spirulina platensis* – stimulating growth of lactic acid bacteria. In: *World Journal of Dairy & Food Sciences*. 2009, nr. 4(2), pp. 160-163. ISSN 1817-308X.

13. **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.

14. **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.

15. **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.

16. **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.

17. **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.

18. BOBEK, J., SMIDOVA, K., CIHAK, M. A waking review: Old and novel insights into the spore germination in *Streptomyces*. In: *Frontiers in Microbiology*. 2017, nr. 8, pp. 1-12. ISSN 1664-302X.

19. BODNAR, O.I., VINIARSKA, H.B., VASILENKO, O.V., GRUBINKO, V.V. Pigment content of *Chlorella vulgaris* beij. under influence of sodium selenite and metals ions. In: *Biotechnologia Acta*. 2009, nr. 9(1), pp. 71-78. ISSN 2410-7751.

20. BOORTSEVA S., BEREZIUK, Y., BYRSA, M., CHISELITSA, O., MANCIU, A., CHISELITSA, N. Qualitative and quantitative composition of lipids of biomass of streptomycetes after cultivation on media with different composition. In: *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*. 2015, nr. 22(2), pp. 57-62. ISSN 1224-5119.
21. 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.
22. BRAÑA, A.F., FIEDLER, H.P., NAVA, H., GONZÁLEZ, V., SARMIENTO-VIZCAÍNO, A., MOLINA, A., ACUÑA, J.L., GARCÍA, L.A., BLANCO, G. Two *Streptomyces* species producing antibiotic, antitumor and anti-inflammatory compounds are widespread among intertidal macroalgae and deep-sea coral reef invertebrates from the central Cantabrian Sea. In: *Microbial Ecology*. 2015, nr. 69(3), pp. 512-524. ISSN 0095-3628.
23. BULGARELLI, D., SCHLAEPPI, K., SPAEPEN, S., THEMAAT, E.V.L., SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. In: *Annual Review of Plant Biology*. 2013, nr. 64, pp. 807-838. ISSN 1543-5008.
24. BUNDALE, S., BEGDE, D., NASHIKKAR, N., KADAM, T., UPADHYAY, A. Optimization of culture conditions for production of bioactive metabolites by *Streptomyces* spp. isolated from soil. In: *Advances in Microbiology*. 2015, nr. 5(6), pp. 441-451. ISSN 2165-3402.
25. BURȚEVA, S., POSTOLACHI, O. Selectarea mediilor de protecție și regenerare pentru liofilizarea tulpinilor de streptomicete. In: *Conferința științifică națională consacrată celei de-a 50 aniversarea de la fondarea Secției de Microbiologie „Probleme actuale ale microbiologiei și biotehnologiei”, 5-6 octombrie 2009*. Chișinău: Tipografia ”Elena-V.I.”, 2009, pp. 35-36. ISBN 978-9975-106-41-2.
26. BURȚEVA, S., USATÎI, A., TODERAȘ, A. Variabilitatea formelor spontane a tulpinii *Streptomyces* sp. 36 – producătoare de substanțe bioactive. In: *Buletinul Academiei de Științe a Republicii Moldova. Științe Biologice și Chimice*. 1996, nr. 280(1), pp. 27-32. ISSN 0568-5192.
27. BURTSEVA, S., BYRSA, M., ACHIRI, I., CHISELITSA, O. The effect on cultural, antimicrobial and growth-regulatory properties of *Streptomyces levoris* CNMN-Ac-01 by using difference methods of storage. In: *2nd International Conference on Microbial Biotechnology, 9-10 October 2014*. Chișinău: Tipografia ”Elena-V.I.”, 2014, p. 108. ISBN 978-9975-4432-8-9.
28. 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.

29. **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.

30. **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.

31. **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.

32. CEPOI, L. Antioxidant activity in *Haematococcus pluvialis* cells during the vital cycle. In: *2nd International Conference on Microbial Biotechnology, 9-10 October 2014*. Chișinău: Tipografia "Elena-V.I.", 2014, pp. 25-29. ISBN 978-9975-4432-8-9.

33. CHAE, W.-B., KIM, Y.-B., CHOI, S.-W., LEE, H.-B., KIM, E.-K. Enhancing the sporulation of *Streptomyces kasugaensis* by culture optimization. In: *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2009, № 26(2), pp. 438-443. ISSN 0256-1115.

34. CHATER, K.F. Recent advances in understanding *Streptomyces*. In: *F1000Research*. 2016, nr. 5, pp. 1-16. ISSN 2046-1402.

35. CHATER, K.F., BIRO S., LEE, K.J., PALMER, T., SCHREMPF, H. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. In: *FEMS Microbiol Reviews*. 2010, nr. 34(2), pp. 171-198. ISSN 1574-6976.

36. CHEN, G., WANG, G.-Y., LI, X., WATERS, B., DAVIES, J. Enhanced production of microbial metabolites in the presence of dimethyl sulfoxide. In: *The Journal of Antibiotics*. 2000, nr. 53(10), pp. 1145-1153. ISSN 0021-8820.

37. CHEN, X., SADINENI, V., MAITY, M., QUAN, Y., ENTERLINE, M., MANTRI, R.V. Finite element method (FEM) modeling of freeze-drying: monitoring pharmaceutical product robustness during lyophilization. In: *AAPS PharmSciTech*. 2015, nr. 16(6), pp. 1317-1326. ISSN 1530-9932.

38. CHISELIȚA, O., BURȚEVA, S., **BÎRSA, M.**, BULIMAGA, V., VASILICIUC, A. Viability and antimicrobial activity of streptomycetes 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.

39. 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.

40. 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.

41. 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.

42. 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.

43. 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.

44. CHISELITSA, O., BATYR, L., TOLOCICHINA, S., SLANINA, V. The viability and antimicrobial activity of *Bacillus* and *Pseudomonas* bacteria strains after long-term storage by using different methods. In: *2nd International Conference on Microbial Biotechnology, 9-10 October 2014*. Chișinău: Tipografia ”Elena-V.I.”, 2014, p. 114. ISBN 978-9975-4432-8-9.

45. CODREANU, S. *Sinteza orientată a cianocobalaminei și porfirinelor de către bacteriile propionice*: autoref. tz. de doct. în biologie. Chișinău, 1995. 22 p.

46. COMAN, G., RADVAN, M. Preliminary studies regarding the behaviour of selected *Streptomyces* strains as xylanases producers preserved by lyophilization. In: *Scientific Study & Research*. 2009, nr. 10(4), pp. 369-364. ISSN 1582-540X.

47. DAY, J.G., STACEY, G. *Cryopreservation and freeze-drying protocols. Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press Inc., 2007. 347 p. ISBN 978-1-59745-362-2.
48. DESAI, S.H., ATSUMI, S. Photosynthetic approaches to chemical biotechnology. In: *Current Opinion in Biotechnology*. 2013, nr. 24(6), pp. 1031-1036. ISSN 0958-1669.
49. DEY, R., PAL, K.K., TILAK, K.V.B.R. Plant growth promoting rhizobacteria in crop protection and challenges. In: *Goyal A., Manoharachary C. (eds). Future Challenges in Crop Protection Against Fungal Pathogens, Fungal Biology Series*. New York: Springer, 2014, pp. 31-58. ISBN 978-1-4939-1188-2.
50. DOWHAN, W. Understanding phospholipid function: Why are there so many lipids? In: *The Journal of Biological Chemistry*. 2017, nr. 292(26), pp. 10755-10766. ISSN 1083-351X.
51. DRYNAN, F.L. *Some studies on lipids and lipase activities in Streptomyces rimosus*: Msc. thesis in biology. Glasgow, 1995. 330 p.
52. DUFOURC, E.J. Sterols and membrane dynamics. In: *Journal of Chemical Biology*. 2008, nr. 1(1-4), pp. 63-77. ISSN 1864-6158.
53. EFREMOVA, N. *Elaborarea procedeeilor de obținere a preparatelor antioxidante pe baza substanțelor bioactive ale cianobacteriilor și microalgelor*: autoref. tz. de doct. în biologie. Chișinău, 2009. 28 p.
54. EMERSON, J.B., ADAMS, I.R., ROMÁN, C.M.B., et all. Schrödinger's microbes: Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems. In: *Microbiome*. 2017, nr. 5, pp. 1-23. ISSN 2049-2618.
55. FIȚ, N.I. *Bacteriologie generală veterinară*. Cluj-Napoca: Academic Press, 2008. 216 p. ISBN: 973-744-055-6.
56. FreeZone Freeze Dry Systems. An overview [online]. *Thermofisher Scientific*, 2012. Disponibil: <http://www.thermofishersci.in/lit/Labconco%20FreeZone%20Freeze%20Dry%20Systems.pdf>
57. FREITAS, R.S., DANTAS, K.C., PEREIRA, C.N., LEVI, J.E., MARTINS, J.E.C. Preservation methods of fungi in 35 years old stock culture storages: a comparative study. In: *African Journal of Microbiology Research*. 2011, nr. 5(5), pp. 555-561. ISSN 1996-0808.
58. GIRME, G., AROSEMENA, E.L., PEREZ, L., VERA, R., GRAU, E., CALVO, M.A. Enhancement of the viability of *Lactobacillus plantarum* during the preservation and storage process based on the response surface methodology. In: *Food and Nutrition Sciences*. 2014, nr. 5(5), pp. 1746-1755. ISSN 2157-944X.

59. GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications, scientifica. In: *Hindawi Publishing Corporation Scientifica*. 2012, nr. 2012, pp. 15. ISSN 2090-98-X.
60. GUILLOT, A., OBIS, D., MISTOU, M.Y. Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress. In: *International Journal of Food Microbiology*. 2000, nr. 55(1-3), pp. 47-51. ISSN 0168-1605.
61. HAMED, J., MOHAMMADIPANAH, F., KLENK, H.P., PÖTTER, G., SCHUMANN, P., SPRÖER, C., JAN, V.M., KROPPESTEDT, R.M. *Streptomyces iranensis* sp. nov., isolated from soil. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2010, nr. 60(7), pp. 1504-1509. ISSN 1466-5026.
62. HANIN, M., BRINI, F., EBEL, C., TODA, Y., TAKEDA, S., MASMOUDI, K. Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. In: *Plant Signaling & Behavior*. 2011, nr. 6(10), pp. 1503-1509. ISSN 1559-2316.
63. HOISCHEN, C., GURA, K., LUGE, C., GUMPERT, J. Lipid and fatty acid composition of cytoplasmic membranes from *Streptomyces hygroscopicus* and its stable protoplast-type L form. In: *Journal of Bacteriology*. 1997, nr. 179(11), pp. 3430-3436. ISSN 0021-9193.
64. HUBALECK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. In: *Criobiology*. 2003, nr. 46(3), pp. 205-229. ISSN 0011-2240.
65. IFEANYI, V.O., NWOSU, S.C., OKAFOR, J.O., ONNEGBU, C.P., NWABUNNIA, E. Comparative studies on five culture media for bacterial isolation. In: *African Journal of Microbiology Research*. 2014, nr. 8(36), pp. 3330-3334. ISSN 1996-0808.
66. IZUTSU, K., KADOYA, S., YOMOTA, C., KAWANISHI, T., YONEMOCHI, E., TERADA, K. Stabilization of protein structure in freeze-dried amorphous organic acid buffer salts. In: *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*. 2009, nr. 57(11), pp. 1231-1236. ISSN 0009-2363.
67. JIN, F., ZHUANG, Z., YU, H., XU, J., LIU, Q., AN, D., IM, W., LEE, S. Microorganisms of special herb-glycosidases and their fermentation, enzyme properties. In: *Chinese Journal of Biotechnology*. 2009, nr. 25(12), pp. 1863-1870. ISSN 1000-3061.
68. JUÁREZ, T.M.S., BRU, E., MARTOS, G., NADER-MACÍAS, M.E. Stability of freeze-dried vaginal *Lactobacillus* strains in the presence of different lyoprotectors. In: *Canadian Journal of Microbiology*. 2009, nr. 55(5), pp. 544-552. ISSN 0008-4166.
69. KALAKOUTSKII, L.V., FATEEVA, M.V. *Catalogue of Microbial Cultures*. VKM. Pushchino: RAN, 1996. 392 p.

70. KANDIL, S., EL SODA, M. Influence of freezing and freeze drying on intracellular enzymatic activity and autolytic properties of some lactic acid bacterial strains. In: *Advances in Microbiology*. 2015, nr. 5(6), pp. 371-382. ISSN 2165-3410.
71. KARPIŃSKI, T.M., ADAMCZAK, A. Anticancer activity of bacterial proteins and peptides. In: *Pharmaceutics*. 2018, nr. 10(54), pp. 1-26. ISSN 1999-4923.
72. KEULEN, V.G., DYSON, P.J. Production of specialized metabolites by *Streptomyces coelicolor* A3(2). In: *Advances in Applied Microbiology*. 2014, nr. 89(1), pp. 217-266. ISSN: 0065-2164.
73. KHANGEMBAM, R., TIWARI, O.N., KALITA, M.C. Production of exopolysaccharides by the cyanobacterium *Anabaena* sp. BTA992 and application as biofloculants. In: *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 2016, nr. 4(1), pp. 8-11. ISSN 2455-7005.
74. KLOSE, C., SURMA, M.A., SIMONS, K. Organellar lipidomics – background and perspectives. In: *Current Opinion in Cell Biology*. 2013, nr. 25(4), pp. 406-413. ISSN 0955-0674.
75. KORONELLI, T.V., KOMAROVA, T.I., PORSHNEVA, O.V., DERMICHEVA, S.G. Lipid composition changes in the R and S types of *Rhodococcus erythropolis* after prolonged storage on laboratory media. In: *Microbiology*. 1998, nr. 67(5), pp. 718-720. ISSN 0026-3656.
76. KOSOUIROV, S., MURUKESAN, G., JOKELA, J., ALLAHVERDIYEVA, Y. Carotenoid biosynthesis in *Calothrix* sp. 336/3: composition of carotenoids on full medium, during diazotrophic growth and after long-term H₂ photoproduction. In: *Plant and Cell Physiology*. 2016, nr. 57(11), pp. 2269-2282. ISSN 0032-0781.
77. KRUMNOW, A.A., SOROKULOVA, I.B., OLSEN, E., GLOBAL, L., BARBAREE, J.M., VODYANOY, V.J. Preservation of bacteria in natural polymers. In: *Journal of Microbiological Methods*. 2009, nr. 78(2), pp. 189-194. ISSN 0167-7012.
78. LI, E., MIRA DE ORDUÑA, R. A rapid method for the determination of microbial biomass by dry weight using a moisture analyser with an infrared heating source and an analytical balance. In: *Letters in Applied Microbiology*. 2010, nr. 50(3), pp. 283-288. ISSN 1472-765X.
79. MACARI, V., IACUB, N., PUTIN, V., MACARI, A., MAȚENCU, D., DIDORUC, S. Impact of the BioR remedy on the improvement of health and productivity of newly weaned young rabbits. In: *2nd International Conference on Microbial Biotechnology, 9-10 October 2014*. Chișinău: Tipografia "Elena-V.I.", 2014, p. 147. ISBN 978-9975-4432-8-9.

80. MARMANN, A., ALY, A.H., LIN, W., WANG, B., PROKSCH, P. Co-cultivation – a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. In: *Marine drugs*. 2014, nr. 12(2), pp. 1043-1065. ISSN 1660-3397.
81. MARSCHNER, P., CROWLEY, D., RENGEL, Z. Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis – model and research methods. In: *Soil Biology Biochemistry*. 2011, nr. 43: 883-894. ISSN: 0038-0717.
82. MARX, J.G., CARPENTER, S.D., DEMING, J.W. Production of cryoprotectant extracellular polysaccharide substances (EPS) by the marine psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H under extreme conditions. In: *Canadian Journal of Microbiology*. 2009, nr. 55(1), pp. 63-72. ISSN 0008-4166.
83. MASHCENKO, N., GUREVA, A., LUPASCU, G., GORINCIOL, E. Iridoid glycosides from *Linaria genistifolia* (L.) Mill. in biological control of soil-borne fungal pathogens of wheat and some structure considerations. In: *Chemistry Journal of Moldova. General, Industrial and Ecological Chemistry*. 2015, nr. 10(1), pp. 57-63. ISSN 1857-1727.
84. MIAO, Z., ZHAO, Y., HUO, X. Assessment and determination of lyoprotectant for survival of freeze-dried *Lactobacillus rhamnosus*. In: *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology*. 2016, nr. 20(1), pp. 105-113. ISSN 2344-150X.
85. MISCU, V. *Biotehnologii de obținere a biopreparatelor pe bază de astaxantină din Haematococcus pluvialis Flotow CNM-AV-05*: autoref. tz. de doct. în biologie. Chișinău, 2010. 28 p.
86. MISHRA, M.K., SINGH, G., TIWARI, S., SINGH, R., KUMARI, N., MISRA, P. Characterization of *Arabidopsis* sterol glycosyltransferase TTG15/UGT80B1 role during freeze and heat stress. In: *Plant Signaling & Behavior*. 2015, 10(12), pp. 1-9. ISSN 1559-2324.
87. 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.
88. MORGAN, C.A., HERMAN, N., WHITE, P.A., VESEY, G. Preservation of microorganisms by drying; A review. In: *Journal of Microbiological Methods*. 2006, nr. 166(2), pp. 183-193. ISSN 0167-7012.
89. 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.

90. MURÍNOVÁ, S., DERCOVÁ, K. Response mechanisms of bacterial degraders to environmental contaminants on the level of cell walls and cytoplasmic membrane. In: *International Journal of Microbiology*. 2014, nr. 2014, pp. 1-16. ISSN 1687-9198.
91. MURO, E., ATILLA-GOKCUMEN, G.E., EGGERT, U.S. Lipids in cell biology: how can we understand them better? In: *Molecular Biology of the Cell*. 2014, nr. 25(12), pp. 1819-1823. ISSN 1939-4586.
92. NATAN, D., NAGLER, A., ARAV, A. Freeze-drying of mononuclear cells derived from umbilical cord blood followed by colony formation. In: *PLOS ONE*. 2009, nr. 4(4), pp. 1-12. ISSN 1932-6203.
93. NAVARTA, L.G., CALVO, J., CALVENTE, V., BENUZZI, D., SANZ, M.I. Freezing and freeze-drying of the bacterium *Rahnella aquatilis* BNM 0523: study of protecting agents, rehydration media and freezing temperatures. In: *Letters in Applied Microbiology*. 2011, nr. 53(5), pp. 565-571. ISSN 1472-765X.
94. NAVARTA, L.G., CALVO, J., POSETTO, P., CERUTTI, S., RABA, J., BENUZZI, D., SANZ, M.I. Postharvest control of gray mold in apples with lyophilized formulations of *Cryptococcus laurentii*: the effect of cold stress in the survival and effectiveness of the yeast. In: *Food and Bioprocess Technology*. 2014, nr. 10(7), pp. 2962-2968. ISSN 1935-5130.
95. NETZKER, T., FISCHER, J., WEBER, J., MATTERN, D.J., KÖNIG, C.C., VALIANTE, V., SCHROECKH, V., BRAKHAGE, A.A. Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. In: *Frontiers in Microbiology*. 2015, nr. 6, pp. 1-13. ISSN 1664-302X.
96. OCHSENREITHER, K., GLÜCK, C., STRESSLER, T., FISCHER, L., SYLDATK, C. Production strategies and applications of microbial single cell oils. In: *Frontiers in Microbiology*. 2016, nr. 7, pp. 1-26. ISSN 1664-302X.
97. O'LEARY, W.M. *Practical Handbook of Microbiology*. 2nd ed. New York: CRC Press LLC, 1989. 681 p. ISBN 0-8493-3704-6.
98. ONNEBY, K., PIZZUL, L., BJERKETORP, J., MAHLIN, D., HÅKANSSON, S., WESSMAN, P. Effects of di- and polysaccharide formulations and storage conditions on survival of freeze-dried *Sphingobium* sp. In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2013, nr. 29(8), pp. 1399-1408. ISSN 0959-3993.
99. OZTURK, S., ASLIM, B. Modification of exopolysaccharide composition and production by three cyanobacterial isolates under salt stress. In: *Environmental Science and Pollution Research*. 2010, nr. 17(3), pp. 595-602. ISSN 0944-1344.

100. PAYTON, N. *The stability of unsaturated liposomal formulations during lyophilization and storage*: PhD thesis in Pharmaceutical Sciences. Albuquerque, 2014. 104 p.
101. PAYTON, N.M., WEMPE, M.F., XU, Y., ANCHORDOQUY, T.J. Long term storage of lyophilized liposomal formulations. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014, nr. 103(12), pp. 3869-3878. ISSN 0022-3549.
102. PEREIRA, D.A., GIANI, A. Cell density-dependent oligopeptide production in cyanobacterial strains. In: *FEMS Microbiology Ecology*. 2014, nr. 88(1), pp. 175-183. ISSN 0168-6496.
103. PEREIRA, D.A., PIMENTA, A.M., GIANI, A. Profiles of toxic and non-toxic oligopeptides of *Radiocystis fernandoii* (Cyanobacteria) exposed to three different light intensities. In: *Microbiological Research*. 2012, nr. 167(7), pp. 413-421. ISSN 0944-5013.
104. PEREIRA, S., ZILLE, A., MICHELETTI, E., MORADAS-FERREIRA, P., PHILIPPIS, D.R., TAMAGNINI, P. Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. In: *FEMS Microbiology Reviews*. 2009, nr. 33(5), pp. 917-941. ISSN 0168-6445.
105. PEREYRA, D.S.V., FERRARI, S.G. Extracellular polymeric substance (EPS) production by *Nostoc minutum* under different laboratory conditions. In: *Advances in Microbiology*. 2016, nr. 6(5), pp. 374-380. ISSN 2165-3402.
106. PEREZ-MONTANO, F., ALIAS-VILLEGAS, C., BELLOGIN, R.A. CERRO, P., ESPUNY, M.R., JIMÉNEZ-GUERRERO, I., LÓPEZ-BAENA, F.J., OLLERO, F.J., CUBO, T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. In: *Microbiological Research*. 2014, nr. 5(6), pp. 325-336. ISSN 0944-5013.
107. PINTO, L.S., VIEIRA, L.M., PONS, M.N., FONSECA, M.M., MENEZES, J.C. Morphology and viability analysis of *Streptomyces clavuligerus* in industrial cultivation systems. In: *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2004, nr. 26(4), pp. 177-184. ISSN 1615-7591.
108. POSTOLACHI, O. *Modificarea caracterelor culturale și biochimice ale unor tulpini de streptomicete după păstrarea îndelungată*: autoref. tz. de doct. în biologie. Chișinău, 2009. 28 p.
109. POSTOLACHI, O., BURȚEVA, S. Selecting the optimal growing medium for strain of streptomycetes *S. canosus* CNMN-Ac-04. In: *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine*. 2010, nr. 67(1), pp. 237-242. ISSN 1843-5270.
110. POSTOLACHI, O., BURȚEVA, S., POSTOLATI, G. Modificarea spectrului aminoacid în biomasa streptomicetelor păstrate timp îndelungat. In: *Transaction on metrology and*

analytical methods of research. ASM, Institute of Chemistry. 2010, nr. 1, pp. 231-237. ISBN 978-9975-62-276-9.

111. 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.

112. PRIATNI, S., BUDIWATI, T.A., RATNANINGRUM, D., KOSASIH, W., ANDRYANI, R., SUSANTI, H., SUSILANINGSIH, D. Antidiabetic screening of some Indonesian marine cyanobacteria collection. In: *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 2016, nr. 17(2), pp. 642-646. ISSN 1412-033X.

113. PROCOPIO, L., SILVA, I.R., MARTINS, M.K., AZEVEDO, J.L., ARAUJO, J.M. Antibiotics produced by *Streptomyces*. In: *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2012, nr. 16(5), pp. 466-471. ISSN: 1413-8670.

114. PROMNUAN, Y., KUDO, T., OHKUMA, M., CHANTAWANNAKUL, P. *Streptomyces chiangmaiensis* sp. nov. and *Streptomyces lannensis* sp. nov., isolated from South-East Asian stingless bee (*Tetragonilla collina*). In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2013, nr. 63(5), pp. 1896-1901. ISSN 1466-5026.

115. PYAR, H., PEH, K.K. Cost effectiveness of cryoprotective agents and modified Deman Rogosa Sharpe medium on growth of *Lactobacillus acidophilus*. In: *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2014, nr. 17(4), pp. 462-471. ISSN 1028-8880.

116. QƏNBƏROV, X.Q., ƏBDÜLHƏMİDOVA, S.M., ZAKİROVA, N.Q., HƏSƏNOVA, S.A., QULİYEVA, S.M. Aktinomisetlərin kulturalar kolleksiyasında saxlanma metodlarının müqayisəli öyrənilməsi. In: *Bakı Universitetinin Xəbərləri. Təbiət elmləri seriyası*. 2015, nr. 11(2), pp. 51-57. ISSN 1609-0586.

117. RAPOSO, D.J.M.F., MORAIS, D.R.M.S.C., MORAIS, D.A.M.M.B. Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. In: *Marine drugs*. 2013, nr. 11(1), pp. 233-252. ISSN 1660-3397.

118. RAVNEET, C., SHRUTI, M. Extracellular polymeric substances from cyanobacteria: Characteristics, isolation and biotechnological applications – a review. In: *International Journal of Advances in Engineering, Science and Technology*. 2013, nr. 3(2), pp. 49-53. ISSN 2347-6710.

119. RIFAAT, H.M. Viability study of some locally isolated *Streptomyces*. In: *Journal of culture collections*. 2009, nr. 6(1), pp. 38-41. ISSN 1310-8360.

120. ROTHROCK, M.J.J., VANOTTI, M.B., SZÖGI, A.A., GONZALEZ, M.C., FUJII, T. Long-term preservation of anammox bacteria. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, nr. 92(1), pp. 147-157. ISSN 0175-7598.

121. RUANGSOMBOON, S. Enhanced production of polysaccharides and protein content in cyanobacterium, *Oscillatoria limnetica* as a defense mechanism against low pH and Pb²⁺. In: *Chiang Mai Journal of Science*. 2015, nr. 4(1), pp. 34-43. ISSN 0125-2526.
122. RUDIC, V. *BioR: Studii biomedicale și clinice*. Chișinău: Tipografia Elena V.I. SRL, 2007. 376 p. ISBN 978-9975-9548-8-4.
123. RUDIC, V. et al. *Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale și realizări practice*. Chișinău: Tipografia „Elena V.I.” SRL, 2007. 364 p. ISBN 978-9975-9892-5-1.
124. RUDIC, V., GUDUMAC, V. *Preparat medicamentos*. Brevet de invenție (545) F1, A61K 35/66. Institutul de Microbiologie al AȘM. Nr. depozit 95-0244. Data depozit 10.05.1995. Publicat: 31.05.1996. In BOPI: 1996, nr. 5, p. 14.
125. SADOVNIC, D., CEPOI, L., RUDI, L., CHIRIAC, T., IAȚCO, I. Efficiency of antioxidant preparation from *Porphyridium cruentum* for preserving vegetable oils. In: *2nd International Conference on Microbial Biotechnology, 9-10 October 2014*. Chișinău: Tipografia ”Elena-V.I.”, 2014, p. 167. ISBN 978-9975-4432-8-9.
126. SAMUEL, C.S.J., JAGANNATHAN, A., BARATH, M., SHREENIDHI, K.S. A Review: bioflocculant and biosurfactant activity of exo-polysaccharides produced by marine cyanobacteria – *Nostoc*. In: *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*. 2015, nr. 4(12), pp. 12747-12754. ISSN 2347-6710.
127. SEMENOV, G.V., TIKHOMIROV, A.A., KRASNOVA, I.S. The choice of the parameters of vacuum freeze drying to thermolabile materials with desired quality level. In: *International Journal of Applied Engineering Research*. 2016, nr. 11(13), pp. 8056-8061. ISSN 0973-4562.
128. SENNI, K., PEREIRA, J., GUENICHE, F., DELBARRE-LADRAT, C., SINQUIN, C., RATISKOL, J., GODEAU, G., FISCHER, A.-M., HELLEY, D., COLLIEC-JOUAULT, S. Marine polysaccharides: A source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering. In: *Marine Drugs*. 2011, nr. 9(9), pp. 1664-1681. ISSN 1660-3397.
129. SHAFIEL, R., ZARMEHRKHORSHID, R., BENTAIB, A., BABANEZHAD, M., LEPRINCE, P., DELVIGNE, F., THONART, P. The role of protein modifications in senescence of freeze-dried *Acetobacter senegalensis* during storage. In: *Microbial Cell Factories*. 2014, nr. 13(26), pp. 1-16. ISSN 1475-2859.
130. SHAN, M., YU, S., YAN, H., GUO, S., XIAO, W., WANG, Z., ZHANG, L., DING, A., WU, Q., LI, S.F.Y. A Review on the phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and toxicology of geniposide, a natural product. In: *Molecules*. 2017, nr. 22, pp. 1-29. ISSN 1420-3049.

131. 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.
132. SHEPHERD, D.M., KHAREL, M.K., BOSSERMAN, M.A., RHOR, J. Laboratory maintenance of *Streptomyces* species. In: *Current Protocols in Microbiology*. 2010, nr. 18(1), pp. 1-10. ISSN 1934-8533.
133. SHUKLA, S. Freeze drying process: a review. In: *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2011, nr. 2(12), pp. 3061-3068. ISSN 2320-5148.
134. SINGH, S., DAS, S. Screening, production, optimization and characterization of cyanobacterial polysaccharide. In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011, nr. 27(9), pp. 1971-1980. ISSN 0959-3993.
135. SMITH, D., FRITZE, D., STACKEBRANDT, E. Public service collections and biological resource centers of microorganisms. In: *The Prokaryotes – Prokaryotic Biology and Symbiotic Associations*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013, pp. 267-304. ISBN 978-3-642-30193-3.
136. SOROKULOVA, I., WATT, J., OLSEN, E., GLOBA, L., MOORE, T., BARBAREE, J., VODYANOY, V. Natural biopolymer for preservation of microorganisms during sampling and storage. In: *Journal of Microbiological Methods*. 2012, nr. 88(1), pp. 140-146. ISSN 0167-7012.
137. SOUZA, M.F.V.Q., LOPES, C.E., PEREIRA, N. Medium optimization for the production of actinomycin D by *Streptomyces parvulus*. In: *Arquivos de biologia e tecnologia*. 1997, nr. 40(2), pp. 405-411. ISSN 1516-8913.
138. SPAEPEN, S, BOSSUYT, S, ENGELEN, K., MARCHAL, K., VANDERLEYDEN, J. Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. In: *New Phytologist*. 2014, nr. 201(3), pp. 850-861. ISSN 1469-8137.
139. SPASIC, J., MANDIC, M., DJOKIC, L., NIKODINOVIC-RUNIC, J. *Streptomyces* spp. in the biocatalysis toolbox. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018, nr. 102(8), pp 3513-3536. ISSN 0175-7598.
140. STRAP, J.L. Actinobacteria – plant interactions: a boon to agriculture. In: *Bacteria in Agrobiology: Plant Growth Responses*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011, pp. 285-307. ISBN 978-3-642-20332-9.
141. STRASSER, S., NEUREITER, M., GEPPL, M., BRAUN, R., DANNER, H. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of

lactic acid bacteria. In: *Journal of Applied Microbiology*. 2009, nr. 107(1), pp. 167-177. ISSN 1365-2672.

142. STRESSLER, T., EISELE, T., ROST, J., HAUNSCHILD, E.M., KUHN, A., FISCHER, L. Production of polyunsaturated fatty acids by *Mortierella alpina* using submerge and solid state fermentation. In: *Chemie Ingenieur Technik*. 2013, nr. 85(3), pp. 318-322. ISSN 1522-2640.

143. SUM, A.K., FALLER, R., PABLO, D.J.J. Molecular simulation study of phospholipid bilayers and insights of the interactions with disaccharides. In: *Biophysical Journal*. 2003, nr. 85(5), pp. 2830-2844. ISSN 0006-3495.

144. TAPIAS, D.R., ORITZ-VERA, M., RIVERA, D., KLOEPPER, J., BONILLA, R. Evaluation of three methods for preservation of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii*. In: *Universitas Scientiarum. Applied Microbiology*. 2013, nr. 18(2), pp. 129-139. ISSN 0122-7483.

145. TARIQ, A., NAZ, F., RAUF, C.A., IRSHAD, G. Long term and least expensive preservation methods for various fungal cultures. In: *Pakistan Journal of Phytopathology*. 2015, nr. 27(2), pp. 147-151. ISSN 1019-763X.

146. THANH, N.V., NOUT, M.J.R. Dormancy, activation and viability of *Rhizopus oligosporus*. In: *International Journal of Food Microbiology*. 2004, nr. 92(2), pp. 171-179. ISSN 0168-1605.

147. TOVEY, F.I. Role of dietary phospholipids and phytosterols in protection against peptic ulceration as shown by experiments on rats. In: *World Journal of Gastroenterology*. 2015, nr. 21(5), pp. 1377-1384. ISSN 1007-9327.

148. TRABELSI, L., M'SAKNI, N.H., OUADA, H.B., BACHA, H., ROUDESLI, S. Partial characterization of extracellular polysaccharides produced by cyanobacterium *Arthrospira platensis*. In: *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2009, nr. 14(1), pp. 27-31. ISSN 1226-8372.

149. UREM, M., ROSSUM, T.V., BUCCA, G., MOOLENAAR, G.F., LAING, E., ŚWIĄTEK-POLATYŃSKA, M.A., WILLEMSE, J., TENCONI, E., RIGALI, S., GOOSEN, N., SMITH, C.P., WEZEL, G.P.V. OsdR of *Streptomyces coelicolor* and the dormancy regulator DevR of *Mycobacterium tuberculosis* control overlapping regulons. In: *Molecular Biology and Physiology*. 2016, nr. 1(3), pp. 1-21. ISSN 2379-5077.

150. USATÎÎ, A., BURȚEV, S., ȘIRȘOV, T. Caracteristica tulpinilor noi de streptomicete – producători activi al lipidelor. În: *Buletinul Academiei de Științe a Republicii Moldova. Științe Biologice și Chimice*. 1994, nr. 272(5), pp. 21-24. ISSN 0568-5192.

151. VACHERON, J.G., DEBROSSES, G., BOUFFAUD, M.-L., TOURAINÉ, B., MOËNNE-LOCCOZ Y., MULLER, D., LEGENDRE, L., WISNIEWSKI-DYÉ, F., PRIGENT-COMBARET, C. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. In: *Frontiers in Plant Science*. 2013, nr. 4, pp. 1-19. ISSN 1664-462X.
152. VIAENE, T., LANGENDRIES, S., BEIRINCKX, S., MAES, M., GOORMACHTIG, S. *Streptomyces* as a plant's best friend? In: *FEMS Microbiology Ecology*. 2016, nr. 92, pp. 1-10. ISSN 0168-6496
153. VYSEKANTSEV, I.P., BABINETS, O.M., MARTSENYUK, V.F., GURINA, T.M. Comparative study of influence of cryopreservation regimes of free and immobilized cells of *Sacharomyces boulardii* probiotic. In: *Problems of Cryobiology*. 2012, nr. 22(1), pp. 21-29. ISSN 2307-6143.
154. WACKETT, L.P. Microbial strain collections and information. An annotated selection of World Wide Web sites relevant to the topics in microbial biotechnology. In: *Microbial Biotechnology*. 2014, nr. 7(4), pp. 371-372. ISSN 1751-7915.
155. WAKSMAN, S.A. *The Actinomycetes. Vol. 2: Classification, identification and descriptions of genera and species*. Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1961. 363 p.
156. WANG, S., OLDENHOF, H., GOECKE, T., RAMM, R., HARDER, M., HAVERICH, A., HILFIKER, A., WOLKERS, W.F. Sucrose diffusion in decellularized heart valves for freeze-drying. In: *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2015, nr. 21(9), pp. 922-931. ISSN 1937-3392.
157. WESSMAN, P., HÅKANSSON, S., LEIFER, K., RUBINO, S. Formulations for freeze-drying of bacteria and their influence on cell survival. In: *Journal of Visualized Experiments*. 2013, nr. 7(78), pp. 1-5. ISSN 1940-087X.
158. WU, L., SUN, Q., DESMETH, P., SUGAWARA, H., XU, Z., MCCLUSKEY, K., SMITH, D., VASILENKO, A., LIMA, N., OHKUMA, M., ROBERT, V., ZHOU, Y., LI, J., FAN, G., INGSRIWANG, S., OZERSKAYA, S., MA, J. World data centre for microorganisms: an information infrastructure to explore and utilize preserved microbial strains worldwide. In: *Nucleic Acids Research*. 2017, nr. 45(1), pp. 611-618. ISSN 0305-1048.
159. XU, W., HSU, F.-F., BAYKAL, E., HUANG, J., ZHANG, K. Sterol biosynthesis is required for heat resistance but not extracellular survival in *Leishmania*. In: *PLOS Pathogens*. 2014, nr. 10(10), pp. 1-18.
160. YANG, S.-H., SEO, S.H., KIM, S.W., CHOI, S.K., KIM, D.H. Effect of ginseng polysaccharide on the stability of lactic acid bacteria during freeze-drying process and storage. In: *Archives of Pharmacal Research*. 2006, nr. 29(9), pp. 735-740. ISSN 0253-6269.

161. YILMAZ, M., KATHRYN, C.C., GÖKHAN, S.H. *De novo* lipogenesis products and endogenous lipokines. In: *Diabetes*. 2016, nr. 65(7), pp. 1800-1807. ISSN 0012-1797.
162. ZAMIOUDIS, C., HANSON, J., PIETERSE, C.M. β -Glucosidase BGLU42 is a MYB72-dependent key regulator of rhizobacteria-induced systemic resistance and modulates iron deficiency responses in *Arabidopsis* roots. In: *New Phytologist*. 2014, nr. 204(2), pp. 368-379. ISSN 1469-8137.
163. ZARNEA, G. *General Microbiology. Theory of Ecology of Microorganisms: Microorganisms and Their Natural Environments*. Bucharest: Romanian Academy Publishers, 1994. 1078 p. ISBN 973-2704-403.
164. ZVYAGINTSEV, D.G., ZENOVA, G.M., LOBAKOVA, E.S., NIKOLAEV, G.M., OMAROVA, E.O., IVANOVA, E.A., SAVELYEV, I.B. Morphological and physiological modifications of cyanobacteria in experimental cyanobacterium-actinomycete associations. In: *Microbiology*. 2010, nr. 79(3), pp. 314-320. ISSN: 0026-3656.
165. АГЕЕВА, И.В., ВЛАСОВА, Т.А. Особенности липидного обмена и ультраструктуры липидных включений у различных по вирулентности штаммов фитопатогенного гриба *Verticillium dahlia*. 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. 21. ISBN 978-5-317-04881-5.
166. АЛМАШИ, Э., ЭРДЭЛИ, Л., ШАРОЙ, Т. *Быстрое замораживание пищевых продуктов*. Москва: Легкая и пищевая промышленность, 1981. 407 с.
167. АНАНЬИНА, А.Е., ЦУЦАЕВА, А.А., БАЛЫБЕРДИНА, Л.М., ГРИША, И.Г., ЩЕГЛОВ, А.В. Лиофилизация споровой культуры *Streptomyces aureofaciens*. В: *Проблемы криобиологии*. 2008, № 10(4), с. 404-406. ISSN 2307-6143.
168. АНДРІЮК, К.І. *Ґрунтові актиноміцети та вищі рослини*. Київ: Наукова Думка, 1972. 144 с.
169. БАЛАШОВА, Н.Н., КИНТЯ, П.К., БЛАНДИНСКАЯ, О.А., КОЗАРЬ, Е.Г., БЕСПАЛЬКО, Л.В., БАЛАШОВА, И.Т., МАЩЕНКО, Н.Е. Влияние экзогенных стероидных гликозидов на развитие серой гнили на перце сладком в условиях пленочных теплиц Подмосковья. В: *Сборник научных трудов международной конференции «Селекция и семеноводство овощных культур»*. Москва, выпуск 45, 31.07-5.08.2014. Москва: В.Ф. Пивоваров, 2014, с. 103-114. ISBN 978-5-901695-62-3.
170. БАТАЕВА, Ю.В., КУРАШОВ, Е.А., КРЫЛОВА, Ю.В. Исследование химического состава экзогенных метаболитов циано-бактериальных сообществ в накопительной

культуре. 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. 31. ISBN 978-5-317-04881-5.

171. БАТРАКОВ, С.Г. Липиды стрептомицетов. В: *Успехи современной биологии*. 1983, № 96(3-6), с. 366-381. ISSN 0042-1324.

172. БЕЛЯВСКАЯ, Л.А. *Біосинтез антипаразитарних і фітостимулюючих речовин Streptomyces avermitilis УКМ Ас-2179*: автореф. дис. на соиск. уч. степени к. б. н. Киев, 2008. 22 с.

173. БЕРГЕЛЬСОН, Л.Д. *Мембраны, молекулы, клетки*. Москва: Наука, 1983. 240 с.

174. БЕРЕЗЮК, Ю.Н., ШЕПТИЦКИЙ, В.А., БУРЦЕВА, С.А., БРАТУХИНА, А.А., БЫРСА, М.Н., ГАНКЕВИЧ, А.Б. Влияние метаболитов стрептомицетов, выделенных из почв Молдовы, на теплокровных животных. 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. 25-26. ISBN 978-5-89606-541-8.

175. БОНДАРЕНКО, Н.А., БЕЛЫХ, О.И., ГОЛОБОКОВА, Л.П., АРТЕМЬЕВА, О.В., ЛОГАЧЁВА, Н.Ф., ТИХОНОВА, И.В., ЛИПКО, И.А., КОСТОРНОВА, Т.Я., ПАРФЁНОВА, В.В., ХОДЖЕР, Т.В. Химический состав, бактериальные и водорослевые сообщества льда озера Байкал. В: *Гидробиологический журнал*. 2013, № 49(1), с. 14-28. ISSN 0375-8990.

176. БОНДАРЦЕВ, А.С. *Шкала цветов*. Москва: изд-во АН СССР, 1954. 28 с.

177. БОРОВИК, О.А., КОРОЛЕВА, Н.А., ГРАБЕЛЬНЫХ, О.И., ПОБЕЖИМОВА, Т.П., ВОЙНИКОВ, В.К. Влияние экзогенной сахарозы на адаптивный потенциал растений при низких температурах. В: *Материалы всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых. Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде, 12-15 сентября 2016*. Иркутск: Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2016, с. 56-57. ISBN 978-5-94797-272-6.

178. БОРОВСКАЯ, А.Д., МАЩЕНКО, Н.Е., ФОКША, Н.Г. Применения биорегуляторов гликозидной природы при возделывания баклажанов в закрытом грунте. In: *Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality. Slovak University of Agriculture in Nitra. Scientific proceedings, November 28, 2016*. Nitra: Slovak University of Agriculture in Nitra, 2016, pp. 34-39. ISBN 978-80-552-1586-0.

179. БОРОВСКИЙ, Г.Б., КОРОТАЕВА, Н.Е., УКОЛОВА, И.В. Дегидрины растений. Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде. В: *Материалы всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых. Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде, 12-15 сентября 2016*. Иркутск: Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2016, с. 16-18. ISBN 978-5-94797-272-6.
180. БОТНАРЬ, В.Ф. и др. *Рекомендации по применению регуляторов роста растений в технологии возделывания овощных культур*. Кишинев: Tipografia „Print-Caro”, 2015. 24 с.
181. БОТНАРЬ, В.Ф. и др. *Рекомендации по применению регуляторов роста растений в технологии возделывания зерновых культур*. Кишинев: „Print-Caro”, 2015. 16 с.
182. БУРЦЕВА, С.А. *Биологически активные вещества стрептомицетов (Биосинтез, свойства, перспективы применения)*: автореф. дис. д-ра хабилитат биологических наук. Кишинев, 2002. 39 с.
183. БУРЦЕВА, С.А. БЫРСА, М.Н., БЕРЕЗЮК, Ю.Н., ВАСИЛЬЧУК, А.В., КИСЕЛИЦА, О.А. Изменения антимикробных свойств стрептомицетов после 5 лет хранения в лиофильном виде. В: *Материалы международной конференции. Современные аспекты сельскохозяйственной микробиологии. 7-8 декабря 2016*. Москва: РГАУ-МСХА, 2016, с. 28-29. ISBN 978-5-9675-1582-8.
184. 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.
185. 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.
186. 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.

187. 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, 19-23 октября 2015*. Киров, 2015, с. 65-70. ISBN 978-5-9906634-8-0.

188. 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.

189. БУРЦЕВА, С.А. *Микробные биоантиоксиданты липидной природы*: автореф. к. б. н. Москва, 1986. 14 с.

190. **БЫРСА, М.Н.** Влияние препаратов цианобактериальной природы на рост и липидообразование *Streptomyces canosus* CNMN-As-02. В: *21-я Международная пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология – Наука XXI века», 18-22 апреля 2017*. Пушино: 2017, с. 11. ISBN 978-5-9908139-1-5.

191. **БЫРСА, М.Н.** Выживаемость и антимикробные свойства стрептомицетов после лиофилизации с разными защитными средами. В: *20-я Международная пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология – Наука XXI века», 18-22 апреля 2016*. Пушино: 2016, с. 12. ISBN 978-5-9908139-0-8.

192. **БЫРСА, М.Н.** Выживаемость и состав популяции стрептомицетов после лиофилизации. В: *19-я Международная пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология – Наука XXI века», 18-22 апреля 2015*. Пушино: 2015, с. 166-167. ISBN 978-5-9906586-0-8.

193. **БЫРСА, М.Н.**, ВАСИЛЬЧУК, А.В. Морфокультуральные особенности стрептомицетов – продуцентов физиологически активных веществ при культивировании на синтетических, органических и комплексных средах. In: *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.

194. ВАЛАГУРОВА, Е.В., КОЗЫРИЦКАЯ, В.Е., ИУТИНСКАЯ, Г.А. *Актиномицеты рода Streptomyces. Описание видов и компьютерная программа их идентификации*. Киев: Наукова думка, 2003. 645 с. ISBN: 966-00-0097-9.

195. ВИНОГРАДОВА, К.А., ФИЛИППОВА, С.Н., БУЛГАКОВА, В.Г. Программируемая клеточная смерть как одна из стадий дифференциации 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. 111. ISBN 978-5-317-05141-9.
196. ВОРОБЬЁВА, Л.И., ХОДЖАЕВ, Е.Ю., МУЛШКИН, А.Л., ТОРОПЫГИН, И.Ю. Механизм действия реактивирующего фактора *Luteococcus casei*. В: Прикладная биохимия и микробиология. 2009, № 45(5), с. 544-549. ISSN 0555-1099.
197. ВОРОБЬЁВА, Л.И., ХОДЖАЕВ, Е.Ю., НОВИКОВА, Т.М., ЧУДИНОВА, Е.М. Антистрессовое перекрестное действие внеклеточных метаболитов бактерий, архей и дрожжей (обзор). В: Прикладная биохимия и микробиология. 2013, № 49(4), с. 333-344. ISSN 0555-1099.
198. ГАУЗЕ, Г.Ф. Определитель актиномицетов. Роды *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Chainia*. Москва: Книга по Требованию, 2014, 248 с. ISBN 978-5-458-47107-7.
199. ГОЛОВАЧ, Т.Н., ГРОМА, Л.И. Влияние криоконсервации и лиофилизации на синтез экзополисахарида и жизнеспособность *Xantomonas campestris* pv. *campestris* IMB V-7001. В: Мікробіологічний журнал. 2013, № 75(1), с. 14-20. ISSN 1028-0987.
200. ГРАЧЕВА, И.В., ВАЛОВА, Т.В., ГРИГОРЬЕВА, Г.В. Традиционные и новые защитные среды для низкотемпературной консервации бактерий. В: Проблемы особо опасных инфекций. 2011, № 110(4), с. 36-40. ISSN 0370-1069.
201. ГРУЗИНА, В.Д., ГОРБАТЮК, Е.В., ЕФРЕМЕНКОВА, О.В., ФИЛИППОВА, С.Н., ЭЛЬ-РЕГИСТАН, Г.И., ДУДНИК, Ю.В. Обнаружение новой регуляторной функции А-фактора – стимуляции прорастания спор стрептомицетов В: Микробиология. 2003, № 72(6), с. 770-774. ISSN 0026-3656.
202. ГУРИНА, В.В., ОЗОЛИНА, Н.В., НЕСТЁРКИНА, И.С., НУРМИНСКИЙ, В.Н. Влияния разных видов абиотического стресса на жирнокислотный состав вакуолярной мембраны. В: Материалы всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых. Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде, 12-15 сентября 2016. Иркутск: Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2016, с. 77-78. ISBN 978-5-94797-272-6.
203. ГУРИНА, Т.М., ВЫСЕКАНЦЕВ, И.П., БАБИНЕЦ, О.М. Стандартизация процесса криоконсервирования дрожжей *Saccharomyces boulardii* для использования в коллекциях и

банках промышленных штаммов микроорганизмов. В: *Мікробіологічний журнал*. 2013, № 75(5), с. 33-39. ISSN 1028-0987.

204. ДЕВЯТЛОВСКАЯ, А.Н., ЖУРАВЛЁВА, Л.Н., АЛАШКЕВИЧ, Ю.Д. Изучение содержания фитостеринов в антагонистических частях боярышника кроваво-красного. В: *Химия растительного сырья*. 2014, № 2, с. 195-198. ISSN 1029-5151.

205. ДЕДЮХИНА, Э.Г., ЕРОШИН, В.К. Незаменимые химические элементы в регуляции метаболизма микроорганизмов. В: *Успехи микробиологии*. 1992, № 25, с. 126-141.

206. ДИДОВИЧ, С.В. Физиологический потенциал цианобактерий и их влияние на растения. In: *XVth congress of Vinogradskyi society of microbiologists of Ukraine. Abstracts of reports, September 11-15, 2017*. Lviv: Spolom, 2017, p. 130. ISBN 978-966-919-301-8.

207. ДИНКАЕВА, К.А., САТЕНОВА, А.М., ЕСКАРАЕВА, А.А., ЕРГЕБАЕВА, Р.К., ШУМЕНОВА, Н.Ж., ЗАКАРЬЯ, К.Д., АЛМАГАМБЕТОВ, К.Х. Оптимизация хранения коллекционных культур методом контактно-сорбционного обезвоживания на препаратах Таган и Алтай сорбент. 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. 78. ISBN 978-5-317-04881-5.

208. ЕГОРОВ, Н.С. *Основы учения об антибиотиках*. Москва: Наука, 2004. 528 с. ISBN 5-211-04669-2.

209. ЕГОРОВ, Н.С. *Промышленная микробиология*. Москва: Высшая школа, 1989. 688 с. ISBN 5-06-001482-7.

210. ЕНИКЕЕВ, А.Г., ГАМБУРГ, К.З. Холодовое хранение культур растительных тканей. Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде. В: *Материалы всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых. Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде, 12-15 сентября 2016*. Иркутск: Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2016, с. 87-88. ISBN 978-5-94797-272-6.

211. 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.

212. ЗЕНОВА, Г.М., ЗВЯГИНЦЕВ, Д.Г. *Разнообразие актиномицетов в наземных экосистемах*. Москва: МГУ, 2002. 135 с. ISBN 5-211-04632-3.
213. ЗЕНОВА, Г.М., ОРЛЕАНСКИЙ, В.К. Альго-бактериально-актиномицетные ассоциации в микрокосмах. 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. 45. ISBN 978-5-317-05141-9.
214. КАЛАКУЦКИЙ, Л.В. Лучистые грибы и родственные им организмы (*Actinomycetales*). В: *Микробиология*. 2004, № 73(5), с. 613-621. ISSN 0026-3656.
215. КАНТЕРОВА, А.В., АЛЕШКЕВИЧ, И.И., НОВИК, Г.И. Сохранение жизнеспособности и свойств дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* методом лиофилизации. В: *Актуальные Аспекты Современной Микробиологии. Тезисы VI Молодежной школы-конференции с международным участием, 25-27 октября 2010*. Москва: МАКС Пресс, 2010, с. 30-32. ISBN 978-5-317-03427-6.
216. КАНТЕРОВА, А.В., ВАЖИНСКАЯ, И.С., НОВИК, Г.И. Методы хранения промышленно-ценных культур в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов. В: *VIII Международная конференция. daRostim-2012 Микробные биотехнологии: актуальность и будущее: материалы международной конференции, 19-22 ноября 2012*. Киев: Kyiv, 2012, с. 134-135.
217. КАРТЕЛЬ, А.Н., КАНТЕРОВА, А.В. Сбраживающая активность дрожжей рода *Saccharomyces*. В: *Микроорганизмы и биосфера : материалы международной научной конференции, 19-20 ноября 2007*. Москва: МАКС Пресс, 2007, с. 54-56. ISBN 978-5-317-02128-3.
218. КИРПЕНКО, Ю.А., КИРПЕНКО, Н.И., ПАРШИКОВА, А.В. Природные популяции синезеленых водорослей – продуценты биологически активных веществ. В: *Гидробиология*. 1999, № 35(1), с. 77-82. ISSN 0375-8990.
219. 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.
220. КОЗЫРИЦКАЯ, В.Е. *Образование каротиноидов и липидов актиномицетами желтой группы*: дис. д-ра биологических наук. Киев, 1980. 22 с.

221. КОЗЫРИЦКАЯ, В.Е., ВАЛАГУРОВА, Е.В., ПЕТРУК, Т.В., БЕЛЯВСКАЯ, Л.А., ИУТИНСКАЯ, Г.А. Биологические свойства авермектинового комплекса *Streptomyces avermitilis* УКМ АС-2179. În: *Știința agricolă*. 2007, nr. 1, pp. 17-20. ISSN 1857-0003.
222. КОНЕВ, Ю.Е., КУЗЬМИНА, Э.Д. Результаты длительного лабораторного хранения *Streptoverticillium hachijoensis* и *Streptoverticillium baldacci* - продуцента трихомицина. В: *Антибиотики*. 1975, № 20(3), с. 235-239. ISSN 0003-5637.
223. КОНОВА, И.В. Характеристика липидов актиномицетов. В: *Биологические науки*. 1983, № 8, с. 5-17. ISSN 1028-0057.
224. КОНОВА, И.В., СЕРГЕЕВА, Я.Э., ГАЛАНИНА, Л.А., КОЧКИНА, Г.А., ИВАНУШКИНА, Н.Е., ОЗЕРСКАЯ, С.М. Липогенез грибов *Geomyces rapoportii* при действии стрессоров. В: *Микробиология*. 2009, № 78(1), с. 52-58. ISSN 0026-3656.
225. КОРНІЄНКО, А.Ф., САФАРОВ, П.Т., ГУДКОВА, О.Т. Вплив ліофілізації і строку зберігання на життєздатність та біохімічні властивості ґрунтових актиноміцетів. В: *Мікробіологічний журнал*. 1977, № 39(5), с. 642-643. ISSN 1028-0987.
226. КРАСИЛЬНИКОВ, Н.А. *Лучистые грибки (высшие формы)*. Москва: Наука, 1970. 535 с.
227. КРАСИЛЬНИКОВ, Н.А. *Методы хранения коллекционных культур микроорганизмов*. Москва: Наука, 1967. 152 с.
228. КРЕПС, Е.М. *Липиды клеточных мембран: Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов*. Москва: Наука, 1981. 339 с.
229. КУЗНЕЦОВ, В.Д., ФИЛИПОВА, С.Н., МУРАВЬЕВА, С.А., ФИШМАН, В.М. Прогнозирование выживаемости лиофилизированных спор *Actinomyces parveellus*, основанное на «методе ускоренного хранения». В: *Микробиология*. 1977, № 46(2), с. 427-431. ISSN 0026-3656.
230. КУПЛЕТСКАЯ, М.Б., АРКАДЬЕВА, З.А. Методы длительного хранения коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии Московского Государственного Университета. В: *Микробиология*. 1987, № 66(2), с. 283-288. ISSN 0026-3656.
231. КУПЛЕТСКАЯ, М.Б., НЕТРУСОВ, А.И. Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения. В: *Микробиология*. 2011, № 80(6), с. 842-846. ISSN 0026-3656.
232. ЛИПЕЙ, С.О., ШЕСТАКОВ, А.И. Методы длительного хранения фототрофных микроорганизмов музея культур кафедры микробиологии. 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. 53. ISBN 978-5-317-05141-9.

233. ЛОБАКОВА, Е.С., СЕЛЯХ, И.О., СЕМЕНОВА, Л.Р., ЧИВКУНОВ, О.Б., ЩЕРБАКОВ, П.Н., СОЛОВЧЕНКО, А.Е. Новые биотехнологически перспективные штаммы зеленых каротиногенных микроводорослей. 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. 150. ISBN 978-5-317-04881-5.

234. ЛЫСАК, В.В., ЖЕЛДАКОВА, Р.А. *Микробиология. Методические рекомендации к лабораторным занятиям, контроль самостоятельной работы студентов. Для студентов биологического факультета*. Минск: БГУ, 2002. 100 с.

235. ЛЫСАК, В.В., ЖЕЛДАКОВА, Р.А., ФОМИНА, О.В. *Микробиология. Практикум: пособие*. Минск: БГУ, 2015. 115 с. ISBN 978-985-566-201-4.

236. МАГДАНОВА, Л.А., ГОЛЯСНАЯ, Н.В. Гетерогенность как адаптивное свойство бактериальной популяции. В: *Микробиология*. 2013, № 82(1), с. 3-13. ISSN 0026-3656.

237. МАЧАВАРИАНИ, Н.Г., ГАЛАТЕНКО, О.А., ТЕРЕХОВА, Л.П. Выделение актиномицетов – потенциальных продуцентов антибиотиков из почвы селективными методами с использованием соединений, стимулирующих прорастание спор. В: *Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее: Всероссийский симпозиум с международным участием*. Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова. Биологический факультет. 27-29 января 2011. Москва: МАКС Пресс, 2011, с. 79. ISBN 978-5-317-03531-0.

238. МАЩЕНКО, Н., МАРЧЕНКО-ЧИКАНЧИ, А. КИНТЯ, П., КОЗАРЬ, Е. Использование гликозидов из некоторых видов *Verbascum L.* для повышения адаптивного потенциала *Capsicum annuum L.* В: *Дендрология, цветоводство и садово-парковое строительство: Материалы международной научной конференции, посвященной 200-летию Никитского Ботанического сада, 5-8 июня 2012*. Ялта: НБС, 2012, т. 1, с. 132.

239. МАЩЕНКО, Н.Е., КИНТЯ, П.К., КОЗАРЬ, Е.Г., БЕСПАЛЬКО, А.В., БАЛАШОВА, И.Т. Гликозиды из *Verbascum densiflorum Bertol.*, как индукторы адаптивного и продуктивного потенциала перца сладкого. В: *Интродукция нетрадиционных и редких растений: материалы X Международной научно-методической*

конференции, посвященной памяти академика РАСХН Немцева Николая Сергеевича, 25-28 июня 2012. Ульяновск: УГТУ, 2012, т. 1, с. 418-420. ISBN 978-5-9795-0973-0.

240. 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, № 12, с. 433-436.

241. НЕТРУСОВ, А.И. *Практикум по микробиологии*. Москва: Академия, 2005. 602 с. ISBN 5-7695-1809-X.

242. НЕЧАЕВА, О.В. *Поиск и использование синтетических соединений гетероциклического ряда для сохранения стабильности популяционного состава коллекционных культур микроорганизмов*: автореф. дис. на соиск. уч. степ. д. б. н. Саратов, 2003. 23 с.

243. НИКОЛАЕВ, Ю.А., МУЛЮКИН, А.Л., СТЕПАНЕНКО, И.Ю., ЭЛЬ-РЕГИСТАН, Г.И. Ауторегуляция стрессового ответа микроорганизмов. В: *Микробиология*. 2006, № 78(4), с. 489-496. ISSN 0026-3656.

244. НИКОЛАЕВ, Ю.А., СУРГУЧЕВА, Н.А., ФИЛИППОВА, С.Н. Эффект дистантных взаимодействий на рост и развитие стрептомицетов. В: *Микробиология*. 2015, № 84(6), с. 673-679. ISSN 0026-3656.

245. НИКОЛАЕВ, Ю.А. Внеклеточные факторы адаптации бактерий к неблагоприятным условиям среды. В: *Прикладная биохимия и микробиология*. 2004, № 40(4), с. 387-397. ISSN 0555-1099.

246. ОВСЯННИКОВ, Т.Н., МИРОНОВА, Н.Г., ЗАБОЛОТНЫЙ, В.Н., ГУБАНОВА, А.Г. Состав и антиоксидантная активность комплекса биополимеров из *Spirulina platensis* (GOM) Geitl. В: *Альгология*. 1998, № 8(1), с. 75-81. ISSN 0848-8540.

247. ОРЛОВА, А.А., БЕССОНОВ, И.В., ЛОБАКОВА, Е.С. Разработка линейки сорбентов для сбора биомассы цианобактерий в природе и при культивировании. 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. 63. ISBN 978-5-317-05141-9.

248. ПЕТРУК, Т.В., ІУТИНСЬКА, Г.О., ЛІНІК, В.В., ДЗЯТКІВСЬКА, Т.П. Вплив авермектинів на мікробні угруповання ґрунту та рослини. В: *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія. (Біологічні системи)*. 2005, № 10(252), с. 193-199. ISSN 2078-8673.

249. ПЕТРУХИНА, Д.И., ЛЫКОВ, И.Н. Исследование эффективности сохранения цианобактерии *Spirulina subsalsa* после криоконсервации при -80°C в присутствии глюкозы. В: *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2016, № 6(4), с. 68-73. ISSN 2227-2925.

250. ПОХИЛЕНКО, В.Д., БАРАНОВ, А.М., ДЕДУШЕВ, К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития. В: *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. Обзор литературы*. 2009, № 4(12), с. 99-121. ISSN 2307-9150.

251. РУССУ, М., БАЛМУШ, Г., КИНТЯ, П., МАЩЕНКО, Н. Возможность применения препарата Линарозид на яблони в условиях Молдовы. В: *Дендрология, цветоводство и садово-парковое строительство: Материалы международной научной конференции, посвященной 200-летию Никитского Ботанического сада, 5-8 июня 2012*. Ялта: НБС, 2012, т. 2, с. 155.

252. РУСУ, М.М., БАЛМУШ, Г.Т., МАЩЕНКО, Н.Е. Влияние препарата Линарозид на пигментный комплекс листьев яблони. В: *VIII съезд общества физиологов растений России «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий», 21-26 сентября, 2015, Петрозаводск*. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2015, с. 459. ISBN 978-5-9274-0687-6.

253. РУСУ, М.М., МАЩЕНКО, Н.Е. Влияние линарозида на содержание пигментов и сахаров в листьях яблони. В: *Материалы XII международной конференции «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования», 6-10 июня 2016, Ялта*. Москва: РУДН, 2016, с. 255-258. ISBN 978-5-209-07269-0.

254. РУСУ, М.М., МАЩЕНКО, Н.Е. Особенности применения Линарозида на яблоне сорта Мичгла. В: *Международная научно-практическая конференция «Современное состояние и перспективы инновационного развития сельского хозяйства» (85 лет со дня основания Приднестровская НИИ сельского хозяйства), 16-17 ноября 2015*. Тирасполь: «Есо-Tiras», 2015, с. 358-361. ISBN 978-9975-53-552-6.

255. РЯБОВА, О.В., ШИРОКИХ, И.Г. Рост и антифунгальная активность стрептомицетов на фоне повышенной кислотности среды. В: *Сельскохозяйственная биология*. 2014, № 49(3), с. 100-107. ISSN 0131-6397.

256. СЕМЕНОВ, С.М. *Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Справочник*. Москва: Агропромиздат, 1990. 239 с.

257. СКОРЛУПКИНА, Н.Н., ЧИСТЯКОВА, Д.А., БЛИНКОВА, Л.П. Стимуляция перехода некультивируемых микроорганизмов в вегетативное состояние при помощи

инулиносодержащих препаратов. В: *20-я Международная пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология – Наука XXI века», 18-22 апреля 2016*. Пушино: 2016, с. 47. ISBN 978-5-9908139-0-8.

258. 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.

259. ТАШИРЕВ, А.Б., РОМАНОВСКАЯ, В.А., БЕРЕГОВАЯ, Т.В., МАТВЕЕВА, Н.А., РОКИТКО, П.В., ТАШИРЕВА, А.А., ФАЛАЛЕЕВА, Т.В. Перспективы использования экстремофильных антарктических микроорганизмов для создания новых промышленных биотехнологий. В: *Український антарктичний журнал*. 2010, № 17(9), с. 158-186. ISSN 1727-7485.

260. ТЕМИРХАНОВ, А.Ж., АБЖАЛЕЛОВ, А.Б., ЗАКАРЬЯ, К.Д. Республиканская коллекция микроорганизмов – основа сохранения генофонда промышленных микроорганизмов. In: *XVth congress of Vinogradskyi society of microbiologists of Ukraine. Abstracts of reports, September 11-15, 2017, Odessa*. Lviv: Spolom, 2017, p. 96. ISBN 978-966-919-301-8.

261. ТЕРЁШИНА, В.М., МЕМОРСКАЯ, А.С., КОТЛОВА, Е.Р. Влияние различных тепловых воздействий на состав мембранных липидов и углеводов цитозоля у мицелиальных грибов. В: *Микробиология*. 2011, № 80(4), с. 447-453. ISSN 0026-3656.

262. ФЕОФИЛОВА, Е.П. Современные направления в изучении биологически активных грибов (Обзор). В: *Прикладная биохимия и микробиология*. 1998, № 34(6), с. 597-608. ISSN 0555-1099.

263. ФЕОФИЛОВА, Е.П. Торможения жизненной активности как универсальный биохимический механизм адаптации микроорганизмов к стрессовым воздействиям (Обзор). В: *Прикладная биохимия и микробиология*. 2003, № 39(1), с. 5-24. ISSN 0555-1099.

264. 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, № 48(1), с. 5-17. ISSN 0555-1099.

265. 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.

266. 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, № 82(3), с. 335-343. ISSN 0026-3656.

267. ФИЛИППОВА, С.Н., СУРГУЧЕВА, Н.А., КУЗНЕЦОВ, В.Д., ЭЛЬ-РЕГИСТАН, Г.И., ГАЛЬЧЕНКО, В.Ф. Оптимизация защитных сред для хранения актиномицетов в жидком азоте. В: *Микробиология*. 2007, № 76(4), с. 573-576. ISSN 0026-3656.

268. ЦУЦАЕВА, А.А., АНАНЬИНА, А.Е., БАЛЫБЕРДИНА, Л.М., СТЕПАНЮК, Л.В., ПАВЛЕНКО, Н.В. Опыт долгосрочного хранения промышленных штаммов микроорганизмов. В: *Микробиология*. 2008, № 77(5), с. 696-700. ISSN 0026-3656.

ANEXE

Anexa 1. Brevet de invenție MD 4473 din 15.07.2016



REPUBLICA MOLDOVA

Agencia de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

**BREVET
DE INVENȚIE**

Nr. 4473

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

**Titlul: Mediu de protecție pentru liofilizarea și păstrarea
îndelungată a tulpinii *Streptomyces canosus*
CNMN-Ac-02**

**Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI
BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A
MOLDOVEI, MD**

Data depozit: 2016.07.15

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

 **Director General**


CHIȘINĂU

Anexa 2. Brevet de invenție MD 4474 din 15.07.2016


REPUBLICA MOLDOVA
Agenția de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

BREVET
DE INVENȚIE

Nr. 4474

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

Titlul: Mediu de protecție pentru liofilizarea și păstrarea îndelungată a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02

Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD

Data depozit: 2016.07.15

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

Director General



CHIȘINĂU

Anexa 3. Brevet de invenție MD 1226 din 29.06.2017



REPUBLICA MOLDOVA

Agencia de Stat pentru
Proprietatea Intelectuala

BREVET
DE INVENTIE
DE SCURTĂ DURATĂ

Nr. 1226

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

Titlul: **Mediu de protecție pentru conservarea și păstrarea
îndelungată a tulpinii *Streptomyces canosus*
CNMN-Ac-02**

Titulari: **INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI
BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A
MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE GENETICĂ,
FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL
ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD**

Data depozit: 2017.06.29

Durata brevetului : 6 ani

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



Director General



CHIȘINĂU

Anexa 4. Brevet de invenție MD 1235 din 29.06.2017



REPUBLICA MOLDOVA

Agenția de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

BREVET
DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ

Nr. 1235

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

Titlul: Mediu de protecție pentru conservarea și păstrarea îndelungată a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02

Titulari: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD

Data depozit: 2017.06.29

Durata brevetului : 6 ani

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



Director General


CHIȘINĂU

Anexa 5. Act de implementare a brevetului MD 4473 nr. 1 din 03.12.2018

APROB Directorul adjunct probleme științifice al IMB dr., conf. cercet., Liliana CEPOI 12 2018	APROB Șef Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene, IMB dr., conf. cercet., Chiselita Oleg Chiselita „03” decembrie 2018
--	--

I.P. "INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE
ȘI BIOTEHNOLOGIE"

leșire Nr. 126

"3" decembrie 2018

ACT de implementare a brevetului MD 4473 Nr. 1 din 03 decembrie 2018

Prin prezentul Act se confirmă, că rezultatele investigațiilor științifice, efectuate în cadrul proiectului instituțional, realizat de cercetătorii laboratorului Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie în anii 2015-2018, sunt implementate în procesul de conservare și păstrare de lungă durată a microorganismelor de interes biotehnologic în CNMN, pentru optimizarea metodelor de liofilizare și păstrare a genofondului microbial autohton.

- Denumirea elaborării:** Mediu de protecție pentru liofilizarea și păstrarea îndelungată a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 (în baza brevetului de invenție MD 4473 B1 2017.03.31, BOPI nr. 3/2017).
- Autorii elaborării:** BÎRSA Maxim, cercet. șt., BURȚEVA Svetlana, dr. hab., prof. cercet., CHISELIȚA Oleg, dr. în biol., conf. cercet., RUDIC Valeriu, academician.
- Organizația executor:** laboratorul Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene.
- Beneficiar:** Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.
- Perioada implementării:** 08.04.2015-08.04.2017
- Esența elaborării:** elaborarea mediului de protecție pentru liofilizarea și păstrarea durabilă a *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 cu utilizarea extractelor cianobacteriene de natură aminoacido- oligopeptidică.
- Rezultate:** rezultatul constă în sporirea cu 15,3-20,1% a viabilității tulpinii *Streptomyces canosus* CNMNAc-02 după liofilizare și cu 20,6-28,3% după 1 an de păstrare la utilizarea mediului protector ce conține 0,1-10,0% vol. extract de aminoacizi și oligopeptide cu concentrația de 5 mg/ml.
- Propuneri:** elaborarea este direcționată pentru optimizarea metodelor de conservare și păstrare *ex-situ* a biodiversității. Informația obținută poate fi utilizată de specialiștii în domeniu și cele conexe.
- Responsabili de implementarea elaborării:**

Șef CNMN, dr. în biol., conf. cercet.

Chiselita Oleg Chiselita

Cercetător științific principal, dr. hab., prof. cercet.,

Burteva Svetlana Burteva

Cercetător științific

Birsa Maxim Birsa

03.12.2018

Anexa 6. Act de implementare a brevetului MD 4474 nr. 2 din 03.12.2018

	APROB Directorul adjunct pentru probleme științifice al IMB dr., conf. cercet., Liliana CEPOL 2018	APROB Șef Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene, IMB dr., conf. cercet., Oleg Chiselița "03" decembrie 2018
---	--	--

I.P. "INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE
ȘI BIOTEHNOLOGIE"

leșire Nr. 127

" 3 " XII 2018

ACT

de implementare a brevetului MD 4474

Nr. 2 din 03 decembrie 2018

Prin prezentul Act se confirmă, că rezultatele investigațiilor științifice, efectuate în cadrul proiectului instituțional, realizat de cercetătorii laboratorului Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie în anii 2015-2018, sunt implementate în procesul de conservare și păstrare de lungă durată a microorganismelor de interes biotehlogic în CNMN, pentru optimizarea metodelor de liofilizare și păstrare a genofondului microbial autohton.

- Denumirea elaborării:** Mediu de protecție pentru liofilizarea și păstrarea îndelungată a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 (în baza brevetului de invenție MD 4474 B1 2017.03.31, BOPI nr. 3/2017).
- Autorii elaborării:** CHISELIȚA Oleg, dr. în biol., conf. cercet., BURȚEVA Svetlana, dr. hab., prof. cercet., BÎRSA Maxim, cercet. șt., RUDIC Valeriu, academician, BULIMAGA Valentina, dr. în biol., conf. universitar.
- Organizația executor:** laboratorul Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene.
- Beneficiar:** Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.
- Perioada implementării:** 08.04.2015- 08.04.2017.
- Esența elaborării:** elaborarea mediului de protecție pentru liofilizarea și păstrarea durabilă a *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 cu utilizarea extractelor cianobacteriene de natură polizaharidică.
- Rezultate:** rezultatul constă în sporirea cu 12,6-38,0% a viabilității tulpinii *Streptomyces canosus* CNMNAc-02 după liofilizare și cu 20,5-39,8% după 1 an de păstrare la utilizarea mediului protector ce conține 1-50,0% vol. extract de polizaharide sulfatate cu concentrația de 10 mg/ml.
- Propuneri:** elaborarea este direcționată pentru optimizarea metodelor de conservare și păstrare *ex-situ* a biodiversității. Informația obținută poate fi utilizată de specialiștii în domeniu și cele conexe.
- Responsabili de implementarea elaborării:**

Șef CNMN, dr. în biol., conf. cercet.

Chiselița Oleg Chiselița

Cercetător științific principal, dr. hab., prof. cercet.,

Burțeva Svetlana Burțeva

Cercetător științific

Bîrsa Maxim Bîrsa

03.12.2018

Anexa 7. Act de implementare a brevetului MD 1226 nr. 5 din 03.12.2018

APROB Director adjunct pe probleme științifice al IMB, dr., în boil., conf. cercet., Liliana CEPOI 12 2018	APROB Director Institutul de Genetică Fiziologie și protecție a Plantelor, dr. hab., prof. cercet., Vasile Botnari 2018
I.P. "INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE" ieșire Nr. 130 " 3 " X (1) 20 18	ACT de implementare a brevetului MD 1226 nr. 5 din 03 decembrie 2018 04.12.2018

Prin prezentul Act se confirmă, că rezultatele investigațiilor științifice, efectuate în cadrul proiectelor instituționale, realizate de cercetătorii laboratorului Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene al IMB și laboratorului Bioreglatori Naturali ai IGFPF în anii 2015- 2018, sunt implementate în procesul de conservare și păstrare de lungă durată a microorganismelor de interes biotehlogic în CNMN, pentru optimizarea metodelor de liofilizare și păstrare a genofondului microbial autohton.

- Denumirea elaborării:** Mediu de protecție pentru conservarea și păstrarea îndelungată a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 (în baza Brevetului de invenție MD 1226, 2018-01-31.).
- Autorii elaborării:** CHISELIȚA Oleg, dr. în biol., conf. cercet., BURȚEVA Svetlana, dr. hab., prof. cercet., BÎRSA Maxim, cercet. șt., MAȘCENCO Natalia., dr. în chimie, conf. cercet.
- Organizația executor:** laboratorul Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene.
- Beneficiar:** Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, Institutul de Genetică Fiziologie și protecție a Plantelor.
- Perioada implementării:** 08.02.2016-08.02.2018.
- Esența elaborării:** elaborarea mediului de protecție pentru conservarea și păstrarea durabilă a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 cu utilizarea extractelor glicozidice vegetale.
- Rezultate:** rezultatul constă în sporirea cu 11,3-18,% a viabilității tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare și cu 6,5-16,6% după 1 an de păstrare la utilizarea mediului protector ce conține 0,00005-0,05% extract de glicozide iridoide din *Linaria genistifolia* -(L.) Mill. (genistifoliozide).
- Propuneri:** elaborarea este direcționată pentru optimizarea metodelor de conservare și păstrare *ex-situ* a biodiversității. Informația obținută poate fi utilizată de specialiștii în domeniu și cele conexe.
- Responsabili de implementarea elaborării:**

Cercetător științific princ., CNMN, dr. hab., prof. cercet., Coppe Svetlana Burțeva

Cercetător științific coord., IGFPF, dr. în chimie., Mașenco Natalia Mașenco

Cercetător științific CNMN Bîrsa Maxim Bîrsa

03.12.2018

Anexa 8. Act de implementare a brevetului MD 1235 nr. 6 din 03.12.2018

APROB Director adjunct pe probleme științifice al IMB, dr. în biol., conf. cercet., Liliana CEPOL 12 2018	APROB Director Institutul de Genetică Fiziologie și protecție a Plantelor, dr. hab., prof. cercet., Vasile Botnari 2018
I.P. "INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE" leșire Nr. 131 " 3 " XII 2018	ACT de implementare a brevetului MD 1235 Nr. 6 din 03 decembrie 2018

Prin prezentul Act se confirmă, că rezultatele investigațiilor științifice, efectuate în cadrul proiectelor instituționale, realizate de cercetătorii laboratorului Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene al IMB și laboratorului Bioregulatori Naturali ai IGFP în anii 2015- 2018, sunt implementate în procesul de conservare și păstrare de lungă durată a microorganismelor de interes biotehlogic în CNMN, pentru optimizarea metodelor de liofilizare și păstrare a genofondului microbial autohton.

- Denumirea elaborării:** Mediu de protecție pentru conservarea și păstrarea îndelungată a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 (în baza Brevetului de invenție MD 1235, 2018-02-28.).
- Autorii elaborării:** CHISELIȚA Oleg, dr. în biol., conf. cercet., BURȚEVA Svetlana, dr. hab., prof. cercet., BÎRSA Maxim, cercet. șt., MAȘCENCO Natalia, dr. în chimie, conf. cercet.
- Organizația executor:** laboratorul Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene.
- Beneficiar:** Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, Institutul de Genetică Fiziologie și protecție a Plantelor.
- Perioada implementării:** 08.02.2016-08.02.2018.
- Esența elaborării:** elaborarea mediului de protecție pentru conservarea și păstrarea durabilă a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 cu utilizarea extractelor glicozidice vegetale.
- Rezultate:** rezultatul constă în sporirea în medie cu 10,1% a viabilității tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare și cu 5,4% după 1 an de păstrare la utilizarea mediului protector ce conține 0,0005-0,05% extract de glicozide iridoide din *Verbascum phlomoides* (L.) (verbascoside).
- Propuneri:** elaborarea este direcționată pentru optimizarea metodelor de conservare și păstrare *ex-situ* a biodiversității. Informația obținută poate fi utilizată de specialiștii în domeniu și cele conexe.
- Responsabili de implementarea elaborării:**

Cercetător științific princ., CNMN, dr. hab., prof. cercet., Svetlana Burțeva

Cercetător științific coord., IGFP, dr. în chimie., Natalia Mașenco

Cercetător științific CNMN, Maxim Bîrsa

03.12.2018

**Anexa 9. Diplomă „Medalia de Aur” Expoziția Europeană a Creativității și Inovării
EUROINVENT, 2017**



**Anexa 10. Diplomă „Medalia de Aur” Expoziția Internațională Specializată
INFOINVENT, 2017**

Ediția a XV-a

AGEPI

AGENTIA DE STAT
PENTRU PROPRIETATEA
INTELECTUALĂ
A REPUBLICII MOLDOVA

Expoziția Internațională Specializată
„INFOINVENT”

DIPLOMĂ

MEDALIA DE AUR

se acordă

*Chiselita Oleg, Burtseva Svetlana, Birsa Maxim,
Rudic Valeriu*

pentru

*Medii lioprotective pentru conservarea
tulpinilor de streptomicete*

L. Boboc

PREȘEDINTELE
COMITETULUI ORGANIZATORIC

Sighe

PREȘEDINTELE
JURIULUI INTERNAȚIONAL

15-18 noiembrie 2017,
Chișinău, Republica Moldova

Anexa 11. Diplomă „Medalia de Aur” Salonul Internațional de Cercetare, Inovare și Transfer Tehnologic, INVENTICA, 2018



Anexa 12. Diplomă „Medalia de Aur” Târgul Internațional de Invenții și Idei Practice, INVENT – INVEST, 2018



Declarația privind asumarea răspunderii

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

Bîrsa Maxim

Semnătura

Data _____

CV-ul candidatului

Nume, prenume:

BÎRSA Maxim

Data, locul nașterii:

08.08.1989, or. Chișinău

Cetățenia:

Republica Moldova



Studii:

2014 – 2017 (doctorat) Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, specialitatea 163.04 – Microbiologie.

2012 – 2014 Universitatea Tehnică a Moldovei, Facultatea Tehnologie și Management în Industria Alimentară, Specialitatea calitatea și securitatea produselor alimentare, magistrul în tehnologii de fabricare și prelucrare;

2008 – 2012 Universitatea Tehnică a Moldovei, Facultatea Tehnologie și Management în Industria Alimentară, Specialitatea Biotehnologii Industriale, licențiat în tehnologie chimică și biotehnologii;

1996 – 2008 Liceul teoretic „Ștefan cel Mare”, or. Chișinău.

Domeniile de interes științific:

Microbiologie, lucrul de colecție, grupul de streptomicete; activitatea antimicrobiană, aplicarea streptomicetelor și a produșilor lor în domeniile agriculturii.

Activitatea profesională: 04.2013 – prezent Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM, Laboratorul Colecția Națională de Microorganisme Neputogene, cercetător științific; 11.2013 – 12.2014 Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecția Plantelor al AȘM, Laboratorul Fitopatologie și Biotehnologie, cercetător științific stagiar; 04.2014 – 04.2016 Institutul de Zoologie, Laboratorul Parazitologie și Helminnologie, cercetător științific stagiar.

Participări la proiecte:

18.80012.51.16A „Validarea testelor microbiologice și biochimice pentru studii de nanotoxicologie”, (2018-2019), proiect pentru tineri cercetători; *executant*.

15.817.05.17A „Potențialul nanotehnologic în bioremedierea solului contaminat cu poluanți organici persistenți”, (2015-2019), proiect instituțional; *executant*.

17.80012.51.10A „Conservanți naturali de origine cianobacteriană pentru păstrarea microorganismelor”, (2017-2018), proiect pentru tineri cercetători; *executant*.

11.817.04.11A cu tema „Evaluarea și valorificarea potențialului microbiologic pentru elaborarea tehnologiilor agriculturii durabile”, (2011-2014), proiect instituțional; *executant*.

14.820.18.05.01 STCU A./5948 „Adaptarea metodelor biologice în protecția plantelor legumicole de fitonematode parazite periculoase și alte maladii fitopatogene în teren protejat din R. Moldova”, (2014 – 2016), proiect bilateral moldo-ucrainean, *executant*.

Participări la foruri științifice:

19-я Международная пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология – Наука XXI века», (Пушино, 2015); 5-й Всероссийский симпозиум с международным участием "Автотрофные микроорганизмы", Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова. Биологический факультет, (Москва, 2015); II Международная научно-практическая конференция, посвященная 105-летию со дня рождения профессора Эмилии Адрияновны Штиной, (Киров, 2015); III Международный Микологический Форум, (Москва, 2015); 3rd International Conference on Microbial Biotechnology, (Chișinău, 2016); Conferința Științifică Internațională a Doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”. Ediția a V-a, (Chișinău, 2016); XII International Scientific Conference for students and PhD students „Youth and progress of biology”. (Lviv, 2016); 20-я Международная пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология – Наука XXI века», (Пушино, 2016); 21-я Международная пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология – Наука XXI века», (Пушино, 2016); EuroInvent 2017. The 9th Edition of Euroinvent European Exhibition of Creativity and Innovation, (Iași, 2017); InfoInvent 2017. Expoziția internațională (Ediția a XV-a), (Chișinău, 2017).

Lucrări științifice publicate: 91, dintre care:

Articole: în reviste recenzate – 13, inclusiv în monoautorat 2, Materiale ale comunicărilor științifice – 72, inclusiv în monoautorat – 7, Brevete de invenții – 6.

Apartenența la societăți/asociații științifice naționale și internaționale:

Membru al Societății de Microbiologie din Moldova; Membru al Federației Europene a Societății Microbiologice.

Cunoașterea limbilor:

Română (maternă), engleza (mediu), rusa (fluent).

Date de contact:

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie,
Republica Moldova, Chișinău, str. Academiei 1, MD-2028,
tel.: 00-22-72-50-55, mobil: +37379306237,
e-mail: mellon23@yandex.ru