

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un mediu pentru liofilizarea tulpinilor de fungi din genul *Trichoderma* și poate fi utilizată pentru conservarea și păstrarea îndelungată a tulpinilor de fungi.

Sunt cunoscute medii de protecție pentru liofilizarea tulpinilor de micromicete, ce conțin lapte degresat de 1% [1], zaharoză, glucoză, lapte degresat în diferite concentrații și combinații [2]. Însă, neajunsul acestor medii de protecție constă în viabilitatea scăzută a tulpinilor după liofilizare și păstrare de lungă durată.

Cea mai apropiată soluție este un mediu pentru liofilizarea tulpinilor din genul *Trichoderma*, care conține lapte degresat +7% glucoză [3]. La conservarea tulpinilor pe acest mediu de protecție în condiții proxim viabilitatea lor după liofilizare variază între 66,9±2,0 și 81,8±4,4%, din numărul inițial. Dezavantajul acestui mediu constă în faptul că compoziția chimică a mediului asigură o viabilitate insuficientă tulpinilor de fungi după liofilizare și păstrare îndelungată.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu de protecție care asigură o viabilitate mai înaltă tulpinilor după liofilizare și păstrare.

Mediul pentru liofilizarea tulpinilor de fungi din genul *Trichoderma*, conform invenției, conține, %: glucoză - 7,0, nanoparticule de Fe₂ZnO₄ cu dimensiunea de 8-15 nm - 0,0005 și lapte degresat - restul.

Pentru obținerea nanoparticulelor de Fe₂ZnO₄ au fost folosiți ca precursori monocristale de compuși ai acidului salicilic și compusul heteronuclear cu formula generală [Fe₂MO(Sal)₆(L)(3-x)(L')(x)]·nSolv·mH₂O, unde M= Zn(II). Ca surfactant a fost folosit acidul oleic și 1-octadecena, conform unei metode cunoscute din literatură (William W. Yu., Joshua C. Falkner ș.a. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. Chem Commun. (Camb.), 2004, 20, p. 2306-2307). Produsele reacției au fost spălate cu amestec de solvenți organici și centrifugate. Suspensiile cu nanoparticule au fost studiate la microscopul electronic prin transmisie TESLA BS-500. S-a stabilit că nanoparticulele obținute au formă sferică cu tendință spre formă cubică cu dimensiuni mai omogene, cuprinse între 8-15 nm.

Efectul pozitiv este cauzat de pătrunderea nanoparticulelor (NP) în interiorul celulei și acțiunea acestora asupra proceselor vitale ale acesteia, și anume la sporirea activității enzimelor oxidative, care protejează celula de factorii de stres, contribuind astfel la majorarea viabilității celulelor formatoare de colonii după liofilizare.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea cu 8-16% a viabilității tulpinilor de fungi din genul *Trichoderma* față de cea mai apropiată soluție, prin suplimentarea a 5 mg/l de NP de Fe₂ZnO₄ în mediul proxim (tab.1). Datorită includerii în mediul protector a nanoparticulelor de Fe₂ZnO₄, care, pătrunzând în interiorul celulei, acționează asupra sistemului enzimatic (precum catalaza, etc.), sporind activitatea acestuia, care anihilează efectul negativ al formelor reactive de oxigen, temperaturilor joase și presiunii înalte, la care sunt supuse microorganismele în timpul liofilizării și păstrării îndelungate.

Experiențele efectuate au fost repetate de 3 ori.

Exemplu de realizare a invenției

În tuburi înclinate cu mediu agarizat Czapek, în condiții sterile, se cultivă separat tulpinile din genul *Trichoderma* timp de 10-14 zile, în termostat la temperatura de 29-30°C. Materialul semincer obținut se transferă în mediul protector – lapte degresat+7% glucoză+5 mg/l NP de Fe₂ZnO₄. Suspensia obținută (1 ml) se plasează în flacoane pentru liofilizare. Probele se congelează brusc la temperatura de minus 50°C. Peste 12 ore se efectuează liofilizarea la temperatura condensatorului de minus 88-94°C, vid 6-7 Pa, timp de 12 ore. Probele liofilizate se sigilează în vid și se păstrează la temperatura de 4-5°C.

Viabilitatea tulpinii liofilizate se exprimă în procente față de numărul inițial de UFC (unități formatoare de colonii) și este calculată conform formulei $BSR = (\log AL / \log BL) \times 100$. Unde: BSR este raportul logaritmului numărului de celule prezente în suspensie după liofilizare AL la logaritmul numărului de celule viabile înainte de liofilizare BL, înmulțit cu 100 % (Muñoz-Rojas J., Bernal P., Duque E., Godoy P., Segura A., Ramos J. Involvement of Cyclopropane Fatty Acids in the Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to Freeze-Drying. Applied Environmental Microbiology, 2006, v. 72(1), p. 472-477).

Cea mai înaltă viabilitate a micromicetelor după liofilizare a fost obținută în varianta LD + 7%G + 5 mg/l NP Fe₂ZnO₄. În varianta martor viabilitatea tulpinilor de fungi variază în limitele 66,9±2,0 și 81,8±4,4%, iar în varianta optimă (LD + 7%G + 5 mg/l NP Fe₂ZnO₄) - 77,0±1,8 - 91,5±5,7%, cu 8,1-16,0% mai mult (Tab. 1).

Tabelul 1

Viabilitatea tulpinilor din genul *Trichoderma* după liofilizare

Tulpina	Titulul inițial (Până la liofilizare), %	Viabilitatea după liofilizare, % față de titlul inițial			
		Mediul proxim (LD +7% G) (M)	M+NP Fe ₂ ZnO ₄ , 1 mg/l	M+NP Fe ₂ ZnO ₄ , 5 mg/l	M+NP Fe ₂ ZnO ₄ , 10 mg/l
<i>T. virens</i> CNMN FD 13	100	80,2 ± 3,2	85,7 ± 1,7	88,2 ± 4,3	82,0 ± 1,3
<i>T. ligmorum</i> CNMN FD 14	100	67,0 ± 1,3	78,8 ± 1,6	81,5±3,5	78,5 ± 1,2
<i>T.ma koningii</i> CNMN FD 15	100	66,9 ±2,0	74,0 ± 1,3	77,0±1,8	75,4 ±2,6
<i>T. harzianum</i> CNMN FD 16	100	75,5 ± 6,2	84,1 ± 1,6	91,5±5,7	87,4 ± 1,6

<i>T. viride</i> CNMN FD 17	100	81,8 ± 4,4	88,6 ± 2,1	89,9±0,1	88,0 ±3,9
--------------------------------	-----	------------	------------	----------	-----------

După 1 an de conservare în stare liofilizată viabilitatea tulpinilor în varianta martor variază în limitele 62,8±0,7-80,2±0,2, iar în varianta propusă 76, ±1,1-85,2±1,0 (cu 5-14,7% mai mult decât în varianta martor) (Tab. 2).

Tabelul 2

Viabilitatea tulpinilor din genul *Trichoderma* după 1 an de păstrare în stare liofilizată

Tulpina	Titrul inițial %	Viabilitatea tulpinilor după 1 an de la liofilizare, % față de titrul inițial			
		Mediul proxim după liofilizare (M)	Mediul proxim după 1 an de la liofilizare	M + NP Fe ₂ ZnO ₄ 5 mg/l, după liofilizare	M + NP Fe ₂ ZnO ₄ 5 mg/l, după 1 an de la liofilizare
<i>T. virens</i> CNMN FD 13	100	80,2 ± 3,2	76,8 ± 2,8	88,2 ± 4,3	82,0 ± 1,2
<i>T. ligmorum</i> CNMN FD 14	100	67,0 ± 1,3	62,8 ± 0,7	81,5±3,5	77,1 ± 0,4
<i>T.ma koningii</i> CNMN FD 15	100	66,9 ±2,0	66,2 ± 0,8	77,0±1,8	76,3 ± 1,1
<i>T. harzianum</i> CNMN FD 16	100	75,5 ± 6,2	70,0 ±0,6	91,5±5,7	84,7 ± 0,8
<i>T. viride</i> CNMN FD 17	100	81,8 ± 4,4	80,2 ± 0,2	89,9±0,1	85,2 ± 1,0

Mediul de protecție propus (LD +7% G + 5 mg/l NP Fe₂ZnO₄) pentru liofilizarea fungilor din genul *Trichoderma* contribuie la stimularea viabilității acestora după liofilizare și păstrare în stare liofilizată.