

Invenția se referă la biotehnologie (criobiologie), în particular la mediile de protecție a actinomicetelor din genul *Streptomyces* și poate fi aplicată pentru conservarea, păstrarea, studierea și utilizarea eficientă a genofondului microbial autohton de interes științific și biotehnologic.

Sunt cunoscute medii de protecție pentru liofilizarea tulpinilor de actinomicete ce conțin, gelatină, zaharoză, glucoză, lapte degresat în diferite concentrații și combinații [1, 2, 3]. Însă, neajunsul acestor medii de protecție constă în viabilitatea scăzută a tulpinilor după liofilizare și păstrare îndelungată.

Cea mai apropiată soluție al mediului protector revendicat pentru liofilizarea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 este mediul care conține, (%): gelatină - 2,5; glucoză -7,5 și în (%/V): extract de polizaharide sulfatate din *Spirulina platensis* (Nordst) Getil CNMN-CB-02 (10mg/ml) – 1-50 [Brevet MD 0086].

La conservarea tulpinii pe acest mediu de protecție în condiții proximale viabilitatea ei după liofilizare variază între 102,9±0,1 și 128,3±6,3 % , iar după păstrare timp de 1 an între 99,6±1,6 și 118,9±5,7 % din numărul inițial, în dependență de concentrația polizaharidelor sulfatate.

Dezavantajul acestui mediu constă în faptul că compoziția chimică a mediului asigură o viabilitate mai mică tulpinii de actinomicete în timpul liofilizării și păstrării îndelungate, decât mediul protector revendicat.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în diversificarea și majorarea asortimentului de substanțe biologice active naturale cu efect lioprotector și elaborarea unui mediu de protecție care asigură viabilitate înaltă tulpinii după liofilizare și păstrarea ei eficientă la nivel înalt timp de 1 an.

Esența invenției constă în aceea că se propune mediul optimizat de protecție a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 care conține, (%): gelatină – 2,5; glucoză – 7,5 și extract de glicozide iridoide din *Verbascum phlomoides* (L.) (verbascoside) – 0,0005-0,05. Extractul de dlicozide iridoide a fost obținut din biomasa proaspătă a plantei *Verbascum phlomoides* (L.). Metoda de extracție și compoziția biochimică a extractului este descrisă în [Brevet M D 328].

Efectul pozitiv este cauzat de înlocuirea extractului de polizaharide sulfatate în mediul de protecție cunoscut prin extract de glicozide iridoide de origine vegetală, care manifestă acțiune antioxidantă, adaptogenă, de stimulare a regenerării țesuturilor și de protecție a membranelor celulare prin reducerea peroxidării lipidelor [4], ce oferă tulpinii o protecție suplimentară, contribuind astfel la majorarea viabilității tulpinii și păstrarea ei la nivel înalt pe durata păstrării îndelungate.

Rezultatul tehnic al invenției 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, față de cea mai apropiată soluție, prin utilizarea concentrațiilor cu până la 3 ordine mai mici a extractului de glicozide iridoide (verbascoside) de origine vegetală (tab. 1). Datorită includerii în mediul protector a extractului de glicozide iridoide de origine vegetală, care manifestă acțiune antioxidantă, adaptogenă, de stimulare a regenerării țesuturilor și de protecție a membranelor celulare, ce anihilează efectul negativ al temperaturilor joase, presiunii înalte, deshidratării și formelor reactive de oxigen, la care sunt supuse microorganismele în timpul liofilizării și păstrării îndelungate.

Exemplu de realizare a invenției

În tuburi înclinate cu mediu agarizat Czapek, în condiții sterile, se cultivă tulpina *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 timp de 14 zile, în termostat la temperatura de +27°C. Materialul semincer obținut se transferă în mediul protector lichid cu următoarea componență, (%): gelatină – 2,5; glucoză – 7,5 și extract de glicozide iridoide (verbascoside) de origine vegetală - 0,0005 – 0,05, pînă la obținerea titrului de 10^{10} - 10^{11} UFC ml⁻¹. Suspensia obținută se divizează a cîte 1 ml în flacoane pentru liofilizare. Probele se congelează brusc la temperatura -50°C. Peste 12 ore se efectuează liofilizarea la temperatura condensorului -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. Utilizând metoda diluțiilor succesive, probele se însămânțează pe medii agarizate și se numără unitățile formatoare de colonii (UFC), pînă, după liofilizare și peste 1 an de păstrare.

În varianta martor viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 este de 102,9-128,3% după liofilizare și de 99,6-118,9 % peste 1 an de păstrare, iar în varianta optimizată de 121,2-130,2% și respectiv 112,2-117,0%, ceea ce este în medie cu 10,1 și respectiv 5,4% mai mult.

Viabilitatea tulpinii după liofilizare și păstrare timp de 1 an, se exprimă în procente față de numărul inițial de UFC și este calculată conform formulei $BSR = (\log AL / \log BL) \times 100$, unde BSR este viabilitatea în %, $\log AL$ – logaritm zecimal al numărului UFC pînă la liofilizare și $\log BL$ - logaritm zecimal al numărului UFC după liofilizare sau păstrare îndelungată (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. In: *Applied Environmental Microbiology*. 2006, vol. 72, № 1, p. 472–477.).

Tabelul 1. Viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare și 1 an de păstrare pe medii de protecție cu diferită compoziție biochimică.

Mediu conform soluției apropiate		Mediu conform invenției					
1-50		0,0005		0,005		0,05	
după	1 an	după	1 an	după	1 an	după	1 an
102,9±0,1 -128,3±6,3	99,6±1,6 - 118,9±5,7	121,2±0,6	112,2±1,6	130,2±0,8	117,0±0,6	125,1±2,0	114,5±2,7