

CZU: 582.287.23:579.6:57.083

DOI: 10.46727/c.v1.18-19-03-2023.p216-219

REZISTENȚA FUNGILOR FITOPATOGENI LA PROCESUL DE LIOFILIZARE ÎN DEPENDENȚĂ DE TEMPERATURA DE CONGELARE

RESISTANCE OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI TO THE FREEZING PROCESS DEPENDING ON THE FREEZING TEMPERATURE

Tamara Sîrbu, dr., conf. cercet, IMB al UTM din Chișinău
Olga Țurcan, cercet. șt. IMB al UTM din Chișinău
Cristina Moldovan, cercet. șt. IMB al UTM din Chișinău

Tamara Sirbu, dr., assistant professor research, IMB of TUM in Chisinau
ORCID: 0000-0001-7809-9870, tamara.sirbu@imb.utm.md
Olga Turcan, researcher, IMB of TUM in Chisinau
ORCID: 0000-0002-7103-5986
Cristina Moldovan, researcher, IMB of TUM in Chisinau
ORCID: 0000-0003-1634-0344

Abstract. *Lyophilization is one of the most used methods of long-term preservation of microorganisms. The viability of freeze-dried microorganisms depends on several factors, including the parameters used in the freeze-drying process, which can significantly alter the viability of cultures after freeze-drying. In this study, it was demonstrated that the freezing temperature of Fusarium fungal strains used in the freeze-drying process plays an important role on their viability after freeze-drying. Thus, the viability of Fusarium cultures after lyophilization, when using the freezing temperature of -20°C varied within the limits of 76-89.8%, compared to the initial titer, and when using the freezing temperature -50°C from 92.2% to 96%.*

Key-words: *fungi, lyophilization, rehydration, viability, protective medium.*

Introducere

Asigurarea conservării fiabile a tulpinilor de ciuperci filamentoase, izolate din natură, și păstrarea lor îndelungată studiate în stare neschimbată este importantă atât pentru dezvoltarea științei fundamentale, cât și pentru rezolvarea problemelor științifice și aplicative. Se știe că diferite tipuri de ciuperci acționează diferit la procesul de conservare și păstrare. Unele dintre ele suportă prost conservarea, în timp ce altele pot fi păstrate viabile pentru o perioadă destul de lungă de timp, folosind aproape orice metodă de conservare (depozitare). Alegerea metodelor optime de păstrare sunt determinate ținând cont de caracteristicile biologice ale microorganismului, nivelul tehnic al colecției, laboratorului [2, 4, 7].

Cele mai des utilizate metode de conservare și păstrare îndelungată a microorganismelor sunt crioconservarea și liofilizarea. Liofilizarea este deshidratarea obiectelor biologice în stare înghețată sub vid. Viabilitatea microorganismelor după liofilizare și păstrare depinde de mai mulți factori: faza de dezvoltare a microorganismului, mediul de protecție, parametrii utilizați în procesul de liofilizare (stabilitatea în procesul de congelare și suplimentare), condițiile de păstrare după liofilizare, buna solubilitate (rehidratare) a liofilizatului [1, 5]. Astfel, în rezultatul selectării condițiilor optime de liofilizare a tulpinilor de bacterii patogene din grupele de patogenitate III-IV, folosind diferite instalații de liofilizare s-a stabilit că preparatele de microorganisme liofilizate în diferite instalații se

caracterizează printr-o viabilitate ridicată a celulelor bacteriene și o durată de valabilitate previzibilă de 4 până la 105 ani, în funcție de tipul de microorganism și tipul de congelare, uscare [8]. Rezultatele studierii activității biologice a tulpinilor de virus gripal A și B izolate de la om în perioada 2018-2020 în Republica Kazahstan, după depozitare la 4°C în stare liofilizată. Au demonstrat că activitatea de hemaglutinare la unele tulpini a scăzut la jumătate după trei luni, în timp ce în rest a rămas la același nivel. Activitatea infecțioasă a tuturor virusurilor gripale testate a scăzut cu o medie de 1-2 lg EID₅₀/0,2 ml. După șase luni de depozitare, atât hemaglutinarea, cât și activitatea infecțioasă a tuturor virusurilor gripale au rămas practic la același nivel. Rezultatele obținute fac posibilă utilizarea acestei metode în combinație cu crioconservarea pentru depozitarea pe termen lung a virusurilor gripale [9].

La conservarea microorganismelor patogene se ține cont și de riscul de infectare. De aceea sunt selectate echipamente de protecție personală, dezinfectanți pentru prelucrarea echipamentelor și a produsul final (ampule, sticlute), este dezvoltat un algoritm de acțiuni ale personalului, care face posibilă creșterea semnificativă a nivelului de protecție împotriva agenților patogeni pentru angajații laboratorului și pentru mediu [6].

Scopul cercetărilor în acest studiu a constat în evaluarea viabilității micromicetelor din genul *Fusarium* după liofilizare în dependență de temperatură de congelare.

Materiale și metode

Obiecte de studiu au servit 6 tulpini de fungi fitopatogeni reprezentanți ai genului *Fusarium*, care sunt utilizate ca test-culturi pentru testarea proprietăților antifungice ale microorganismelor din CNMN. Mediul de protecție utilizat la liofilizarea acestor tulpini a constat din lapte degresat + 7% glucoză (LD+7%G).

Pentru liofilizare culturile luate în studiu au fost cultivate în tuburi pe mediul malț-agar, timp de 10-14 zile, apoi spori au fost suspendați în mediul de protecție. În flacoane de 5 ml au fost introduse câte 1 ml de suspensie de spori, care ulterior au fost congelate. Au fost testate două temperaturi de congelare: -20°C; -50°C. Congelarea a fost efectuată în refrigeratorul Ult Freezer DW86L626/386/286. În procesul de liofilizare a fost utilizată sistemul de sublimare „LABCONCO 6 plus”.

Pentru rehidratare În fiecare flacon cu cultura liofilizată a fost introdus câte 1 ml apă distilată, sterilă. Rehidratarea a fost efectuată la temperatura de 28°C timp de 2 ore.

Viabilitatea tulpinilor până și după liofilizare (exprimate în unități formatoare de colonii UFC ml⁻¹) a fost determinată prin metoda contării coloniilor pe mediul agarizat Czapek pe cutiile Petri. După efectuarea diluțiilor succesive a suspensiei de spori și inocularea acestora pe mediul agarizat Czapek, s-a efectuat calculul unităților formatoare de colonii peste 7-10 zile de incubare la 28°C. Numărul de celule viabile a fost exprimat prin log₁₀ a unităților formatoare de colonii (UFC) în 1,0 ml de suspensie [2, 3].

Viabilitatea a fost calculată conform formulei:

$$c \% = (\lg \text{UFC ml}^{-1}_{\text{fin}} / \lg \text{UFC ml}^{-1}_{\text{in}}) \times 100\% , \text{ unde:}$$

- ✓ $\lg \text{UFC ml}^{-1}_{\text{in}}$ este logaritmul (cu baza 10) a numărului UFC înainte de liofilizare;
 - ✓ $\lg \text{UFC ml}^{-1}_{\text{fin}}$ este logaritmul numărului UFC după liofilizare sau păstrare;
- c – viabilitatea culturilor în procente

Rezultate și discuții

Evaluarea viabilității tulpinilor fungice din genul *Fusarium*, congelate la temperatura de -20°C , după liofilizare a demonstrat că, supraviețuirea acestora variază în limitele 76-89,8% față de titrul inițial, de până la liofilizare (Tab. 1). Cea mai înaltă viabilitate fiind înregistrată la tulpina *Fusarium moniliforme* (89,8%), iar cea mai joasă la tulpina *Fusarium sporotrichiela* (76%).

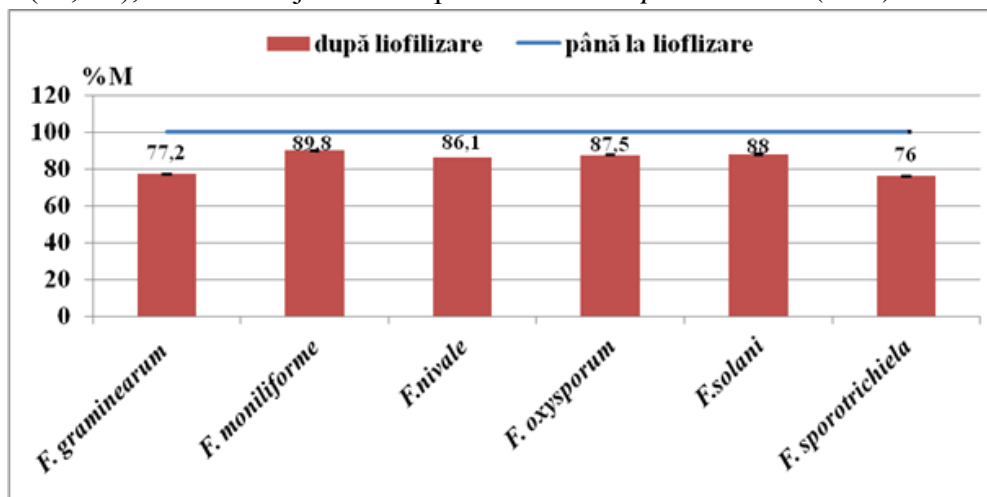


Fig. 1. Viabilitatea tulpinilor de *Fusarium* congelate la -20°C după liofilizare

Viabilitatea tulpinilor fungice din genul *Fusarium*, congelate la temperatura de -50°C , după liofilizare a fost mai înaltă față de cea obținută la congelarea acestora la temperatura de -20°C (Tab. 2).

Conform rezultatelor obținute (Tab. 2) rata de supraviețuire a tulpinilor fungice din genul *Fusarium*, congelate la temperature de -50°C , după liofilizate, variază de la 92,2% până la 96,0%, comparativ cu titrul inițial, înregistrat până la liofilizare.

Astfel, pentru o viabilitate mai înaltă a tulpinilor liofilizate este necesar de a utiliza în procesul de liofilizare temperatura de congelare de -50°C .

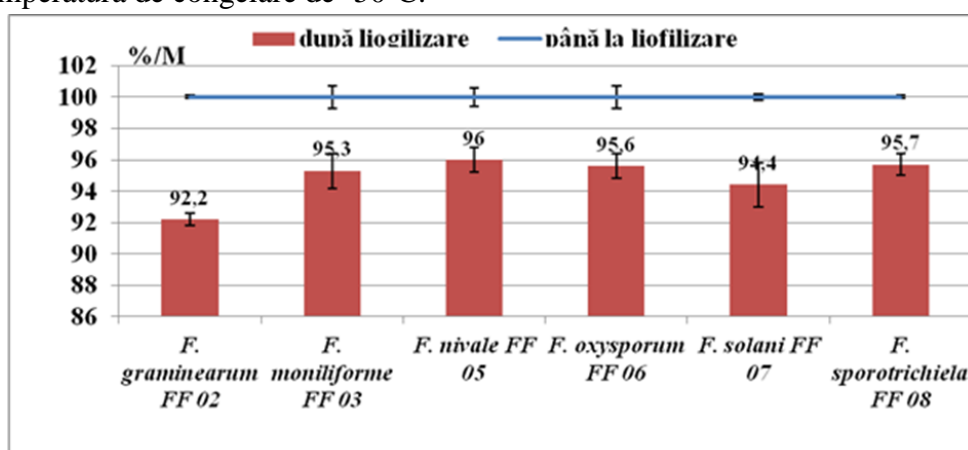


Fig. 2. Viabilitatea tulpinilor de *Fusarium* congelate la -50°C după liofilizare

La examinarea culturilor după liofilizare s-a observat o creștere mai lentă a miceliului și o sporulare slabă, comparativ cu varianta martor (de până la liofilizare). După 2-3 pasaje pe mediul agarizat Czapek culturile își revin la starea inițială.

Concluzii

Temperatura optimă de congelare în procesul de liofilizare a tulpinilor fungice din genul *Fusarium* este de -50°C.

Tulpinile liofilizate își păstrează proprietățile morfo-culturale inițiale.

Cercetările au fost îndeplinite în baza proiectului 20.80009.7007.09, finanțat de ANCD.

Bibliografie

1. GRZEGORCZYK, M.; KANCELISTA, A.; ŁABA, W.; PIEGZA, M.; WITKOWSKA, D. The effect of lyophilization and storage time on the survival rate and hydrolytic activity of *Trichoderma* strains. *Folia Microbiol (Praha)*. 2018, 63 (4), p. 433-441. ISSN 0015-5632. doi: 10.1007/s12223-017-0581-0.
2. KRIGER, O.V.; NOSKOVA, S.Y. Properties of lactic acid microorganisms: Long-term preservation methods. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2018, 48 (4), p. 30-38. ISSN 2074-9414. doi: <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2018-4-30-38>.
3. MUÑOZ-ROJAS, J. et al. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Applied Environmental Microbiology*. 2006, 72 (1). ISSN 0099-2240. p. 472-477.
4. RYAN, M.J.; SMITH, D.; JEFFRIES, P. A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi. *World J. Microb. Biotech.* 2000, 16, p. 183-186. ISSN 0959-3993.
5. АНАНЬИНА, А.Е.; ВЫСЕКАНЦЕВ, И.П.; ГУРИНА, Т.М.; ГРИША, И.Г. Разработка технологии криоконсервирования и лиофилизации иммобилизованных пробиотиков. *Збірник наукових праць. VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю "Біологічні дослідження - 2017, 14-16 березня 2017 року, Житомио"*, с. 330-332.
6. ЖИЛЧЕНКО, Е.Б.; ЖАРИНОВА, Н.В.; СЕРДЮК, Н.С.; КОНЯЕВА, О.А.; ГАВРИЛОВА О.Н. Обеспечение биологической безопасности при лиофилизации микроорганизмов I-II групп патогенности. *Здоровье населения и среда обитания – ЗНУСО*. 2019, (1) с. 46-50. ISSN 2219-5238.
7. ИВАНУШКИНА, Н.Е.; КОЧКИНА, Г.А.; ЕРЕМИНА, С.С.; ОЗЕРСКАЯ, С.М. Опыт использования современных методов длительного хранения грибов во Всероссийской Коллекции Микроорганизмов. *Микология и Фитопатология*. 2010, 44 (1), с. 19-30. ISSN 0026-3648.
8. ОСИН, А.В.; ЧЕРВЯКОВА, Н.С.; ВАЛОВА, Т.В. Лиофилизация штаммов патогенных микроорганизмов на сублимационных установках разного типа и оценка качества полученных препаратов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016, 3, с. 66-70. ISSN 0370-1069. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-3-66-70>
9. САКТАГАНОВ, Н.; ГЛЕБОВА, Т.; БАЙМУХАМЕТОВА, А.; БАЙСЕЙИТ, С.; ОНГАРБАЕВА, Н.; ИСМАГУЛОВА, Д.; ЛУКМАНОВА, Г.; КЛИВЛЕЕВА, Н.; АБДИЛОВА, Г.; ЖАНУЗАКОВА, Н.; ИСАЕВА, Е. Использование лиофилизации для хранения штаммов вируса гриппа. *Микробиология және вирусология*. 2021, 35 (4), с. 48-55. ISSN 2304-585X. <https://doi.org/10.53729/MV-AS.2021.04.04>