

MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE

<https://doi.org/10.52388/1857-064X.2021.1.13>

LIOFILIZAREA *STREPTOMYCES CANOSUS* CNMN-Ac-02 ÎN PREZENȚA POLIZAHARIDELOR SULFATATE CU Zn DIN SPIRULINA

Chiselița Oleg, Burțeva Svetlana, Bîrsa Maxim, Rudic Valeriu

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

Rezumat

În articol sunt prezentate rezultatele referitor la influența polizaharidelor sulfatate cu zinc (PSS^{Zn}) obținute din cianobacteria *Arthrospira platensis* CNMN-CB-02 (spirulina), asupra viabilității tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare și păstrare îndelungată. În rezultatul cercetărilor s-a stabilit că suplینirea mediului protector ce conține gelatină 2.5 % și glucoză 7.5 % cu PSS^{Zn} în concentrație de 1.0; 5.0; 20.0; 30.0; 50.0%/V duce la majorarea viabilității culturii cu 13.6-39.0% față de martor. Morbiditatea minimă și viabilitatea înaltă de 95.3-118.0% a probelor cu PSS^{Zn} după un an de păstrare, evidențiază eficiența acestora în protecția și păstrarea îndelungată a tulpinii. Diferența semnificativă în viabilitatea probelor rehidratate cu apă distilată și celor cu soluție de PSS^{Zn} în concentrație de 0.1; 0.5; 5.0%/V, relevă oportunitatea utilizării acestui extract-pentru revitalizarea tulpinii liofilizate.

Cuvinte cheie: streptomicete, liofilizare, lioprotector, viabilitate, *Arthrospira platensis* CNMN-CB-02 (spirulina), polizaharide sulfatate cu zinc.

Depus la redacție 19 iulie 2021

Adresa pentru corespondență: Chiselița Oleg, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, str. Academiei, 1, MD-2028 Chișinău, Republica Moldova; e-mail: chiselita@mail.ru; tel. +373(22) 72 55 24

Introducere

Primele colecții de culturi microbiene au apărut odată cu izolarea microorganismelor în cultură pură și cultivarea lor pe medii nutritive specifice, reprezentând un suport științific și practic esențial pentru microbiologi până în prezent [2]. Colecțiile sunt o sursă nepuizabilă de microorganisme care prezintă interes științific și aplicativ și, de regulă, servesc pentru conservarea și păstrarea durabilă *ex situ* a microorganismelor [3, 16, 17].

Unul din principalele obiective a oricărei colecții de microorganisme este conservarea și păstrarea eficientă a viabilității, caracterelor morfo-culturale și proprietăților biotehnologice ale tulpinilor microbiene [19]. Cu acest scop, în cadrul lor, sunt utilizate diverse metode de păstrare, așa ca: reînsămânțarea periodică, păstrarea sub ulei mineral, uscarea pe diverse suporturi, crioconservarea și liofilizarea [23]. În baza experienței acumulate pe parcursul unei perioade îndelungate de timp, savanții consideră liofilizarea drept cea mai eficientă și comodă metodă de conservare [6].

Parametrii și mediile de protecție utilizate în procesul liofilizării depind de varietatea taxonomică a tulpinilor de microorganisme [12, 14].

Una din problemele Colecției Naționale de Microorganisme Nepatogene, este selectarea metodelor eficiente de conservare și păstrare a actinobacteriilor din genul *Streptomyces*. Pentru minimizarea riscului mutațiilor genetice și păstrarea proprietăților biosintetice ale tulpinilor de microorganisme, este utilizată liofilizarea [5, 7, 8], care permite păstrarea îndelungată a tulpinilor, fără modificări ale proprietăților morfo-culturale și fiziologo-biochimice [10]. Este cunoscut, că procesul liofilizării constă din congelarea materialului biologic în timpul căreia se formează cristale de gheață care provoacă diverse leziuni ale celulelor vii. Pentru minimizarea acestui prejudiciu, de regulă, sunt utilizate diverse substanțe crio/lioprotectoare: alcoolii, carbohidrați, aminoacizi, diverse substraturi de natură complexă, precum laptele degresat, mierea, extractul de drojdie, polizaharidele [7]. Etapa de revitalizare reprezintă un punct critic al procesului de conservare și păstrare îndelungată, de care depinde viabilitatea tulpinilor de microorganisme. Pentru rehidratare, de regulă, sunt utilizate diverse soluții izotonice în baza sărurilor minerale, carbohidraților sau apa distilată. În unele cazuri combinarea mediului protector cu cel de rehidratare rezultă în majorarea semnificativă a viabilității microorganismelor [12]. Pentru a asigura viabilitate maximă și variabilitate minimă a tulpinilor în procesul liofilizării și păstrării durabile, este necesar de a identifica cele mai eficiente substanțe în calitate de componente a mediilor de protecție și rehidratare. Plantele și microalgele, de regulă, răspund rapid la fluctuațiile temperaturii, radiației și deficiența substanțelor nutritive prin transformarea și adaptarea sistemului fotosintetic și a metabolismului lor la stres, prin intensificarea sintezei pigmentilor, lipidelor, polizaharidelor, și altor compuși cu caracter protector. În natură, când temperatura mediului scade la valori suboptimale, la majoritatea organismelor vii se activează procesul de hidroliză a polizaharidelor până la monomeri care posedă proprietăți crioprotective. Pe măsură scăderii temperaturii, proteinele formează complexe cu carbohidrați, care de asemenea au menirea de a proteja organismul de temperaturile scăzute. Aceste complexe ajută la reducerea temperaturii de cristalizare a gheții și la eliminarea apei la temperaturi scăzute [1]. Carbohidrații pot modifica structura apei și a gheții, sporind viabilitatea celulelor după decongelare. Deși există multe informații despre utilizarea monozaharidelor (galactoza, glucoza, manoza) și dizaharidelor (melibioza, lactoza, tregaloza, zaharoza) în calitate de crioprotectori [4], sunt disponibile date limitate despre efectul similar al polimerilor cu greutate moleculară mare (oligo- și polizaharidelor) [15].

În această ordine de idei, un interes deosebit prezintă studiul influenței polizaharidelor sulfatate cu Zn din *Arthrospira platensis* CNMN-CB-02 (spirulina) în calitate de lioprotector pentru conservarea microorganismelor, deoarece se cunoaște efectul protector, de stabilizare a membranelor celulare și activitatea antioxidantă înaltă a polizaharidelor sulfatate algale [18], iar zincul este un element esențial ca cofactor catalitic sau structural al enzimelor cheie implicate în multe procese vitale, inclusiv replicarea ADN și sinteza proteinelor.

Astfel, **scopul cercetărilor** constă în evaluarea influenței PSS^{Zn} obținute din spirulina asupra viabilității tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare și păstrare îndelungată.

Materiale și metode

Ca obiect de studiu a servit tulpina *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene (CNMN),

producătoare de fitohormoni (auxine, gibereline), aminoacizi esențiali, inclusiv imunoactivi, lipide, inclusiv fosfolipide, sterine și acizi grași nesaturați, ce prezintă interes pentru agricultură, zootehnie și fitotehnie [20]. Tulpina este menținută pe medii agarizate de ovăz și Czapek cu glucoză, la $t^{\circ} = +4^{\circ}\text{C}$. Pentru liofilizare, tulpina a fost cultivată în tuburi de sticlă pe mediul agarizat Czapek cu glucoză, timp de 14 zile, la $t^{\circ} = +27^{\circ}\text{C}$, până la faza staționară de dezvoltare [21, 27]. Liofilizarea a fost efectuată la liofilizatorul „LABCONCO” FreeZone Plus 6 Liter Cascade Console Freeze Dry System (SUA), la temperatura condensorului de $-88 \dots -94^{\circ}\text{C}$, în vid 6-7 Pa, temperatura de precongelare -50°C , timp de 12 ore.

În calitate de mediu protector a servit mediul constituit din gelatină 2.5% + glucoză 7.5% [12, 22, 27] (mediul martor) și variantele acestuia, suplimentate cu PSS^{Zn} din cianobacteria *Arthrospira platensis* CNMN-CB-02, în concentrații de 1.0; 5.0; 20.0; 30.0; 50.0%/V.

Pentru rehidratarea tulpinii a fost utilizată apa distilată și soluțiile de PSS^{Zn} de 0.1; 0.5; 5.0%/V. Rehidratarea a fost efectuată la temperatura camerei timp de 1 oră. Probele liofilizate au fost păstrate la temperatura $+4^{\circ}\text{C}$.

Pentru a determina viabilitatea culturii, conținutul fiolelor a fost resuspendat în 1,0 ml de mediu de rehidratare. După efectuarea diluțiilor succesive și inocularea acestora pe mediu agarizat Czapek cu glucoză, s-a efectuat calculul unităților formatoare de colonii peste 7-14 zile de incubare la 27°C [24]. Numărul de celule viabile a fost exprimat prin $\log_{10}$ al unităților formatoare de colonii (UFC) în 1.0 ml de suspensie.

Viabilitatea a fost calculată conform formulei $\text{BSR} = (\log_{10}\text{BL}/\log_{10}\text{AL}) \times 100$ [13], unde BSR este viabilitatea tulpinii în %, $\log_{10}\text{BL}$ – logaritmul zecimal al numărului UFC până la liofilizare și $\log_{10}\text{AL}$ – logaritmul zecimal al numărului UFC după liofilizare sau păstrare.

Prelucrarea statistică a datelor a fost efectuată cu ajutorul programului Excel 2013.

Rezultate și discuții

În studii anterioare a fost constatat, că păstrarea *S. canosus* CNMN-Ac-02 prin reînsămânțări periodice a dus la diminuarea capacităților biosintetice ale tulpinii. Astfel, pentru stoparea acestor procese este necesară liofilizarea tulpinii și inducerea ei în stare de anabioză.

În rezultatul cercetărilor s-a stabilit că suplینirea mediului martor cu PSS^{Zn} și revitalizarea cu apă distilată au avut efect pozitiv asupra viabilității tulpinii, aceasta, în toate probele experimentale, fiind cu 13.6-39.0% mai mare ca în proba martor, indiferent de concentrația utilizată. Viabilitatea maximă a fost stabilită în probele cu PSS^{Zn} în concentrație de 30%/V. De asemenea merită menționat faptul, că în toate probele experimentale, numărul UFC după liofilizare a fost mai mare ca cel inițial considerat ca 100% (figura 1).

Utilizarea PSS^{Zn} în componența soluției de rehidratare a avut efect pozitiv semnificativ, statistic veridic (cu 50.2 % mai mult față de martor) asupra viabilității, numai în concentrație de 5.0%/V la probele liofilizate pe mediul protector suplimentat cu PSS^{Zn} în concentrație de 30%/V. Rezultatele sunt prezentate în figura 1.

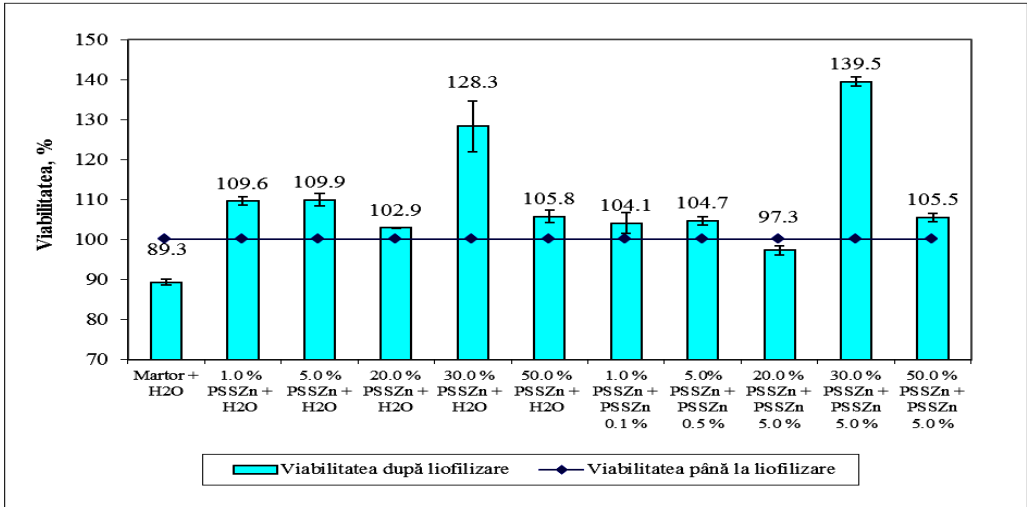


Figura 1. Viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare și rehidratare cu apă distilată și soluții de PSS^{Zn} de diferite concentrații.

Deoarece liofilizarea este o metodă de conservare de lungă durată, care trebuie să asigure viabilitatea pe un termen îndelungat, la următoarea etapă a cercetărilor a fost evaluată viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după un an de păstrare. Rezultatele cercetărilor au demonstrat că viabilitatea probelor liofilizate, după un an de păstrare pe mediul protector suplinit cu PSS^{Zn}, și rehidratate cu apă distilată este de 99.6-118.0%, ce este cu 20.5-38.9% mai mult față de proba martor (figura 2). Acest fapt denotă morbiditatea mult mai scăzută a tulpinii pe mediile protective cu PSS^{Zn} comparativ cu mediul martor pe care viabilitatea după 1 an de păstrare a fost doar de 79.1% față de cea inițială. La fel ca și după liofilizare, peste 1 an de păstrare, viabilitatea maximă a tulpinii a fost înregistrată în probele liofilizate pe mediul protectiv suplinit cu 30%/V PSS^{Zn} și rehidratate cu soluție PSS^{Zn} de 5%/V, în care acest indice a fost cu 57.6% mai mare comparativ cu martorul (fig. 2).

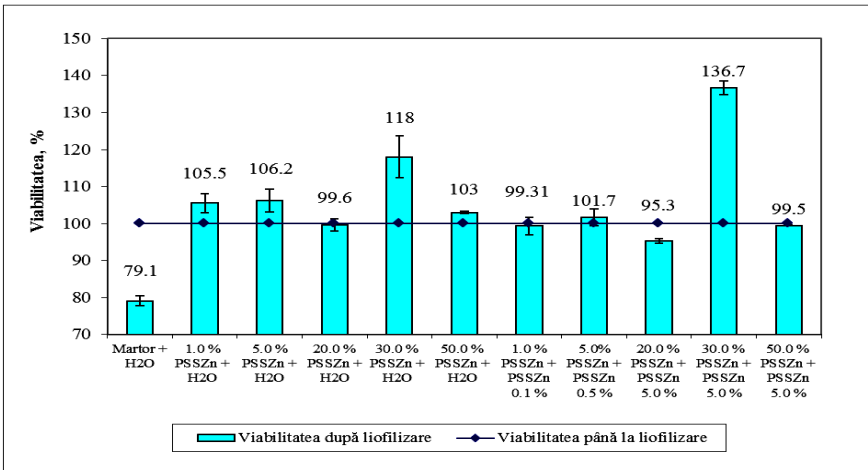


Figura 2. Viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după 1 an de păstrare în stare liofilizată și rehidratare cu apă distilată și soluții de PSS^{Zn} de diferite concentrații.

De regulă, pentru ca procesul de liofilizare să se considere de succes, viabilitatea minimă nu trebuie să fie mai mică de 70-80%, tulpina să nu sufere modificări genetice şi să poată fi revitalizată după o perioadă îndelungată de păstrare [11].

Creşterea titrului tulpinii după liofilizare şi păstrare îndelungată faţă de cel iniţial, la probele suplimentate cu extract de PSS^{Zn} poate fi explicată prin faptul că numeroşi spori ai tulpinii se află în stare latentă şi din diverse motive nu sunt capabili să germineze în condiţii standard de cultivare, însă pot germina sub influenţa factorilor stresanţi sau în prezenţa unor substanţe biologice active [25, 26]. Astfel, putem menţiona că PSS^{Zn} oferă tulpinii nu numai protecţie faţă de temperaturile joase, presiunea înaltă, deshidratare şi diverse forme de oxigen reactiv, dar acţionează şi ca stimulator al germinării sporilor latenţi. Efecte similare, crioprotective, ale polizaharidelor vegetale şi cianobacteriene faţă de obiectele biologice, datorită activităţii antioxidante, de stabilizare a membranelor celulare şi diminuării punctului de îngheţ al apei au fost raportate şi de Khudyakov şi colab. [9].

Concluzii

1. Viabilitatea înaltă a tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare, evidenţiază proprietăţile protective ale PSS^{Zn} din *Arthrospira (Spirulina) platensis* CNMN-CB-02 şi perspectiva utilizării lor în calitate de lioprotector pentru elaborarea mediilor protective destinate conservării tulpinilor din genul *Streptomyces*.

2. Morbiditatea minimă, viabilitatea înaltă de 95.3-136.7% după 1 an de păstrare a tulpinii, evidenţiază eficienţa extractului de origine cianobacteriană în protecţia, conservarea şi păstrarea îndelungată a tulpinii.

3. Diferenţa semnificativă a viabilităţii între probele rehidratate cu apă distilată şi cele cu soluţii de PSS^{Zn}, relevă oportunitatea utilizării extractului pentru revitalizarea tulpinii liofilizate.

Bibliografie

1. Belous A. M., Grishchenko V. I. Kriobiologiya (Cryobiology). // Kiev, Ukraine: 1994, Naukova Dumka.
2. Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T., Garrity G. M. Bergey's manual of systematic bacteriology 2nd ed. Springer. // US, 2005, p. 111-112.
3. Çaktü K., Türkoğlu E. A. Microbial Culture Collections: The essential resources for life. // Gazi University Journal of Science, v. 24, № 2, 2011, p. 175-180.
4. Chaytor J. I., Tokarew J. M., Wu L. K. et al. Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation. // Glycobiology, v. 22, 2012, p. 123-133.
5. 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. // AAPS PharmSciTech., v. 16, № 6, 2015, p. 1317-1326.
6. Day J. G., Stacey G. Methods in molecular biology. Cryopreservation and freeze-drying protocols. // Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2007, 368 p.
7. Hubaleck Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. // Criobiology, v. 46, 2003, p. 205-229.

8. Kandil S., El Soda M. Influence of freezing and freeze drying on intracellular enzymatic activity and autolytic properties of some lactic acid bacterial strains. // *Advances in Microbiology*, № 5, 2015, p. 371-382.

9. Khudyakov A. N., Polezhaeva T. V., Zaitseva O. O. et al. The cryoprotectant effect of polysaccharides from plants and microalgae on human white blood cells. // *Biopreservation and Biobanking*, v. 13, № 4, 2015, p. 240-246.

10. Kuznetsov V. D., Filippova S. N., Kudryavtseva A. V. Intrapopulation variability of antibiotic biosynthesis in streptomycetes // *Folia. Microbiol. Praha*, V. 37, № 4, 1992, p. 283-285.

11. Lopez M. D. G., Fernandez F. U. La conservacion de cepas microbianas. // *Actualidad SEM*, 3, 2000, p. 12-16.

12. Morgan C. Freeze-drying of microorganisms encyclopedia of microbiology. // Oxford, UK: Academic Press (Third Edition). 2009, p. 162-173.

13. 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*, vol. 72, № 1, 2006, p. 472-477.

14. 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. // *International Journal of Applied Engineering Research*, v. 11, № 13, 2016, p. 8056-8061.

15. Solomina O. N., Svedentsov E. P., Zaitseva O. O. et al. Cryoprotective properties of some pectins. // *Doklady Biological Sciences*, v. 430, 2010, p. 559-561.

16. Uruburu F. History and services of culture collections. // *International Microbiology*, № 6, 2003, p. 101-103.

17. Waites M. J., Morgan N. L., Rockey J. S., Highton G. Industrial Microbiology: An introduction 1st ed. Blackwell Science. // Great Britain, 2001, p. 78-79.

18. Wang J., Zhang Z., Li Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. // *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 42, 2008, p. 127-132.

19. Wu L., Sun Q., Desmeth P. et al. World data centre for microorganisms: an information infrastructure to explore and utilize preserved microbial strains worldwide. // *Nucleic Acids Research*, 2016. doi: 10.1093/nar/gkw903.

20. Бурцева С. А. Биологически активные вещества стрептомицетов (Биосинтез, свойства, перспективы применения). // Автореферат диссертации на соискание учёной степени доктора хабилитат биологических наук, Кишинев, 2002. 39 с.

21. Ганбаров Х. Г., Абдулгамидова С. М. Методы хранения дрожжевых культур в коллекции (Обзор). // *Baki Universitetinin Xəbərləri, Təbiət elmləri seriyası*. № 2, 2013, с. 75-83.

23. Головач Т. Н., Грома Л. И. Влияние криоконсервации и лиофилизации на синтез экзополисахарида и жизнеспособность *Xantomonas campestris* pv. *campestris* IMB B-7001. // *Мікробіологічний журнал*. том 75, № 1, 2013, с. 14-20.

23. Егоров Н. С. Промышленная микробиология. // Высшая школа, Москва., 1989, с. 688.

24. Нетрусов А. И. Практикум по микробиологии. // Москва, 2005, 603 с.

25. Феофилова Е. П. Торможения жизненной активности как универсальный биохимический механизм адаптации микроорганизмов к стрессовым воздействиям (Обзор). // Прикладная химия и микробиология. Том 39, № 1, 2003, с. 5-24.

26. Феофилова Е. П., Ивашечкин А. А., Алёхина А. И., Сергеева Я. Э. Споры грибов: покой, прорастание, химический состав и значение для биотехнологии (Обзор). // Прикладная Биохимия и Микробиология. Том 48, № 1, 2012, с. 5-17.

27. 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. // Микробиология, том 76, № 4, 2007, с. 573-576.