

CZU: 579.22

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.5681437>

STUDIUL ACȚIUNII MEDIILOR DE REHIDRATARE ÎN BAZA NANOPARTICULELOR ASUPRA VIABILITĂȚII MICROMICETELOR LIOFILIZATE

*Tamara SÎRBU, Ion TIMUȘ, Olga ȚURCAN, Cristina MOLDOVAN, *Viorina GORINCIOI*

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

** Institutul de Chimie*

Ultima etapă importantă a liofilizării este rehidratarea, care exercită o influență majoră asupra viabilității microorganismelor. În calitate de medii de rehidratare a micromicetelor liofilizate sunt folosite diferite medii nutritive, laptele degresat, apa distilată etc. În acest studiu, pentru rehidratarea tulpinilor liofilizate de micromicete a fost utilizată apa distilată și soluțiile de nanoparticule (NP) Fe_2O_3 și Fe_2ZnO_4 în concentrație de (mg/l): 0,05; 0,1; 1,0. Rezultatele obținute au demonstrat că soluțiile de NP Fe_2O_3 și de NP Fe_2ZnO_4 , în concentrație de 0,1 mg/l și de 0,05 mg/l, au influențat diferit asupra viabilității micromicetelor. La unele tulpini din genul *Penicillium* s-a înregistrat o stimulare a viabilității de 7-8%, iar la altele o diminuare de 6-9%, față de varianta martor. Viabilitatea tulpinilor din genurile *Aspergillus* și *Trichoderma* a diminuat cu 5-10% la utilizarea NP în concentrație de 0,05 mg/l, iar la concentrația de 0,1 mg/l a variat în limitele $\pm 2-3\%$, comparativ cu varianta martor.

Cuvinte-cheie: micromicete, mediu de rehidratare, nanoparticule, liofilizare, viabilitate.

STUDY OF THE ACTION OF REHYDRATION MEDIA ON THE BASIS OF NANOPARTICLES ON THE VIABILITY OF LYOPHILISED MICROMYCETES

The last important stage of lyophilisation is rehydration, which has a major influence on the viability of microorganisms. Various nutrient media, skim milk, distilled water, etc. are used as rehydration media for lyophilised micromycetes. In this study, distilled water and nanoparticle (NP) solutions Fe_2O_3 and Fe_2ZnO_4 in a concentration of (mg/l): 0.05; 0.1; 1.0 were used for the rehydration of lyophilised strains of micromycetes. The obtained results showed that the solutions of NP Fe_2O_3 , and NP Fe_2ZnO_4 , in a concentration of 0.1 mg/l and 0.05 mg/l, had a different influence on the viability of micromycetes. In some strains of the genus *Penicillium* there was a stimulation of viability of 7-8%, and in others a decrease of 6-9%, compared to the control variant. The viability of strains of the genus *Aspergillus* and *Trichoderma* decreased by 5-10% when using NP at a concentration of 0.05 mg/l, and at a concentration of 0.1 mg/l varied within $\pm 2-3\%$, compared to the control variant.

Keywords: micromycetes, rehydration medium, nanoparticles, lyophilisation, viability.

Introducere

În ultimele decenii metoda de liofilizare 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 [1-6].

Pe parcursul liofilizării, microorganismele sunt supuse diferitor factori de stres: temperaturi și presiuni joase, deshidratare, rehidratare etc., în rezultatul cărora pot apărea modificări ale structurii, modificarea permeabilității membranei celulare; modificarea pH-ului soluțiilor; cristalizarea polizaharidelor; stresul osmotic; deteriorarea structurilor celulare și moleculare etc. Reacțiile oxidative în preparatele cu celule liofilizate modifică compoziția și structura lipidelor, proteinelor, acizilor nucleici și, în consecință, reduc numărul de celule vii în timpul depozitării [7-10]. Toate acestea necesită eficientizarea metodei de păstrare a microorganismelor în stare liofilizată, fiind necesară standardizarea mediilor optime de protecție și regenerare a culturilor [11-16]. Ultima etapă importantă a liofilizării este rehidratarea. Procedeele de rehidratare și condițiile de regenerare a microorganismelor după liofilizare exercită o influență majoră asupra viabilității acestora. Rehidratarea include trei procese simultane: absorbția apei în materialul uscat, umflarea și readucerea la forma inițială a materialelor solubile, amploarea cărora depinde de gradul de afectare a structurii celulare și de modificările chimice cauzate de deshidratare. Acest proces se produce cu degajarea căldurii, majorarea concentrației de electroliți, oscilații necontrolate ale pH-ului, astfel încât mediile de regenerare utilizate, temperatura și viteza de hidratare sunt factori esențiali deloc neglijabili vis-à-vis de păstrarea viabilității microorganismelor studiate [17-20]. Un rol important îl joacă și temperatura de rehidratare. Astfel, Ray și colaboratorii săi au ajuns la concluzia că numărul celulelor viabile rehidratate la temperatura de 15-25°C este mult mai mare decât a celor rehidratate

la 35 și 45°C [21]. Cele mai bune rezultate ale viabilității bacteriilor, fungilor, actinobacteriilor au fost obținute la temperatura de 18-28°C, iar temperaturile >30°C sunt sugerate pentru celulele mai mari, cum ar fi drojdiile [6,22–25].

Conform datelor științifice prezentate în numeroase publicații, rezultatul maxim pentru obținerea celulelor viabile poate fi atins prin adăugarea treptată a cantității de 0,2-1,0 ml de apă distilată sau din robinet, de asemenea pot fi folosite: bulionul de carne, peptonă, laptele degresat, soluții de acizi organici, trehaloza, diverse medii nutritive etc. [7,17,26-28].

În calitate de supliment în mediile de rehidratare sunt folosite și principii bioactive de origine cianobacteriană și vegetală. Spre exemplu, la rehidratarea actinobacteriilor liofilizate a fost testat extractul cianobacterian (BioR și Psh*ZnS), dar și principii bioactive de origine vegetală din plantele sălbatice *Linaria* și *Verbascum*. S-a demonstrat că utilizarea substanțelor bioactive de origine cianobacteriană și vegetală în calitate de rehidranți majorează nesemnificativ viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02, maximum cu 2,07-18,7% [29].

Actualmente, un interes deosebit prezintă aplicațiile multiple ale nanoparticulelor metalice în diverse domenii: medicină, agricultură, ecologie, industria alimentară etc. Numeroase cercetări demonstrează acțiunea benefică a nanoparticulelor asupra celulelor vii, însă, ca și orice tehnologie nouă, aceasta prezintă un risc deosebit cu privire la posibilele efecte adverse, precum modificarea ADN-ului, accelerarea proceselor de îmbătrânire și moartea celulelor etc. [30-33]. Conform rezultatelor din diverse publicații științifice, efectul nanoparticulelor asupra activității biosintetice a microorganismelor variază în funcție de compoziția chimică, mărimea și concentrația particulelor, precum și de particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinilor luate în studiu [28,34,35]. Astfel, a fost demonstrat că efectul nanoparticulelor (NP) de Fe₃O₄ și Fe(0) asupra creșterii micromicetelor din genurile *Penicillium* și *Trichoderma*, atât în lipsa, cât și în prezența trifluralinei (TF), depinde de dimensiunile și concentrațiile utilizate. S-a stabilit că NP de Fe₃O₄ cu mărimea de 20-25 nm, în concentrații mici (1-10 mg/l), stimulează creșterea micromicetelor în prezența trifluralinei [36]. De asemenea, s-a demonstrat că NP de Fe₃O₄ sporesc activitatea antifungică a micromicetelor din genurile *Trichoderma* și *Penicillium* cultivate în prezența TF [37]. S-a constatat că nanoparticulele Fe₃O₄, în concentrații de 0,5–30,0 mg/l, nu modifică semnificativ producția de biomasă celulară, însă schimbă compoziția biochimică a levurii *Rhodotorula gracilis* CNMNY-30, micșorând conținutul de carbohidrați și proteine, iar în concentrații mari provoacă dereglări semnificative în activitatea catalazei [38]. Nanoparticulele TiO₂ în concentrații de 0,5-15,0 mg/l nu modifică în mod semnificativ multiplicarea și producția de biomasă la *Saccharomyces cerevisiae* CNMNY-20, *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, *Rhodotorula gracilis* II/6, dar determină scăderea conținutului de proteine în biomasa levurilor genului *Saccharomyces* și acumularea de proteine la tulpina de levuri pigmentate *Rhodotorula gracilis* II/6 [39].

Astfel, scopul cercetărilor a constat în studierea acțiunii mediilor de rehidratare în baza nanoparticulelor de Fe₂O₃ și Fe₂ZnO₄ asupra viabilității tulpinilor de micromicete după liofilizare.

Material și metode

În calitate de obiect de studiu au fost utilizate 20 de tulpini de micromicete ce se păstrează în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene (CNMN) în stare liofilizată. Mediul de protecție utilizat la liofilizarea tulpinilor de micromicete a fost laptele degresat + 7% glucoză.

În calitate de mediu de rehidratare a tulpinilor liofilizate s-a utilizat apa distilată (H₂O) (variante martor – M) și 2 variante suplimentate cu nanoparticule (NP): H₂O+NP Fe₂O₃; H₂O + NP Fe₂ZnO₄. Au fost testate 3 concentrații de nanoparticule (mg/l): 0,05; 0,1; 1,0. Dimensiunile NP utilizate de Fe₂O₃ – 2-10 nm și ale Fe₂ZnO₄ – 8-15 nm.

Pentru rehidratarea culturilor liofilizate, în fiecare flacon cu cultura liofilizată a fost introdus câte 1 ml apă distilată, sterilă, sau una dintre soluțiile cu nanoparticule menționate. Rehidratarea a fost efectuată la temperatura de 28°C timp de 2 ore. După 2 ore de rehidratare și efectuarea diluțiilor succesive suspensia a fost inoculată în cutii Petri pe mediul Czapek, iar după incubarea la 28°C timp de 4-10 zile au fost numărate celulele formatoare de colonii (UFC). Numărul de celule viabile a fost exprimat prin log₁₀ a unităților formatoare de colonii (UFC) în 1,0 ml de suspensie, apoi calculată în % comparativ cu varianta martor [40,41].

Rezultate și discuții

Rezultatele obținute în acest studiu au demonstrat că mediul de rehidratare suplimentat cu nanoparticule acționează diferit asupra viabilității tulpinilor liofilizate.

La prima etapă a fost determinată concentrația optimă a soluțiilor de NP Fe₂O₃ și de Fe₂ZnO₄, utilizate în calitate de mediu de rehidratare. Au fost montate 3 variante cu NP de Fe₂O₃ și Fe₂ZnO₄ în trei concentrații (mg/L): 0,05; 0,1; 1,0 și varianta martor (H₂O distilată), luându-se în studiu 3 tulpini de micromicete, din genurile: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* (a se vedea Tabelul).

Tabel

Viabilitatea tulpinilor de micromicete după liofilizare în dependență de concentrația de nanoparticule utilizată în mediul de rehidratare

Tulpina	Nanoparticulele în mediul de rehidratare					
	Fe ₂ O ₃ (mg/l)			Fe ₂ ZnO ₄ (mg/l)		
	0,05	0,1	1,0	0,05	0,1	1,0
<i>Penicillium viride</i> CNMN FD 09	99,4±0,6	94,4± 1,1	92,8±1,1	101,4±1,5	100,4±1,2	99,7 ± 1,3
<i>Aspergillus fumigatus</i> CNM FA 04	99,4±0,6	94,4± 1,1	92,8±1,1	101,4±1,5	100,4±1,2	99,7 ± 1,3
<i>Trichoderma harzianum</i> CNMN FD 16	98,1±1,1	100,2±1,0	98,1±1,1	98,1±1,1	99,2±0,9	97,5 ± 1,6

Conform datelor prezentate în Tabel, putem constata că viabilitatea tulpinilor *P. viride* FD 09 și *A. fumigatus* FA 04 după rehidratare în variantele cu concentrația NP Fe₂O₃ de 0,1mg/l și de 1,0 mg/l a fost mai mică comparativ cu viabilitatea obținută în varianta martor, iar a tulpinii *T. harzianum* FD 16 a fost aproape de nivelul martorului. Numai în varianta cu concentrația NP de 0,05 mg/l viabilitatea celor 3 tulpini studiate a fost aproape de nivelul martorului (98-100%, comparativ cu M).

La suplimentarea în mediul de rehidratare a NP de Fe₂ZnO₄ viabilitatea tulpinilor studiate a variat în limitele variantei martor, cu mici devieri (± 1-2%).

Potrivit rezultatelor obținute, mai benefic asupra viabilității tulpinilor au acționat totuși NP Fe₂O₃ și Fe₂ZnO₄, suplimentate în mediul de rehidratare, în concentrație de 0,05 și de 0,1mg/l. Astfel, în a doua etapă pentru rehidratarea tuturor tulpinilor luate în studiu au fost utilizate concentrațiile NP de 0,05 și de 0,1 mg/l.

La rehidratarea tulpinilor din genul *Penicillium* cu soluții de NP Fe₂O₃ în concentrație de 0,05 și de 0,1 mg/l la unele tulpini au fost observate devieri semnificative ale viabilității comparativ cu varianta martor (Fig.1). Astfel, la utilizarea soluției de 0,5 mg/l NP Fe₂O₃, diminuări semnificative ale viabilității de 7-9% au manifestat 3 din cele 10 tulpini testate: *P. funiculosum* CNM FP 01, *P. funiculosum* CNMN FD 11 și *P. camemberti* CNM FP 03, iar 2 tulpini au manifestat o stimulare cu 5-7,5%, comparativ cu M. La restul tulpinilor, precum și în variantele cu concentrația NP de 0,1 mg/l, viabilitatea după rehidratare a variat în limitele ±3%, comparativ cu M(H₂O).

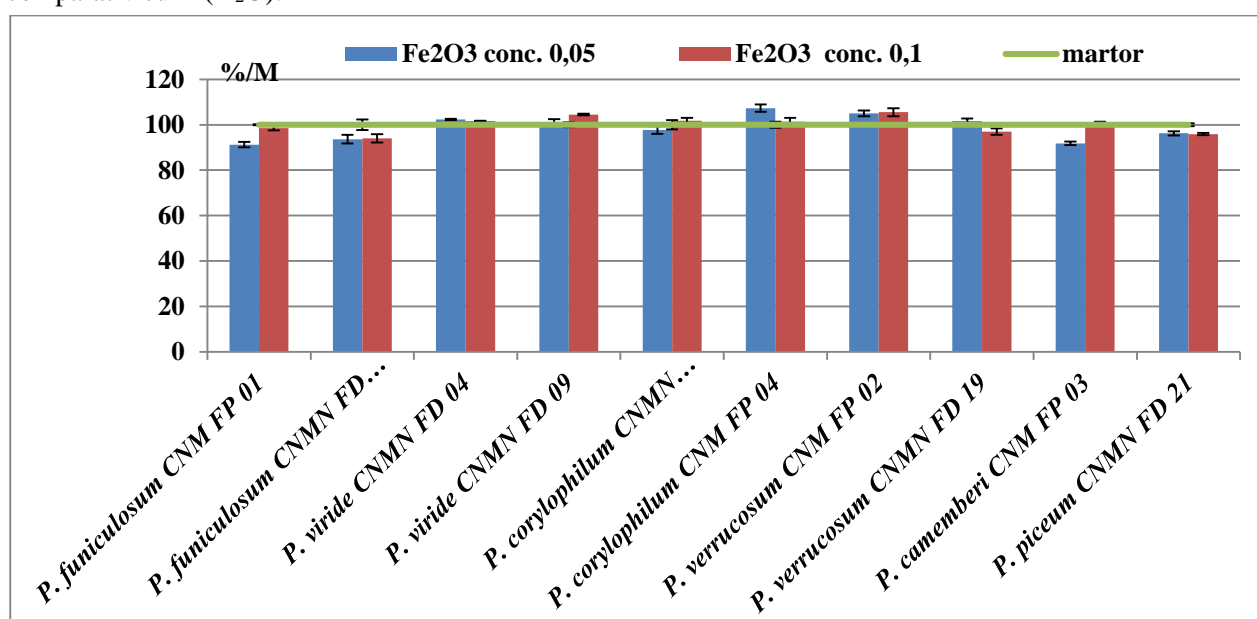


Fig.1. Viabilitatea tulpinilor de *Penicillium* rehidratate cu soluții de NP Fe₂O₃.

În cazul rehidratării tulpinilor din genul *Penicillium* cu soluții de NP Fe₂ZnO₄ în concentrație de 0,05 mg/l au fost observate diminuări semnificative cu 6-10% la două tulpini (*P. funiculosum* CNM FP 01 și *P. viride* CNMN FD 04) (Fig.2), iar la două tulpini (*P. corylophilum* CNMN FD 20 în varianta cu 0,05 mg/l NP Fe₂ZnO₄ (107,3%) și *P. corylophilum* CNM FP 04 în ambele variante testate (0,05 și 0,1 mg/l NP) au fost înregistrate stimulări ale viabilității ce depășesc maritorul cu 7,3-8,2%. Viabilitatea celorlalte tulpini după rehidratare, cu soluții de NP Fe₂ZnO₄, în concentrație de 0,05 sau de 0,1 mg/l, variază în limitele ± 3%, comparativ cu M(H₂O).

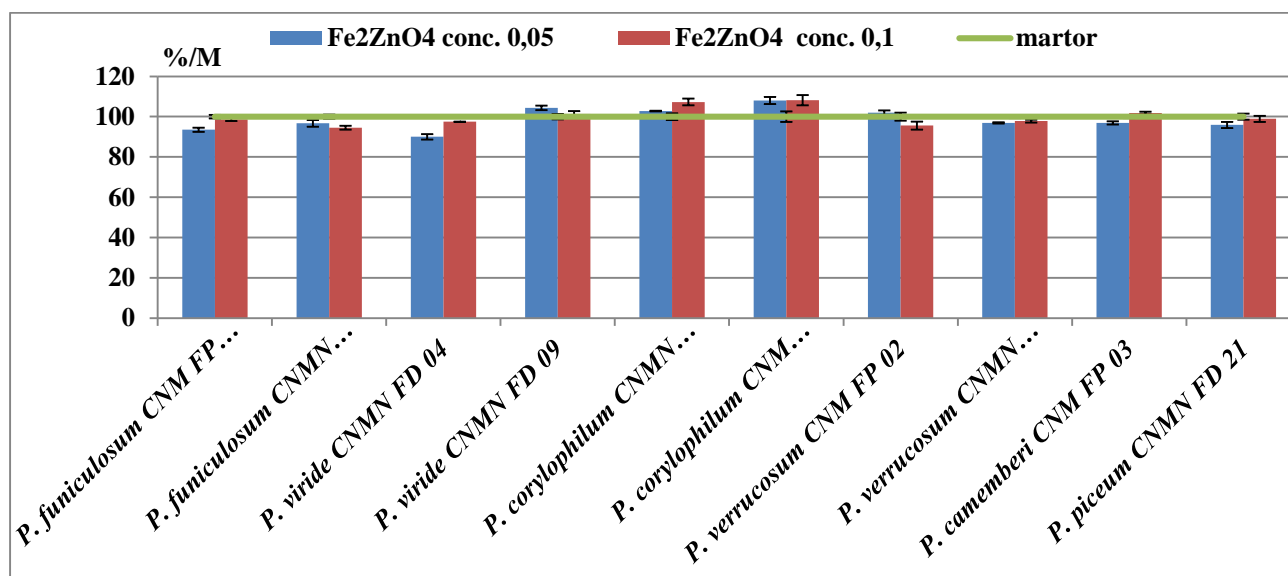


Fig.2. Viabilitatea tulpinilor de *Penicillium* rehidratate cu soluții de NP Fe₂ZnO₄.

În cazul rehidratării tulpinilor din genurile *Aspergillus* și *Trichoderma* (Fig.3) cu soluția de NP Fe₂O₃ în concentrație de 0,05 mg/l și de 0,1 mg/l, viabilitatea tulpinilor s-a reflectat în mod diferit. Astfel, utilizarea în calitate de rehidrant a soluției de NP Fe₂O₃ în concentrație de 0,05 mg/l a acționat negativ asupra a 8 tulpini studiate, diminuând viabilitatea acestora cu 3-7% față de varianta martor, iar la 2 tulpini viabilitatea a fost la nivelul martorului. În variantele cu utilizarea soluției de NP Fe₂O₃ în concentrație de 0,1 mg/l diminuări semnificative de 7-8% au fost înregistrate la 2 tulpini din genul *Aspergillus* (*A. alliaceus* FA 01 și *A. niger* FA 03), iar la 2 tulpini din acest gen fiind înregistrată o stimulare de 3-4%, comparativ cu varianta martor. Viabilitatea tulpinilor din genul *Trichoderma*, în variantele cu concentrația NP Fe₂O₃ de 0,1 mg/l, variază în limitele ± 1-2% față de varianta martor.

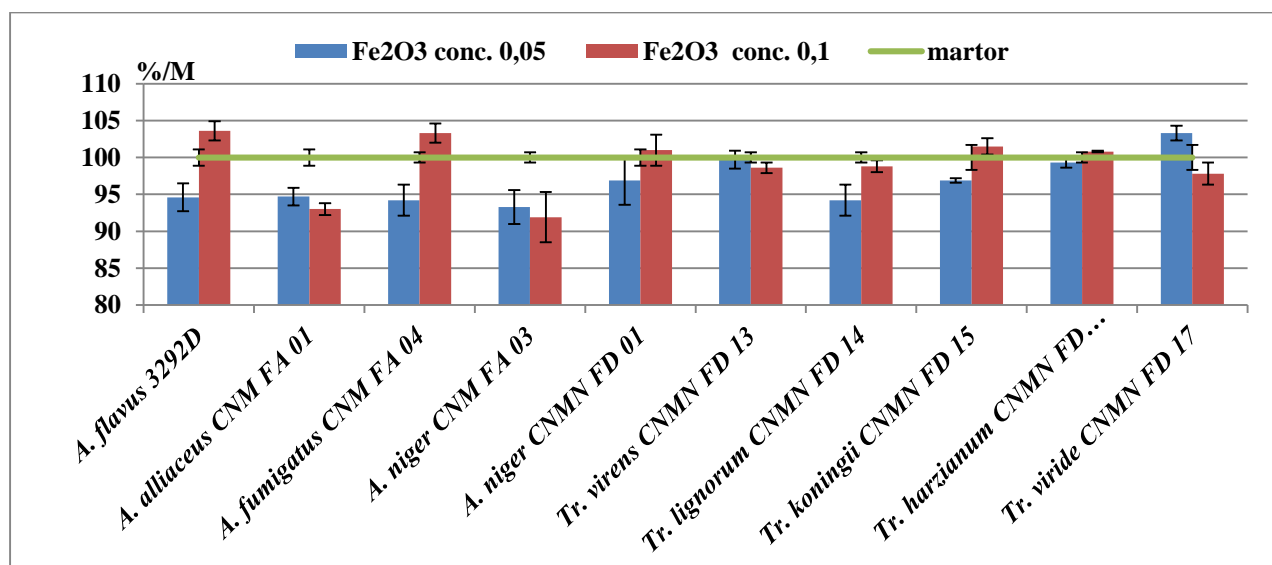


Fig.3. Viabilitatea tulpinilor din genurile *Aspergillus* și *Trichoderma* după liofilizare și rehidratate cu soluții de NP Fe₂O₃.

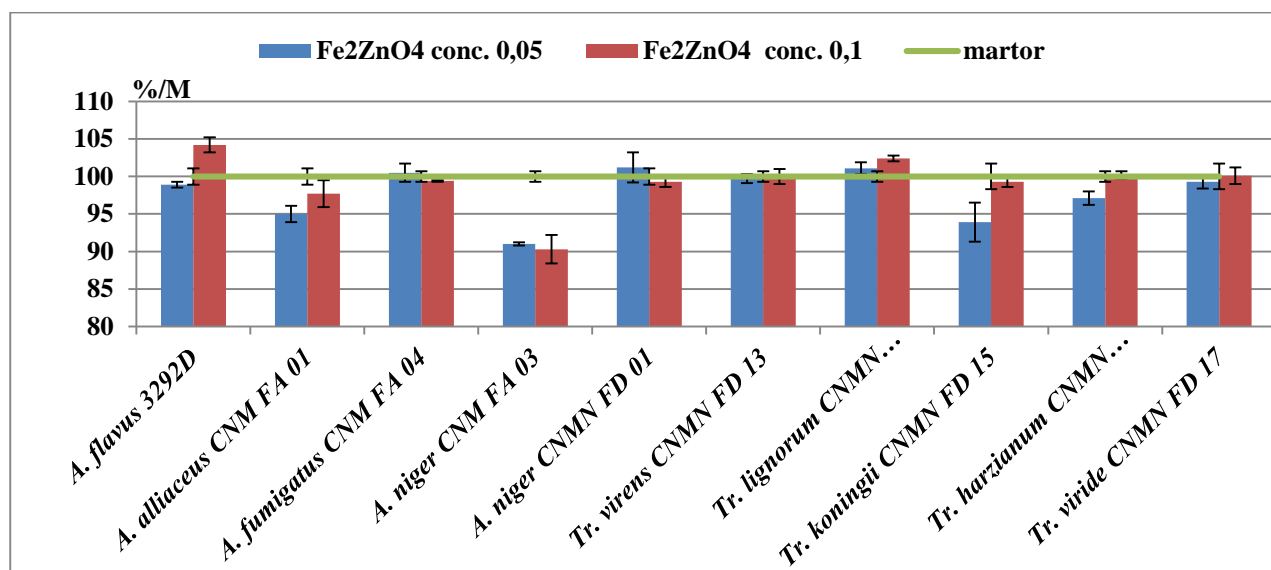


Fig.4. Acțiunea NP Fe₂ZnO₄ utilizate în calitate de rehidratant asupra viabilității tulpinilor din genurile *Aspergillus* și *Trichoderma*.

În variantele cu utilizarea soluțiilor de 0,05 mg/l și de 0,1 mg/l NP Fe₂ZnO₄ au fost înregistrate diminuări semnificative de 5-10% la 2 tulpini din genul *Aspergillus* (*A. niger* CNM FA 03 și *A. alliaceus* CNM FA 01) și de 3-7% la 2 tulpini din genul *Trichoderma* (*T. koningii* CNMN FD 15 și *T. harzianum* CNMN FD 16) în varianta cu concentrația NP de 0,05 mg/l. În cazul celorlalte tulpini studiate din genurile *Aspergillus* și *Trichoderma* viabilitatea, în ambele variante montate, a variat în limitele ± 1-2% față de varianta martor.

Concluzii

Acțiunea soluțiilor de NP Fe₂O₃ sau de Fe₂ZnO₄, în calitate de rehidratant la revitalizarea tulpinilor liofilizate de micromicete, a fost diferită în dependență de concentrația soluției de NP utilizată, precum și de cultura testată. Astfel, la unele tulpini din genul *Penicillium* s-a înregistrat o stimulare (mai semnificativă în variantele cu NP de Fe₂ZnO₄) a viabilității cu 7- 8%, iar la altele o diminuare cu 6-9% față de martor. În rezultatul rehidratării tulpinilor din genurile *Aspergillus* și *Trichoderma*, cu soluții de NP Fe₂O₃ sau de Fe₂ZnO₄, în concentrație de 0,05 mg/l, s-a înregistrat o diminuare de 5-10% la majoritatea tulpinilor testate, iar la concentrația de 0,1mg/l viabilitatea acestora a variat în limitele ± 2-3 %, față de varianta martor, cu unele excepții (*A. alliaceus* CNM FA 01 și *A. niger* CNM FA 03).

Referințe:

- ADAMS, G. The Principles of Freeze-Drying. In: *Methods Mol. Biol.*, 2007, 368:15–38. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_2
- AMENAN, Y.A., WATHELET, B., THONART, P. Effect of protective compounds on the survival, electrolyte leakage, and lipid degradation of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11 during storage. In: *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, no19(8), p.810–817.
- BANK, H., MAZUR, P. Visualization of freezing damage. In: *J. Cell. Biol.*, 1973, no5(3), p.729–742.
- MORGAN, C. *Freeze-drying of microorganisms encyclopedia of microbiology*. Oxford, UK: Academic Press (Third Edition), 2009, p.162–173.
- SHUKLA, S. Freeze drying process: a review. În: *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2011, vol.2, no.12, p.3061-3068.
- SIRBU, T., MOLDOVAN, C., TURCAN, O. Assessment of micromycetes viability from National Collection of Non-pathogenic Microorganisms after 15 years of storage. In: *Analele Universității din Oradea. Fascicula Biologie*, 2021, nr.28(1), p.78-84.
- BERGENHOLTZ, A.S., WESSMAN, P., WUTTKE, A., HEKANSSON, S. A case study on stress preconditioning of a *Lactobacillus* strain prior to freeze-drying. In: *Cryobiology*, 2012, 64, p.152–159. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2012.01.002
- BUITINK, J., LEPRINCE, O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. In: *C. R. Biol.*, 2008, no331(10), p.788–795. DOI: 10.1016/j.crv.2008.08.002

9. PRAKASH, O., YOGESH, N., YOGESH, S.S. Practice and prospects of microbial preservation. In: *FEMS Microbiol. Lett.*, 2013, no.339, p.1–9.
10. ГРИШКИНА, Т.А., ТИМОФЕЕВА, Е.В., СПИРИДОНОВ, В.А. Оценка результатов хранения музейных штаммов возбудителя сапа в течение длительного периода. В: *Проблемы особо опасных инфекций*, 2004, №1(87), с.40–42.
11. ABADIAS, M., TEIXIDA, N., USALL, J., BENABARRE, A., VINAS, I. Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. In: *J. Food Prot.*, 2001, no.64, p.856-861.
12. SÎRBU, T., CODREANU, S. Selectarea mediilor de revitalizare a culturilor liofilizate de fungi. În: *Buletinul AȘM. Științele vieții*, 2009, nr.2 (308), p.108-113.
13. PEIREN, J., BUYSE, J., De VOS, P., LANG, E., CLERMONT, D., HAMON, S., BÉGAUD, E., BIZET, C., PASCUAL, J., RUVIRA, M.A., MACIÁN, M.C., ARAHAL, D.R. Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections. Arahal. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, no.99(8), p.3559–3571. DOI: 10.1007/s00253-015-6476-6
14. КАНТЕРОВА, А.В., ФАЛЬКОВСКАЯ, У.В., КОПИЦЯ, В.Н., НОВИК, Г.И. Развитие специализированной коллекции фитопатогенных микроорганизмов. В: *Изучение и реабилитация экосистем*, 2016, с.20-34.
15. КУПЛЕТСКАЯ, М.Б., НЕТРУСОВ, А.И. Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения. В: *Микробиология*, 2011, 80(6), с.842–846.
16. 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*, 2009, №4 (12), с.99-121.
17. MORGAN, C.A., HERMAN, N., WHITE, P.A., VESEY, G. Preservation of micro-organisms by drying; a review. In: *J. Microbiol. Methods*, 2006, no.66(2), p.83-93.
18. ВОЛКОВ, В.Я. К вопросу о физиологических и физикохимических механизмах устойчивости микроорганизмов к замораживанию и высушиванию. В: *Микробиология*, 1994, №63(1), с.5-15.
19. ГОЛОВАЧ, Т.Н., ГРАМА, Л.И. Влияние криоконсервации и лиофилизации на синтез экзополисахарида и жизнеспособность *Xantomonas campestris* pv. *campestris* IMB В -7001. В: *Мікробіологічний журнал*, 2013, том.75, №1, с.14-20.
20. СЛАБОВА, О.И., НИКИТИН, Д.И. Взаимосвязь температурных условий на проявление стресса у олиготрофных бактерий. В: *Микробиология*, 2004, 73, №6, с.738-762.
21. RAY, B., BEDZYS, J., BUSTA F. Effect of rehydration on recovery, repair and growth of injured freeze-dried *Salmonella anatum*. In: *Applied Microbiology*, 1971, no.22(2), p.184-189.
22. BURȚEVA, S., POSTOLACHI, O. Selectarea mediilor de protecție și regenerare pentru liofilizarea tulpinilor de streptomicete. În: *Materialele Conferinței științifice naționale consacrate celei de-a 50 aniversări de la fondarea Secției de Microbiologie „Probleme actuale ale microbiologiei și biotehnologiei”*. Chișinău, 2009, p.35-36.
23. NAVARTA, L.G. et al. Freezing and freeze-drying of the bacterium *Rahnella aquatilis* BNM 0523: study of protecting agents, rehydration media and freezing temperatures. In: *Lett. Appl. Microbiol.*, 2011, no.53(5), p.565-571.
24. Om PRAKASH, Yogesh Nimonkar & Yogesh S. Shouche. Practice and prospects of microbial preservation. In: *FEMS Microbiol. Lett.*, 2013, no.339, p.1-9.
25. Om PRAKASH, Yogesh Nimonkar, Dhananjay Desai. A recent overview of microbes and microbiome preservation. In: *Indian J. Microbiol.*, 2020, no.60(3), p.297 - 309. DOI: 10.1007/s12088-020-00880-9
26. HOEFMAN, S., Van HOORDE, K., BOON, N., VANDAMME, P., De Vos, P. & HEYLEN, K. Survival or revival: long-term preservation induces a reversible viable but non-culturable state in methane oxidizing bacteria. In: *PLOS one*, 2012, no.7, p.1–9.
27. JALALI, M., ABEDI, D., VARSHOSAZ, J., NAJJARZADEH, M., MIRLOHI, M. and TAVAKOLI, N. Stability evaluation of freeze-dried *Lactobacillus paracasei* subsp. tolerance and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in oral capsules. In: *Research in Pharmaceutical Sciences*, 2012, no.7(1), p.31-36.
28. SLANINA, V., LUPAȘCU, L., TOLOCICHINA, S., BURȚEVA, S., POSTOLACHI, O., SÎRBU, T., STEPANOV, V., CHISELIȚA, O. Standardizarea procedurii de conservare a tulpinilor de bacterii păstrate în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene. Standardizarea procedurii de conservare a tulpinilor din genul *Pseudomonas* păstrate în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene. În: *Buletinul AȘM. Științele vieții*, 2012, nr.2(317), p.160-167.
29. STEPANOV, V., BURȚEVA, S., POSTOLACHI, O., SÎRBU, T., TOLOCICHINA, S., SLANINA, V. Standardizarea procedurii de conservare a tulpinilor de actinomicete păstrate în Colecția Națională de Microorganisme neapatogene. I. Selectarea mediilor de protecție și revitalizare optime pentru liofilizarea culturilor de streptomicete. În: *Buletinul AȘM. Științele vieții*, 2010, nr.1(310), p.128-134.
30. БЫРСА, М.Н. Выживаемость и антимикробные свойства стрептомицетов после лиофилизации с разными защитными средами. В: *Материалы 20-й Международной конференции молодых ученых «Биология – Наука XXI века»*. Пушино, 2016, с.12.

31. CEPOI, L., ZINICOVSCAIA, I., RUDI, L., CHIRIAC, T., ROTARI, I., TURCHENKO, V., DJUR, S. Effect of peg-coated silver and gold nanoparticles on *Spirulina platensis* biomass during its growth in closed system. In: *Coatings*, 2020, no.10, p.717. DOI: 10.3390/coatings10080717
32. KITCHING, M. et al. Fungal biosynthesis of gold nanoparticles: mechanism and scale up. In: *Microbiol. biotechnology*, 2014, no.17, p.1-14.
33. KOTZYBIK, K. et al. Influence of different nanomaterials on growth and mycotoxin production of *Penicillium verrucosum*. In: *PLOS*, Published: March 14, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150855>
34. ТУРАНСКАЯ, С.П., КУСЯК, А.П., ТУРОВ, В.В., ГОРБИК, П.П. Взаимодействие магнитных наночастиц с клетками. В: *Медико-биологические проблемы поверхности. Поверхность*, 2013, вып.5(20), с.227–246.
35. ЧИЛОЧИ, А., ТЮРИНА, Ж., ЛАБЛЮК, С., ДВОРНИНА, Е., КЛАПКО, С., БИВОЛ, Ч., ГУЦУЛ, Т., РУССУ, Е., НИКОРИЧ А. Влияние наноокислов некоторых металлов на биосинтез внеклеточных гидролаз микромицетов. В: *Buletinul AȘM. Științele vieții*, 2016, nr.3(330), p.164-171.
36. SÎRBU, T., ZOP, A., GUȚUL, T. Impactul nanoparticulelor de Fe₃O₄ asupra activității antifungice a micromicetelor. În: *Buletinul AȘM. Științele vieții*, 2017, nr.2(332), p.131-138.
37. SÎRBU, T., ZOP, A., GUȚUL, T. Acțiunea nanoparticulelor de Fe₃O₄ și Fe(0) asupra creșterii micromicetelor în prezența trifluralinei. În: *Buletinul AȘM. Științele vieții*, 2017, nr.1(331) p.117-124.
38. USATÎI, A., BEȘLIU, A., CHIRIȚA, E., BORISOVA, T. Efectele nanoparticulelor Fe₃O₄ asupra parametrilor bio-productivi ai levurii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30. În: *Buletinul AȘM. Științele vieții*, 2017, nr.1(331), p.111-117.
39. USATÎI, A., CHISELIȚA, N., MOLODOI, E., BEJENARU, L., CHIRIȚA, E., BEȘLIU, A., BORISOVA, T. Efectul nanoparticulelor TiO₂ asupra reproducerii celulelor și conținutului de proteine la levuri. În: *Buletinul AȘM. Științele vieții*, 2015, nr.3(327), p.149-155.
40. MUÑOZ-ROJAS, J. et al. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. In: *Applied Environmental Microbiology*, 2006, vol.72, no.1, p.472-477.
41. ЗОЛОТИЛОВА, Г.Д., ЩАКИРЗЯНОВА, М.Р. Жизнеспособность коллекционного фонда бактерий при длительном хранении. В: *Доклады Академии наук Республики Узбекистан*, 2004, №2, с.84-90.

Notă: Lucrarea a fost efectuată în cadrul proiectului „Conservarea și valorificarea biodiversității microbiene în calitate de suport pentru dezvoltarea tehnologiilor și agriculturii durabile, integrarea științei și educației”, cu cifra 20.80009.7007.09

Date despre autori:

Tamara SÎRBU, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător; Șeful laboratorului *Colecția Națională de Microorganisme Nematogene* al IMB (Institutul de Microbiologie și Biotehnologie).

E-mail: tfsirbu@gmail.com

ORCID: 0000-0001-7809-9870

Ion TIMUȘ, cercetător științific în laboratorul *Colecția Națională de Microorganisme Nematogene* al IMB.

E-mail: Timus_ion@mail.ru

Olga ȚURCAN, cercetător științific în laboratorul *Colecția Națională de Microorganisme Nematogene* al IMB.

E-mail: turcanolga2019@mail.ru

ORCID: 0000-0002-7103-5986

Cristina MOLDOVAN, doctorand, cercetător științific în laboratorul *Colecția Națională de Microorganisme Nematogene* al IMB.

E-mail: tina-92@mail.ru

Viorina GORINCIOI, cercetător științific în laboratorul *Bioanorganică și Nanocompozite*, Institutul de Chimie.

E-mail: oviorina@gmail.com

ORCID: 0000-0001-6991-2241

Prezentat la 29.09.2021