

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

elaborată de **Mihai Bogdan NICOLCIOIU** sub îndrumarea **Conf. Univ. Dr. Abilitat Florentina MATEI**

„CARACTERIZAREA UNOR SPECII DE MACROMICETE UTILE DIN PUNCT DE VEDERE BIOTEHNOLOGIC”

Cuvinte cheie : macromicete, culturi submerse, biomasă fungică, extracte etanolicе, activitate antimicrobiană, polifenoli, flavone, enzime ligninolitice, biodegradare, variabilitate genetică, markeri moleculari.

Prezenta teză de doctorat înglobează activitatea de cercetare derulată în perioada 2015-2018 în Facultatea de Biotehnologii din USAMV București în laboratoarele de Genetică, Biologie moleculară și Microbiologie aplicată.

Ciupercile sunt bine cunoscute la nivel mondial pentru valorile lor nutriționale, precum și pentru cele terapeutice datorite produșilor lor de metabolism. Printre numeroasele molecule sintetizate de macrofungi se regăsesc și compuși bioactivi cum ar fi polizaharidele, terpenoidele, lectinele, precum și o largă varietate de proteine, cu acțiuni biologice de interes, multe dintre acestea având un potențial biotehlogic valoros ce poate fi valorificat în medicină, în industrie sau în bioremedierea mediului înconjurător.

În cadrul prezentei teze de doctorat s-a urmărit valorificarea din punct de vedere biotehlogic a unor specii de ciuperci comerciale sau din flora noastră spontană, cu valoare nutrițională și/sau medicinală, care ar duce la diversificarea sortimentului de ciuperci atât pentru piața autohtonă cât și a produselor oferite pentru export, la obținerea unor suplimente alimentare cu valoare nutrițională și terapeutică sau la utilizarea lor în biodegradare. S-a avut în vedere ca din ciupercile comestibile/sălbaticе luate în studiu, în urma rezultatelor obținute, să poată fi astfel valorificate în industria alimentară sau farmaceutică sau pentru conservarea și regenerarea mediului. În acest sens s-a urmărit evaluarea, din punct de vedere biotehlogic, a zece specii de macromicete comerciale sau din flora noastră spontană, cu valoare nutrițională și/sau medicinală, dintre care unele dintre ele mai puțin cunoscute și exploatate în țara noastră. Aceste specii sunt:

Flammulina velutipes, *Lentinus edodes*, *Pleurotus eryngii* tulpina 2600, *P.ostreatus* var. *Florida*, *Trametes versicolor*, *Hericium coralloides*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, *Agaricus campestris*, *Laetiporus sulphureus*.

Pentru atingerea scopului propus au fost adresate următoarele obiectivele de cercetare:

- Obținerea *in vitro* a materialului fungic - sursă de inocul - de la speciile de ciuperci considerate a fi utile din punct de vedere biotehnologic;
- Evaluarea potențialului de creștere a ciupercilor în condiții submerse și a condițiilor de cultură pentru obținerea de biomasă fungică;
- Evaluarea activității antimicrobiene a unor extracte etanolice preparate din biomasă fungică obținută *in vitro* în condiții submerse;
- Analiza biochimică a extractelor fungice obținute din corpii de fructificare ai ciupercilor;
- Investigarea *in vitro* a potențialului biotehnologic a unor specii de macromicete pentru utilizarea lor în biodegradarea unor poluanți organici (coloranți și hidrocarburi aromatice);
- Caracterizarea moleculară a unor tulpini de macromicete de interes biotehnologic.

Teza este structurată în două părți: prima parte, incluzând 4 capitole, abordează studii bibliografice referitoare la stadiul actual al cunoașterii problematicii abordate în lucrare; cea de a doua parte, care totalizează 8 capitole, prezintă contribuția personală în realizarea obiectivelor propuse.

Studiile bibliografice au abordat o serie de aspecte ce vor fi prezentate în continuare.

În capitolul I sunt abordate aspectele economice ale cultivării ciupercilor comestibile și medicinale la nivel mondial și național, cu evidențierea impactului social și de mediu al tehnologiilor de cultivare.

În capitolul II sunt detaliate proprietățile nutriționale și medicinale și alte ale principalelor specii de macromicete, cu evidențierea principalilor compuși bioactivi de interes biotehnologic.

Având în vedere faptul că partea experimentală a abordat o serie de tehnici de biologie moleculară pentru caracterizarea speciilor de interes, în **capitolul III** au fost descrise tehnicile moleculare de actualitate utilizate pentru identificarea speciilor de macromicete.

Capitolul IV abordează potențialele aplicații industriale și biotehnologice ale enzimelor izolate din macromicete (enzime lignolitice), cu descrierea modului lor de acțiune.

Contribuția personală este detaliată în cadrul a 6 capitole experimentale, corelate cu obiectivele principale ale tezei, precedate de un capitol ce prezintă motivația și contextul derulării cercetărilor și finalizându-se cu un capitol de concluzii generale ale acestor cercetări. Cele șase capitole experimentale, după o scurtă introducere în tematica de interes, prezintă un subcapitol ce descrie metodologia utilizată, urmat de rezultate și discuții și finalizându-se cu o serie de concluzii parțiale ale cercetărilor.

Astfel, **capitolul V** descrie contextul experimentelor, menționează motivația și obiectivele generale, locațiile derulării experimentelor și echipamentele din acele locații.

În cadrul **capitolului VI** este prezentată obținerea *in vitro* a materialului fungic- ca sursa de inocul- de la speciile de ciuperci considerate a fi utile din punct de vedere biotehnic. S-a concluzionat că mediile de cultură solide testate, PDA și respectiv MEA, au fost optime pentru obținerea de inocul fungic pentru toate speciile de macromicete luate în studiu. Excepție au făcut specia de *Agaricus campestris* și *Hericium coralloides* pentru care mediul MEA a fost mai propice pentru creșterea miceliană. Materialul biologic obținut pe mediile sintetice solide s-a utilizat ca sursă de inocul pentru derularea experimentelor ulterioare.

Capitolul VII a abordat evaluarea potențialului de creștere a ciupercilor în condiții submerse și a condițiilor optime de cultură pentru obținerea de biomasă fungică, respectiv compoziția chimică a mediilor de cultură și influența evoluției pH-ului asupra producerii de biomasă. În comparație cu mediile solide, culturile lichide au avantajul obținerii a unei cantități ridicate de biomasă miceliană într-o perioadă scurtă de timp, într-un spațiu restrâns. Dintre cele 10 tipuri de ciuperci luate în studiu, speciile de *Ganoderma* au prezentat cel mai mare potențial de producere de biomasă în condiții submerse pe toate cele 6 variante de medii testate, iar *Lentinus edodes* cel mai mic potențial. Măsurând variațiile de pH pe parcursul perioadei de creștere a miceliului s-a constatat că acestea au scăzut gradual (în cazul culturilor pe mediile ME și PD) sau au crescut gradual (în cazul culturii pe mediul PMP), speciile testate având capacitatea să vireze pH-ul mediului în funcție de metaboliții elaborați extracelular. Cea mai drastică scădere de la valorile inițiale de pH, a fost înregistrată la *Laetiporus sulphureus* în mediile de cultură ME și PD (de la un pH înregistrat inițial de 5,4 și respectiv 5,0 la pH 2,8). În general, s-a constatat că acidifierea mediului de cultură (la pH 3,27) a dus la obținerea unei cantități reduse de biomasă.

Mediile cu conținut ridicat de glucoză (2%) au influențat favorabil producerea de biomasă. Astfel, pe mediul MCM s-a obținut o producția maximă de biomasă pentru *L. sulphureus*, *P. ostreatus* Florida și *F. velutipes*, iar mediul PD, a fost favorabil pentru obținerea de biomasă maximă pentru speciile: *L. edodes*, *G. applanatum*, *T. versicolor* și *H. coralloides*.

În **capitolul VIII** a fost evaluată activitatea antimicrobiană a unor extracte etanolice preparate din biomasă fungică obținută *in vitro* în condiții submerse, filtrată și uscată. Rezultatele au arătat că extractele etanolice de *G. applanatum*, *L. sulphureus*, *F. velutipes*, *T. versicolor*, *H. coralloides* și *A. campestris* au avut activități inhibitoare semnificative în special asupra *B. subtilis* subsp. spizizenii. Niciunul dintre extractele de ciuperci testate nu a avut activitate antimicrobiană în interacțiunea cu speciile de drojdii patogene *Candida albicans* ATCC 10231 și *Candida parapsilosis* CBS604.

Capitolul IX: a abordat analiza biochimică a extractelor hidroalcoolice obținute din corpuri de fructificare ai ciupercilor. S-au evaluat conținutul total de polifenoli și flavone în extractele fungice prin metode spectrofotometrice, corelat cu cromatografia în strat subțire (TLC), precum și conținutul în enzime ligninolitice. Cel mai ridicat conținut în fenoli a fost înregistrat în cazul extractului de *A. campestris* și de *P. ostreatus* var. Florida. Analiza TLC pentru detectarea flavonelor a relevat că toate extractele fungice testate au prezentat spoturi benzi de fluorescență caracteristice pentru flavonele C- glucozidice orientină și vitexină. Referitor la activitatea enzimatică, speciile care au înregistrat o valoare crescută pentru mangan peroxidază (MnP) au fost *P. ostreatus* var. Florida, urmat de *A. campestris*, *G. applanatum* și *L. sulphureus*; Lignin peroxidaza (LiP) a avut o activitate crescută la toate izolatele fungice testate, cu cele mai ridicate valori în cazul *A. campestris*, *P. ostreatus* var. Florida, *T. versicolor* și *F. velutipes*. Cea mai ridicată activitate a lacazei a înregistrat extractul de *P. ostreatus* var. Florida.

Capitolul X descrie investigarea *in vitro* a potențialului biotehnologic al unor specii de ciuperci de a decolora anumiți coloranți utilizați în industria textilă și s-a evaluat potențialul unor tulpini de *P. ostreatus* de a degrada petrolul brut din mediul de cultură. Dintre toate probele testate, numai speciile *T. versicolor*, *P. ostreatus* var. Florida și *G. applanatum* au prezentat capacitate de decolorare asupra tuturor coloranților textili de tip Bemacid. În ceea ce privește colorantul Roșu Congo (CR), nici un extract din cele testate nu a avut o acțiune de decolorare asupra acestuia. Tulpiniile de *Pleurotus ostreatus* s-au adaptat diferit la prezența prelolului în mediul de cultură și au prezentat grade diferite de dezvoltare. În toate variantele experimentale s-

a remarcat faptul că, miceliul dezvoltat pe mediile tratate cu petrol a prezentat o culoare maro închis, în comparație cu culoarea alb-gri tipică ciupercii, ceea ce înseamnă că *P. ostreatus* prezintă abilitatea de eliminare a poluantului prin acumularea acestuia în corpii de fructificare.

Capitolul XI abordează variabilitatea genetică în cazul unor tulpini comerciale de *Pleurotus* sp. provenite din diferite zone geografice și legătură lor genetică cu izolatele de *Pleurotus ostreatus* indigene. Analizele moleculare cu markeri pentru β - tubulină au evidențiat existența unui polimorfism atât la nivel intra - cât și interspecific. Toate varietățile de ciuperci comerciale europene au fost similare și comparabile cu izolatul natural din România. Diferențe semnificative s-au observat între tulpinile europene și cele din SUA. Concluzia generală a fost aceea că diversitatea genetică dintre populațiile de macromicete este strâns legată de distribuția lor geografică.

În ultimul capitol, **capitolul XII** sunt prezentate concluziile care se desprind ca urmare a rezultatelor obținute din analizele experimentale realizate.

Elementele de noutate și de originalitate ale tezei constau în următoarele aspecte: analiza unui număr mare și variat de specii de ciuperci izolate, cu proprietăți nutriționale/ medicinale de interes; cultivarea în condiții submerse și stabilirea unor medii culturale optime pentru obținerea unui randament maxim de biomasă fungică la unele specii sălbatice precum: *L. sulphureus*, *Ganoderma spp*, *F. velutipes*, *L. edodes*, *T. versicolor*, *H. coralloides*, specii mai puțin studiate. S-au stabilit medii optime de cultivare submersă la speciile de macromicete studiate, medii care, optimizate, ar putea produce cantități mari de biomasă și compuși bioactivi de mare valoare în procesele biotehnologice.