

REZUMAT

Al tezei de doctorat intitulată:

“Studii privind acțiunea antifungică a bacteriilor lactice”

Elaborată de drd. Adrian MATEI sub îndrumarea științifică a prof. univ. dr. Petruța Călina CORNEA.

Cuvinte cheie: bacterii lactice, activitate antifungică, fungi filamentoși, metaboliți, nanoparticule de argint, bioprezervare.

Scopul prezentei teze de doctorat este selectarea și identificarea unor tulpini de bacterii lactice cu activitate antifungică, având potențial de utilizare ca agenți de biocontrol și/sau bioprezervanți.

Obiectivele principale sunt reprezentate de:

1. Izolarea și identificarea unor tulpini fungice fitopatogene și/sau contaminante ale unor produse alimentare de origine vegetală, pentru utilizarea ulterioară în experimente ca fungi indicator.
2. Screeningul unor tulpini de bacterii lactice provenite din produse tradiționale românești fermentate pentru activitatea antifungică.
3. Stabilirea spectrului de acțiune antifungic al tulpinilor de bacterii lactice selectate
4. Identificarea și caracterizarea tulpinilor de bacterii lactice cu proprietăți antifungice
5. Stabilirea mecanismelor de acțiune antifungică ale tulpinilor bacterii lactice selectate
6. Aplicații practice ale efectului antifungic al bacteriilor asupra *Penicillium expansum* la mere
7. Aplicațiile bacteriilor lactice în biosinteza nanoparticulelor de argint și evaluarea efectului antifungic

Teza de doctorat este structurată în două părți (studiul bibliografic și cercetări proprii) alcătuite din cuprins, rezumatul tezei, introducere, 5 capitole și bibliografie.

PARTEA I, STUDIUL BIBLIOGRAFIC cuprinde:

Capitolul I – STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRILOR PRIVIND BACTERIILE LACTICE ȘI ROLUL ACESTORA ÎN CONTROLUL CREȘTERII FUNGILOR în care sunt sintetizate datele din literatură privind contaminarea cu fungi a produselor alimentare, principalele micotoxine, metodele de control al contaminării cu fungi filamentoși, generalități privind morfologia, fiziologia, particularitățile metabolice, clasificarea bacteriilor lactice și activitatea antifungică. Sunt prezentați factorii care influențează activitatea antifungică, principalii metaboliți cu rol antifungic produși de diferite specii de bacterii lactice, interacțiunile dintre aceștia și fungii filamentoși, precum și aplicațiile actuale ale bacteriilor lactice în industria

alimentară pentru biocontrolul contaminării fungice și implicarea bacteriilor lactice în biosinteza de nanoparticule de argint.

PARTEA a II-a, CERCETĂRI PROPRII este alcătuită din patru capitole care evidențiază scopul și obiectivele tezei de doctorat, materialele și metodele utilizate, rezultatele obținute și discuțiile referitoare la semnificația acestora în raport cu cercetările din domeniu, concluzii generale.

Capitolul II – SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRILOR EFECTUATE ÎN CADRUL TEZEI DE DOCTORAT

Capitolul III – MATERIALE ȘI METODE descrie metodele de caracterizare a tulpinilor de bacterii lactice, izolarea și caracterizarea de noi specii fungice, metodele de screening al bacteriilor lactice, de evidențiere a efectului antifungic pe medii solide și lichide. Sunt descrise metodele utilizate pentru evidențierea producerii de agenți antifungici (acizi organici, biosurfactanți, exopolizaharide, lacaze), tehnicile de cromatografie specifice utilizate, nanotehnologia de biosinteză a nanoparticulelor de argint și parametrii de caracterizare a acestora. Este prezentată structura experimentului *ex vivo* privind aplicarea bacteriilor lactice ca bioprezervanți ai merelor, precum și metodele statistice utilizate în prelucrarea rezultatelor.

Capitolul IV – REZULTATE ȘI DISCUȚII este structurat în 7 subcapitole care cuprind rezultatele cercetărilor efectuate în perioada 2012-2015 în cadrul stagiului doctoral, în laboratorul de genetică și inginerie, precum și în laboratorul de enzimologie al Facultății de Biotehnologii București. Pe parcursul acestui capitol sunt prezentate 113 figuri originale, reprezentând grafice, imagini fotografice, precum și 19 tabele.

În cadrul primului subcapitol se prezintă rezultate privind izolarea, identificarea și alcătuirea unei colecții de 11 noi tulpini fungice, aparținând genurilor *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichotecium* și *Stachybotrys* cunoscute ca fiind patogeni ai plantelor cultivate sau asociate cu contaminarea lanțului de produse alimentare, având proprietăți de virulență neatenuate de menținerea în cultură *in vitro*. Avantajul folosirii acestora ca fungi indicatori conferă bacteriilor lactice care îi inhibă posibilitatea utilizării în tehnologii de combatere eficiente.

Subcapitolul al 2-lea prezintă rezultatele screeningului a 38 de tulpini de bacterii lactice testate împotriva *Aspergillus ochraceus* și *Penicillium digitatum*. Din acestea, 30 de tulpini (79%) au prezentat activitate antifungică asupra ambelor specii. Tulpina de *P. digitatum* a fost mai sensibilă la acțiunea bacteriilor lactice testate, comparativ cu *A. ochraceus*. S-au evidențiat tulpinile: LAB 13, LAB 15, LAB 35, LAB 43, LAB 58, LAB 61, LAB 113, LAB 118 și LAB 122, care au determinat formarea unor zone de inhibare a creșterii miceliului cu un diametru de peste 25 mm, la cel puțin una din speciile fungice.

În continuare sunt prezentate rezultatele testelor de evidențiere a efectului antifungic a opt tulpini de bacterii lactice selectate asupra noilor izolate fungice și asupra unor tulpini din colecția laboratorului, cu realizarea spectrului antifungic. În urma testării efectului antifungic asupra *A.flavus* M4, *A.niger* M3, *A.ochraceus* P, *A.ochraceus* BZ, *A.ochraceus* 5S, *A.fumigatus*, *P.expansum*, *P.digitatum*, *F.verticillioides*, *T.roseum* și *S.chartarum*, s-a constatat că cele mai eficiente tulpini, asupra majorității speciilor indicatoare, au fost LAB 13, LAB 15, LAB 43, LAB 58 și Lpl.

Cel de-al patrulea subcapitol prezintă identificarea și caracterizarea tulpinilor de bacterii lactice selectate cu proprietăți antifungice.

Identificarea moleculară a bacteriilor lactice selectate prin BOX-PCR a evidențiat faptul că, dacă în cazul tulpinilor LAB 13, LAB 15, LAB 35 și LAB 58 profilul benzilor de ADN rezultate prin amplificare sunt similare celor obținute pentru tulpina de *Lactobacillus plantarum* Lpl, în cazul tulpinii LCM5 profilul ampliconilor este diferit. De asemenea, și în cazul tulpinilor LAB 64 și LAB 43 profilul ampliconilor prezintă diferențe importante, ceea ce susține ideea că aparțin unor specii diferite.

Folosirea ERIC-PCR a condus la obținerea unor rezultate mai puțin clare comparativ cu BOX-PCR dar, în general ele confirmă aspectele evidențiate în primul caz.

Identificarea tulpinilor de bacterii lactice ca aparținând speciei *Lb.plantarum* creează premisele utilizării practice ale acestora, ținând cont că bacteriile aparținând acestei specii sunt considerate ca fiind sigure pentru om și animale.

Tulpinile de bacterii lactice selectate au produs exopolizaharide, evidențiate prin microscopie optică și electronică de baleiaj (SEM), iar cantitatea acestora a variat în funcție de tulpină și de condițiile de cultură. Sunt prezentate efectele condițiilor de temperatură, pH și ale sursei de carbon asupra creșterii bacteriilor lactice și a producerii de EPS. Lactoza a fost glucidul preferat de majoritatea tulpinilor testate ca sursă de carbon pentru a produce exopolizaharide în cantitate mai mare. De asemenea, în mod surprinzător, cantitatea de EPS a fost în general mai mare atunci când valoarea pH a fost crescută (pH 7,5), iar temperatura optimă de cultivarea a fost $38\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Rezultatele obținute pentru toate tulpinile de bacterii lactice, în urma măsurării la 24 ore a densității optice (O.D.600nm), arată valori ridicate ale acestora în condiții de temperatură de 28°C , pH 7,5 și folosind ca sursă de carbon glucoza (10%).

Testarea prezenței lacazelor a arătat halouri slabe în cazul tulpinilor LCM5, Lpl, Lpa, LAB 43 și LAB 13, halourile clare detectate în cazul anumitor culturi mixte (*F.verticillioides* + Lpa; *F.verticillioides* + LAB 43; *T.roseum* + Lpa; *T.roseum* + LAB 15; *T.roseum* + LAB 43; *P.digitatum* + Lpa; *A.ochraceus* + LAB 15; *S.chartarum* + LAB 43) sugerând existența unor

interacțiuni specifice între metaboliții sintetizați de microorganismele care interacționează și ar interveni în fenomenele de antagonism biochimic dintre bacterii și fungi.

Cromatografia Pfeiffer a confirmat antagonismul dintre metaboliții tulpinilor de bacterii lactice și speciile fungice indicatoare, prin schimbarea aspectului cromatogramelor la zona de contact și formarea de linii de precipitare.

Subcapitolul cinci prezintă rezultate privind mecanismele de acțiune ale tulpinilor de bacterii lactice cu proprietăți antifungice. În general, aspectele de microscopie optică au arătat că modificările produse la nivelul miceliului fungic de către compușii difuzibili sintetizați de bacteriile lactice au fost asemănătoare: liza peretelui celular, vacuolizări, răsucirea hifelor, dar intensitatea lor este diferită. De asemenea, la nivelul zonelor de inhibare au fost observate și modificări la nivelul conidioforilor și conidiilor.

Testarea efectului bacteriilor lactice împotriva formării biofilmului fungic a arătat că tulpinile LAB 13, LAB 15 și LAB 43 au inhibat creșterea și dezvoltarea miceliului fungic la toate izolatele fungice testate și au blocat, prin metaboliții sintetizați, agregarea celulelor fungice, aderarea la pereții vasului de cultură și formarea biofilmului la majoritatea speciilor fungice indicatoare.

Cuantificarea producerii de acizi organici prin HPLC a evidențiat faptul că majoritatea tulpinilor testate produc acid lactic după primele 24 ore de incubare, iar nivelul acestui acid are tendință de creștere în următoarele zile și cantități mici de acid acetic, acid fenilactic și hidroxifenilactic. Eficiența bacteriilor în privința producerii de acid lactic a fost în ordine descrescătoare: LAB 15 > Lpl > LAB 35 > LAB 58 > LAB 43.

Tulpina LAB 43 a prezentat o acțiune antifungică ridicată față de majoritatea fungilor indicatori față de care a fost testată și un nivel foarte scăzut al acizilor organici de interes, fapt care semnifică posibilitatea intervenției altor mecanisme de acțiune antifungică.

Rezultatele obținute în urma experimentelor cu filtrate de cultură sterile și sterile neutralizate confirmă faptul că la majoritatea tulpinilor de bacterii lactice activitatea antifungică se datorează sintezei de acizi organici. În cazul tulpinilor LAB 43 și LAB 58, se poate afirma că activitatea inhibitoare se datorează atât biosintezei de acizi organici (față de anumite ținte fungice), cât și producerii altor agenți antifungici. În plus, pentru unele tulpini bacteriene, activitatea antifungică este de tip fungicid (așa cum este cazul tulpinilor LAB 43 și LAB 58), în timp ce pentru altele acțiunea este fungistatică, scăzând pe parcursul unei incubări prelungite.

Rezultatele indică faptul că tulpinile de bacterii lactice au produs biosurfactanți cu caracter anionic.

Capacitatea biosurfactanților produși de tulpinile de bacterii lactice de a adera la suprafețele solide ar putea constitui un nou mijloc eficient de combatere a contaminării cu fungi

a produselor alimentare și de a inhiba dezvoltarea acestora. De altfel, corelând rezultatele legate de biosurfactanți cu cele legate de inhibarea producerii agregatelor miceliene și a biofilmului fungic se poate aprecia faptul că, cel puțin în cazul tulpinilor LAB 13, LAB 35 și LAB 43 aceste proprietăți sunt legate de producerea de biosurfactanți.

Aplicația practică privind efectul antifungic al bacteriilor lactice, prezentată în cadrul subcapitolului șase a demonstrat că tulpinile Lpl, LAB 43, LCM5 și Lpa au prezentat efect protector împotriva *Penicillium expansum* la merele din soiul Ionatan de Voinești, având potențial crescut în biocontrol, constituind o alternativă la produsele chimice de combatere.

Subcapitolul șapte prezintă elemente de noutate privind utilizarea unor tulpini de bacteriilor lactice izolate din produse tradiționale românești fermentate în biosinteza nanoparticulelor de argint. Nanoparticulele de argint biosintetizate cu ajutorul filtratelor de bacterii lactice și caracterizate prin microscopia electronică cu transmisie (TEM) au prezentat, în general, o bună dispersie, forme aproximativ sferice, cu striții paralele care atestă structura cristalină și dimensiuni sub 45 nm.

Tulpinile care au produs nanoparticulele de argint cu cea mai intensă activitate antifungică față de *Aspergillus flavus* M4, *Aspergillus ochraceus* BZ și *Penicillium expansum* au fost LAB 132, LCM 5, LAB 58 și LAB 35, urmate de LAB 43 și LAB 13, la care activitatea antifungică a fost diferită față de speciile fungice, dar de cele mai multe ori superioară tulpinilor de referință (Lpa și Lpl). Activitatea antifungică exercitată de nanoparticulele de argint sintetizate de tulpinile de bacterii lactice s-a păstrat mai mult de 14 zile, sugerând efectul fungicid al acestora.

Capitolul V – CONCLUZII cuprinde concluziile generale ale experimentelor efectuate și sublinierea contribuțiilor originale la studiul efectului antifungic al bacteriilor lactice și la posibilele aplicații practice ale acestora în nanotehnologii.

Originalitatea și caracterul inovativ al acestei lucrări constă în îmbunătățirea metodelor de bioconservare și biocontrol prin utilizarea unor noi tulpini de bacterii lactice performante, capabile să producă compuși antagoniști cu impact asupra controlului fungilor fitopatogeni și/sau contaminanți ai produselor alimentare de origine vegetală.

Bibliografia cuprinde 283 de titluri ale lucrărilor de specialitate publicate la nivel național și internațional.