

REZUMAT

al tezei de doctorat intitulată:

SELECTAREA ȘI CARACTERIZAREA UNOR TULPINI MICROBIENE PRODUCĂTOARE DE METABOLIȚI UTILI ÎN PROCESELE BIOTEHNOLOGICE

Doctorand: **MICU Georgiana**

Coordonator științific: **Prof. Univ. Dr. CORNEA Petruța Călina**

CUVINTE-CHEIE: L-asparaginază, protecția plantelor, activitate antifungică, micotoxine, biofilm

Majoritatea microorganismelor prezintă un rol important pentru mediul înconjurător, aducând diferite aporturi industriei alimentare, domeniului medical cât și agriculturii. O multitudine de microorganisme sunt capabile să producă compuși biologic activi valoroși, printre aceștia numărându-se și enzimele.

Enzimele sunt structuri proteice ce se găsesc la nivelul corpului uman și animal, la nivelul plantelor cât și al microorganismelor. Acești compuși sunt capabili să catalizeze reacții ce stau la baza desfășurării normale a funcțiilor metabolice. Enzima L-asparaginază joacă un rol important pentru medicină. Aceasta este considerată una dintre cele mai studiate enzime, focusul actual fiind pe noile surse care să o producă într-o formă cât mai pură.

Cercetările teoretice sunt conturate sub forma a două capitole ce vizează subiecte referitoare la enzima L-asparaginază și la obținerea unor compuși biologic activi cu importanță în agricultură.

În primul capitol, prezenta lucrare se axează pe aspectele teoretice și practice ale enzimei L-asparaginază. Aceasta este o enzimă deosebit de importantă pentru domeniul medical deoarece ajută la tratarea diferitelor afecțiuni neoplazice, fiind folosită cu succes în schemele de chimioterapie. Utilitatea acesteia este foarte mare, iar cererea globală este în continuă creștere. În practică, enzima L-asparaginază este produsă de bacteria *Escherichia coli*, iar un mare dezavantaj al acestei metode este legat de faptul că enzima L-asparaginază rezultată produce atât efecte benefice cât și reacții secundare grave. Aceste reacții adverse sunt datorate faptului că enzima nu este produsă sub o formă pură, formându-se alături de ea și alte enzime de contaminare. Pe lângă marea utilitate din medicină, enzima L-asparaginază se folosește și în industria alimentară. Această enzimă ajută la reducerea compușilor Maillard care se formează în produsele alimentare amidonoase. Ea are rolul de a reduce acrilamida, considerată compus toxic care se formează în produsele bogate în carbohidrați și gătit la temperaturi înalte. Importanța enzimei a fost evidențiată în diferite produse alimentare supuse tratamentului termic.

În unele încercări enzima a reușit să își mențină activitatea după mai multe cicluri de utilizare, demonstrându-și potențialul pentru aplicări industriale.

În cercetările teoretice se evidențiază faptul că enzima L-asparaginază este produsă în principal de bacterii, dar și de unele plante. Această enzimă izolată din diferite surse prezintă parametri fizico-chimici și cinetici specifici, selectându-se cea care este cea mai apropiată de forma secretată de *Escherichia coli*. Aceste cercetări teoretice întăresc ideea că, sursele microbiene prezintă caracteristici promițătoare pentru obținerea unei enzime cât mai pure. Cel de-al doilea capitol al cercetărilor teoretice, urmărește importanța diferitelor microorganisme producătoare de L-asparaginază în agricultură. Acest domeniu se confruntă cu o serie de probleme datorate în principal schimbărilor climatice.

Unul dintre aspectele importante care vine în ajutorul agriculturii este conturat pe ideea de a obține compuși antimicrobieni cu ajutorul microorganismelor. Acești compuși au ca scop reducerea sau chiar eliminarea contaminanților plantelor.

O serie de compuși studiați de-a lungul timpului au demonstrat activități antifungice și antibacteriene puternice, sugerând potențialul lor pentru utilizarea în biocontrolul plantelor. Aceste activități sunt deosebit de importante pentru dezvoltarea unor alternative ecologice la pesticidele chimice tradiționale.

Contribuțiile personale sunt conturate în două capitole ce au la bază totalitatea informațiilor din cadrul cercetărilor teoretice. Cercetările proprii din primul capitol au avut drept obiective: 1) Izolarea unor noi microorganisme capabile să producă enzima L-asparaginază liberă de alți compuși de contaminare; 2) Evaluarea capacității microorganismelor izolate de a produce enzima de interes atât prin metode calitative cât și prin metode cantitative. Prima parte a lucrării oferă o bază pentru a înțelege modul de acțiune, modul de obținere cât și importanța enzimei L-asparaginază, în timp ce partea practică validează potențialul microorganismelor testate de a produce această enzimă.

Obiectivele specifice au inclus evaluarea posibilităților de a obține enzima L-asparaginază într-o cantitate cât mai mare din surse biologice noi, fără să conțină alte enzime de contaminare. Microorganismele testate au fost atât din colecția Facultății de Biotehnologii, cât și izolate noi din sol. Acestea au fost cultivate pe medii de cultură specifice pentru a vedea potențialul lor de a produce enzima de interes. Experimentele s-au completat prin cuantificarea producției enzimatice cu ajutorul unei metode spectrofotometrice.

Pe parcursul experimentelor practice din capitolul trei, s-au testat bacterii din genul *Streptomyces* sp., rizobacterii, bacterii endofite, drojdii și fungi privind obținerea enzimei L-asparaginază liberă de glutaminază, urează sau NaNO_3 . Evaluarea capacității microorganismelor selectate de a produce enzima de interes s-a realizat atât prin metode rapide calitative, cât și prin metode cantitative. Aceste metode au permis o evaluare mai detaliată a potențialului producător al fiecărei tulpini microbiene. Rezultatele s-au uniformizat în urma cunatificării enzimatice dinamice, pe parcursul mai multor zile, rezultând faptul că cea mai mare cantitate enzimatică a fost produsă de

genurile *Streptomyces* (2 tulpini), *Bacillus* (4 tulpini), bacteriile endofite (2 tulpini), cât și de noile izolate bacteriene din sol, GM1, GM3 și GM18.

Cercetările proprii din partea a doua a lucrării, au avut ca punct de pornire rezultatele din primul capitol practic astfel încât obiectivul principal se axează pe evaluarea potențialelor unor tulpini microbiene producătoare de enzime de interes biomedical în domeniul protecției plantelor. Pe baza acestei idei s-au conturat două obiective secundare: 1) Determinarea capacității tulpinilor bacteriene selectate de a produce metaboliți inhibitori pentru dezvoltarea unor fitopatogeni; 2) Testarea proprietăților de stimulare a creșterii și dezvoltării plantelor de către tulpinile selectate.

Pe lângă producerea de L-asparaginază, în capitolul patru, tulpinile selectate au fost evaluate privind capacitatea lor de a produce compuși care inhibă dezvoltarea fitopatogenilor și care ajută la stimularea creșterii plantelor. Aceste cercetări deschid calea pentru utilizarea acestor microorganisme în agricultură, contribuind la obținerea unor recolte mai sănătoase și mai productive.

Tulpinile bacteriene selectate au fost testate privind activitatea lor antimicrobiană împotriva unor patogeni comuni ai plantelor. Rezultatele au arătat că anumite tulpini, în special cele din genul *Bacillus* sp., au prezentat o activitate antimicrobiană semnificativă. Aceste tulpini au inhibat creșterea unor patogeni precum *Fusarium graminearum*, un agent patogen al grâului, prin producerea de compuși biologic activi cu efecte antifungice. O activitate antifungică puternică a prezentat-o tulpina de *Bacillus* sp. GM3 care a inhibat creșterea tuturor fungilor testați, iar efectele s-au menținut pe toată perioada de incubare.

Activitatea antifungică a microorganismelor este atribuită unor proprietăți naturale care permit producerea de compuși variați. Acești compuși acționează asupra fungilor prin diferite mecanisme, inclusiv competiția pentru nutrienți, antibioza (producerea de biosurfactanți și/sau antibiotice), sinteza de enzime hidrolitice. În plus, anumite microorganisme pot stimula creșterea plantelor prin sinteza de fitohormoni, producerea de siderofori, fixarea azotului, solubilizarea fosfatului și producerea unor metaboliți secundari cu efecte complexe. Evaluarea genetică a capacității tulpinii bacteriene GM3 de a produce biosurfactanți a evidențiat faptul că aceasta posedă genele *ituD*, *fen*, *bmyA* și *ituA*, responsabile de sinteza unor compuși valoroși pentru agricultură.

Determinarea capacității tulpinilor bacteriene de a produce metaboliți cu proprietăți antifungice a sugerat faptul că tulpinile selectate pot descompune peretele celular fungic prin secretarea unor compuși hidrolitici (proteaze, chitinaze, celulaze), evidențiindu-se o bună producție în cazul tulpinilor GM3, GM12 și GM21. Pe lângă acestea s-a mai urmărit impactul tulpinii bacteriene GM3 asupra producției de micotoxine rezultând faptul că tulpina bacteriană reduce semnificativ nivelul de zearalenonă și ochratoxină.

În capitolul patru s-a mai urmărit formarea de biofilm de către bacteriile selectate, evidențiindu-se capacitatea lor de a coloniza rădăcinile plantelor și de a le proteja împotriva stresului. Experimentele au arătat că bacteriile testate au fost capabile să formeze biofilme puternice, ceea ce duce la creșterea capacității de colonizare și protecție a plantelor. Această abilitate este crucială pentru aplicarea biotehnologică a

acestor bacterii în agricultură, asigurând o simbioză eficientă și durabilă între bacterii și plante.

Tulpinile bacteriene testate nu doar că au contribuit la protecția plantelor, dar au și îmbunătățit ratele de germinare și dezvoltare a plantelor. Un alt aspect important al cercetării a fost evaluarea impactului tratamentului bacterian asupra germinării și dezvoltării plantelor. S-a observat că boabele de grâu tratate cu tulpina bacteriană GM3 au germinat rapid (rată de 95%) și au produs plante viguroase, iar cele tratate cu patogenul *Fusarium graminearum*, au prezentat o rată de germinare mai redusă (61,6%) și plante firave. Aceste rezultate subliniază potențialul bacteriilor selectate de a stimula creșterea plantelor și de a le proteja împotriva patogenilor. Tulpina bacteriana *Bacillus* sp. GM3, în urma acestor teste poate fi considerată o variantă bună pentru biocontrolul patogenilor fungici și pentru stimularea creșterii plantelor, oferind o alternativă sustenabilă la fungicidele chimice, promovând astfel agricultura ecologică.

Pe baza rezultatelor obținute, tulpina *Bacillus* sp. GM3 este considerată un candidat promițător pentru aplicații în protecția plantelor. Totuși, sunt necesare informații suplimentare privind mecanismele implicate în activitatea antifungică și potențialul de biostimulare al acestei tulpini.

Totalitatea cercetărilor s-au axat pe evidențierea potențialului unor tulpini microbiene de a produce enzima L-asparaginază de puritate înaltă, cu aplicații promițătoare în domeniul medical, cât și utilizarea acestor tulpini în protecția plantelor. Aceste rezultate subliniază importanța izolării și caracterizării detaliate a microorganismelor pentru a maximiza beneficiile biotehnologice.

La finalul lucrării sunt prezentate concluziile generale ale tuturor capitolelor elaborate, sumarizând elementele de noutate, cât și o serie de recomandări pentru cercetările viitoare. Cercetările viitoare se pot baza pe optimizarea proceselor de producție și purificare a enzimei L-asparaginază ducând la obținerea unui produs cu randament ridicat și o eficiență crescută.

În ansamblu, recomandările subliniază potențialul biotehnologic al tulpinilor bacteriene selectate, producătoare de L-asparaginază pentru protecția plantelor și stimularea creșterii acestora. Necesitatea continuării cercetărilor este explicită pentru a înțelege mai bine mecanismele implicate și pentru a optimiza aplicarea acestor microorganisme în agricultură.