

REZUMAT

al tezei de doctorat intitulată:

CERCETĂRI PRIVIND DIVERSITATEA ȘI BIOACTIVITATEA CIUPERCILOR ENDOFITE DIN FLORA SPONTANĂ IDENTIFICATĂ PE SOLURI POLUATE CU HIDROCARBURI

Doctorand: **GURĂU M. Lorena-Roxana**

Coordonator științific: **Prof. univ. Dr. ILIE Leonard**

CUVINTE CHEIE: *diversitate, ciuperci endofite, soluri poluate, biomecanisme, ecologie*

De-a lungul evoluției, s-a stabilit o interconexiune profundă între viața fungică și cea a plantelor, a solului și implicit a omului. Degradarea mediului, pierderea biodiversității, deteriorarea terenurilor și a apei contribuie la problemele cu care se confruntă omenirea. Endofitele, microorganismele care se află în țesuturile plantelor vii, sunt surse relativ nestudiate ce dețin un rol ecologic semnificativ în ecosistemele plantelor și un potențial imens de exploatare în agricultură, industrie și medicină.

Teza de doctorat intitulată **„CERCETĂRI PRIVIND DIVERSITATEA ȘI BIOACTIVITATEA CIUPERCILOR ENDOFITE DIN FLORA SPONTANĂ IDENTIFICATĂ PE SOLURI POLUATE CU HIDROCARBURI”** reprezintă o analiză aprofundată asupra importanței comunității endofite și a biomecanismelor acestora implicate în degradarea unor contaminanți, în condiții de laborator.

Teza de doctorat cuprinde două părți ce însumează 4 capitole. Prima parte cuprinde studiul bibliografic, iar partea a doua reprezintă cercetările proprii.

Studiul bibliografic cuprinde primele două capitole intitulate **„Stadiul actual al cunoașterii privind comunitățile de ciuperci endofite”** și **„Implicarea comunităților endofite în procesul de degradare al hidrocarburilor”**. Primul capitol prezintă o varietate de aspecte ce vizează microorganismele endofite și principiile acestora. Pe baza studiilor efectuate până în prezent, sunt evidențiate informații cu privire la importanța, transmiterea, colonizarea, ecologia, distribuția, interacțiunea cu planta gazdă și aplicabilitatea ciupercilor endofite.

Capitolul II expune date cu privire la situația actuală a solurilor poluate cu hidrocarburi în România, precum și efectele poluării cu hidrocarburi asupra florei spontane și asupra solului. Pe lângă acestea, capitolul este completat și cu noțiuni legate de biomecanismele fungice implicate în degradarea contaminanților.

Cea de-a doua parte a tezei detaliază în două capitole scopul și obiectivele acesteia, cadrul natural și condițiile climatice, materialele și metodele de lucru și rezultatele obținute cu privire la diversitatea comunităților endofite din flora spontană și evaluarea bioactivității acestora sub influența factorilor cercetați.

Scopul prezentei teze de doctorat a constat în efectuarea de cercetări privind evaluarea diversității și a bioactivității unei comunități de ciuperci endofite izolate din rădăcini de plante identificate în flora spontană prezentă pe soluri poluate cu hidrocarburi. Pentru un demers cât mai bun în realizarea acestuia, dar și a obiectivelor, cercetările au fost efectuate în laborator.

Examinările din laborator au fost mult mai complexe și au avut ca obiectiv izolarea ciupercilor endofite și identificarea lor prin metode de morfologie și tehnici moleculare, analize în ceea ce privește ecologia și diversitatea comunității de ciuperci endofite și evaluarea capacității de degradare a compușilor poluanți a acestora pe mediu nutritiv sintetic. Cercetările din câmp au vizat selecționarea locațiilor cu potențial de poluare cu hidrocarburi și prelevarea mostrelor vegetale și a celor de sol.

Capitolul III, intitulat **„Cercetări privind diversitatea comunităților endofite din flora spontană”** expune inițial date cu privire la cadrul natural, locația principală și anume orașul Băicoi, județul Prahova și punctele de lucru secundare ce au vizat zone din proximitatea unor sonde de extracție petrolieră și o zonă cu salinitate ridicată. Este prezentată metodologia de lucru vizavi de prelevarea probelor de sol, a mostrelor de plante vegetale luate în studiu (*Cichorium intybus*, *Xanthium strumarium*, *Salicornia europaea* și *Suaeda maritima*), descrierea acestora, precum și modul de desfășurare în laborator a izolării ciupercilor endofite din fragmente radiculare pe un mediu nutritiv cu contaminant (PDA cu motorină/PDA cu ulei de motor), iar ulterior purificarea și conservarea acestora. Tot în acest capitol este prezentată identificarea izolatelor la nivel macroscopic, microscopic și molecular. Conform rezultatelor de similitudine a secvențelor de ADN utilizând regiunea ITS, s-au identificat în specia *Cichorium intybus* 12 genuri și 23 de specii, din specia *Xanthium strumarium* 5 genuri și 8 specii, din specia *Suaeda maritima* 5 genuri și 9 specii, iar din specia *Salicornia europaea* 8 genuri și 17 specii.

În vederea analizei diversității comunităților endofite, a fost calculată statistic frecvența de colonizare (FC%) ca numărul total de fragmente dintr-un eșantion (plantă/zona rădăcinii) colonizat de un OTU împărțit la numărul total de fragmente per eșantion, precum și indicii de diversitate Margalef, Shannon și Simpson. Cu ajutorul RStudio care este un limbaj de programare pentru calcul statistic și grafică, au fost interpretate datele în ceea ce privește analiza elementelor de ecologie ale comunităților fungice endofite și asocierea acestora. Capitolul conține și partea de rezultate și discuții cu privire la frecvența și colonizarea genurilor fungice în fiecare specie de plantă, parte radiculară și mediu. În cazul speciei *Cichorium intybus*, considerând cele două medii nutritive (PDA + motorină și PDA + ulei de motor), a fost observat un număr total de 10

genuri, dintre care cinci genuri comune în cele două medii (*Alternaria*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Mucor*), și cinci genuri unice (*Aspergillus*, *Beauveria*, *Clonostachys*, *Paraphoma*, *Penicillium*). Genul *Fusarium* a prezentat cea mai mare frecvență, urmat de *Alternaria* și *Diaporthe*, în ambele medii. Considerând un singur mediu (PDA + ulei de motor), cea mai ridicată valoare de frecvență a fost înregistrată de genul *Aspergillus* (FC% = 19,45), urmat de *Beauveria* și *Clonostachys* cu valori mult mai scăzute (FC% = 5,5 și respectiv 2,8).

În cazul speciei *Xanthium strumarium*, considerând ambele medii nutritive (PDA + motorină și PDA + ulei de motor) s-au identificat cinci genuri fungice, dintre care trei genuri comune (*Alternaria*, *Macrophomina*, *Fusarium*), urmate de două genuri unice (*Aspergillus*, *Talaromyces*). Similar ca în cazul speciei *Cichorium intybus*, genul *Fusarium* a avut cea mai ridicată valoare de frecvență de colonizare (FC% = 36,1), urmat de *Alternaria* și *Macrophomina* (FC% = 11 și 8,3), în ambele medii. La specia de plantă *Salicornia europaea*, pentru cele două medii nutritive (PDA+ motorină și PDA+ ulei de motor), au fost identificate nouă genuri fungice, dintre care șase genuri izolate pe ambele medii (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Monosporascus*, *Phaeosphaeriaceae* sp., *Pleospora*, *Aporospora*), urmate de trei genuri unice (*Dimorphosporicola*, *Laburnicola*, *Tremateia*). Rezultatele frecvenței de colonizare indică și că genurile *Fusarium* și *Pleospora* au prezentat valori ridicate (FC% = 22,2) față de celelalte patru genuri comune. Dintre cele trei genuri singulare, *Tremateia*, a prezentat cea mai scăzută frecvență comparativ cu celelalte două genuri (FC% *Laburnicola* = 5,5 și FC% *Dimorphosporicola* = 8,3). În urma determinării genurilor din specia de plantă *Suaeda maritima*, a fost observat un număr total de cinci genuri fungice izolate pe ambele medii nutritive (PDA+ motorină și PDA+ ulei de motor), dintre care patru genuri comune (*Alternaria*, *Laburnicola*, *Monosporascus*, *Phaeosphaeriaceae* sp.), și un singur gen unic (*Clonostachys*), obținut doar din PDA contaminat cu motorină.

În ceea ce privește calculul indicilor de diversitate a genurilor fungice în speciile de plante, *Cichorium intybus* a înregistrat cel mai mare număr de genuri detectate, altfel spus, bogăția speciilor fungice, (Species Richness index = 14), comparativ cu celelalte trei plante *Salicornia europaea* (Species Richness index = 9); *Xanthium strumarium* (Species Richness index = 5) și *Suaeda maritima* (Species Richness index = 5). Indicele de diversitate Shannon a arătat valori de abundență și echitabilitate a distribuției speciilor aproape similare pentru *Salicornia europaea* (Shannon-Wiener Index = 1,87) și *Cichorium intybus* (Shannon-Wiener Index = 1,77), ușor redusă diversitatea în *Suaeda maritima* (Shannon-Wiener Index = 1,42), și foarte scăzută în cazul lui *Xanthium strumarium* (Shannon-Wiener Index = 0,98). Diversitatea lui Simpson privind numărul de specii prezente și abundența fiecăreia, a avut valori asemănătoare în trei din cele patru specii de plante: *Salicornia europaea* (Simpson Index = 0,82), *Cichorium intybus* (Simpson Index = 0,77) și *Suaeda maritima* (Simpson Index = 0,74), pe când specia

Xanthium strumarium a deținut valoarea cea mai mică (Simpson Index = 0,49), arătând un caracter dominant al comunității fungice.

Capitolul IV prezintă două testări *in vitro* ce au avut ca obiective evaluarea bioactivității endofitelor fungice prin comportamentul ciupercilor pe un mediu contaminat și evaluarea capacității de biodegradare a acestora asupra hidrocarburilor.

Inițial a fost urmărită viteza de creștere a ciupercilor, în funcție de mărimea diametrului micelian format la 24, 48, 72 ore până la 10 zile, în acest fel clasificându-le în două categorii: ciuperci cu creștere rapidă și ciuperci cu creștere lentă.

Ulterior s-au efectuat evaluări și observații privind potențialul acestor sușe obținute din speciile spontane de *Cichorium inthybus*, *Xanthium strumarium*, *Salicornia europaea* și *Suaeda maritima*, de a crește pe mediu cu concentrații de până la 20% hidrocarburi (ulei de motor, motorină și petrol) și examinarea capacității de degradare a poluanților a acestora care au prezentat cel mai mare indice de toleranță pe mediu contaminat, folosind o tehnică bazată pe indicatorul de decolorare redox 2,6-Diclorofenol-indofenol. Potențialul de creștere al ciupercilor endofite pe mediu tratat cu hidrocarburi a fost verificat prin primul experiment, care a fost realizat în două etape, pe două seturi diferite de concentrații ale contaminanților (0,1%, 0,5% și 1% (setul 1) și 5%, 10% și 20% (setul 2). Au existat de asemenea și variante martor, la care nu s-au adăugat contaminanți (notate CTRL- control).

Întregul experiment s-a realizat în mediu steril, la hota cu flux laminar și în plăci Petri cu diametrul de 90 mm. Soluțiile stoc cu contaminanți s-au păstrat la 5°C pentru 1-2 luni. Testarea s-a efectuat în grupuri restrânse de ciuperci, maxim 10 ciuperci, pentru evitarea posibilelor contaminări. Cantitatea de PDA pentru fiecare volum de lucru a fost sterilizată în prealabil fără contaminant (ulei motor/motorină) pentru a se evita evaporarea hidrocarburilor. Volumul final pentru fiecare placă Petri a fost de 5 ml, volum alcătuit din mediu nutritiv PDA+ SS. Pentru primul set de testare, la concentrația de 0,1% au rezultat 5 μl SS+ 4995 μl PDA, pentru concentrația de 0,5% au rezultat 25μl SS+ 4975 μl PDA, iar pentru concentrația de 1% au rezultat 50μl SS+ 4950 μl PDA într-un volum final de 5 ml. Pentru setul al doi-lea de testare, au rezultat 250 μl SS+ 4750 μl PDA pentru concentrația de 5%, 500 μL SS+ 4500 μL PDA pentru concentrația de 10% și 1000 μl SS+ 4000 μl PDA pentru concentrația de 20%. Pentru inocularea fiecărei sușe pe cele nouă plăci Petri aferente tratamentelor, martorului și fiecărei concentrații/set de testare, s-au decupat câte 72 inoculi cu diametrul de 4 mm, din cele mai recente purificări.

Pentru fiecare din cei opt inoculi/fiecare placă s-au măsurat câte 2 diametre de creștere. Momentul optim efectuării măsurătorilor a vizat ca nici una din cele opt creșteri miceliene să nu se întrepătrundă cu o alta. Prin urmare, pentru fiecare izolat fungic s-au efectuat câte 144 de măsurători, ce au fost notate în tabele, alături de data la care s-au efectuat și timpul dintre notări (creșterea ciupercii), alcătuiind o bază de date electronică. Valorile medii ale măsurătorilor au fost necesare în evaluarea finală a comportamentului izolatelor pe mediu poluat la diferite concentrații și la calculul indicelui de toleranță la

stres pe mediu cu hidrocarburi. S-a considerat că, cu cât valorile indicelui au fost peste valoarea de 1, cu atât toleranța la stres a fost mai ridicată.

Analiza bioactivității ciupercilor endofite și interpretarea datelor statistice s-a realizat cu ajutorul programului RStudio. Pentru a putea observa și analiza tendințele și preferințele sușelor între grupări și între tratamente la aceeași concentrație de contaminant, s-au realizat grafice de sinteză (Clustering Key) și regresie non-parametrică (loess regresion). Prin urmare, în urma tuturor calculelor și măsurătorilor, putem considera că răspunsul la tratamente (motorină și ulei de motor) variază semnificativ între tulpini, indicând diferențe genetice sau fiziologice în capacitatea de a face față poluanților petrolieri.

Toate genurile fungice analizate prezintă o sensibilitate mai mare la motorină decât la uleiul de motor. Motorina are un efect inhibitor puternic asupra creșterii coloniilor fungice pentru majoritatea genurilor, cu scăderi semnificative ale diametrului la concentrații mari. Uleiul de motor tinde să aibă un efect stimulator ușor la concentrații mici pentru multe genuri, urmat de o inhibare moderată la concentrații mari. Genuri precum *Aspergillus*, *Diaporthe* și *Talaromyces* tind să prezinte o toleranță bună atât la motorină, cât și la uleiul de motor, făcându-le potențiale candidate pentru studii de bioremediere. Genuri precum *Alternaria*, *Fusarium* și *Mucor* sunt extrem de sensibile la motorină, dar tolerează relativ bine uleiul de motor.

Ce-a de-a doua parte a capitoului IV s-a concentrat pe examinarea capacității de degradare a hidrocarburilor petroliere, a izolatelor fungice ce au marcat indice de toleranță ridicat, pe mediu contaminat cu ulei de motor/motorină și petrol, folosind o tehnică bazată pe indicatorul redox 2,6-Diclorofenol- indofenol. Prin adăugarea în mediul de cultură a acestui reactiv, am putut observa capacitatea ciupercilor de a utiliza hidrocarburi ca sursă de carbon și energie, prin reacția de decolorare a acestuia (de la albastru spre incolor).

Pentru acest experiment s-au folosit tratamentele anterioare la care s-a adăugat și petrolul în concentrație de 10%. Astfel, pe lângă reacția de degradare am putut analiza și creșterea miceliană pe un contaminant nou. Au fost selectate cinci sușe ce au avut o creștere miceliană de șapte zile. Criteriul de alegere a avut în vedere uniformitatea miceliului în placă și categoria de creștere (toate sușele fiind cu creștere rapidă). Pe fiecare placă s-au imersat câte 3 inoculi la distanțe relativ egale. Astfel din fiecare ciupercă au fost decupate câte 54 de inoculi necesari pentru toate variantele de testare și varianta martor (tratament ulei motor/ motorină/petrol).

Observațiile au urmărit măsurarea razei zonei de decolorare la șapte zile și măsurarea diametrului micelian pentru indicele de toleranță, în urma reacției de oxidare, pentru fiecare izolat/placă Petri și examinarea vizuală a gradului de decolorare. Totodată s-au efectuat fotografii pentru a urmări formarea haloului de decolorare la 7, 10 și 15 zile. Vizualizarea datelor statistice s-a realizat prin diagrame de tip boxplot (folosind

libraria "ggplot2" în RStudio) cu distribuția acestora reprezentând valoarea minimă, cuartila inferioară, mediana, cuartila superioară și valoarea maximă.

Analiza haloului a avut în vedere media diametrelor razelor de decolorare pentru fiecare izolat/fiecare mediu cu tratament (ulei de motor, motorină și petrol) și fiecare concentrație de PDA (0,1%, 1% și 100%). În urma observațiilor vizuale și procentuale, putem afirma că în cazul petrolului de 10% cea mai mare putere de biodegradare a fost în prezența CEH19 cu valorile cele mai reprezentative, pentru uleiul de motor capacitatea de degradare cea mai ridicată a fost în prezența CEH34, iar în ceea ce privește biodegradarea motorinei, CEH43 a evidențiat procentul cel mai semnificativ al gradului de decolorare. Toate cele trei izolate aparțin genului *Fusarium*, ceea ce-l face reprezentativ pentru acest studiu.

Prin urmare, se consideră că ciupercile endofite evaluate au un potențial semnificativ pentru biodegradarea hidrocarburilor, cu accent pe genul *Fusarium*, în special în condiții optime de absorbție, astfel concentrația mai mare de PDA stimulând activitatea de degradare și indicând ideea că nutrienții joacă un rol major în procesele de biodegradare.

Prezenta lucrare de doctorat conține un număr de 159 de pagini, incluzând un număr de 6 tabele și 54 de figuri.

Rezultatele obținute în urma cercetărilor desfășurate au fost valorificate în 3 articole publicate astfel, un articol indexare ISI: Impact Factor: 0.161 (2024) și două articole (Indexare bază de date BDI). Bibliografia tezei cuprinde 199 surse (cărți, articole în reviste de specialitate, lucrări științifice, surse web).

Rezultatele obținute în prezenta teză de doctorat contribuie la completarea și îmbunătățirea cunoștințelor existente.