

PROIECT 105/2012: *Selectarea unor noi tulpini funcționale de bacterii lactice izolate din materiale vegetale, cu aplicații în biotehnologiile alimentare (PLANTLAB)*

ETAPA I

“Crearea unei colecții de microorganisme a proiectului”

REZUMAT

Fructele și legumele proaspete și/sau fermentate, respectiv cerealele fermentate (de exemplu borșul), reprezintă o parte importantă a dietei zilnice în România, alături de alimentele de origine animală. Din păcate, fructele și legumele proaspete au o perioadă de valabilitate redusă, datorită faptului că au un conținut ridicat de apă și nutrienți, care favorizează dezvoltarea de bacterii, drojdii, mucegaiuri, unele dintre acestea producătoare de toxine (de exemplu micotoxine) sau spori alergeni, punând serioase probleme legate de sănătatea consumatorilor. Pe de altă parte, agenții microbieni dăunători menționați mai sus cauzează serioase probleme economice, privind producerea de fructe și legume proaspete, dar și în perioada post-recoltă, nu numai la noi în țară, ci și pe plan internațional.

Siguranța și calitatea alimentelor se bucură în prezent de o atenție deosebită pe plan internațional, iar cercetarea științifică în acest domeniu a devenit recent o prioritate, inclusiv în Strategia Națională a Cercetării din România. Mai mult, consumatorii au devenit recent foarte atenți la alimentație, la modul în care alimentele le afectează sănătatea și sunt în permanentă căutare de diversitate, de alimente cu un gust mai bun, mai puțin procesate și cu cât mai puțini aditivi și conservanți.

Pentru a contracara efectele negative ale agenților microbieni dăunători, atât pentru fructele sau legumele proaspete, cât și pentru alimentele fermentate, se pune tot mai mult problema găsirii unor alternative naturale, de conservare biologică, folosind în loc de aditivi chimici microorganisme capabile să controleze microbiota nedorită din alimente.

În acest context, prin proiectul de față ne propunem izolarea de noi bacterii lactice din diferite surse de natură vegetală, puțin explorate la noi în țară (flori, fructe și legume proaspete și fermentate, borș) și selectarea de tulpini funcționale, cu potențial biotehnologic. Vor fi evaluate, în special activitatea antibacteriană și antifungică, producerea de bacteriocine și exopolizaharide. Pe de altă parte, microbiota contaminantă/patogenă din fructele și legumele proaspete sau din

alimentele fermentate, va fi identificată și folosită ca indicator, în încercarea de a găsi agenți de biocontrol specifici pentru problemele locale.

În prima etapă a proiectului au fost izolate, pe de o parte bacterii lactice, pe de altă parte bacterii și fungi din microbiota contaminantă, folosind ca sursă de izolare material de origine vegetală, în special fructe și legume proaspete și fermentate, flori și borș. Microorganismele izolate au fost identificate preliminar și depuse în colecțiile de laborator ale partenerilor implicați în proiect, urmând a fi folosite în etapele următoare.

Tulpinile de bacterii lactice au fost izolate din produse de origine vegetală: flori (trandafiri, margarete), fructe (mere, pere, gutui, prune), legume proaspete (roșii, castraveți, ardei, dovlecei, morcovi varză), verdețuri (pătrunjel, leuștean, ștevie, mărar, lobodă), borș, murături și suc de mere. Majoritatea acestor produse au fost obținute din gospodării particulare sau piață, iar murăturile de la o mică fabrică de murături din apropiere de București. Tulpinile bacteriene izolate au fost supuse unei identificări preliminare, constând în producerea de catalază, colorația Gram și aspect morfologic.

Materialul utilizat la izolarea fungilor a constat în fructe cu infecții incipiente de putregai, paste de fructe contaminate, semințe, borș și legume murate în saramură. Identificarea s-a realizat, la majoritatea fungilor izolați, pe baza simptomelor produse pe materialul de origine, a caracteristicilor morfologice, a celor de cultură și a aspectelor microscopice. Pentru speciile de *Fusarium* și unele specii de *Aspergillus* au fost aplicate tehnici moleculare (PCR) folosind amorse caracteristice.

Pentru izolarea altor microorganisme procariote și eucariote contaminante au fost folosite diferite probe de natură vegetală, cum ar fi: legume (roșii, castraveți, varză, etc.), fructe (piersici, prune, struguri, etc.), plante (rostopască, cimbrisor, etc.) și cereale (grâu, secară, etc.). Fructele, legumele și cerealele au fost procurate de la producători particulari sau piețe agroalimentare, în timp ce plantele utilizate au fost colectate din Grădina Botanică din București.

Un număr de 390 de tulpini bacteriene au fost izolate din probele de origine vegetală folosite ca sursă de izolare. În urma testului catalazei și colorației Gram au fost reținute 210 tulpini, aparținând cel mai probabil, grupului de bacterii lactice. Acestea nu produc catalază și sunt Gram-pozitive. În ceea ce privește aspectul macroscopic al coloniilor, acesta nu este foarte variat. În general, bacteriile lactice formează colonii alb-crem, rotunde sau lenticulare, mai mult sau mai puțin bombate, cu margini netede. Analiza microscopică a bacteriilor lactice nou izolate a evidențiat faptul că acestea se prezintă sub formă de bacili, coci, cocobacili, dispuși în diplo- sau în lanțuri de diferite mărimi. Se remarcă o preponderență a bacteriilor lactice cu aspect de coci, un număr de 127 de tulpini aparținând acestui grup.

În ceea ce privește fungii filamentoși, în colecția proiectului au fost introduse în total 32 de izolate fungice, majoritatea identificate la nivel de specie: 5 izolate de *Botrytis cinerea*, 2

izolate de *Monilinia* sp., 5 izolate de *Penicillium* sp., 11 izolate de *Aspergillus*, 5 izolate de *Fusarium* și 4 izolate de *Alternaria*.

În vederea caracterizării tulpinilor microbiene contaminante din materiale de origine vegetală a fost realizată analiza macro și microscopică a acestora, constatându-se într-o primă etapă că majoritatea tulpinilor nou izolate sunt bacterii. Morfologia coloniilor, atât în cazul tulpinilor bacteriene cât și a celor de drojdii a fost variată, coloniile având margini netede sau neregulate, mărime, consistență și culoare diferite. Analiza microscopică a evidențiat faptul că atât bacteriile Gram pozitive, cât și cele Gram negative, din punct de vedere morfologic se prezintă sub formă de coci, bacili, cocobacili de diverse mărimi, izolați, în diplo sau lanțuri. În cazul tulpinilor de drojdii, acestea au prezentat celule rotunde, ovale sau alungite cu înmugurire multilaterală.

Din cele 51 de tulpini bacteriene nou izolate, 3 tulpini au fost încadrate preliminar în specia *Bacillus cereus*, 5 tulpini fac parte din grupul stafilococilor coagulazo pozitivi și 23 de tulpini au fost încadrate în familia *Enterobacteriaceae*. Rezultatele obținute în ceea ce privește analiza biodiversității de la nivelul microbiotei contaminante a materialelor vegetale în probele analizate, au evidențiat o pondere ridicată a bacteriilor Gram pozitive (71%) comparativ cu tulpinile de bacterii Gram negative (19%) și de drojdii (10%).

Concluzie

Activitățile de cercetare desfășurate în cadrul prezentei etape au permis obținerea unei minicolecții de bacterii lactice și de tulpini microbiene contaminante din materiale de origine vegetală, microorganisme care vor fi utilizate în etapele ulterioare ale proiectului. Tulpinile nou izolate au fost caracterizate și identificate preliminar prin teste convenționale.

Obiectivele prevăzute pentru această etapă au fost îndeplinite.