

MARIAN PETRE
conferențiar universitar doctor

ALEXANDRU TEODORESCU
profesor universitar doctor inginer

BIOTEHNOLOGIA PROTECȚIEI MEDIULUI

– Note de curs –

Ediția a II-a, revizuită și adăugită

Volumul II

CAPITOLUL 15 – Biotehnologii ecologice de valorificare a deșeurilor agroalimentare

15.1. Conceptul de biotehnologie ecologică	9
15.2. Metode pentru cultivarea <i>in vitro</i> a microorganismelor cu potențial biotehnologic	10
15.3. Biotehnologii ecologice utilizate în industria agroalimentară.....	12
15.4. Biotehnologii de fermentare submersibilă a subproduselor cerealiere	13
15.5. Elaborarea biotehnologiilor de laborator pentru obținerea de alimente funcționale prin cultivarea submersibilă a ciupercilor comestibile și medicinale	21
15.6. Biotehnologii de cultivare submersibilă a fungilor filamentoși	23
15.7. Formarea peletelor fungice din speciile <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Grifola frondosa</i> și <i>Lentinus edodes</i>	30

CAPITOLUL 16 – Bioremedierea ecosistemelor forestiere deteriorate

16.1. Bazele termodinamice ale deteriorării ecosistemelor	35
16.2. Deteriorarea ecosistemelor forestiere.....	37
16.2.1. Deteriorarea prin poluare.....	37
16.2.2. Deteriorarea prin eroziune.....	38
16.2.3. Deteriorarea prin supraexploatarea pădurilor.....	39
16.2.4. Deteriorarea prin construirea de baraje și canale.....	40
16.3. Starea de sănătate a pădurilor	40
16.4. Conceptul de bioremediere	41
16.5. Diversitatea microbiană	42
16.6. Micoremedierea	43
16.7. Micorizele.....	44
16.8. Micorize ale unor specii de conifere	51
16.9. Biotehnologia culturilor monospecifice de fungi micoritici	52
16.10. Interacțiuni rizosferice ale microorganismelor telurice cu rădăcinile plantelor.....	55
16.11. Rolul fungilor micoritici în bioremediere	57

CAPITOLUL 17 – Biotehnologii de epurare a apelor reziduale

17.1. Poluarea și autoreglarea ecosistemelor acvatice poluate	61
17.2. Definiția noțiunii de ape reziduale.....	63
17.3. Clasificarea apelor reziduale.....	64
17.4. Epurarea apelor reziduale	64
17.5. Procedee pentru epurarea apelor reziduale industriale.....	65
17.6. Tehnologii de tratare aerobă a apelor reziduale	69
17.7. Microbiota apelor reziduale (uzate)	71
17.8. Tehnologii de tratare anaerobă a apelor reziduale	78

17.9. Analiza calității apelor reziduale industriale.....	82
17.10. Dezinfectia apelor epurate.....	87

CAPITOLUL 18 – Biotehnologii pentru producerea combustibililor alternativi

18.1. Definierea noțiunii de combustibil alternativ (C.A.).....	89
18.2. Tipuri de combustibili alternativi.....	90
18.3. Procedee de obținere a etanolului din biomasa.....	91
18.4. Procedee pentru obținerea de biodiesel.....	96
18.5. Procedee de obținere a biogazului.....	99
18.6. Procedee de obținere a uleiului vegetal presat la rece.....	101

CAPITOLUL 19 – Depoluarea biologică a gazelor reziduale

19.1. Rolul atmosferei în existența vieții.....	105
19.2. Poluarea aerului atmosferic.....	106
19.3. Principalii poluanți atmosferici.....	109
19.4. Rolul microorganismelor în monitorizarea poluării atmosferei.....	114
19.5. Sisteme de filtrare biologică a gazelor reziduale industriale.....	124

CAPITOLUL 20 – Biotehnologii de degradare microbiană a hidrocarburilor petroliere

20.1. Biodegradare <i>versus</i> biodeteriorare.....	131
20.2. Compoziția chimică a țițeiului.....	132
20.3. Biodegradarea microbiană a țițeiului.....	134
20.4. Evoluția procesului de biodegradare microbiană a țițeiului.....	139
20.5. Biodegradarea în sol a hidrocarburilor din petrol.....	141
20.6. Biodegradarea stimulată a țițeiului.....	143

CAPITOLUL 21 – Biotehnologii pentru recuperarea metalelor din zăcăminte

21.1. Biomineritul.....	149
21.2. Microorganisme utilizate în biominerit.....	149
21.3. Biosolubilizarea microbiană a metalelor.....	152
21.3.1. Biosolubilizarea directă.....	153
21.3.2. Biosolubilizarea indirectă.....	154
21.3.3. Biosolubilizarea galvanică.....	157
21.4. Procedee utilizate pentru biosolubilizarea metalelor.....	157
21.4.1. Biosolubilizarea aerobă a metalelor din zăcăminte minerale.....	158
21.4.2. Biosolubilizarea anaerobă a metalelor.....	162

CAPITOLUL 22 – Biotehnologii de obținere a microorganismelor modificate genetic

22.1. Organismele modificate genetic (OMG).....	165
22.2. Organisme modificate genetic pe cale naturală.....	166
22.3. Microorganismele modificate genetic (MMG).....	167
22.3.1. Riscul eliberării necontrolate a MMG în mediul natural.....	168
22.3.2. Aplicațiile biotehnologice ale MMG.....	169
22.3.3. Consecințele introducerii MMG în ecosistemele terestre.....	170

22.4. Ce este microbiotehnologia?	171
22.5. Rolul determinant al ingineriei genetice în formarea MMG.....	171
22.6. MMG – o sursă nepuizabilă de produse alimentare.....	172
22.7. MMG – agenți naturali pentru biosinteza de medicamente.....	174
22.8. Biotehnologia reacției în lanț a polimerazei	175
22.9. Utilizarea biotehnologiei moleculare de tip PCR în identificarea și caracterizarea chemotaxonomică a MMG.....	177
22.10. Biologia sintetică.....	184

CAPITOLUL 23 – Biotehnologii de obținere a plantelor și animalelor modificate genetic

23.1. Plantele modificate genetic (PMG)	189
23.1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> – model experimental pentru cercetări de inginerie genetică	190
23.1.2. Plantele transgenice – un regn aparte.....	190
23.1.3. Metode recombinante <i>versus</i> metode nerecombinante.....	192
23.1.4. Transferul artificial de gene între specii neînrudite periclitează biodiversitatea	193
23.1.5. „Eroziunea genetică” și scăderea biodiversității.....	194
23.1.6. Variații genetice naturale <i>vs.</i> variații genetice artificiale.....	195
23.1.7. Actualele PMG = viitoarele buruieni.....	196
23.1.8. PMG = surse de generare a unor noi agenți fitopatogeni virali.....	196
23.1.9. Fluxul intra- și interspecific al transgenelor	197
23.1.10. Riscul diseminării transgenelor între specii diferite.....	198
23.2. Animalele modificate genetic (AMG)	199
23.2.1. Impactul AMG asupra mediului natural.....	200
23.2.2. Cum se poate defini clonarea?.....	201
23.2.3. Importanța cunoașterii efectelor ecologice ale OMG	203
Glosar.....	205
Rezumat.....	221
Summary	229
Bibliografie selectivă.....	236

BIOTEHNOLOGII ECOLOGICE DE VALORIFICARE A DEȘEURILOR AGROALIMENTARE

15.1. Conceptul de biotehnologie ecologică

Așa cum s-a prezentat în cuprinsul primului volum, respectiv la capitolul 2, conceptul de biotehnologie ecologică implică, într-o accepțiune restrânsă, utilizarea exclusivă a organismelor vii în scopul prevenirii fenomenelor de poluare a mediului natural, prin aplicarea biotehnologiilor care nu produc sau nu eliberează subproduse sau deșeuri cu efecte negative asupra ecosistemelor terestre ori acvatice.

În sens mai larg, conceptul de biotehnologie ecologică se referă la aplicarea unor procedee de recuperare și reintroducere în circuitul natural și în cel economic a materialelor redundante, nevalorificate, sub forma unor produse utile din punct de vedere economic.

Biotehnologiile ecologice reprezintă acel grup distinct de biotehnologii moderne, utilizate în scopul prevenirii sau combaterii efectelor fenomenelor de poluare a ecosistemelor, prin utilizarea unor specii de organisme vii, care au capacitatea metabolică de a converti factorii poluanți în produse biogene, cu proprietăți benefice pentru starea de sănătate a populațiilor umane, precum și pentru menținerea calității mediului natural. Biotehnologiile ecologice sunt destinate intensificării metabolismului specific microorganismelor utilizate pentru conversia anumitor substraturi, prin creșterea și multiplicarea celulelor microbiene în bioreactoare, complet automatizate și computerizate, care oferă numeroase avantaje economice, tehnice și de păstrare a stării de sănătate a mediului.

Biotehnologiile ecologice sunt destinate intensificării metabolismului specific microorganismelor utilizate pentru conversia anumitor substraturi, prin creșterea și multiplicarea celulelor microbiene în bioreactoare, complet

automatizate și computerizate, care oferă numeroase avantaje tehnico-economice și de păstrare a stării de sănătate a mediului.

În acest context, se pot enumera numai câteva dintre avantajele respective:

- scurtarea semnificativă a ciclului biologic de dezvoltare celulară, în medie, de la 6-10 săptămâni (în sistemul „clasic”, în funcție de specie), până la cel mult o săptămână;
- asigurarea parametrilor optimi de acțiune a factorilor abiotici, indispensabili pentru realizarea cantităților maxime de biomasă celulară, în cel mai scurt timp;
- reducerea considerabilă a cheltuielilor de energie și manoperă, precum și a volumului de materii prime manipulate;
- eliminarea oricăror surse de poluare, prin utilizarea unor medii de creștere și dezvoltare a culturilor celulare, care sunt preparate fără a recurge la anumite amendamente sau la aditivi de sinteză chimică, așa cum se procedează în culturile de tip „clasic”, precum și prin absența totală a reziduurilor de orice natură;
- biomasa celulară (vegetală, animală sau microbiană), obținută prin aplicarea acestor biotehnologii de cultivare ecologică este 100% naturală și poate fi utilizată integral pentru fabricarea de produse alimentare sau farmaceutice, care vor contribui la creșterea stării de sănătate a consumatorilor umani.

15.2. Metode pentru cultivarea *in vitro* a microorganismelor cu potențial biotehnologic

Condițiile optime pentru desfășurarea proceselor enzimatiche de acumulare de biomasă microbiană sunt asigurate prin utilizarea în acest scop a unor instalații biotehnologice de tipul bioreactoarelor sau fermentatoarelor.

În principal, există trei modalități importante de cultivare a microorganismelor producătoare de compuși organici utili din punct de vedere economic, prin folosirea bioreactoarelor sau fermentatoarelor:

- a) cultivarea discontinuă sau de tip *batch*;
- b) cultivarea semi-continuă;
- c) cultivarea continuă sau de tip chemostat.

În vasul de cultivare al unui bioreactor pot fi efectuate culturi statice sau agitate, cu aport de oxigen sau în absența acestuia, în mediu lichid sau semi-

solid, iar microorganismele utilizate pot fi în stare liberă sau imobilizate pe diferite tipuri de substraturi.

În cazul inițierii unui proces de cultivare tip *batch*, microorganismele sunt inoculate într-un volum fix de mediu de cultură, iar pe parcursul derulării acestuia nutrimentele sunt consumate, iar produsele rezultate sub formă de biomasă sau metaboliți se acumulează până la momentul epuizării resurselor nutritive.

În consecință, acest tip de proces prezintă dezavantajele limitării fenomenului de creștere și dezvoltare a microorganismelor cultivate, din cauza scăderii treptate a substanțelor nutritive din mediul de cultivare, precum și ca urmare a acumulării unor produși toxici, rezultați din metabolismul microbial.

Pentru atenuarea unor asemenea dezavantaje și prelungirea unui astfel de proces de cultivare în sistem *batch*, se utilizează două metode alternative de sporire a cantității de nutrimente:

- metoda *fed batch*, care constă în adăugarea treptată a unor componente nutritive, sub formă concentrată, în scopul sporirii volumului de biomasă, prin stimularea proceselor de creștere și dezvoltare accelerată a celulelor microbiene, bacteriene sau fungice;
- metoda perfuziei – adăugarea unei cantități suplimentare de mediu nutritiv proaspăt și colectarea concomitentă a unui volum echivalent de biomasă și mediu de cultivare deja epuizat de componentele sale nutritive.

În contrast cu procesele de cultivare tip *batch*, culturile în sistem continuu oferă mult mai multe avantaje, în special în privința creșterii relativ echilibrate a microorganismelor, în funcție de cantitatea de nutrimente existente în bioreactor, precum și de fluctuațiile acestora, de volumul de metaboliți, numărul de celule microbiene și cantitatea de biomasă produsă. În mod aproape invariabil, în astfel de procese este implicat un număr mare de celule, bioreactorul asigurând, practic, toate condițiile optime, necesare pentru dezvoltarea acestor microorganisme care sintetizează compuși organici cu valoare economică ridicată.

Funcția esențială a unui asemenea bioreactor este aceea de a minimiza costurile de producție necesare pentru obținerea unui anumit tip de produs organic. Un exemplu concludent în acest context îl constituie utilizarea biotehnologiilor moderne pentru intensificarea metabolismului fungic, prin creșterea și multiplicarea hifelor miceliene în bioreactoare, complet automatizate și

computerizate. Acest tip de biotehnologii ecologice oferă numeroase avantaje tehnico-economice, precum și de păstrare a stării de sănătate a mediului. Așadar, cantitatea de biomasă miceliană, produsă prin utilizarea acestor biotehnologii neconvenționale, reprezintă o importantă direcție de dezvoltare atât a industriei agroalimentare, cât și a celei cu profil biofarmaceutic.

15.3 Biotehnologii ecologice, utilizate în industria agroalimentară

Aplicarea acestor biotehnologii ecologice, cu precădere în domeniul activităților agroindustriale, are un dublu efect benefic, prin:

- 1) soluționarea problemelor legate de impactul antropic asupra mediului, generat prin acumularea anumitor materiale reziduale, care provin din procesele tehnologice de prelucrare a produselor agroalimentare, prin procedee și tehnici de bioremediere, utilizând în acest scop mijloace biologice pentru transformarea lor integrală, fără efecte poluante și eficiente din punct de vedere economic;
- 2) obținerea unor produse alimentare sau farmaceutice, ale căror efecte nutritive și terapeutice vor determina creșterea stării de sănătate a publicului consumator.

Unele dintre cele mai importante organisme biologice utilizate în biotehnologie, sunt cele care constituie Regnul *Fungi*. Dintre acestea, *fungii macroscopici* sau *macromicetele*, cunoscute și sub denumirea populară de „ciuperci cu pălărie”, reprezintă grupul taxonomic cel mai important sub aspectul numeroaselor aplicații biotehnologice și produse obținute prin utilizarea lor.

Unele specii de ciuperci comestibile au proprietăți terapeutice dovedite prin nenumărate studii și cercetări de specialitate, fiind utilizate ca factori adaptogeni și stimulatori pentru sistemul imun al organismului uman. Astfel, asemenea substanțe adaptogene, sintetizate de aceste specii de ciuperci, stimulează, în mod indirect, sistemul imun, prin inducerea rezistenței organismului uman la acțiunea factorilor de stres nespecific, reprezentați de: noile produse chimice de sinteză, introduse în mod deliberat în natură, efortul fizic și psihic prelungit, stările emoționale, zgomotul de înaltă intensitate etc.

Efectele benefice se pot materializa prin valorificarea totală a deșeurilor vegetale sub formă de suplimente alimentare, bogate în compuși biologic activi, cu proprietăți nutritive remarcabile, precum și prin soluționarea integrală a problemelor legate de impactul acestor materiale reziduale asupra mediului.

15.4. Biotehnologii de fermentare submersibilă a subproduselor cerealiere

Un progres considerabil a fost înregistrat în ultimii ani în domeniul producerii de alimente funcționale, prin utilizarea unor specii de fungi filamentoși în calitate de biocatalizatori ai proceselor biotecnologice de fermentare a unor substraturi, reprezentate de subproduse sau deșeuri rezultate din fluxurile tehnologice aplicate în industria alimentară. În prezent, pe plan internațional, cercetările referitoare la producerea de alimente funcționale – care au efecte benefice asupra sănătății consumatorilor umani și care se pot obține din biomasa diferitelor specii de macromicete comestibile și medicinale – sunt destul de avansate. Studiile aprofundate, efectuate în China, Japonia, S.U.A. și Rusia, au demonstrat efectele extrem de benefice ale producerii de alimente funcționale din biomasa fungică, obținută prin cultivarea unor macromicete comestibile, în vederea utilizării acestora pentru prevenirea și tratarea unor multiple afecțiuni umane (Breene, 1990; Hobbs, 1995).

Fermentarea submersibilă controlată este un proces biochimic de conversie enzimatică a unor substraturi nutritive în fază lichidă, compuse preponderent din hidrați de carbon, care constă în creșterea și dezvoltarea unor culturi microbiene (bacteriene sau fungice) în condiții de monitorizare permanentă a parametrilor fizico-chimici de cultivare.

Caracteristica cea mai importantă a culturilor fungice submersibile este că, atât în cazul fungilor filamentoși, cum sunt ciupercile comestibile și medicinale, cât și al celor nefilamentoși din grupul drojdiilor (levurilor), procesele fermentative sunt de două tipuri:

- a) culturi fungice staționare, în cursul cărora nu se agită mediile de cultivare, iar hifele miceliene dezvoltă o biomasă luxuriantă la suprafața acestora, precum și
- b) culturi fungice prin agitare rotativă sau orbitală, în timpul cărora se formează așa-numitele pelete fungice, prin creșterea și dezvoltarea hifelor miceliene, sub forma unor structuri relativ sferice, compactizate, în interiorul cărora există un gradient de oxigen și unul al concentrației de substrat de cultivare, ce descresc concomitent, pornind de la exteriorul către interiorul peletelor formate prin agitarea continuă a mediului de cultivare, așa cum se observă în figurile 15.1a și 15.1b.

Centrul peletelor se caracterizează prin concentrații foarte scăzute de oxigen dizolvat și de substrat de cultivare, acest fapt fiind determinat de

consumul acestora de către celulele fungice, situate către exteriorul peletelor și care se suprapun peste cele formate inițial.

Influența parametrilor fizici, chimici și biologici asupra proceselor biotehnologice de producere a miceliului de ciuperci comestibile

Efectul sursei de carbon

În scopul selectării sursei optime de carbon, care este indispensabilă creșterii miceliului și, ulterior, formării de pelete fungice, fragmente ale hifelor aparținând sușei *Pleurotus ostreatus* – P. o. 14 au fost cultivate, timp de 7-12 zile, în diferite medii nutritive, conținând surse variate de carbon, fiecare dintre aceste surse fiind adăugată în compoziția de bază a mediului standard de cultivare, la o concentrație de 1,5% (w/v).

În cazul variantei în care celulele fungice au fost crescute în mediul nutritiv unde s-a adăugat sucroză, atât producția de biomasă miceliană, cât și numărul total de pelete per vas de cultivare au atins cele mai mari valori dintre toate variantele surselor de carbon testate în experimentele efectuate (Tabelul 15.1).

Tabelul 15.1

Efectul sursei de carbon asupra creșterii miceliului și formării de pelete, la specia *Pleurotus ostreatus*

Sursa de carbon (1,5%, w/v)	Substanța uscată a biomasei fungice (g/l)	Număr de pelete fungice/vas de cultivare	pH final
Glucoză	6,46±0,10	41±0,05	5.5
Maltoză	5,21±0,15	35±0,12	5.8
Sucroză	7,28±0,35	55±0,03	5.1
Xiloză	4,95±0,28	28±0,07	5.3

De asemenea, trebuie precizat faptul că sursa de carbon, reprezentată prin maltoză, a avut un efect stimulator semnificativ asupra procesului de creștere a miceliului, precum și al formării de pelete fungice. Procesele fermentative au fost efectuate la temperatura de 25°C și valoarea inițială a indicelui pH de 5.5, timp de 12 zile. Datele înregistrate reprezintă media deviației standard pentru trei determinări succesive.

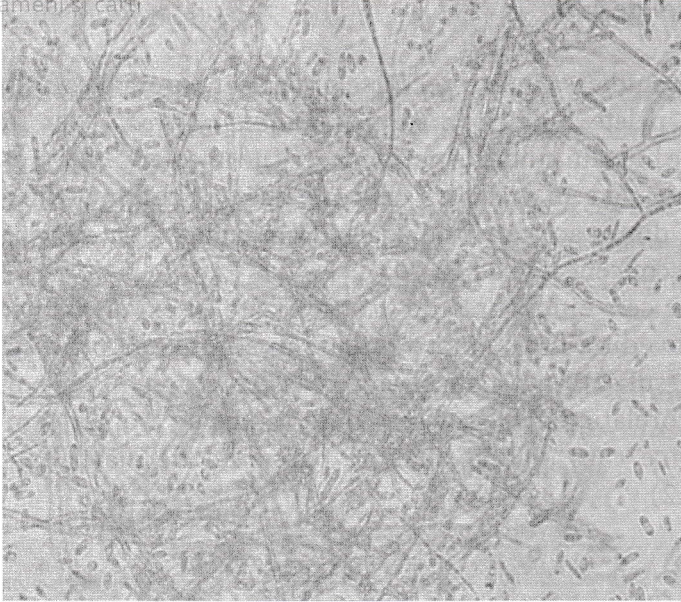


Fig. 15.1.a – *Hife miceliene, în culturi staționare*

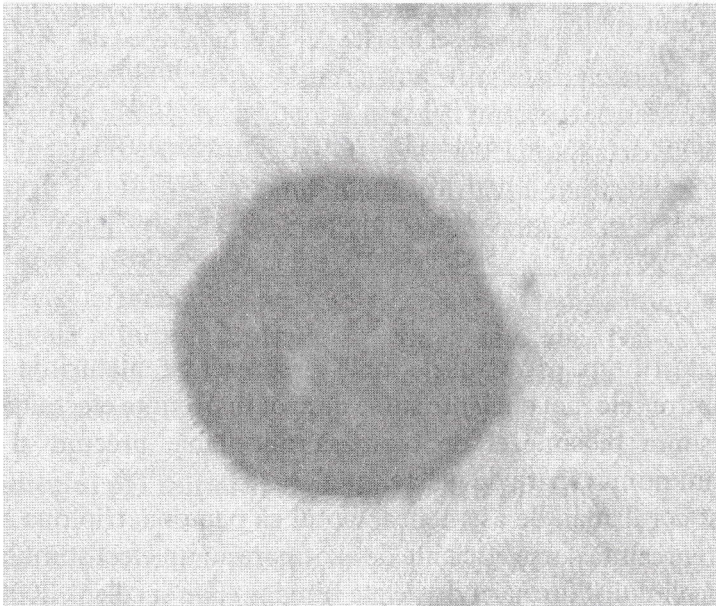


Fig. 15.1.b – *Pelete fungice, în culturi cu agitare*

Fig. 15.1 – *Schemă comparativă a morfologiei hifelor miceliene în culturi staționare (a) și a peletelor fungice în culturi cu agitare (b)*

Răspuns la întrebările de la 15.1 și 15.2

Efectul sursei de azot

Pentru studierea influenței surselor de azot asupra creșterii miceliului și formării de pelete fungice la specia *Pleurotus ostreatus* au fost prelevate fragmente de hife din culturile pure, conservate în colecția de microorganisme și au fost inoculate în medii de cultivare care au conținut diferite surse de azot, fiecare dintre acestea fiind adăugată în compoziția de bază a mediului nutritiv, la o concentrație de 10 g/l.

Printre cele cinci surse de azot utilizate în experimente, tărâțele de orez s-au dovedit a fi cele mai eficiente în stimularea proceselor fermentative, în cursul cărora s-a observat o creștere exponențială a miceliului și, în strânsă corelație cu aceasta, s-a determinat un număr semnificativ de pelete fungice care s-au format pe parcursul derulării experimentelor (Tabelul 15.2).

Tabelul 15.2.

Efectul sursei de azot asupra creșterii miceliului și formării de pelete, la specia *Pleurotus ostreatus*

Sursa de azot (1,0%, w/v)	Substanța uscată a biomasei fungice (g/l)	Număr de pelete fungice/vas de cultivare	pH final
Tărâțe de orez	6,47±0,14	57±0,05	5.5
Malț extract	6,41±0,23	55±0,03	5.3
Peptonă	4,45±0,15	41±0,12	4.6
Triptonă	5,23±0,09	28±0,07	5.1
Extract de drojdie	5,83±0,35	30±0,01	4.3

În același timp, extractul de malț a reprezentat, alături de tărâțele de orez, una dintre cele mai eficiente surse de azot în privința efectului stimulatив exercitat asupra biosintezei de biomasă miceliană, precum și în sensul formării unui număr mare de pelete fungice.

A fost confirmat, de asemenea, faptul că peptona, triptonă și extractul de drojdie reprezintă surse eficiente de azot, care au un efect stimulatив asupra creșterii miceliului și formării de pelete fungice (Bae și colab., 2000).

Procesele de fermentație submersibilă au fost efectuate la temperatura de 25°C și valoarea inițială a indicelui pH de 5.5, timp de 12 zile, iar datele înregistrate, cuprinse în tabelul 15.2, reprezintă media deviației standard pentru trei determinări succesive.

Efectul surselor minerale

Influența unor variate surse de substanțe minerale asupra creșterii miceliului și formării de pelete fungice a fost studiată utilizând o concentrație standard a acestora, și anume 5 mg.

Dintre sursele minerale testate, K_2HPO_4 a demonstrat cea mai semnificativă influență asupra proceselor fermentative efectuate, în privința stimulării producției de miceliu și a formării unui număr mare de pelete fungice (Tabelul 15.3).

Tabelul 15.3.

Efectul sursei de minerale asupra creșterii miceliului și formării de pelete, la specia *Pleurotus ostreatus*

Sursa de minerale (5 mg)	Substanța uscată a biomasei fungice (g/l)	Număr de pelete fungice/vas de cultivare	pH final
KH_2PO_4	5,71±0,09	45±0,07	5.5
KH_2PO_4	6,98±0,13	57±0,05	5.1
$MgSO_4 \cdot 5H_2O$	6,18±0,20	55±0,09	5.6

Rezultate similare au fost înregistrate de Xiao și colab., în 2004, în cursul unor experimente referitoare la aceleași procese fermentative, realizate cu ajutorul speciei *P. ostreatus*. K_2HPO_4 poate spori productivitatea biosintezei miceliene prin acțiunea sa de tamponare a nivelului indicelui pH, precum și prin faptul că fosfații au un efect favorabil asupra creșterii miceliului în culturi (Chang și Hayes, 1978; Kuo și colab., 1996).

Procesele fermentative au fost efectuate la temperatura de 25°C și valoarea inițială a indicelui pH de 5.5, timp de 6 zile. Datele înregistrate, prezentate în tabelul 15.3, constituie media abaterii standard pentru trei determinări succesive.

Efectele indicelui pH inițial și ale temperaturii inițiale

Pentru a determina modul în care indicele pH inițial, precum și temperatura inițială a mediului de cultivare pot influența atât creșterea miceliului prin biosinteză fungică, cât și formarea unui număr mare de pelete fungice, sușa *P. o. 14* a speciei *P. ostreatus* a fost cultivată într-un mediu de tip CDB (cartof-dextroză-bulion), la diferite valori ale indicelui pH inițial, în intervalul 4.5-6.0, utilizând incubatoare cu agitare de tip orbital. Nivelul

optim al indicelui pH, pentru stimularea creșterii miceliului și formarea unui număr cât mai mare de pelete fungice, a fost de 5.5 (Tabelul 15.4).

În scopul stabilirii temperaturii optime pentru aceste procese fermentative, culturile sușei *P.o. 14* au fost incubate la diferite temperaturi în intervalul 20-25°C, iar, în final, valoarea de 23°C a fost considerată cea mai potrivită pentru obținerea celor mai mari cantități de biomasă miceliană și a unui număr sporit de pelete fungice.

Această temperatură a fost corelată în cursul experimentelor cu nivelul 5.5 al indicelui pH (Tabelul 15.4). Procesele fermentative au fost efectuate la temperatura de 25°C și valoarea inițială a indicelui pH de 5.5, timp de 6 zile, iar datele din tabelul 15.4 reprezintă media deviației standard pentru trei determinări succesive.

Tabelul 15.4.

Efectele indicelui pH inițial și ale temperaturii inițiale asupra creșterii miceliului și formării de pelete, la specia *Pleurotus ostreatus*

pH inițial	Temperatura inițială (t0)	Substanța uscată a biomasei fungice (g/l)	Număr de pelete fungice/vas de cultivare
4.5	18	1,90±0,10	12±0,02
5.0	21	2,55±0,05	20±0,14
5.5	23	3,49±0,15	35±0,23
6.0	26	3,37±0,12	30±0,03
6.5	29	2,05±0,23	25±0,15

Efectele vârstei și volumului probei de inoculum

Printre multe alte proprietăți fiziologice ale speciilor de ciuperci, vârsta probei de inoculum, precum și volumul acesteia au un rol determinant în dezvoltarea miceliană și în formarea peletelor fungice (Glazebrook și colab., 1992).

Pentru a studia efectul acestor doi parametri extrem de importanți ai unei culturi fungice, *P. ostreatus* – *P. o. 14* a fost crescută pe medii solide de tip CDA (cartof-dextroză-agar) într-o perioadă cuprinsă între 3 și 12 zile, în cursul acestui interval de timp utilizându-se volume diferite ale probelor de inoculum, respectiv între 2 și 10% (v/v).

Așa cum se poate observa în tabelele 15.5 și 15.6, vârsta probei de inoculum, precum și volumul au efecte asemănătoare asupra creșterii și dezvoltării biomasei miceliene, precum și asupra formării de pelete fungice.