

**UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI CLUJ-NAPOCA**

**Facultatea de Biologie și Geologie**

**Școala doctorală de Biologie integrativă**

**Caracteristici biologice ale unor ciuperci tericole de pe diferite substraturi**

**Rezumat**

**Conducător științific:**

**Prof. Dr. Pârvu Marcel**

**Student – doctorand:**

**Mircea Cristina**

**Cluj-Napoca  
2019**

## Cuprins

Listă de abrevieri.....	4
Listă de figuri.....	5
Listă de tabele.....	8
Introducere.....	9
Scopul studiului.....	11
Mulțumiri.....	13
I. Date din literatură.....	15
1. Importanța fungilor în activitatea umană.....	15
2. Microbiomul terestru.....	17
2.1. Metode de caracterizare a structurii microbiomului terestru.....	18
2.2. Rolul fungilor în ecosistemul terestru.....	23
2.3. Factori de mediu care influențează microbiomul terestru.....	24
3. Ciuperci tericole cu potențial nociv pentru om.....	25
3.1. Ciuperci fitopatogene.....	26
3.2. Ciuperci asociate patrimoniului cultural.....	28
3.3. Ciuperci patogene pentru om.....	31
4. Combatere/conservare/tratament.....	32
4.1. Combaterea fungilor fitopatogeni.....	33
4.2. Conservarea obiectelor din patrimoniul arheologic.....	34
4.3. Tratarea micozelor la om.....	35
II. Materiale și metode de cercetare.....	37
1. Surse de izolare.....	37
1.1. Plante.....	37
1.2. Probe arheologice.....	39
1.3. Unghie umană.....	43
2. Pregătirea probelor pentru analiză.....	43
2.1. Plante.....	43
2.2. Probe arheologice.....	44
2.3. Unghie umană.....	44
3. Metode de analiză.....	44
3.1 Metode moleculare.....	44

3.2. Metode fizice .....	48
4. Metode de tratament .....	49
4.1. Testarea extractelor vegetale cu activitate antifungică .....	49
4.2. Testarea produselor antifungice comerciale naftifină și bifonazol .....	50
4.3. Teste de depigmentare/repigmentare .....	50
4.4. Evidențierea rolului carotenoizilor .....	50
4.5. Măsurarea cantității de carotenoizi .....	51
III. Rezultate și discuții .....	52
1. Fungi fitopatogeni .....	52
1.1 Caracterizarea fungilor izolați de pe plante .....	52
1.2. Testarea extractului de <i>Hedera helix</i> .....	58
2. Fungi asociați probelor arheologice .....	67
2.1. Fungi asociați oaselor arheologice .....	67
2.2. Fungi asociați resturilor vegetale carbonizate .....	83
3. Fungi patogeni la om .....	86
3.1. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ca agent al onicomicozei .....	86
3.2. Testarea antifungicelor comerciale naftifină și bifonazol asupra speciei <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> .....	88
3.3. Evidențierea rolului carotenoizilor .....	93
IV. Concluzii .....	96
Bibliografie .....	99
Performanță științifică .....	118

**Cuvinte cheie:** fungi fitopatogeni; extract de *Hedera helix*, tafonomie, secvențe ITS, oase arheologice, FTIR, microscopie, onicomicoză, naftifină, carotenoizi.

## **I. Date din literatură**

### **1. Importanța fungilor în activitatea umană**

Fungii sunt organisme ubicuitare cu impact economic însemnat pentru viața omului, influențând o gama largă de activități antropice. Sunt importante, cu precădere, pentru domeniile agricol, alimentar, medical, farmaceutic (Kendrick, 2001) și al biotehnologiilor (May și Adams, 1997). Nu poate fi ignorat rolul lor ecologic, fiind în prezent obiect de studiu pentru lămurirea câtorva probleme fundamentale legate de biodiversitate, clasificare și evoluție (Lange, 2014).

Efectul fungilor în domeniile menționate este atât pozitiv, fiind întrebuințate pentru fabricarea berii și a produselor de panificație, în fermentații la nivel industrial, pentru producerea de enzime și compuși farmaceutici utili sau ca sursă de hrană, cât și negativ, cauzând pierderi financiare importante, prin degradarea și distrugerea alimentelor, materialelor de construcție și producerea de boli plantelor, animalelor și omului (Kendrick, 2001; Mueller *et al.*, 2011).

### **2. Microbiomul terestru**

Solul este considerat un ecosistem terestru cu o mare diversitate taxonomică și funcțională în ceea ce privește ciupercile asociate (Orgiazzi *et al.*, 2013). Totalitatea ciupercilor a fost definită cu termenul de microbiom, diversitatea acestuia fiind strâns corelată cu stratificarea solului și tipul de vegetație prezent, asigurând legăturile fiziologice și ecologice ale ecosistemului (Dighton, 2016). Ca dimensiuni, variază de la drojdii unicelulare și mucegaiuri microscopice până la ciuperci cu pălărie și picior, de dimensiuni mari (Tonge *et al.*, 2014).

Cunoașterea structurii exacte a comunităților fungice din sol conduce la o mai bună înțelegere a interacțiunilor ecologice specifice cu plante, pesticide sau cu alte microorganisme (Baldrian *et al.*, 2012). Identificarea precisă a ciupercilor asociate solului devine astfel foarte importantă (Orgiazzi *et al.*, 2012). Există numeroase studii în literatură prin care sunt prezentate metode de identificare, pornind de la variantele tradiționale și ajungând la metode moleculare clasice și moderne (Guarro *et al.*, 1999; Atkins și Clark, 2004).

## 2.1. Metode de caracterizare a structurii microbiomului terestru

Metodele clasice de identificare se bazează pe caracterele fenotipice, observabile, ale fungilor. Trăsăturile definiții ale acestora se referă la modul lor de viață, având în vedere: nutriția, starea vegetativă, tipul de perete celular, tipul nucleului, modalitatea de reproducere, distribuția lor în natură și importanța lor ecologică. Fungii sunt organisme heterotrofe, care preiau nutrienții prin absorbție din mediu, în general imobile, cu talul numit miceliu, format din hife. Peretele celular este format din glucani, chitină și celuloză, celulele fiind uni sau multi nucleate, haploide sau diploide. Se pot înmulți sexuat, asexuat sau parasexuat (Webster și Weber, 2007).

Cel mai frecvent, analiza clasică presupune analiza microscopică a probelor pentru o observare cât mai fidelă a caracterelor de interes. Varianta clasică a microscopului optic a fost îmbunătățită cu variantele de microscopie cu contrast, fluorescență, citochimie și microscopie electronică (Guarro *et al.*, 1999). Neajunsurile metodelor clasice de identificare se referă la faptul că necesită mult timp pentru a fi realizate, nu sunt cantitative, având de cele mai multe ori doar rezultate calitative și se pot solda cu identificări greșite ale speciei de interes (Atkins și Clark, 2004).

O identificare exactă a unei specii pe baza caracterelor morfologice presupune în primă fază izolarea ei, pe un mediu de cultură, cu excepția celor necultivabile (Gupta *et al.*, 1993). Optimizarea condițiilor de creștere a început încă de timpuriu (Harley, 1934) pentru ca în prezent să existe medii nutritive general întrebuințate pentru o gamă variată de specii sau medii special concepute pentru o anumită specie ținând cont de toate necesitățile nutritive ale acesteia (Atlas, 2010). Limitările metodelor clasice de identificare pot fi soluționate cu ajutorul tehnicilor moleculare. Acizii nucleici au devenit cele mai utilizate molecule țintă în procesul de identificare a comunităților fungile din sol o dată cu apariția reacției în lanț a polimerazei (PCR – Polymerase Chain Reaction) (White *et al.*, 1990). Dezvoltarea tehnologiei de secvențializare permite analiza *high-throughput* a microbiomului terestru, oferind o modalitate mai bună de accesare a informației legate de diversitatea acestuia, a relațiilor funcționale și ecologice dintre comunități și a evoluției acestora (Lindahl *et al.*, 2013).

Una dintre provocările analizelor moleculare ale comunităților fungice terestre o constituie alegerea celui mai potrivit *barcode* în vederea obținerii unei rezoluții cât mai bune a identificării taxonomice. Dezvoltarea amorsoarelor universale care să vizeze regiuni conservate ale moleculei de

ADN, caracteristice fungilor, dar care să permită în același timp diferențierea acestora până la nivel de specie este una dintre principalele preocupări (Stielow *et al.*, 2015).

Noile tehnici de secvențializare, pirosecvențializarea și secvențializarea de nouă generație (Next Generation Sequencing – NGS) au condus la apariția unui număr mare de secvențe de fungi din sol stocate în baze de date specializate FungiBD (Stajich *et al.*, 2012), PHYMYCO-BD (Mahé *et al.*, 2012) și a *pipeline*-urilor destinate analizei datelor obținute prin metabarcoding CLOTU (Kumar *et al.*, 2011), PLUTOF (Abarenkov *et al.*, 2010), PIPITS (Bálint *et al.*, 2014; Gweon *et al.*, 2015).

Caracterizarea microbiomului terestru nu presupune doar contabilizarea diversității acestuia, ci și stabilirea funcțiilor pe care fungi le îndeplinesc în structura lui. Identificarea unei secvențe de ADN caracteristice unei specii nu lămurește rolul acesteia în funcționarea microbiomului, neștiindu-se pe baza unei simple recunoașteri, dacă ADN-ul aparține unei celule vii, implicate activ în utilizarea unui anumit substrat ca sursă de hrană sau unei celule moarte sau dormante (Blagodatskaya și Kuzyakov, 2013).

## **2.2. Rolul fungilor în ecosistemul terestru**

Fungii deservesc câteva funcții de bază în ecosistemul terestru fiind descompunători, simbionți sau paraziți. Fungii cu nutriție saprofită asigură circuitul nutrienților, cu implicații trofice importante fiind circuitul carbonului, azotului, sulfului și fosforului (Paul, 2014). Speciile simbiote se asociază cel mai adesea cu rădăcinile plantelor formând micorize.

## **2.3. Factori de mediu care influențează microbiomul terestru**

Factorii ambientali determină variații temporale și spațiale în structura comunităților fungice, fiind hotărâtori pentru abundența și diversitatea speciilor componente (Buee *et al.*, 2009). Principalii factori care influențează direct comunitățile fungice sunt: tipologia și orizontul de sol, umiditatea, temperatura (care variază sezonier în majoritatea zonelor de climă), pH-ul, cantitatea de substanțe organice disponibile (Tedersoo *et al.*, 2007).

## **3. Ciuperci tericole cu potențial nociv pentru om**

Efectul fungilor din ecosistemul terestru asupra societății umane poate fi interpretat ca fiind unul negativ, atunci când acestea produc pagube (De Lucca, 2007). Câteva contexte în care omul se poate confrunta cu urmările nocive ale acțiunii fungilor din sol sunt: distrugerea recoltelor

agricole (Termorshuizen și Jeger, 2008; Alabouvette *et al.*, 2009), distrugerea patrimoniului cultural (Marchiafava *et al.*, 1974; Kozlov și Kisternaya, 2014; Wahab *et al.*, 2015) sau potențiali agenți patogeni pentru sănătatea umană (De Lucca, 2007).

#### **4. Combatere/prezervare/tratament**

Ca resursă naturală, solul este exploatat cu precădere prin agricultură (White, 2013). Sănătatea solului este un concept utilizat în literatură pentru a caracteriza calitatea lui de resursă naturală (Kibblewhite *et al.*, 2008). În aprecierea acestui atribut se ține cont de proprietățile lui fizice, chimice și biologice, fiind luate în considerare ecosisteme puternic antropizate, precum cel agricol și horticol, cât și ecosisteme naturale reprezentate de pășuni și păduri (Frac *et al.*, 2018). În ceea ce privește componenta biologică a sănătății solului, funghi au un rol hotărâtor, diversitatea crescută a acestora permițând ameliorarea calității solului și creșterea productivității agricole (Ramachandra *et al.*, 2018). Două dintre cele mai frecvente practici agricole, cu rol în diminuarea diversității fungice în sol, sunt utilizarea fungicidelor (Baćmaga *et al.*, 2016) și a îngrășămintelor (Weber *et al.*, 2013).

Totodată solul reprezintă mediul ambiental pentru obiectele înhumate ale patrimoniului cultural. Potențialul de conservare al acestuia este apreciat pe baza capacității sale de a dezvolta și menține un echilibru, *in situ*, între bunurile arheologice și particulele de sol, după înhumare pe o durată cât mai mare de timp (Kibblewhite *et al.*, 2015). Factorii care alterează echilibrul atins (schimbarea nivelului de drenare, utilizarea îngrășămintelor și fungicidelor în straturile superficiale ale solului) vizează cu precădere schimbarea acidității solului și a conținutului de substanțe organice și minerale (Davidson și Wilson, 2006), cu potențial efect direct asupra structurii comunității microbiene prezente (Rousk *et al.*, 2009). Totodată, multe din speciile de microorganisme care vin în contact cu obiectele arheologice în timpul depunerii în sol, sunt transferate, post excavare, în spațiile de depozitare, în care factorii ambientali (umiditate, temperatură, nivel de oxigenare) se schimbă radical, conducând la modificarea echilibrului conservativ la care s-a ajuns *in situ* (Le Cabec și Toussaint, 2017).

Pentru domeniul medical, utilizarea irațională a fungicidelor constituie o problemă serioasă, determinând apariția de comunități rezistente la agenți antifungici preponderent utilizați în domeniul agricol și cel clinic (Ribas e Ribas *et al.*, 2016).

## **II. Materiale și metode de cercetare**

### **1. Surse de izolare**

#### **1.1. Plante**

Funghi fitopatogeni au fost evidențiați pe diverse substraturi ca plante ornamentale (*Rosa* spp., *Tulipa* spp. și *Galdiolus* spp.), plante de cultură (*Daucus carota* și *Allium cepa*) și plante medicinale (*Ranunculus ficaria*).

#### **1.2. Probe arheologice**

Pentru evidențierea potențialului efect degradativ al fungilor asupra oaselor arheologice au fost selectate probe, evident afectate de atac microbial, din siturile de la Feleacu (jud. Cluj), Tărian (jud. Bihor) și Turdaș (jud. Hunedoara). Au fost urmărite efectele fungilor și asupra resturilor vegetale carbonizate, reprezentate de cariopse de cereale, recuperate din situl arheologic de la Cetatea Capidava (jud. Constanța).

##### **1.2.1. Sol**

Probele de sol analizate provin din siturile arheologice de la Tărian, Feleacu, Turdaș (asociate resturilor osteoarheologice corespunzătoare), și Capidava. Condițiile pedologice diferă între siturile menționate, cât și cele ambientale, umiditatea ridicată care caracterizează siturile de la Feleacu, Turdaș și Tărian absentând în cazul sitului de la Capidava aflat în interiorul cetății neinundabile.

#### **1.3. Unghie umană**

Fragmente de unghie afectată de onicomicoză au fost recoltate de la o pacientă în vârstă de 85 de ani cu hepatită cronică cu virusul hepatic B (VHB), cu ajutorul unei truse sterile pentru unghii.

## **2. Pregătirea probelor pentru analiză**

### **2.1. Plante**

Plantele vizibil afectate de atac fungic au fost utilizate ca sursă pentru inoculări și extracții directe de ADN fără a suferi tratamente anterioare analizei propriu-zise.



## **2.2. Probe arheologice**

### **2.2.1. Probe osteologice**

Suprafețele oaselor vizibil atacate de fungi au fost curățate cu apă ultrapură (PCR grade water, Jena Bioscience, Jena, Germany). Pentru fiecare probă, de pe suprafețele cu colorații evidente, s-au obținut 1g de pulbere utilizând un micromotor dentar (Marathon-3 Champion, Saeyang Microtech, Daegu, South Korea) și freze dentare autoclavate.

### **2.2.2. Resturi vegetale carbonizate**

Spre deosebire de probele de oase afectate de atac microbial, cariopsele de cereale analizate nu au putut fi spălate, datorită perisabilității lor crescute. Ele au fost expuse la lumină ultravioletă timp de 10 minute pe fiecare parte (utilizând UVilink crosslinker, UVITEC, Cambridge, UK).

### **2.2.3. Sol**

Probele de sol analizate nu au suferit tratamente anterioare analizei propriu-zise.

## **2.3. Unghie umană**

Fragmentele de unghie colectate au fost sterilizate în etanol 20% timp de un minut.

## **3. Metode de analiză**

### **3.1. Metode moleculare**

#### **3.1.1. Metoda de analiză dependentă de cultivarea pe mediu**

##### **3.1.1.1. Medii de cultură**

Pentru izolarea și obținerea de culturi pure pentru ciupercile fitopatogene s-a folosit mediul selectiv Czapek-agar conținând: 30 g/L sucroză, 15 g/L agar, 3 g/L NaNO<sub>3</sub>, 1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g/L KCl 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.01 g/L FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 2% amidon solubil, 50 μg/mL cloramfenicol la pH 7.3 Toate mediile au fost sterilizate prin autoclavare la 121° timp de 30 minute. Pentru obținerea de culturi pure de *Dumontinia tuberosa* au fost utilizate mediile cartof-dextroză-agar (PDA - Potato Dextrose Agar) conținând: 500g/L cartof, 20g/L glucoză, 15g/L agar, și 50 μg/mL cloramfenicol și cu mediul Czapek-agar cu amidon conținând 30 g/L sucroză, 15 g/L agar, 3 g/L NaNO<sub>3</sub>, 1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g/L KCl 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.01 g/L FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 2% amidon

solubil, 50 µg/mL cloramfenicol la pH 7.3. Toate mediile au fost sterilizate prin autoclavare la 121° C timp de 30 minute. Pentru a determina speciile de fungi de pe suprafața oaselor de la Tărian, Feleacu și Turdaș și din solul asociat, a fost utilizat mediul de cultură Sabouraud-agar, folosit cu precădere pentru izolarea drojdiilor și majorității fungilor filamentoși, conținând: 40 g/L glucoză, 10 g/L peptonă, 15 g/L agar, 50 µg/mL cloramfenicol la pH 5.6 (Atlas, 2010). După inoculare, plăcile au fost incubate pentru 5 zile la 22° C.

Pentru identificarea speciilor de fungi care cauzează onicomicoză la om, a fost utilizat, împreună cu mediul Sabouraud-agar și mediul cu extract de drojdie, peptonă și dextroză (YPD - Yeast Extract-Peptone-Dextrose) conținând 0.5% peptonă, 0.3% extract de drojdie, 0.5% glucoză și 30 mg/L cloramfenicol. După inoculare, plăcile au fost incubate pentru 3 zile la 25°C. Pentru culturile realizate în mediu lichid (YPD), au fost utilizate tuburi Falcon cu volumul de 50 ml, conținând 10 mL de mediu, fiind crescute după inoculare la 22° C timp de trei zile, cu agitare pe un rotor la 100 (GFL Orbital Shaker 3017, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Germania).

#### **3.1.1.1. Inoculare**

Culturile pure de fungi fitopatogeni au fost obținute prin inocularea în punct central a plăcilor Petri cu mediu Czapek-agar cu fragmente de miceliu/spori preluate de pe materialul vegetal afectat. Pentru obținerea de colonii pure de fungi de pe suprafața oaselor arheologice și din probele de sol, 300 mg de pulbere obținută din țesutul osos exterior, respectiv 100 mg de sol, au fost hidratate cu 500 µl apă ultrapură timp de 2 ore la temperatura camerei. 300 µl din amestec au fost distribuiți pe plăcile Sabouraud-agar (Arora, 2003). Fragmentele de unghie afectate de onicomicoză au fost utilizate pentru inocularea în trei puncte a plăcilor Petri cu mediu Sabouraud-agar (Hankin și Anagnostakis, 1975).

#### **3.1.1.2. Extracția ADN-ului**

ADN-ul a fost extras din fiecare colonie izolată, apărută pe mediu de cultură, utilizând Animal and Fungi DNA Preparation Kit® (Jena Bioscience, Jena, Germany) în conformitate cu indicațiile producătorului.

### **3.1.2. Metoda de analiză independentă de cultivare pe mediu**

#### **3.1.2.1. Extracția ADN-ului**

Din probele osteologice și solul aferent a fost extras direct ADN utilizând PowerSoil®DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, USA) pentru 200 mg de pulbere de os, respectiv 200 mg sol, pentru fiecare din probe, în conformitate cu indicațiile producătorului. Pentru extracția ADN-ului din resturile vegetale, a fost utilizat protocolul propus de (Hofreiter *et al.*, 2000).

#### **3.1.3. Markerii utilizați pentru identificarea moleculară**

Identificarea speciilor de fungi a fost realizată pe baza regiunii spacer-ului intern transcris, ITS, fiind amplificat un fragment de 520 perechi de baze cu ajutorul amorsoarelor ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') și ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTCGATATGC-3') (White *et al.*, 1990)

#### **3.1.4. Amplificarea fragmentelor de interes**

Reacția în lanț a polimerazei (PCR - Polymerase Chain Reaction) asigură amplificarea fragmentelor dorite. Amestecul de reacție folosit a fost următorul, pentru un volum final de 25 μl: 1X MangoTaq Colored Reaction Buffer (Bioline), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Bioline), 0.2 mM dNTP (Bioline), 0.5 mM din fiecare amorsă (Macrogen Sequencing Service, Korea), 1.25U MangoTaq (Bioline), 2μl ADN. A fost rulat în paralel controlul negativ, conținând toate elementele mediului de reacție, cu excepția ADN-ului. Amplificările au constat din câte 35 de cicluri după cum urmează: 95°C pentru 5 minute, 95° C pentru 30 secunde, 56° C pentru 30 secunde și 72° C pentru 30 secunde, 72° C pentru 5 minute, 4° C infinit.

#### **3.1.5. Evaluarea eficienței amplificării**

Prođușii de amplificare au fost migrați în gel de agaroză (1.5% agaroză, 0.5μg/ml bromură de etidiu). Fragmentele de dimensiuni dorite au fost purificate cu FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit (FAVORGEN, Ping-Tung, Taiwan) conform cu indicațiile producătorului.

#### **3.1.6. Clonarea fragmentelor de interes**

Fragmentele amplificate pornind de la ADN-ul extras direct din probele arheologice osteologice și vegetale respectiv solul aferent au fost clonate utilizând CloneJET™PCR Cloning

Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) respectând recomandările producătorului. Pentru transformare au fost folosite celule competente de *Escherichia. coli*, tulpina DH5 $\alpha$ , rezistentă la ampicilină. Pentru fiecare probă, au fost alese aleator câte 16 colonii de pe plăcile (LB și ampicilină) obținute în urma transformării și inoculate ulterior în 5 ml de mediu LB lichid pentru extracția plasmidelor. Plasmidele au fost purificate utilizând kitul GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA), conform specificațiilor producătorului. Verificarea prezenței fragmentelor de interes s-a realizat prin digestie cu enzima de restricție Bgl II (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA).

### **3.1.7. Secvențializarea fragmentelor de interes**

Fragmentele generate prin amplificarea ADN-ului extras din speciile izolate în prealabil pe mediu de cultură au fost secvențializate utilizând amorsa ITS 1 (White *et al.*, 1990), iar pentru fragmentele clonate a fost utilizată amorsa pJET1.2F a vectorului folosit pentru clonare. Secvențializarea a fost realizată folosind serviciul oferit de at Macrogen Inc. (Seoul, South Korea).

### **3.1.8. Analiza secvențelor**

Secvențele obținute au fost verificate manual, utilizând programul BioEdit versiunea 7.0.9 (Tom Hall, Ibis Biosciences). Secvențele au fost comparate cu cele din bazele de date ale National Centre for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) utilizând BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool) pentru a identifica secvențele similare (Altschul *et al.*, 1997). Secvențele au fost depuse în baza de date GenBank având numerele de acces: MF373466- MF373487, MF399498-MF399539.

### **3.1.9. qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction)**

Pentru cuantificarea moleculelor de fungi prezente în probele arheologice și în cele de sol au fost folosite amorsele FR1 (5'-AICCATTC AATCGGTAIT-3') și FF390 (5'-CGATAACGAACGAGACCT-3') (Chemidlin Prevost-Boure *et al.*, 2011) care țintesc un fragment de 390pb din gena pentru ARN ribozomal 18S.

Pentru curba standard s-a folosit un plasmid pJET1.2 conținând fragmentul de interes care a fost secvențializat în prealabil, șirul concentrațiilor urmărite fiind între 10<sup>2</sup>-10<sup>9</sup>. Amplificările au avut loc în Rotor-Gene® Q (QIAGEN, Hilden, Germany) utilizând SensiFASTTM SYBR No-ROX Kit (Bioline, London, UK). Reacțiile s-au desfășurat într-un volum final de 20  $\mu$ l, 1x

SensiFAST SYBR No-ROX Mix, 0.5 mM din fiecare amorsă, 1.5  $\mu$ l de ADN și 6.5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. A fost utilizat un program de PCR în trei pași, după cum urmează: 95°C pentru 3 minute, (95°C pentru 10 secunde, 56°C pentru 15 secunde, 72°C pentru 15 secunde)X 40. Au fost utilizate duplicate pentru fiecare probă cât și controale negative.

## **3.2. Metode fizice**

### **3.2.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)**

Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier a fost utilizată pentru identificarea speciilor de fungi izolate de pe oasele arheologice, cât și pentru evaluarea integrității structurale a țesutului osos extern. Spectrele FTIR au fost înregistrate cu ajutorul spectrometrului JASCO 4100 (Jasco, Tokyo, Japan) al Institutului de Cercetări în Bio-Nano-Științe. Coloniile de fungi din culturile pure au fost depuse pentru măsurători între două tablete de KBr obținute din 200 mg de sare cu ajutorul unei prese hidraulice. Pentru probele de osteologice, 2 mg de praf de os au fost omogenizate cu 200 mg KBr și transformate ulterior în tablete (Surovell și Stiner, 2001). Spectrele au fost înregistrate la temperatura camerei, în intervalul spectral 400-6000cm<sup>-1</sup>, având rezoluția spectrală de 4cm<sup>-1</sup>.

### **3.2.2 Microscopie electronică**

Imaginile de microscopie electronică de scanning pentru probele osteologice au fost înregistrate cu FEI Quanta 3D FEG dual beam electron microscope (FEI, Eindhoven, Netherlands), al Institutului de Cercetări în Bio-Nano-Științe, la un voltaj de accelerație de 30kV. Probele au fost acoperite cu un strat de 5nm de aur pentru a amplifica semnalul electronilor secundari. Acoperirea a fost realizată cu ajutorul Q150R ES automatic Sputter Coater (Quorum Technologies Ltd., Laughton, UK), în atmosferă de argon (Flegler *et al.*, 1993).

Imaginile de microscopie electronică de scanning și transmisie pentru probele de fungi izolate de pe substraturile vegetale, respectiv unghie au fost obținute cu JEOL JEM 1010 electron microscope (Japan Electron Optics Laboratory Co., Tokyo, Japan) al Centrului de Microscopie Electronică Profesor Constantin Crăciun al Universității Babeș-Bolyai. Pregătirea probelor pentru microscopia de scanning a constat în uscarea acestora în CO<sub>2</sub> lichid, aderarea pe grile de carbon (Agar Scientific, Cambridge, England) și acoperirea lor cu un strat de 10 nm de aur. Pentru microscopia electronică de transmisie probele fixate cu 2.7% glutaraldehidă (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, USA) și uscate au fost inserate în rășină (Electron Microscopy

Sciences, Fort Washington, USA) și depuse pe grile de cupru acoperite de carbon coloidal (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, USA) și colorate negativ cu citrat de plumb și acetat de uranil (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, USA) (Hayat, 2000).

#### **4. Metode de tratament**

##### **4.1. Testarea extractelor vegetale cu activitate antifungică**

Materialul vegetal folosit pentru prepararea extractului testat, *Hedera helix* a fost colectat din Grădina Botanică din Cluj-Napoca și depozitat la Herbarul Universității Babeș-Bolyai (voucher CL 664210). Prepararea extractului a fost realizată prin repercolare la temperatura camerei timp de trei zile (Sundaram și Gurumoorthi, 2012) a unor fragmente de frunze (0.5-1 cm), extrase cu 50% etanol (Merck, București, România), în Laboratorul de Micologie al Universității Babeș-Bolyai. Raportul de extracție a fost de 1:1.

Determinarea activității antifungice a extractului a fost evaluată prin concentrația minimă inhibitoare (MIC – Minimum Inhibitory Concentration) în comparație cu fluconazole (Krka, Novo Mesto, Slovenia) și un control conținând mediu nutritiv și etanol. Substanțele testate au fost introduse în mediul de creștere. Procentul de inhibiție a creșterii miceliului (P) a fost calculat utilizând formula  $P=(C-T) \times 100 / C$ , unde C reprezintă diametrul coloniei control și T diametrul coloniei tratate (Nidiry și Babu, 2005).

##### **4.2. Testarea produselor antifungice comerciale naftifină și bifonazol**

Două produse farmaceutice cu efect antifungic, Exoderil (cu 10 mg/ml naftifină ca substanță activă, Sandoz GmbH Kundl Austria) și Canespor (cu 10 mg/ml bifonazol ca substanță activă, KVP Pharma + Veterinär Produkte GmbH, Kiel, Germany) au fost testate pe probele de fungi izolate de pe unghie. Concentrația minimă inhibitoare responsabilă pentru inhibarea creșterii a 50% din populația asupra căreia a fost testată (MIC50) a fost determinată spectrofotometric pe baza densității optice la 600nm pentru ambele antifungice. Concentrațiile testate pentru obținerea MIC50 au fost de 0, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.6, 1.2, 3.6, 10.8, 50, 100, 500, 1000 mg/l pentru naftifină și 0, 0.015, 0.03, 0.06, 0.12, 1, 10, 50, 100, 500, 1000 mg/l pentru bifonazol (Carrillo-Munoz *et al.*, 1999).

#### **4.3. Teste de depigmentare/repigmentare**

Pentru specia *Rhodotorula mucilaginosa*, izolată atât de pe oase arheologice cât și de unghie a fost evidențiat efectul naftifinei ca inhibitor al sintezei carotenoizilor. Coloniile depigmentate au fost obținute prin resuspendarea unei colonii de *R. mucilaginosa* control în soluție de naftifină de 1 mg/ml diluată cu 20% etanol, înainte de însămânțarea pe mediu de cultură. Metoda a fost inspirată din modul de administrare a hidrocloratului de naftifină ca unguent în tratarea micozelor superficiale.

O altă variantă de evidențiere a depigmentării produse de naftifină coloniilor de *R. mucilaginosa* a constat în introducerea substanței în concentrații de 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml în mediul de creștere SDA înainte de inoculare. Coloniile depigmentate au fost obținute după incubare la 22°C timp de 3 zile. Reinocularea mediului de creștere fără naftifină cu colonii depigmentate a condus la obținerea de colonii repigmentate. Experimentele au fost realizate în triplicat în cadrul Departamentului de Chimie al Facultății de Chimie și Inginerie Chimică a Universității Babeș-Bolyai.

#### **4.4. Evidențierea rolului carotenoizilor**

Concentrația de 1.2 mg/l naftifină a fost selectată pentru investigarea rolului carotenoizilor în mecanismele de apărare împotriva stresului oxidativ ale celulelor de *R. mucilaginosa*. Au fost utilizați câte 20 μl de cultură pentru inocularea a 10 ml mediu YPD cu naftifină, respectiv fără naftifină. Un set de experimente a constat în expunerea timp de 40 min la radiație UV flacoanele Erlenmeyer inoculate. Un al doilea set experimental a constat în crearea unui mediu hipoxic în flacoanele de creștere, barbotând argon timp de 60 s, atât pentru culturile tratate cu naftifină cât și pentru cele netratate.

#### **4.5. Măsurarea cantității de carotenoizi**

Pentru determinarea cantității de carotenoizi au fost utilizate suspensii lichide, omogene, de 2 ml, spălate de trei ori cu 1 ml de soluție de NaCl 0.9%. 900 μl din suspensie au fost centrifugați, iar soluția salină îndepărtată. Depozitul a fost resuspendat în 1.8 ml DMSO și agitat pentru lizarea celulelor și obținerea carotenoizilor în soluție. Tuburile au fost centrifugate la 20000g pentru depunerea resturilor celulare. Supernatantul a fost folosit pentru măsurarea spectrului UV-Vis în intervalul 200-800 nm cu ajutorul spectrofotometrului Varian Cary 5000 UV-

Vis-NIR Spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, US). Absorbanța maximă a fost înregistrată la 512 nm, fiind utilizată ca indicator al conținutului total de carotenoizi.



### III. Rezultate și discuții

#### 1. Fungi fitopatogeni

##### 1.1. Testarea extractului de *Hedera helix*

Activitatea antifungică a extractului de *Hedera helix* a fost determinată prin testarea diferitelor concentrații ale acestuia prin încorporarea în mediul de creștere Czapek-agar. Extractul a fost comparat cu antimicoticul comercial fluconazol, introdus la rândul său în mediul de creștere și cu un control în care a fost adăugat etanol în mediul Czapek-agar (Tabelul 1).

Concentrațiile de extract folosite pentru determinarea activității antifungice au fost de: 6, 8, 10, 12, 14% pentru *A. niger*; 3, 6, 8, 10% pentru *B. cinerea*; 3, 6, 8, 10% pentru *B. tulipae*; 3, 6, 8, 10, 12% pentru *F. oxysporum*; 3, 6, 8, 10% pentru *P. gladioli* și 3, 6, 8, 10% pentru *S. sclerotiorum*. Concentrațiile de fluconazol utilizate au fost de 0.2, 0.4, 0.5, 0.6 mg/ml pentru *A. niger*, 0.04, 0.12, 0.2, 0.24 mg/ml pentru *B. cinerea*, 0.04, 0.12, 0.2, 0.24 mg/ml pentru *B. tulipae*, 0.04, 0.12, 0.16, 0.2 mg/ml pentru *F. oxysporum*, 0.2, 0.32, 0.4, 0.5, 0.6 mg/ml pentru *P. gladioli* și 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 mg/ml pentru *S. sclerotiorum* (Roșca-Casian *et al.*, 2017).

Concentrația minimă inhibitoare (Minimum Inhibitory Concentration - MIC) definește concentrația minimă a substanței testate care inhibă total dezvoltarea vizibilă a unui miceliu (Andrews, 2001). Valorile MIC-urilor extractului de *H. helix* asupra speciilor studiate au fost 14% pentru *A. niger*, 12% pentru *F. oxysporum* și 10% pentru *B. cinerea*, *B. tulipae*, *P. gladioli* și *S. sclerotiorum*. Comparativ, pentru fluconazol, s-au obținut valori ale MIC-urilor de 30% pentru *A. niger* și *P. gladioli*, 16% pentru *S. sclerotiorum*, 12% pentru *B. cinerea*, *B. tulipae* și 10% pentru *F. oxysporum*.

**Tabelul 1** Testarea efectului extractului de *Hedera helix* și a fluconazolului asupra speciilor *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Botrytis tulipae*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium gladioli* și *Sclerotinia sclerotiorum*. P - procentul de inhibiție a creșterii a miceliului, <sup>a</sup> – efectul extractului de *Hedera helix*, <sup>b</sup> – efectul fluconazolului, C – control, rezultatele reprezintă medii±SD calculate pentru 4 replicare.

Specie	Concentrația extractului de <i>Hedera felix</i> (1:1) folosit (%)		Diamtrul coloniei (mm)	P <sup>a</sup> (%)	Concentrația de fluconazol (%) (mg/ml)		Diamtrul coloniei (mm)	P <sup>b</sup> (%)
<i>Aspergillus niger</i>	C		22	0	C		22	0
	6		18	18.18±0.81	10	0.2	11	54.13±0.50
	8		15	31.81±0.50	20	0.4	7	68.18±0.50
	10		8	63.63±0.57	25	0.5	3	86.36±0.57
	12		2	90.90±0.57	30	0.6	0	100
	14			100				
<i>Botrytis cinerea</i>	C		65	0	C		65	0
	3		44	32.30±0.50	2	0.04	40	38.46±0.50
	6		11	83.07±0.81	6	0.12	20	69.23±0.95
	8		4	93.84±0.95	10	0.2	3	95.38±0.50
	10		0	100	12	0.24	0	100
<i>Botrytis tulipae</i>	C		62	0	C		62	0
	3		41	33.87±0.50	2	0.04	50	19.35±0.50
	6		10	83.87±0.50	6	0.12	24	61.29±0.81
	8		3	95.16±0.57	10	0.20	3	95.16±0.50
	10		0	100	12	0.24	0	100
<i>Fusarium oxysporum</i>	C		32	0	C		32	0
	3		29	9.37±0.57	2	0.04	20	37.5±0.50
	6		17	46.87±0.50	6	0.12	8	75±0.50
	8		12	62.5±0.50	8	0.16	2	93.75±0.57
	10		4	87.5±0.81	10	0.20	0	100
	12		0	100				
<i>Penicillium gladioli</i>	C		15	0	C		15	0
	3		11	26.66±0.50	10	0.2	11	26.66±0.50
	6		7	53.33±0.81	16	0.32	9	40±0.50
	8		3	80±0.57	20	0.4	6	60±0.50
	10		0	100	25	0.5	3	80±0.50
					30	0.6	0	100
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	C		64	0	C		64	0
	3		31	51.56±0.50	2	0.04	30	53.12±0.50
	6		15	76.56±0.57	4	0.08	15	76.56±0.50
	8		3	95.31±0.81	6	0.12	4	93.75±0.57
	10		0	100	8	0.16	0	100

## **2. Fungi asociați probelor arheologice**

### **2.1. Fungi asociați oaselor arheologice**

#### **2.1.1. Evaluarea gradului de degradare a oaselor arheologice**

Potrivit scorurilor tafonomice atribuite prin analiza antropologică oasele arheologice analizate prezintă un nivel bun de conservare globală, remarcându-se local alterări ale culorii pentru toate probele analizate și exfolieri ale țesutului osos extern în cazul probei de la Feleacu.

Fragmente ale zonelor pigmentate de pe suprafață oaselor au fost examinate la microscopul electronic de scanning, remarcându-se pe suprafața osului de la Feleacu prezența unui biofilm fungic al speciei *Stachybotrys chartarum*. Pe suprafețele oaselor de la Turdaș și Tărian se remarcă prezența țesutului osos superficial, fără celule microbiene vii.

În general, în contextul oaselor arheologice, markerii biodegradării evidențiați pe suprafața probelor analizate au fost acumularea de pigmenți (Piepenbrink, 1986), încorporarea de fragmente celulare din mediu (Garland, 1989), microtunele, crăpăturile superficiale și adânciturile (Marchiafava *et al.*, 1974; Hackett, 1981). Pentru probele de la Feleacu și Tărian, nu au putut fi observate astfel de remodelări ale țesutului osos superficial, dar pentru proba de la Turdaș se remarcă prezența de crăpături superficiale și adâncituri cu diametrul de 6  $\mu\text{m}$ .

Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier permite evaluarea modificărilor apărute în reorganizarea componentei minerale respectiv organice (Stiner *et al.*, 2001), deoarece hidroxiapatita, respectiv colagenul absorb lumina infraroșie incidentă la lungimi de undă diferite (Beasley *et al.*, 2014).

Pentru țesutul osos superficial al celor trei probe analizate au fost înregistrate spectrele FTIR, pe baza cărora au fost calculați trei dintre cei mai utilizați indici pentru evaluarea degradării componentei minerale respectiv organice în timp. Factorul de separare în infraroșu (Infrared Splitting Factor - IRSF) exprimă cât de bine sunt organizate cristalele de hidroxiapatită în structura osului (Berna *et al.*, 2004) și a fost calculat adunând valorile maxime ale absorbanței la  $565\text{ cm}^{-1}$  și  $605\text{ cm}^{-1}$  și împărțind suma la valoarea minimă înregistrată între cele două vârfuri (Surovell și Stiner, 2001). Raportul carbonatului la fosfat (C/P) evaluează transformările suferite de componenta minerală, fiind corelat negativ cu IRSF (Nielsen-Marsh și Hedges, 2000) și a fost calculat împărțind valoarea absorbanței la  $1415\text{ cm}^{-1}$  la cea de la  $1035\text{ cm}^{-1}$  (Wright și Schwarcz, 1996). Raportul amidei la fosfat (Am/P) estimează degradarea componentei organice și a fost

calculat împărțind valoarea absorbantei la  $1640\text{ cm}^{-1}$  la cea de la  $1035\text{ cm}^{-1}$  (Trueman *et al.*, 2004). Pierderea colagenului favorizează procesele de recristalizare în faza minerală fiind la rândul său invers corelat cu IRSF (Nielsen-Marsh și Hedges, 2000).

Valorile indicilor IRSF, C/P și Am/P pentru probele de la Feleacu, Turdaș și Tărian au fost au fost comparate, remarcându-se pentru proba de la Turdaș cea mai ridicată valoare a IRSF (3.02), corelată cu cele mai scăzute valori ale C/P (0.32) și Am/P (0.237) spre deosebire de proba de la Tărian caracterizată prin cea mai scăzută valoare a IRSF (2.14) și cele mai ridicate valori ale C/P (0.473) și Am/P (0.713). Diferențele observate între cele două probe pot fi explicate pe baza datării celor două necropole la mileniul al V-lea a Chr pentru Turdaș, respectiv secolul al XIX-lea p Chr pentru Tărian. Valorile obținute pentru proba de la Feleacu (IRSF = 2.55; C/P = 0.527; Am/P = 0.477) sunt intermediare celor de la Turdaș și Tărian, explicate de faptul că necropola a fost datată între secolele al XIII-lea și al XVI-lea p Chr. Valoarea C/P a probei de la Feleacu este însă cea mai ridicată dintre cele trei probe. Corelația liniară (Trueman *et al.*, 2008) și inversă (Bartelink *et al.*, 2014) cu IRSF ar trebui să plaseze valoarea C/P a probei de la Feleacu sub cea a osului de la Tărian. Valoarea este însă mai mare decât intervalul raportat pentru probe arheologice 0.15-0.35, indicând depunerea de carbonat preluat din mediu pe suprafața osului.

Totodată, diferențele observate ar putea fi explicate independent de vechimea probelor, de alți factori ca tipul de os arheologic analizat (Feleacu – fragment tibie, Turdaș – fragment tibie, Tărian – fragment scapulă), modul de preparare a probelor (Hollund, 2013) sau prezența microorganismelor care afectează structura osului (Müller *et al.*, 2011). Numărul redus de probe și absența replicatelor nu permit evidențierea unei corelații între vechime și valorile indicilor obținuți.

### **2.1.2. Specii izolate pe mediu de cultură**

Speciile de fungi izolate de pe oasele arheologice de la Feleacu, Turdaș și Tărian, respectiv din solurile aferente sunt sumarizate în Tabelul 2. Pe baza secvenței ITS au fost identificate 14 specii și 2 genuri de fungi aparținând claselor Sordariomycetes, Eurotiomycetes, Leotiomycetes, Dothideomycetes din încrengătura Ascomycota, Microbotryomycetes, Tremellomycetes din încrengătura Basidiomycota și Mortierellacetes din încrengătura Mucoromycota. Reprezentanții încrengăturii Ascomycota domină raportat la cei din încrengăturile Basidiomycota și Mucoromycota, situație care se suprapune cu cea descrisă în literatură, privind frecvența celor trei încrengături în structura micobioamelor din sol (Dai *et al.*, 2013; Benucci *et al.*, 2018).

Pe oasele arheologice din siturile de la Feleacu, Turdaș și Tărian au fost identificate ciupercile *Stachybotrys chartarum* (la Feleacu), *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus ustus* și *Rhodotorula mucilaginosa* (la Turdaș), *Penicillium chrysogenum*, *Cryptococcus saitoi* și *Rhodospiridiobolus ruineniae* (la Tărian) (Tabelul 2). În probele de sol aferente au fost identificate un număr mai mare de ciuperci decât pe oase. În solul de la Feleacu au fost identificate speciile de ciuperci *Stachybotrys chartarum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor*, și o specie a genului *Geomyces*, în cel de la Turdaș au fost identificate speciile *Pseudogymnoascus pannorum*, *Mortierella alpina*, *Dactylonectria macrodidyma* și *Entoleuca mammata*, iar în proba de la Tărian speciile *Stachybotrys chartarum*, *Penicillium chrysogenum*, *Pseudogymnoascus pannorum*, *Alternaria alternata*, *Ilyonectria radiculicola*, *Solicoccozyma aerea* și o specie a genului *Thielavia* (Tabelul 2).

**Tabelul 2** Specii de fungi identificate în probele de os și sol de la Feleacu, Turdaș și Tărian pe baza secvenței ITS după izolarea pe mediu Sabouraud-agar.

Substrat	Sit	Specie [Număr de acces în NCBI]	Clasă	Încrengătură
Os	Feleacu	<i>Stachybotrys chartarum</i> [MF373466]	Sordariomycetes	Ascomycota
Sol	Feleacu	<i>Stachybotrys chartarum</i> [MF373467]	Sordariomycetes	Ascomycota
		<i>Penicillium chrysogenum</i> [MF373468]	Eurotiomycetes	Ascomycota
		<i>Aspergillus versicolor</i> [MF373469]	Eurotiomycetes	Ascomycota
		<i>Geomyces</i> sp. [MF373470]	Leotiomycetes	Ascomycota
Os	Turdaș	<i>Aspergillus versicolor</i> [MF373471]	Eurotiomycetes	Ascomycota
		<i>Aspergillus ustus</i> [MF373472]	Eurotiomycetes	Ascomycota
		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> [MF373473]	Microbotryomycetes	Basidiomycota
Sol	Turdaș	<i>Pseudogymnoascus pannorum</i> [MF373474]	Leotiomycetes	Ascomycota
		<i>Mortierella alpina</i> [MF373475]	Mortierellacetes	Mucoromycota
		<i>Dactylonectria macrodidyma</i> [MF373476]	Sordariomycetes	Ascomycota
		<i>Entoleuca mammata</i> [MF373477]	Sordariomycetes	Ascomycota
Os	Tărian	<i>Penicillium chrysogenum</i> [MF373478]	Eurotiomycetes	Ascomycota
		<i>Cryptococcus saitoi</i> [MF373479]	Tremellomycetes	Basidiomycota
		<i>Rhodospiridiobolus ruineniae</i> [MF373480]	Microbotryomycetes	Basidiomycota
Sol	Tărian	<i>Stachybotrys chartarum</i> [MF373481]	Sordariomycetes	Ascomycota
		<i>Penicillium chrysogenum</i> [MF373482]	Eurotiomycetes	Ascomycota
		<i>Pseudogymnoascus pannorum</i> [MF373483]	Leotiomycetes	Ascomycota
		<i>Alternaria alternata</i> [MF373484]	Dothideomycetes	Ascomycota
		<i>Ilyonectria radiculicola</i> [MF373485]	Sordariomycetes	Ascomycota
		<i>Solicoccozyma aerea</i> [MF373486]	Tremellomycetes	Basidiomycota
	<i>Thielavia</i> sp. [MF373487]	Sordariomycetes	Ascomycota	

Speciile identificate prin izolare pe mediu de cultură prezintă celule viabile. Patru dintre speciile identificate *Stachybotrys chartarum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor* și *Pseudogymnoascus pannorum* au fost prezente în mai multe izolate din probele de os sau sol din situri de la Feleacu, Turdaș și Tărian fiind cel mai probabil contaminanți ai spațiului în care probele au fost depozitate. Cele patru specii au fost frecvent descrise în literatură ca ocupanți ai aerului din spații închise (Kuhn și Ghannoum, 2003) și din depozite ale obiectelor cu importanță istorică (Kavkler *et al.*, 2015).

Punctul de pătrundere a speciilor, în depozitul Centrului de Bioarheologie al Institutului de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Științe, nu poate fi determinat cu exactitate, dar prezența lor în mai multe probe atât de os, cât și de sol din situri arheologice diferite indică faptul că au pătruns o dată cu probele în spațiul de depozitare. Probele de la Feleacu și Turdaș au fost printre primele depuse în depozit, urmate de cele de la Tărian. *S. chartarum* a fost singura specie izolată de pe suprafața osului de la Feleacu, regăsindu-se și în proba de sol corespunzătoare și în proba de sol de la Tărian. Absența speciei cultivate în probele de la Turdaș de os și sol și în proba de os de la Tărian ar putea indica faptul că a fost preluată în depozit de pe proba de la Feleacu, răspândindu-se ușor între probele osteologice depozitate în cutii de carton (substrat nutritiv preferat de această specie) (Betancourt *et al.*, 2015). Aceeași explicație pentru modul de răspândire ar putea fi aplicată și pentru speciile *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor* și *Alternaria alternata* caracterizate prin capacitatea de a utiliza celuloza ca substrat nutritiv (Zyani *et al.*, 2009).

Speciile *Stachybotrys chartarum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor*, *Pseudogymnoascus pannorum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus ustus*, *Rhodotorula mucilaginosa* și genul *Geomyces* (Kuhn și Ghannoum, 2003) au fost frecvent raportate în literatură ca poluanți ai mediului în care se dezvoltă, eliberând în atmosferă spori, toxine sau alergeni cu potențiale implicații asupra sănătății umane cauzând afecțiuni pulmonare sau disfuncții neurologice (Viegas *et al.*, 2015). *R. mucilaginosa* este una dintre speciile izolate de pe suprafața osului de la Turdaș și este adeseori asociată cu afecțiuni la nivel cutanat (Findley *et al.*, 2013), în special la indivizi cu un sistem imunitar deficitar, fiind caracterizată în detaliu în capitolul III. 3. al lucrării de față ca agent al onicomicozei (Moț *et al.*, 2017).

Dintre speciile identificate prin cultivare, *Penicillium chrysogenum* este singura care ar putea fi implicată în degradarea post excavare a țesutului osos din probele osteologice analizate. Specia produce colagenaze, enzime care au ca substrat colagenul (de Albuquerque Wanderley *et*

al., 2016). Potențialul degradativ este însă limitat, colagenul din țesutul osos fiind înglobat în matricea de hidroxiapatită (Trueman și Martill, 2002), iar *P. chrysogenum* nu produce acizi organici (Van Den Berg *et al.*, 2008) care ar putea dizolva conținutul mineral (Kendall *et al.*, 2017).

### 2.1.3 Diversitatea comunității fungice atribuită independent de cultivarea pe mediu

Speciile de fungi și alge verzi identificate pe oasele arheologice de la Feleacu, Turdaș și Tărian, respectiv în solurile aferente sunt sumarizate în Tabelul 3. Pe baza secvenței ITS au fost identificate 33 specii și 2 genuri de fungi aparținând claselor Oomycetes (încregătura Oomycota), Saccharomycetes Sordariomycetes, Eurotiomycetes, Leotiomycetes, Dothideomycetes (încregătura Ascomycota), Microbotryomycetes, Tremellomycetes și Agaricomycetes (încregătura Basidiomycota) și Chlorophyceae (încregătura Chlorophyta a regnului Plantae).

Pentru unele din fragmentele din regiunea ITS utilizate pentru interogarea bazelor de date de secvențe nucleotidice a fost obținut atributul de Uncultured sp., însemnând că secvența este similară cu o secvență obținută printr-o metodă independentă de izolarea pe mediu de creștere, a cărei denumire de gen și specie nu este publică în baza de date.

Pe oasele arheologice din siturile de la Feleacu, Turdaș și Tărian au fost identificate ciupercile *Stachybotrys chartarum*, *Stachybotrys echinata*, *Chaetomium murorum* și *Thielavia hyalocarpa* (la Feleacu), *Stachybotrys chartarum*, *Aspergillus versicolor*, și *Alternaria alternata* (la Turdaș) *Stachybotrys chartarum*, *Cryptococcus albidus*, *Daedaleopsis confragosa*, *Omphalina mutila*, *Cladosporium herbarum*, *Rhodosporidiobolus runinae*, *Epicoccum nigrum* și *Volutella ciliata* (Tărian) (Tabelul 3). În probele de sol aferente au fost identificate un număr mai mare de specii de fungi decât pe oase. În solul de la Feleacu au fost identificate speciile *Stachybotrys chartarum*, *Acremonium persicinum*, *Stachybotrys eucylindrospora*, *Stachybotrys chlorohalonata*, *Stachybotrys kampalensis*, *Penicillium solitum* și *Aspergillus nomius*, în cel de la Turdaș speciile *Stachybotrys chartarum*, *Phialophora hyalina*, *Ramaria decurrens* și *Chaetomidium leptoderma*, iar în proba de la Tărian speciile *Kazachstania barnetti*, *Bremia lactucae*, *Neocudoniella radicea*, *Entoloma asterosporum*, *Epicoccum nigrum* și o specie a genului *Thelebolus* (Tabelul 3).

**Tabelul 3** Specii de fungi și alge verzi identificate în probele de os și sol de la Feleacu, Turdaș și Târian pe baza secvenței ITS fără izolare pe mediu.

Substrat	Sit	Specie [Număr de acces în NCBI]	Număr de clone	Clasă	Îngrengătură
Os	Feleacu	<i>Stachybotrys chartarum</i> [MF399498]	13	Sordariomycetes	Ascomycota
		<i>Stachybotrys echinata</i> [MF399499]	5	Sordariomycetes	Ascomycota
		<i>Chaetomium murorum</i> [MF399500]	2	Sordariomycetes	Ascomycota
		<i>Thielavia hyalocarpa</i> [MF399501]	3	Sordariomycetes	Ascomycota
		Uncultured sp. [MF399502]	1		
Sol	Feleacu	<i>Stachybotrys chartarum</i> [MF399503]	7	Sordariomycetes	Ascomycota
		<i>Acremonium persicinum</i> [MF399504]	2	Sordariomycetes	Ascomycota
		<i>Stachybotrys eucylindrospora</i> [MF399505]	7	Sordariomycetes	Ascomycota
		<i>Stachybotrys chlorohalonata</i> [MF399506]	1	Sordariomycetes	Ascomycota
		<i>Stachybotrys kampalensis</i> [MF399507]	5	Sordariomycetes	Ascomycota
		<i>Penicillium solitum</i> [MF399508]	1	Eurotiomycetes	Ascomycota
		<i>Aspergillus nomius</i> [MF399509]	1	Eurotiomycetes	Ascomycota
Os	Turdaș	<i>Stachybotrys chartarum</i> [MF399510]	5	Sordariomycetes	Ascomycota
		<i>Aspergillus versicolor</i> [MF399511]	4	Eurotiomycetes	Ascomycota
		<i>Tetracystis</i> sp. [MF399512]	8	Chlorophyceae	Chlorophyta
		<i>Spongiochloris spongiosa</i> [MF399513]	2	Chlorophyceae	Chlorophyta
		<i>Chlorosarcinopsis eremi</i> [MF399514]	2	Chlorophyceae	Chlorophyta
		<i>Alternaria alternata</i> [MF399515]	2	Dothideomycetes	Ascomycota
		Uncultured sp. [MF399516]	1		
Sol	Turdaș	<i>Stachybotrys chartarum</i> [MF399517]	5	Sordariomycetes	Ascomycota
		<i>Phialophora hyalina</i> [MF399518]	10	Eurotiomycetes	Ascomycota
		<i>Ramaria decurrens</i> [MF399519]	2	Agaricomycetes	Basidiomycota
		<i>Chaetomidium leptoderma</i> [MF399520]	6	Sordariomycetes	Ascomycota
		Uncultured sp. [MF399521]	1		
Os	Târian	<i>Stachybotrys chartarum</i> [MF399522]	2	Sordariomycetes	Ascomycota
		<i>Cryptococcus albidus</i> [MF399523]	3	Tremellomycetes	Basidiomycota
		<i>Daedaleopsis confragosa</i> [MF399524]	2	Agaricomycetes	Basidiomycota
		<i>Omphalina mutila</i> [MF399525]	2	Agaricomycetes	Basidiomycota
		<i>Cladosporium herbarum</i> [MF399526]	2	Dothideomycetes	Ascomycota
		<i>Rhodosporidiobolus ruminiae</i> [MF399527]	3	Microbotryomycetes	Basidiomycota
		<i>Epicoccum nigrum</i> [MF399528]	7	Dothideomycetes	Ascomycota
		<i>Volutella ciliata</i> [MF399529]	2	Sordariomycetes	Ascomycota
		Uncultured sp. [MF399530]	1		
		Sol	Târian	<i>Kazachstania barnetti</i> [MF399531]	3
<i>Bremia lactucae</i> [MF399532]	2			Peronosporae	Oomycota
<i>Thelebolus</i> sp. [MF399533]	2			Leotiomycetes	Ascomycota
<i>Neocudoniella radicea</i> [MF399534]	2			Leotiomycetes	Ascomycota
<i>Entoloma asterosporum</i> [MF399535]	2			Agaricomycetes	Basidiomycota
<i>Epicoccum nigrum</i> [MF399536]	3			Dothideomycetes	Ascomycota
<i>Tetracystis</i> sp. [MF399537]	6			Chlorophyceae	Chlorophyta
<i>Spongiochloris spongiosa</i> [MF399538]	3			Chlorophyceae	Chlorophyta
Uncultured sp. [MF399539]	1				



Majoritatea speciilor identificate pentru probele de os și sol din cele trei situri arheologice sunt frecvent întâlnite în sol (Kuhn și Ghannoum, 2003) și în spații de depozitare a obiectelor cu valoare istorică (Koul și Upadhyay, 2018). Pentru probele de la Feleacu se remarcă cu precădere prezența speciilor din genul *Stachybotrys*. Pe lângă specia *S. chartarum*, prezentă și în probele de la Turdaș și Tărian, au fost identificate patru specii precum *S. echinata*, *S. eucylindrospora*, *S. chlorohalonata*, *S. kampalensis*, caracteristice sitului de la Feleacu, localizat într-un mediu închis, reprezentat de interiorul bisericii din localitate. Numărul ridicat de specii ale genului *Stachybotrys*, doar în probele de la Feleacu, readuce în discuție posibilitatea ca ele să fi constituit punctul de pătrundere a ciupercilor în spațiul de depozitare, a cărui răspândire să fie favorizată de materialul celulozic al cutiilor de depozitare folosite pentru stocarea probelor. Totodată, genul are o răspândire ubicuitară concluzia de mai sus putând fi influențată de numărul mic de clone analizate (24 clone/probă (os/sol)/sit arheologic).

#### 2.1.4. Cuantificarea ADN-ului fungic

Numărul de molecule de ADN fungic a fost cuantificat pentru probele de os și sol de la Feleacu, Turdaș și Tărian fiind exprimat ca număr de copii ale genei pentru ARN 18S /mg probă (os/sol) (**Error! Reference source not found.**). Comunitatea fungică cea mai numeroasă a fost înregistrată în proba de sol de la Tărian ( $3.34E+09$ ), pe când cea mai puțin numeroasă a fost înregistrată în proba de sol de la Turdaș ( $9.28E+02$ ), diferența fiind de șapte ordine de mărime între probele cu valori extreme. Comparând valorile obținute pentru probele de os se remarcă cea mai ridicată valoare în proba de la Feleacu ( $8.07E+06$ ), comparativ cu cele de la Turdaș și Tărian cu valori foarte apropiate ( $5.14E+03$ ). Proba de os de la Feleacu a fost singura pe suprafața căreia a fost evidențiată cu ajutorul microscopiei prezența de celule fungice (*Stachybotrys chartarum*). Pentru probele de la Feleacu ( $8.07E+06$ ) și Turdaș ( $5.14E+03$ ) se pot remarca valori mai ridicate pentru comunitățile fungice de pe oase comparativ cu probele de sol aferente de la Feleacu ( $2.36E+06$ ) și Turdaș ( $9.28E+02$ ). Valorile ar putea fi explicate de faptul că unele celule fungice ar fi putut adera sau au putut fi încorporate în țesutul osos superficial (Garland, 1989), în contrast cu particulele de sol care ar putea fi spălate în mod constant de moleculele de apă ambientală care se infiltrează. Raportul între dimensiunea comunităților este inversat pentru probele de la Tărian, înregistrându-se  $3.34E+09$  molecule/mg probă pentru solul analizat și  $5.14E+03$  molecule/mg probă pentru os, solul de la Tărian conferind condiții propice dezvoltării comunității fungice (Jumpponen *et al.*, 2010). Dimensiunile comunităților nu pot fi explicate doar prin interpretarea

valorilor ca fiind proprii unui context *in situ* al probelor, având în vedere faptul că a fost semnalată prezența de posibili contaminanți induși în timpul excavării și analizei probelor, respectiv în timpul depozitării.

### **2.1.5. FTIR**

Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier permite înregistrarea modalităților particulare de vibrație ale principalelor tipuri de legături chimice (C-C, C-H, C-O, H-O) din structura celulară a fungilor. Câteva tipuri de legături pot fi utilizate ca discriminanți pentru identificarea speciilor de fungi, fiind înregistrate spectre, majoritatea regăsindu-se între 600–4000  $\text{cm}^{-1}$  (Salman *et al.*, 2010).

Au fost înregistrate spectrele FTIR pentru toate coloniile izolate pe mediu de cultură, dar doar 5 din cele 20 de spectre au fost utilizabile ulterior în încercarea de confirmare spectrofotometrică. Două dintre probe provin de pe suprafață osului de la Tărian fiind speciile identificate molecular ca TARIAN\_1 – *Cryptococcus saitoi*, TARIAN\_3 – *Rhodosporidiobolus ruineniae*, una din solul de la Tărian TARIAN\_4 – *Stachybotrys chartarum*, iar probele de la Turdaș provin din sol fiind identificate ca TURDAS\_5 – *Pseudogymnoascus pannorum* și TURDAS\_7 – *Entoleuca mammata* (Tabelul 2).

Pentru niciuna din speciile menționate nu au fost înregistrate, până în momentul de față, în literatură spectrele FTIR neexistând o bază pentru comparații. Totodată, spectrele menționate nu sunt identice cu alte spectre ale unor specii cunoscute, putând fi autentice, însă veridicitatea lor nu a fost confirmată prin măsurători multiple de spectre obținute din multiple culturi independente pentru aceeași specie.

## **2.2. Fungi asociați resturilor vegetale carbonizate**

Pentru cariopsele carbonizate de la Capidava nu s-a reușit amplificarea fragmentului de ADN pentru secvența ITS. Frecvent, cerealele descoperite în situri arheologice sunt carbonizate (Bilgic *et al.*, 2016), fenomen datorat de cele mai multe ori unor incendii secundare apărute în situri (Matuzeviciute *et al.*, 2018) sau depunerii acestora sub formă carbonizată (Gustafsson, 2000). De cele mai multe ori, procesul de ardere este asociat cu o bună preservare a plantelor arheologice (Antolín și Buxó, 2011), nu doar sub aspect morfologic, ci reușindu-se, de multe ori cu succes, amplificarea de molecule de ADN vechi, endogene materialului vegetal (Bilgic *et al.*, 2016). În solul asociat au fost identificate 4 specii din clasa Dothideomycetes, încrengătura

Ascomycota. Uncultured sp. este identică cu secvența unei ciuperci micorizante din încregătura Glomeromycota (Corradi *et al.*, 2004). Speciile identificate aparțin predominant genului *Alternaria* (*A. tenuissima*, *A. alternata*, *A. brassicae*) și genului *Aureobasidium* (*A. pullulans*) și sunt frecvente în sol, fiind caracterizate ca fitopatogeni pentru un număr mare de plante tericole (Pethybridge *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2009).

Numărul de molecule de ADN fungic a fost cuantificat și pentru proba de sol de la Capidava, fiind exprimat ca număr de copii ale genei pentru ARN 18S /mg sol și comparat ulterior cu valorile obținute pentru probele similare din siturile de la Feleacu, Turdaș și Tărian. Dimensiunea comunității fungice de la Capidava ( $7.67E+03$ ) este mai mare decât cea de la Turdaș ( $9.28E+02$ ), dar mai redusă decât cele înregistrate în probele de la Tărian ( $3.34E+09$ ) și Feleacu ( $8.75E+05$ ). Diferențele legate de dimensiunea populațiilor pot fi explicate prin condițiile ambientale diferite, marcate de lipsa umidității pentru proba de la Capidava, care favorizează totuși dezvoltarea unei comunități fungice mai numeroase decât la Turdaș.

### **3. Fungi patogeni la om**

#### **3.1. *Rhodotorula mucilaginosa* ca agent al onicomicozei**

Onicomicozele sunt infecții multifactoriale caracterizate prin îngroșarea, decolorarea și deformarea unghiilor, fără a induce durere (Cengiz *et al.*, 2018). Diagnosticul onicomicozei este realizat inițial prin evaluarea vizuală directă a unghiilor afectate, ulterior, fragmente din unghie sunt îndepărtate și utilizate pentru izolarea pe mediu a agenților infecțioși și pentru constatarea gardului de invazitate al acestora (Velasquez-Agudelo și Cardona-Arias, 2017).

Majoritatea infecțiilor se datorează acțiunii combinate a unor specii care preferă keratina ca substrat nutritiv (dermatofite) sau unor mucegaiuri și drojdii fără preferință pentru keratină (non-dermatofite) (Westerberg și Voyack, 2013). *Rhodotorula mucilaginosa* este unul dintre agenții patogeni la om cauzatori ai onicomicozei (da Cunha *et al.*, 2009). Prezența speciei *R. mucilaginosa* a fost confirmată molecular, pe baza secvenței ITS, în proba obținută din unghia infectată.

*R. mucilaginosa* face parte din clasa Microbotryomycetes din încregătura Basidiomycota, fiind o specie care prezintă celule ovale, aderente unele la suprafața celorlalte, fără a forma hife, care produc carotenoizi (Frengova și Beshkova, 2009).

Carotenoizii sunt precursori colorați ai vitaminei A cu proprietăți antioxidante (Mata-Gómez *et al.*, 2014). Sinteza lor pornește de la acetil coenzima A, care este transformată inițial în izopentenil pirofosfat și apoi în licopen care poate fi transformat în numeroși alți carotenoizi (Goodwin, 1952). Carotenoizii au rolul de a anihila speciile reactive de oxigen de la nivel celular, protejând celulele de stresul foto-oxidativ. *R. mucilaginosa* produce patru tipuri de pigmenți torularhodin, torulen,  $\beta$  – caroten și  $\gamma$  – caroten (Mata-Gómez *et al.*, 2014). Sinteza carotenoizilor este favorizată de factori ca expunerea la lumină ultravioletă, stres oxidativ sau osmotic (El-Banna *et al.*, 2012). Torularhodin asigură supraviețuirea celulelor în lumină ultravioletă (Moliné *et al.*, 2010) și împreună cu  $\beta$  – carotenul previne efectul citotoxic al speciilor reactive de oxigen (Moore și Breedveld, 1989).

### **3.2. Testarea antifungicelor comerciale naftifină și bifonazol asupra speciei *Rhodotorula mucilaginosa***

Asupra speciei *R. mucilaginosa* a fost testată pentru efectul antifungic naftifina (substanța activă din produsul farmaceutic Exoderil în compoziția căruia se află în concentrație de 10 mg/ml). MIC50 a fost determinat pe baza densităților optice (OD – Optical Density) la 600 nm ale culturilor în mediu lichid cu extract de drojdie, peptonă și dextroză (YPD) la concentrații de 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.6, 1.2, 3.6, 10.8, 50, 100, 500, 1000 mg/l naftifină. Valoarea MIC50 de  $55 \pm 14$  mg/l este similară cu valoarea de 0.5 mg/l raportată în literatură pentru naftifina testată asupra speciei *R. rubra* (fosta denumire a speciei *R. mucilaginosa*) (Carrillo-Munoz *et al.*, 1999).

Pentru concentrații scăzute de naftifină s-a observat depigmentarea coloniilor analizate, fără a fi afectată creșterea celulară. Efectul compusului asupra depigmentării și concentrația minimă necesară pentru depigmentare (MDC) au fost determinate prin urmărirea absorbanței la 512 nm concomitent cu cea a densității optice la 600nm. Scăderea conținutului de carotenoizi (conținutul total fiind estimat prin valoarea absorbantei la 512 nm) corelată direct cu creșterea cantității de naftifină, poate fi asociată cu o scădere a densității optice de la 2.4 la 2.3, sugerând menținerea aproape constantă a numărului de celule independent de variația naftifinei. Valoarea MDC este de  $0.088 \pm 0.02$  mg/l, comparabilă cu valoarea de 0.008 mg/l raportată în literatură ca fiind concentrația inhibitoare a naftifinei în sinteza carotenoizilor pentru specia de bacterii *Staphylococcus aureus* (Chen *et al.*, 2016).

La nivel celular, naftifina afectează ultima enzimă (farnesil difosfate sintaza) implicată în sinteza izoprenoidului izopentenil difosfat (IPP). IPP este un produs comun în căile de sinteză ale

ergosterolului și licopenului (Verwaal *et al.*, 2007), concentrațiile mici de naftifină determinând scăderea licopenului celular (Chen *et al.*, 2016), în detrimentul ergosterolului (cu rol esențial în structura membranelor celulare fungice) afectat doar de concentrații mai ridicate ale naftifinei (Carrillo-Munoz *et al.*, 1999).

Spectrele UV-Vis au fost măsurate pentru carotenoizii extrași din coloniile de *R. mucilaginosa* tratate cu naftifină. Vârfurile de absorbție ale celor trei pigmenți celulari majori au fost înregistrate astfel:  $\beta$  – caroten (475 nm), torulen (512 nm) și torularhodin (544 nm) (Perrier *et al.*, 1995). Conformația vârfurilor se modifică o dată cu creșterea concentrației de naftifină testate, indicând o creștere a conținutului relativ de  $\beta$  – caroten o dată cu scăderea conținutului de torularhodin și torulen. La concentrații mai mari de 1.2 mg/l naftifină sinteza carotenoizilor este total inhibată.

Un alt produs antifungic comercial, bifonazol (substanța activă din produsul farmaceutic Canespor în compoziția căruia se află în concentrație de 10 mg/ml), a fost testat asupra speciei *R. mucilaginosa*. MIC50 a fost determinat pe baza OD-ului la 600 nm ale culturilor în mediu YPD lichid la concentrații de 0, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 1.2, 2.4, 10, 50, 100, 500, 1000 mg/l bifonazol. Valoarea MIC50 de  $4.4 \pm 0.8$  mg/l este similară cu valoarea de 0.3 mg/l raportată în literatură pentru bifonazol testată asupra speciei *R. rubra* (fosta denumire a speciei *R. mucilaginosa*) (Carrillo-Munoz *et al.*, 1999). Comparativ cu MIC50 obținut pentru naftifină, valoarea MIC50 a bifonazolului este mai mică cu un ordin de mărime.

Spre deosebire de naftifină, bifonazolul nu interferează cu calea de sinteză a carotenoizilor. Efectul antifungic se datorează inhibării sintezei ergosterolului prin inhibarea activității HMG-CoA-reductazei responsabile de demetilarea 4,4',14-trimetilsterolilor (Berg *et al.*, 1984).

### **3.3. Evidențierea rolului carotenoizilor**

Carotenoizii au rol în protejarea celulelor în condiții de stres (stres oxidativ, expunere la UV), motiv pentru care blocarea sintezei acestora ar putea fi corelată cu existența unor celule mai puțin rezistente la condițiile de stres. Conținutul de carotenoizi (prin absorbția la 512 nm) și creșterea celulară (prin densitatea optică la 600 nm) au fost evaluate concomitent pentru colonii control de *R. mucilaginosa*, colonii tratate cu naftifină și colonii repigmentate în condiții de creștere normale, respectiv în condiții de stres reprezentate de hipoxie și expunere la UV.

Astfel, coloniile control au fost comparate cu coloniile control tratate cu naftifină (1.2 mg/l), cu coloniile repigmentate, cu coloniile control expuse la lumină UV timp de 40 minute, cu coloniile tratate cu naftifină (1.2 mg/l) expuse la lumină UV timp de 40 min, cu coloniile control barbotate cu argon timp de 60 secunde și cu coloniile tratate cu naftifină (1.2 mg/l) barbotate cu argon timp de 60 secunde.

Tratamentele aplicate influențează ușor rata creșterii celulare, astfel valorile OD<sub>600</sub>-urilor pentru coloniile control de *R. mucilaginosa*, respectiv pentru cele tratate cu naftifină și repigmentate rămân constante, în jurul valorii de 3 (cu o ușoară creștere a valorii OD<sub>600</sub> pentru coloniile repigmentate), în timp ce, pentru probele expuse la UV valorile OD<sub>600</sub>-urilor scad până în jurul valorii de 2.5, iar pentru cele dezvoltate în mediu hipoxic au fost înregistrate cele mai scăzute valori ale OD-urilor, apropiate de 2. Atât în cazul expunerii la UV, cât și în mediu hipoxic, valorile OD<sub>600</sub>-urilor înregistrate pentru coloniile tratate și cu naftifină (UV+naft și arg+naft) sunt mai ridicate decât pentru coloniile omoloage pigmentate (UV și arg).

Conținutul total de carotenoizi este cel mai ridicat pentru colonia control de *R. mucilaginosa* și are valori similare pentru colonia repigmentată. Expunerea la UV și mediul hipoxic au determinat o scădere a conținutului de carotenoizi (de la 0.18 în control la 0.03 în proba expusă la UV și 0.04 în proba barbotată cu argon), independent de prezența naftifinei. Coloniile tratate cu naftifină au valori comparabile ale Abs<sub>512</sub> înregistrându-se 0.016 pentru control, respectiv 0.006 pentru UV+naft și 0.007 pentru arg+naft.

Rata de supraviețuire celulară mai bună a coloniilor tratate cu naftifină (1.2 mg/l) în condiții de stres (UV+naft și arg+naft), comparativ cu cele netratate, supuse aceluiași condiții (UV și arg) se poate datora stimulării producerii de ergosterol în contextul blocării căii de sinteză a carotenoizilor de către naftifină (Carrillo-Munoz *et al.*, 1999). La nivel celular, ergosterolul are rol fundamental în sistemul de membrane, incluzând membrana celulară ca atare, microdomeniile acesteia (reprezentate de asocierile lipidelor cu glicoproteine membranare, importante în semnalizarea celulară, transportul la nivel membranar și fluiditatea membranei), picăturile de grăsime din citoplasmă, vacuolele și mitocondriile (Lv *et al.*, 2016). Efectul fungicid al luminii UV asupra drojdiilor se datorează în primul rând distrugerii membranelor celulare (Ozcelik, 2007). Naftifina influențează ultrastructura celulelor de *R. mucilaginosa* (**Error! Reference source not found.**E și F), remarcându-se picături de lipide mai voluminoase în citoplasma celulelor, la concentrația de 1 mg/ml, corelate, probabil, cu creșterea cantității de ergosterol (Lv *et al.*, 2016).



#### IV. Concluzii

Extractul etanolic din frunze de *Hedera helix* a prezentat activitate antifungică împotriva ciupercilor fitopatogeni testate (*Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Botrytis tulipae*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium gladioli* și *Sclerotinia sclerotiorum*) într-o manieră dozată, cu valori ale concentrației minime inhibitoare (MIC) cuprinse între 10% și 14%. Rezultatele au fost comparabile cu cele obținute pentru fungicidul comercial fluconazol (valori ale MIC-uri cuprinse între 10% și 30%), motiv pentru care extractul de iederă ar putea fi un agent fungicid eficient în controlul și tratamentul bolilor plantelor, ca mucegaiul gri, putregaiul alb și a celor responsabile de ofilirea frunzelor.

Studiului comunităților fungice asociate oaselor/solurilor din siturile arheologice de la Feleacu, Turdaș și Tărian a condus la identificarea de specii de ciuperci raportate frecvent în literatură în diverse probe de sol sau în mediul ambiental al încăperilor închise reprezentate de spații de depozitare sau încăperi de locuit. Evaluarea comunității fungice este adusă în discuție în raport cu gradul de conservare al oaselor arheologice excavate, înainte și în timpul depozitării/procesării lor. S-a încercat stabilirea structurii comunității fungice în momentul săpăturii arheologice și urmărirea evoluției speciilor endogene, respectiv a contaminanților exogeni, pentru evaluarea potențialului lor degradativ și ca factori de risc pentru sănătatea cercetătorilor. A fost utilizată o abordare interdisciplinară care implică evaluarea vizuală macroscopică, microscopia electronică de scannig, spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier și *barcode*-uri fungice (ITS, gena pentru ARN18S) pe probe izolate în prealabil pe mediu de cultură sau analizate direct, fără izolare.

*Rhodotorula mucilaginosa* a fost identificată și confirmată molecular ca agent al onicomicozei la o pacientă în vârstă de 85 de ani cu hepatită cronică cu virusul hepatic B. Totodată, specia a fost izolată și pe osul din situl arheologic de la Turdaș. Pentru agenții antifungici naftifină (10 mg / ml, substanță activă în Exoderil) și bifonazol (10 mg / ml, substanță activă în Canespor) au fost evidențiat efectul fungicid, determinându-se valorile MIC50. Mecanismele acțiunii antifungice ale naftifinei și bifonazolului în celulele de *R. mucilaginosa* au fost similare, afectând calea biosintetică a ergosterolului. Numai naftifina afectează, însă, calea biosintetică a carotenoizilor, determinând depigmentarea coloniilor de *R. mucilaginosa*. Depigmentarea este un proces reversibil; celulele de drojdie tratate cu naftifină reluând producția de carotenoizi după transferul pe mediu de cultură fără antifungic. Spectrometria UV-vis a permis detectarea



modificărilor conținutului de carotenoizi în celulele de drojdie depigmentate, evidențiind variații în compoziția principalilor carotenoizi (torularhodin, torulen,  $\beta$  – caroten).

## Bibliografie

- Abarenkov, K., Tedersoo, L., Nilsson, R.H., Vellak, K., Saar, I., Veldre, V., Parmasto, E., Proux, M., Aan, A., Ots, M., (2010), PlutoF—a web based workbench for ecological and taxonomic research, with an online implementation for fungal ITS sequences, *Evolutionary Bioinformatics Online*, **6**, 189.
- Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, Q., Steinberg, C., (2009), Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*, *New Phytologist*, **184**, 529-544.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., (1997), Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic acids research*, **25**, 3389-3402.
- Andrews, J.M., (2001), Determination of minimum inhibitory concentrations, *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, **48**, 5-16.
- Antolín, F., Buxó, R., (2011), Proposal for the systematic description and taphonomic study of carbonized cereal grain assemblages: a case study of an early Neolithic funerary context in the cave of Can Sadurní (Begues, Barcelona province, Spain), *Vegetation History and Archaeobotany*, **20**, 53-66.
- Arora, D.K., (2003), *Handbook of fungal biotechnology*. CRC Press.
- Atkins, S.D., Clark, I.M., (2004), Fungal molecular diagnostics: a mini review, *Journal of Applied Genetics*, **45**, 3-15.
- Atlas, R.M., (2010), *Handbook of microbiological media*. CRC press.
- Baćmaga, M., Wyszowska, J., Kucharski, J., (2016), The effect of the Falcon 460 EC fungicide on soil microbial communities, enzyme activities and plant growth, *Ecotoxicology*, **25**, 1575-1587.
- Baldrian, P., Kolarik, M., Stursova, M., Kopecky, J., Valaskova, V., Vetrovsky, T., Zifcakova, L., Snajdr, J., Ridl, J., Vlcek, C., Voriskova, J., (2012), Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition, *The ISME journal*, **6**, 248-258.
- Bálint, M., Schmidt, P.A., Sharma, R., Thines, M., Schmitt, I., (2014), An Illumina metabarcoding pipeline for fungi, *Ecology and evolution*, **4**, 2642-2653.
- Bartelink, E., Berry, R., Chesson, L., (2014), Stable isotopes and human provenancing, *Advances in forensic human identification*, 165-192.
- Beasley, M.M., Bartelink, E.J., Taylor, L., Miller, R.M., (2014), Comparison of transmission FTIR, ATR, and DRIFT spectra: implications for assessment of bone bioapatite diagenesis, *Journal of Archaeological Science*, **46**, 16-22.
- Benucci, G.M.N., Bonito, V., Bonito, G., (2018), Fungal, Bacterial, and Archaeal Diversity in Soils Beneath Native and Introduced Plants in Fiji, South Pacific, *Microbial ecology*, 1-11.
- Berg, D., Regel, E., Harenberg, H., Plempel, M., (1984), Bifonazole and clotrimazole. Their mode of action and the possible reason for the fungicidal behaviour of bifonazole, *Arzneimittel-Forschung*, **34**, 139-146.
- Berna, F., Matthews, A., Weiner, S., (2004), Solubilities of bone mineral from archaeological sites: the recrystallization window, *Journal of archaeological Science*, **31**, 867-882.
- Betancourt, D.A., Dean, T.R., Kim, J., Levy, J., (2015), Genome sequence of *Stachybotrys chartarum* strain 51-11, *Genome announcements*, **3**, e01114-01115.

Bilgic, H., Hakki, E.E., Pandey, A., Khan, M.K., Akkaya, M.S., (2016), Ancient DNA from 8400 year-old Çatalhöyük wheat: implications for the origin of Neolithic agriculture, *PloS one*, **11**, e0151974.

Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., (2013), Active microorganisms in soil: critical review of estimation criteria and approaches, *Soil Biology and Biochemistry*, **67**, 192-211.

Buee, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R.H., Uroz, S., Martin, F., (2009), 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity, *The New phytologist*, **184**, 449-456.

Carrillo-Munoz, A., Tur-Tur, C., Bornay-Llinares, F., Arévalo, P., (1999), Comparative study of the in vitro antifungal activity of bifonazole, naftifine and sertaconazole against yeasts, *Journal of chemotherapy*, **11**, 187-190.

Cengiz, F.P., Cemil, B.C., Emiroglu, N., Bahali, A.G., Ozkaya, D.B., Su, O., Onsun, N., (2018), Etiology of Onychomycosis in Patients in Turkey, *Journal of the American Podiatric Medical Association*, **108**, 253-256.

Chemidlin Prevost-Boure, N., Christen, R., Dequiedt, S., Mougel, C., Lelievre, M., Jolivet, C., Shahbazkia, H.R., Guillou, L., Arrouays, D., Ranjard, L., (2011), Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR, *PloS one*, **6**, e24166.

Chen, F., Di, H., Wang, Y., Cao, Q., Xu, B., Zhang, X., Yang, N., Liu, G., Yang, C.-G., Xu, Y., (2016), Small-molecule targeting of a diapophytoene desaturase inhibits *S. aureus* virulence, *Nature chemical biology*, **12**, 174-179.

Corradi, N., Hijri, M., Fumagalli, L., Sanders, I.R., (2004), Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) harbour ancient fungal tubulin genes that resemble those of the chytrids (Chytridiomycota), *Fungal Genetics and Biology*, **41**, 1037-1045.

da Cunha, M.M., Dos Santos, L.P., Dornelas-Ribeiro, M., Vermelho, A.B., Rozental, S., (2009), Identification, antifungal susceptibility and scanning electron microscopy of a keratinolytic strain of *Rhodotorula mucilaginosa*: a primary causative agent of onychomycosis, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **55**, 396-403.

Dai, M., Bainard, L.D., Hamel, C., Gan, Y., Lynch, D., (2013), Impact of land use on arbuscular mycorrhizal fungal communities in rural Canada, *Applied and environmental microbiology*, AEM. 01333-01313.

Davidson, D.A., Wilson, C.A., (2006), An assessment of potential soil indicators for the preservation of Cultural Heritage, [sassa.org.uk/UK](http://sassa.org.uk/UK), Stirling University, School of Biological and Environmental Science.

de Albuquerque Wanderley, M.C., Neto, J.M.W.D., de Lima Filho, J.L., de Albuquerque Lima, C., Teixeira, J.A.C., Porto, A.L.F., (2016), Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review, *brazilian journal of microbiology*.

De Lucca, A.J., (2007), Harmful fungi in both agriculture and medicine, *Revista iberoamericana de micología*, **24**, 3.

Dighton, J., (2016), *Fungi in ecosystem processes*. CRC Press.

El-Banna, A.A., El-Razek, A.M.A., El-Mahdy, A.R., (2012), Some factors affecting the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*, *Food and Nutrition Sciences*, **3**, 64.

Findley, K., Oh, J., Yang, J., Conlan, S., Deming, C., Meyer, J.A., Schoenfeld, D., Nomicos, E., Park, M., Kong, H.H., (2013), Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin, *Nature*, **498**, 367-370.

Flegler, S.L., Heckman Jr, J.W., Klomparens, K.L., (1993), Scanning and transmission electron microscopy: an introduction, Oxford University Press(UK), 1993, 225.

Frać, M., Hannula, S.E., Bełka, M., Jędrzycka, M., (2018), Fungal biodiversity and their role in soil health, *Frontiers in microbiology*, **9**.

Frengova, G.I., Beshkova, D.M., (2009), Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance, *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, **36**, 163.

Garland, A.N., (1989), Microscopical analysis of fossil bone, *Applied Geochemistry*, **4**, 215-229.

Goodwin, T.W., (1952), The comparative biochemistry of the carotenoids, *The comparative biochemistry of the carotenoids*.

Guarro, J., Gené, J., Stchigel, A.M., (1999), Developments in fungal taxonomy, *Clinical microbiology reviews*, **12**, 454-500.

Gupta, S.K., Pereira, B., Singh, A., (1993), Survey of airborne culturable and non-culturable fungi at different sites in Delhi metropolis, *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, **11**, 19.

Gustafsson, S., (2000), Carbonized cereal grains and weed seeds in prehistoric houses—an experimental perspective, *Journal of Archaeological Science*, **27**, 65-70.

Gweon, H.S., Oliver, A., Taylor, J., Booth, T., Gibbs, M., Read, D.S., Griffiths, R.I., Schonrogge, K., (2015), PIPITS: an automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform, *Methods in Ecology and Evolution*, **6**, 973-980.

Hackett, C.J., (1981), Microscopical focal destruction (tunnels) in exhumed human bones, *Medicine, Science and the Law*, **21**, 243-265.

Hankin, L., Anagnostakis, S., (1975), The use of solid media for detection of enzyme production by fungi, *Mycologia*, 597-607.

Harley, J., (1934), Some critical experiments upon culture methods used for fungi, *New Phytologist*, **33**, 372-385.

Hayat, M.A., (2000), Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications. Cambridge University Press, Cambridge.

Hofreiter, M., Poinar, H.N., Spaulding, W.G., Bauer, K., Martin, P.S., Possnert, G., Pääbo, S., (2000), A molecular analysis of ground sloth diet through the last glaciation, *Molecular Ecology*, **9**, 1975-1984.

Hollund, H.I., (2013), Diagenetic screening of bone samples; tools to aid taphonomic and archaeometric investigations.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

Huang, W., Cai, Y., Surveswaran, S., Hyde, K., Corke, H., Sun, M., (2009), Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species, *Fungal Diversity*.

Jumpponen, A., Jones, K.L., Blair, J., (2010), Vertical distribution of fungal communities in tallgrass prairie soil, *Mycologia*, **102**, 1027-1041.

Kavkler, K., Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., Demšar, A., (2015), Fungal contamination of textile objects preserved in Slovene museums and religious institutions, *International Biodeterioration & Biodegradation*, **97**, 51-59.

- Kendall, C., Eriksen, A.M.H., Kontopoulos, I., Collins, M.J., Turner-Walker, G., (2017), Diagenesis of archaeological bone and tooth, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*.
- Kendrick, B., (2001), Fungi: ecological importance and impact on humans, eLS.
- Kibblewhite, M., Ritz, K., Swift, M., (2008), Soil health in agricultural systems, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **363**, 685-701.
- Kibblewhite, M., Tóth, G., Hermann, T., (2015), Predicting the preservation of cultural artefacts and buried materials in soil, *Science of the Total Environment*, **529**, 249-263.
- Koul, B., Upadhyay, H., (2018), Fungi-Mediated Biodeterioration of Household Materials, Libraries, Cultural Heritage and Its Control, Fungi and their Role in Sustainable Development: Current Perspectives. Springer, pp. 597-615.
- Kozlov, V., Kisternaya, M., (2014), Sorption properties of historic and recent pine wood, *International Biodeterioration & Biodegradation*, **86**, 153-157.
- Kuhn, D.M., Ghannoum, M.A., (2003), Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective, *Clinical microbiology reviews*, **16**, 144-172.
- Kumar, S., Carlsen, T., Mevik, B.-H., Enger, P., Blaaid, R., Shalchian-Tabrizi, K., Kauserud, H., (2011), C LOTU: An online pipeline for processing and clustering of 454 amplicon reads into OTUs followed by taxonomic annotation, *BMC bioinformatics*, **12**, 182.
- Lange, L., (2014), The importance of fungi and mycology for addressing major global challenges, *IMA fungus*, **5**, 463-471.
- Le Cabec, A., Toussaint, M., (2017), Impacts of curatorial and research practices on the preservation of fossil hominid remains, *Journal of Anthropological Sciences*, **95**, 1-28.
- Lindahl, B.D., Nilsson, R.H., Tedersoo, L., Abarenkov, K., Carlsen, T., Kjøller, R., Kõljalg, U., Pennanen, T., Rosendahl, S., Stenlid, J., (2013), Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers—a user's guide, *New Phytologist*, **199**, 288-299.
- Lv, Q.-z., Yan, L., Jiang, Y.-y., (2016), The synthesis, regulation, and functions of sterols in *Candida albicans*: well-known but still lots to learn, *Virulence*, **7**, 649-659.
- Mahé, S., Duhamel, M., Le Calvez, T., Guillot, L., Sarbu, L., Bretaudeau, A., Collin, O., Dufresne, A., Kiers, E.T., Vandenkoornhuyse, P., (2012), PHYMYCO-DB: a curated database for analyses of fungal diversity and evolution, *PLoS One*, **7**, e43117.
- Marchiafava, V., Bonucci, E., Ascenzi, A., (1974), Fungal osteoclasia: a model of dead bone resorption, *Calcified tissue research*, **14**, 195-210.
- Mata-Gómez, L.C., Montañez, J.C., Méndez-Zavala, A., Aguilar, C.N., (2014), Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview, *Microbial cell factories*, **13**, 12.
- Matuzeviciute, G.M., Abdykanova, A., Kume, S., Nishiaki, Y., Tabaldiev, K., (2018), The effect of geographical margins on cereal grain size variation: Case study for highlands of Kyrgyzstan, *Journal of Archaeological Science: Reports*, **20**, 400-410.
- May, G.S., Adams, T.H., (1997), The importance of fungi to man, *Genome research*, **7**, 1041-1044.
- Moliné, M., Flores, M.R., Libkind, D., del Carmen Diéguez, M., Farías, M.E., van Broock, M., (2010), Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin, *Photochemical & Photobiological Sciences*, **9**, 1145-1151.
- Moore, M.M., Breedveld, M.W., (1989), The role of carotenoids in preventing oxidative damage in the pigmented yeast, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Archives of biochemistry and biophysics*, **270**, 419-431.

Moş, A.C., Pârvu, M., Pârvu, A.E., Roşca-Casian, O., Dina, N.E., Leopold, N., Silaghi-Dumitrescu, R., Mircea, C., (2017), Reversible naftifine-induced carotenoid depigmentation in *Rhodotorula mucilaginosa* (A. Jörg.) FC Harrison causing onychomycosis, *Scientific reports*, **7**, 11125.

Mueller, G.M., Foster, M.S., Bills, G.F., (2011), *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Academic Press.

Müller, K., Chadeaux, C., Thomas, N., Reiche, I., (2011), Microbial attack of archaeological bones versus high concentrations of heavy metals in the burial environment. A case study of animal bones from a mediaeval copper workshop in Paris, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **310**, 39-51.

Nidiry, E.S.J., Babu, C.B., (2005), Antifungal activity of tuberose absolute and some of its constituents, *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, **19**, 447-449.

Nielsen-Marsh, C.M., Hedges, R.E., (2000), Patterns of diagenesis in bone I: the effects of site environments, *Journal of Archaeological Science*, **27**, 1139-1150.

Orgiazzi, A., Bianciotto, V., Bonfante, P., Daghino, S., Ghignone, S., Lazzari, A., Lumini, E., Mello, A., Napoli, C., Perotto, S., Vizzini, A., Bagella, S., Murat, C., Girlanda, M., (2013), 454 Pyrosequencing Analysis of Fungal Assemblages from Geographically Distant, Disparate Soils Reveals Spatial Patterning and a Core Mycobiome, *Diversity*, **5**, 73-98.

Orgiazzi, A., Lumini, E., Nilsson, R.H., Girlanda, M., Vizzini, A., Bonfante, P., Bianciotto, V., (2012), Unravelling soil fungal communities from different Mediterranean land-use backgrounds, *PloS one*, **7**, e34847.

Ozcelik, B., (2007), Fungi/bactericidal and static effects of ultraviolet light in 254 and 354 nm wavelengths, *Res J Microbiol*, **2**, 42-49.

Paul, E.A., (2014), *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Academic press.

Perrier, V., Dubreucq, E., Galzy, P., (1995), Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains, *Archives of microbiology*, **164**, 173-179.

Pethybridge, S.J., Hay, F., Jones, S., Wilson, C., Groom, T., (2006), Seedborne infection of pyrethrum by *Phoma ligulicola*, *Plant disease*, **90**, 891-897.

Piepenbrink, H., (1986), Two examples of biogenous dead bone decomposition and their consequences for taphonomic interpretation, *Journal of Archaeological Science*, **13**, 417-430.

Ramachandra, T., Bharath, S., Gupta, N., (2018), Modelling landscape dynamics with LST in protected areas of Western Ghats, Karnataka, *Journal of environmental management*, **206**, 1253-1262.

Ribas e Ribas, A.D., Daniela, A., Spolti, P., Del Ponte, E.M., Donato, K.Z., Schrekker, H., Fuentesfria, A.M., (2016), Is the emergence of fungal resistance to medical triazoles related to their use in the agroecosystems? A mini review, *brazilian journal of microbiology*, **47**, 793-799.

Roşca-Casian, O., Mircea, C., Vlase, L., Gheldiu, A.-M., Teuca, D.T., Pârvu, M., (2017), Chemical composition and antifungal activity of *Hedera helix* leaf ethanolic extract, *Acta Biologica Hungarica*, **68**, 196-207.

Rousk, J., Brookes, P.C., Bååth, E., (2009), Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization, *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 1589-1596.

Salman, A., Tsrer, L., Pomerantz, A., Moreh, R., Mordechai, S., Huleihel, M., (2010), FTIR spectroscopy for detection and identification of fungal phytopathogenes, *Spectroscopy*, **24**, 261-267.

- Stajich, J.E., Harris, T., Brunk, B.P., Brestelli, J., Fischer, S., Harb, O.S., Kissinger, J.C., Li, W., Nayak, V., Pinney, D.F., (2012), FungiDB: an integrated functional genomics database for fungi, *Nucleic acids research*, **40**, D675-D681.
- Stielow, J., Lévesque, C., Seifert, K., Meyer, W., Iriny, L., Smits, D., Renfurm, R., Verkley, G., Groenewald, M., Chaduli, D., (2015), One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes, *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, **35**, 242.
- Stiner, M.C., Kuhn, S.L., Surovell, T.A., Goldberg, P., Meignen, L., Weiner, S., Bar-Yosef, O., (2001), Bone preservation in Hayonim Cave (Israel): a macroscopic and mineralogical study, *Journal of Archaeological Science*, **28**, 643-659.
- Sundaram, U., Gurumoorthi, P., (2012), Validation of HPTLC method for quantitative estimation of l-dopa from *Mucuna pruriens*, *Int Res J Pharm*, **3**, 300-304.
- Surovell, T.A., Stiner, M.C., (2001), Standardizing infra-red measures of bone mineral crystallinity: an experimental approach, *Journal of Archaeological Science*, **28**, 633-642.
- Tedersoo, L., Suvi, T., Beaver, K., Koljalg, U., (2007), Ectomycorrhizal fungi of the Seychelles: diversity patterns and host shifts from the native *Vateriaopsis seychellarum* (Dipterocarpaceae) and *Intsia bijuga* (Caesalpiniaceae) to the introduced *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae), but not *Pinus caribea* (Pinaceae), *The New phytologist*, **175**, 321-333.
- Termorshuizen, A., Jeger, M., (2008), Strategies of soilborne plant pathogenic fungi in relation to disease suppression, *Fungal Ecology*, **1**, 108-114.
- Tonge, D.P., Pashley, C.H., Gant, T.W., (2014), Amplicon-based metagenomic analysis of mixed fungal samples using proton release amplicon sequencing, *PLoS One*, **9**, e93849.
- Trueman, C., Martill, D.M., (2002), The long-term survival of bone: the role of bioerosion, *Archaeometry*, **44**, 371-382.
- Trueman, C.N., Behrensmeyer, A.K., Tuross, N., Weiner, S., (2004), Mineralogical and compositional changes in bones exposed on soil surfaces in Amboseli National Park, Kenya: diagenetic mechanisms and the role of sediment pore fluids, *Journal of Archaeological Science*, **31**, 721-739.
- Trueman, C.N., Privat, K., Field, J., (2008), Why do crystallinity values fail to predict the extent of diagenetic alteration of bone mineral?, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **266**, 160-167.
- Van Den Berg, M.A., Albang, R., Albermann, K., Badger, J.H., Daran, J.-M., Driessen, A.J., Garcia-Estrada, C., Fedorova, N.D., Harris, D.M., Heijne, W.H., (2008), Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*, *Nature biotechnology*, **26**, 1161.
- Velasquez-Agudelo, V., Cardona-Arias, J.A., (2017), Meta-analysis of the utility of culture, biopsy, and direct KOH examination for the diagnosis of onychomycosis, *BMC infectious diseases*, **17**, 166.
- Verwaal, R., Wang, J., Meijnen, J.-P., Visser, H., Sandmann, G., van den Berg, J.A., van Ooyen, A.J., (2007), High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Applied and environmental microbiology*, **73**, 4342-4350.
- Viegas, C., Pinheiro, A.C., Sabino, R., Viegas, S., Brandão, J., Veríssimo, C., (2015), *Environmental mycology in public health: fungi and mycotoxins risk assessment and management*. Academic Press.

Wahab, S.N.A., Mohammed, N.I., Khamidi, M.F., Jamaluddin, N., (2015), Qualitative assessment of mould growth for higher education library building in Malaysia, *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, **170**, 252-261.

Weber, C.F., Vilgalys, R., Kuske, C.R., (2013), Changes in fungal community composition in response to elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and nitrogen fertilization varies with soil horizon, *Frontiers in microbiology*, **4**, 78.

Webster, J., Weber, R., (2007), *Introduction to fungi*. Cambridge University Press.

Westerberg, D.P., Voyack, M.J., (2013), Onychomycosis: Current trends in diagnosis and treatment, *American family physician*, **88**.

White, R.E., (2013), *Principles and practice of soil science: the soil as a natural resource*. John Wiley & Sons.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., (1990), Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, *PCR protocols: a guide to methods and applications*, **18**, 315-322.

Wright, L.E., Schwarcz, H.P., (1996), Infrared and isotopic evidence for diagenesis of bone apatite at Dos Pilas, Guatemala: palaeodietary implications, *Journal of Archaeological Science*, **23**, 933-944.

Zyani, M., Mortabit, D., Mostakim, M., Iraqui, M., Haggoud, A., Ettayebi, M., Koraichi, S.I., (2009), Cellulolytic potential of fungi in wood degradation from an old house at the Medina of Fez, *Annals of microbiology*, **59**, 699-704.