

**ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE BIOLOGIE BUCUREȘTI**

TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

**STUDII GENERALE PRIVIND COMPLEXITATEA MICROBIOLOGICĂ A
LACULUI SĂRAT LETEA**

Conducător științific:

CS I DR. ARDELEAN IOAN

Doctorand:

LUCACI ANCA IOANA

BUCUREȘTI

2020

Cuprins

INTRODUCERE.....	4
CONTRIBUȚII ORIGINALE	8
1. CARACTERIZAREA PARAMETRILOR FIZICO-CHIMICI AI LACULUI LETEA.....	8
1.1. MATERIALE ȘI METODE.....	8
1.1.1. Stabilirea punctelor de prelevare	8
1.1.2. Determinarea parametrilor fizico-chimici ai Lacului Letea.....	8
1.1.2.1. Determinarea parametrilor fizico-chimici	8
1.1.2.2. Analiza XRF a probelor prelevate.....	9
1.1.3. Determinarea anionului clorură.....	9
1.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII	9
2. ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN CIRCUITELE BIOGEOCHIMICE ÎN LACUL LETEA.....	16
2.1. MATERIALE ȘI METODE.....	16
2.1.1. Evidențierea microorganismelor implicate în circuitul biogeochimic al carbonului ..	16
2.1.2. Evidențierea microorganismelor implicate în circuitul biogeochimic al azotului.....	16
2.1.2.1. Bacterii amonificatoare.....	16
2.1.2.2. Bacterii denitrificatoare	17
2.1.3. Evidențierea microorganismelor implicate în circuitul biogeochimic al sulfului	17
2.1.4. Evidențierea microorganismelor specifice lacurilor saline- cazul Lacului Letea (microorganisme halofile/halotolerante)	18
2.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII	18
3. CARACTERIZAREA BACTERIILOR HALOFILE	22
3.1. MATERIALE ȘI METODE.....	22
3.1.1. Caracterizarea morfologică a bacteriilor halofile	22
3.1.2. Caracterizarea biochimică a bacteriilor halofile.....	23
VII.1.3. Încadrarea taxonomică a izolatelor într-un Domeniu.....	23
VII.1.4. Influența salinității asupra creșterii unor tulpini bacterine	23

3.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII	24
CAPITOLUL 4. SCREENING-UL UNOR IZOLATE PRODUCĂTOARE DE ENZIME EXTRACELULARE DIN CLASA HIDROLAZELOR	26
4.1. MATERIALE ȘI METODE.....	26
4.1.1. Hidroliza amidonului	26
4.1.2. Hidroliza cazeinei	26
4.1.3. Hidroliza esterazelor	27
4.1.3.1. Hidroliza Tween 80	27
4.1.3.2. Hidroliza tributirinei.....	27
4.1.4. Hidroliza carboximetil-celulozei (CMC)	27
4.1.5. Hidroliza inulinei	27
4.1.6. Hidroliza gelatinei	28
4.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII	28
5. ÎNCADRAREA TAXONOMICĂ A UNOR BACTERII HALOFILIE INVESTIGATE	30
5.1. MATERIALE ȘI METODE.....	30
5.1.1. Extracția ADN	30
5.1.2. Analiza secvenței ARNr 16S.....	30
5.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII	30
CONCLUZII GENERALE	33
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	35

CUVINTE CHEIE

LACUL LETEA

CIRCUIT BIOGEOCHIMIC

LACURI ALCALINE SĂRATE

BACTERII HALOHILE

BIOTEHNOLOGII

ENZIME EXTRACELULARE

INTRODUCERE

Larg răspândite la nivel geografic, lacurile sărate sunt ecosisteme cu importanță economică, culturală, recreativă și științifică. Fiind considerate medii lipsite de viață și cu valoare economică și științifică redusă, timp îndelungat nu au prezentat interes pentru comunitate (Florn, 2013).

Din punct de vedere economic, lacurile sărate sunt importante surse de minerale (litiu, uraniu, borax etc), produși biochimici (ex. proteine; carotenoizi, de exemplu izolați din cultivarea algei *Dunaliella salina*) sau pot fi habitat pentru păsările flamingo. Aceste tipuri de ecosisteme prezintă o valoare ecologică importantă datorită diversității speciilor ce se pot dezvolta în condițiile oferite de un astfel de tip de ecosistem. Totodată, pot fi și puncte de atracție pentru activitatea recreațională și de interes turistic, social sau economic (Marea Moartă sau Mono Lake, California).

În același timp, lacurile sărate sunt expuse condițiilor de schimbări climatice, dar și unor factori care le pun în discuție științifică și socio-economică existența (procesul de evaporare, scăderile dramatice ale nivelului apei, accentuarea nivelului salinității, radiațiile UV, intervenția umană - minerit, poluare, activități de captare etc). Spre deosebire de apele dulci, multă vreme, aceste ecosisteme au fost considerate lipsite de importanță.

Este important să se conștientizeze valoarea socio-economică, balneologică a lacurilor sărate, dar și impactul negativ al intervenției antropice și să fie elaborate planuri de conservare și protecție a acestora.

O trăsătură comună a tuturor corpurilor de apă sărată o reprezintă salinitatea, care este reprezentată de suma concentrațiilor ionilor (magneziu, calciu, potasiu, sodiu) și anionilor (carbonat, bicarbonat, clorură, sulfat) dizolvați. În general, predomină anionul clorură și cationul de sodiu, clasificând lacurile sărate în carbonat, clorocarbonat, carboclorurat, clorosulfat și clorurat. În același timp, salinitatea fiind un parametru influențat de diferiți factori biotici și abiotici, variază sezonier și spațial, fiind mai scăzută la suprafața lacului în

comparație cu apa situată mai în adâncime, fapt care definește fenomenul de heliatermie al lacurilor sărate (Grant și Jones, 2016).

În funcție de salinitate, lacurile sărate se împart în hiposaline, cu valori ale acestui parametru care variază între 3-20 g L⁻¹ și hipersaline, cu valori ale salinității peste 50 g L⁻¹. Valorile de pH ale corpurilor de apă le grupează în lacuri acide, alcaline și neutre, acestea din urmă fiind cele mai frecvente. Valoarea de pH influențează în mod direct diversitatea la nivelul lacului astfel încât cele mai bine reprezentate din acest punct de vedere sunt lacurile alcaline (Hammer, 1986).

Bacteriile halofile constituie un grup complex de microorganisme adaptate să supraviețuiască în medii hipersaline. Ele au fost izolate din lacuri hipersaline, soluri sărate sau heleșteiele de cristalizare a sării de mare (salterne). Deși multe din bacteriile halofile au fost izolate din medii sărate, totuși au putut fi izolate și din apă dulce (Larsen, 1962; Sarkar și colab., 1985; Ramos-Cormenzana, 1990). Pe lângă semnificația ecologică a acestui grup, microorganismele moderat halofile prezintă un potențial biotehnologic important deoarece acumulează la nivelul citoplasmei concentrații mari de soluții compatibile care pot funcționa ca osmoprotectori și stabilizatori enzimatici și celulari, și produc enzime extracelulare care prezintă toleranță la săruri, cu aplicabilitate deosebită în procese biotehnologice (Ramos-Cormenzana, 1990).

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI

Lucrarea de față își propune evidențierea la modul general a complexității microbiologice (inclusiv a buclei microbiene) a Lacului Letea și reprezintă *primul studiu de acest fel*, fiind așadar de o importanță aparte pentru comunitatea științifică și pentru cea locală, cu impact asupra dezvoltării studiilor și cercetărilor viitoare pentru acest ecosistem unic, cât și pentru Delta Dunării.

Din anul 1991, Delta Dunării a intrat în patrimonial mondial UNESCO, când a fost clasificată atât ca rezervație a biosferei la nivel național, cât și ca parc național conform IUCN. Situl este protejat ca zonă umedă de importanță internațională prin Convenția Ramsar (Marinescu, 2010).

Lacul Letea este situat în proximitatea satului și a pădurii cu același nume, în regiunea dintre brațele Chilia și Sulina (Popescu și colab., 1987). Este un lac permanent, neacoperit de vegetație acvatică (Moldoveanu și colab., 2020). Lacul mai poartă denumirea de *ghiol*, termen provenit din limba turcă (Șăineanu, 1932; Lucaci și colab., 2019). Se presupune că ar fi luat naștere în urma surpării pământului, în anul 1970, iar adâncimea variază între 4 și 5 metri (Torică, 2006).

Obiectivele principale care au stat la baza elaborării tezei de doctorat sunt:

1. evaluarea diversității microbiene din Lacul sărat Letea, cu salinitate condiționată sezonier,
2. caracterizarea rețelelor trofice microbiene din Lacul sărat Letea,
3. rolul comunităților microbiene în funcționalitatea sistemului salin,
4. izolarea și identificarea microorganismelor cu potențial biotehnologic din Lacul sărat Letea.

În vederea atingerii obiectivelor au fost folosite tehnici de:

- ✓ *microbiologie clasică*,
- ✓ *microscopie optică*,
- ✓ *spectroscopie (XRF)*,
- ✓ *biochimie* - screening-ul bacteriilor halofile și halotolerante în producerea de enzime extracelulare,
- ✓ *biologie moleculară* - extracție ADN genomic, amplificare PCR cu amorse specifice, electroforeza în gel de agaroză, analiza secvenței ARNr 16S, construirea de arbori filogenetici.

STRUCTURA TEZEI

Lucrarea este alcătuită din două părți și conține 36 de figuri, din care 24 în partea de contribuții personale și 25 tabele, din care 13 în partea a doua.

Prima parte prezintă informații generale despre Delta Dunării (localizare, factori climatici și diversitatea la nivelul acestei regiuni).

În partea a doua sunt prezentate contribuțiile personale asupra rolului microorganismelor implicate în ciclurile biogeochimice. Au fost izolate, caracterizate și testate o serie de bacterii moderat halofile și halotolerante. În același timp, s-a urmărit și capacitatea acestora de a sintetiza enzime extracelulare. Fiecare capitol este structurat în subcapitole ce cuprind: introducere, materiale și metode, rezultate și discuții, concluzii.

CONTRIBUȚII ORIGINALE

1. CARACTERIZAREA PARAMETRILOR FIZICO-CHIMICI AI LACULUI LETEA

1.1. Materiale și metode

1.1.1. Stabilirea punctelor de prelevare

La nivelul Lacului Letea, s-au stabilit trei puncte de prelevare iar cu ajutorul GPS-ului s-au determinat coordonatele (Rasooli și colab., 2016). Prelevările s-au desfășurat pe parcursul a doi ani, octombrie 2016 – mai 2019, sezonier: toamna 2016, primăvara, vara, toamna 2017 și primăvara 2018. Din cele trei puncte au fost prelevate probe de apă în recipiente sterile și ținute la 4°C în timpul transportului spre laborator pentru investigații ulterioare (Azhar și colab., 2014).

1.1.2. Determinarea parametrilor fizico-chimici ai Lacului Letea

1.1.2.1. Determinarea parametrilor fizico-chimici

Cu ajutorul sondei multiparametru Hanna s-au măsurat *in situ*: pH-ul, temperatura apei, salinitatea, potențialul oxido-reducător (ORP), solidele dizolvate totale (TDS), conductivitatea și saturația în oxigen (DO%).

1.1.2.2. Analiza XRF a probelor prelevate

Analiza XRF a probelor de apă prelevate din Lacul Letea s-a realizat prin spectrometrie de fluorescență de raze X cu ajutorul aparatului Supermini X-Ray Fluorescence Spectrometer (Rigaku Corporation, Japan). S-a folosit o metodă semicantitativă de determinare sub formă procentuală a elementelor ușoare, în atmosferă de heliu. Pentru efectuarea testelor s-a folosit un volum de 10 ml de probă (Neagu și colab., 2014).

1.1.3. Determinarea anionului clorură

Determinarea conținutului de cloruri dizolvate în apă s-a efectuat prin metoda Mohr (Nielsen, 2017). Principiul acestei metode constă în reacția ionilor clorură cu ionii de argint, în prezența bicromatului de potasiu 10% ca indicator. Sub agitare energetică, se formează un precipitat de clorură de argint. În procesul de titrare, la apariția unei culori roșu-cărămiziu, specifică pentru cromatul de argint se consideră că reacția dintre ionii de clorură și cei de argint (Nielsen, 2017) marchează finalul titrării. Volumul total folosit pentru test a fost de 50 ml.

1.2. Rezultate și discuții

Punctele de prelevare, notate L1, L2 și L3 (tabel 1.2.1) au fost alese astfel încât să acopere aproximativ întreaga suprafața a lacului ținând cont de faptul că, în funcție de sezon și condiționat de rata de evaporare, aceasta suferă modificări, în sensul că, în sezonul de primăvară și toamnă aria ei este mai mare comparativ cu sezonul de vară. Coordonatele geografice ale punctelor de prelevare se regăsesc detaliate în tabelul 1.2.1.

Tabel 1.2.1. Coordonatele GPS ale punctelor de prelevare (L1- Letea1, L2-Letea2, L3-Letea3).

Punct de prelevare	N	E
L1	45°16'51.978"	29°33'10.4184"
L2	45°16'53.0688"	29°33'11.6244"
L3	45°16'51.8628"	29°33'12.0204"

Sonda multiparametru Hanna a furnizat date referitoare la anumiți parametri fizico-chimici (Tabel 1.2.2).

Tabel 1.2.2. Determinarea unor parametri fizico-chimici cu ajutorul sondei multiparametru Hanna.

Sezon	Primăvară						Vară			Toamnă					
An	2017			2018			2017			2016			2017		
Punct prelevare	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3
pH	10,0	9,5	9,4	9,3	9,6	9,5	9,2	8,7	9,3	9,6	9,4	9,5	10,2	9,4	10,4
Temperatură apă (°C)	5,2	6,6	5,4	19,4	20,2	20,3	27,5	27,4	27,4	19,2	19,2	19,2	8,7	8,7	8,6
Conductivitate (mS/cm)	27,7	27,4	27,9	13,9	14,2	14,0	42,2	42,1	41,2	59,3	56,2	59,6	58,3	58,4	58,4
DO (mg O ₂ /L)	4,1	4,9	4,4	3,2	1,2	1,2	2,7	2,6	2,6	6,7	6,9	7,2	17,0	11,7	15,6
Salinitate (ppm)	16,9	16,8	16,6	7,8	8,2	8,1	27,1	27,0	26,6	39,8	38,4	39,9	38,6	38,7	38,7

Legendă: DO = oxigen total dizolvat; Puncte de prelevare: Letea1 (L1), pentru Letea2 (L2) și Letea3 (L3)

În ceea ce privește valoarea pH, în cazul apelor cu conținut ridicat de cloruri și sulfati, aceasta se situează în zona valorilor neutre. Prezența carbonaților de Ca și Mg determină ca valoarea pH-ului apei să fie cuprinsă în intervalul 7,5 - 8,5 unități de pH. O valoare de pH în intervalul 8,5 - 12 definește apele alcaline și ușor alcaline și care se caracterizează printr-un conținut ridicat al sărurilor de siliciu. Pe de altă parte, apele saline acide caracterizate printr-o valoare de pH cuprinsă în intervalul 2-3 unități posedă această caracteristică în principal ca urmare a absenței carbonaților și a capacității scăzute ca agenți de tamponare a silicaților (Benison și colab., 2007; Bowen și Benison, 2009; Hines și colab., 1992).

În Lacul Letea se observă o variație a valorii pH pornind de la 8,7 unități, valoare înregistrată în vara anului 2017, până la o valoare maximă de 10,4 unități, în toamna anului 2017 (tabel 1.2.2). Aceste valori, ale acestui parametru fizico-chimic înregistrate în mod constant peste valori de 7 unități, conduc la concluzia că Lacul Letea poate fi încadrat în categoria lacurilor cu valori de pH ușor/slab alcaline. În acest sens, comparând media valorilor de pH din perioada de toamna anului 2017 înregistrate pentru Lacul Letea, cu date din literatură de specialitate, se constată că valorile constatate de 10 unități de pH sunt asemănătoare cu valorile obținute în lacul Altai (Rusia), respectiv 10 – 10,3 unități (Foti și colab., 2008).

În raport cu datele din literatura de specialitate (Ramos - Cormenzana, 1993) și în cazul Lacului Letea s-a observat că relația dintre temperatura apei și oxigenul dizolvat este invers proporțională. Din analiza datelor obținute de-a lungul celor cinci perioade de prelevare, s-a constatat faptul că valorile înregistrate pentru oxigenul dizolvat scad sezonier, față de creșterea temperaturii apei.

În acest context, în toamna anului 2016, precum și în verile anilor 2017 și 2018, a fost înregistrată aceeași scădere a valorilor oxigenului dizolvat în raport cu valorile crescute ale temperaturii apei lacului. Acest aspect este confirmat de valoarea ridicată a oxigenului dizolvat din toamna anului 2017 și valoarea relativ scăzută a temperaturii lacului.

Cercetările efectuate pentru această lucrare, au arătat faptul că în urma analizei probelor de apă s-a constatat faptul că o serie de compuși au fost: frecvent întâlniți (HgO, SiO₂, Al₂O₃, K₂O, CaO, Fe₂O₃, Cr₂O₃), întâlniți în anumite perioade (MgO, Br, SO₃, Co₂CO₃, SrO, CuO, GeO₂, Y₂O₃, HoO₃, Ir₂O₃) întâlniți în urme (TiO₂, ZnO, Ga₂O₃, MnO, NiO, HfO₂, Nb₂O₅, Ag₂O, Ta₂O₅, ZrO₂, As₂O₃, Cs₂O).

Din analiza datelor obținute prin spectroscopie (Figura 1.2.1), s-a constatat faptul că cele mai mari valori ale celor mai frecvenți compuși s-au obținut în primăvara anului 2018. Astfel, în punctul de prelevare Letea1 (L1), procentele de masă pentru Al₂O₃ și HgO au fost de 3,814, respectiv 5,303. Pentru Fe₂O₃, valoarea maximă s-a înregistrat în punctul de prelevare Letea2 (L2). În ultimul punct, procentele de masă pentru SiO₂, K₂O și CaO au fost de 6,737; 20,014 și 9,688.



Figura 1.2.1. Aparatul Supermini X-Ray Fluorescence Spectrometer

Analizând rezultatele obținute în acest studiu, în funcție de sezon, în punctul de prelevare Letea1 (L1), în toamna anului 2016 și în vara anului 2017 s-a constatat că a predominat CaO și K₂O, ca mai apoi, în primăvara anului 2017, acești compuși să nu mai fie identificați în probele de apă de analizate. Pe de altă parte, compusul Cr₂O₃ a fost identificat numai în sezonul de primăvară din anii menționați. Dintre toate elementele determinate prin această tehnică, trei dintre acestea, respectiv SiO₂, Al₂O₃ și Fe₂O₃ au fost identificate în fiecare sezon de prelevare a probelor, respectiv primăvară, vară și toamnă (Figura 1.2.2).

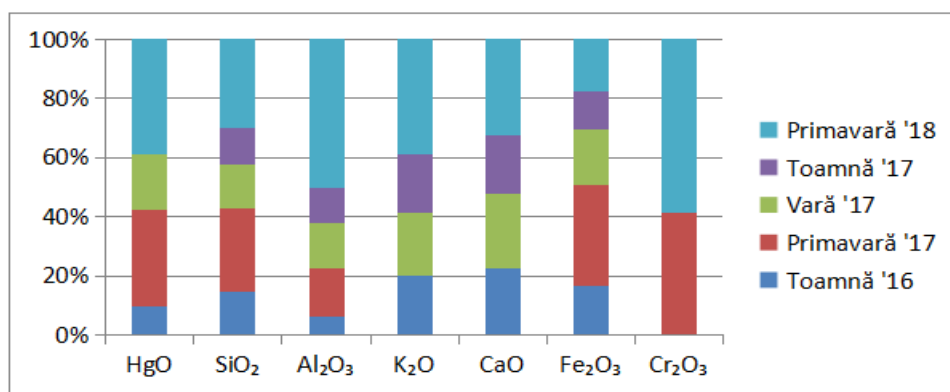


Figura 1.2.2. Prezența elementelor chimice în punctele de prelevare Letea1 (L1) ('16- 2016; '17- 2017; '18- 2018).

Pe parcursul celor cinci campanii de prelevare a probelor de apă din Lacul Letea s-a constatat că în punctul de prelevare marcat cu L2 (Letea2) predomină trei elemente, respectiv SiO₂, K₂O, Fe₂O₃. Pe de altă parte, în acest punct de prelevare, elementul Cr₂O₃ a fost identificat prin analiza XRF numai în vara anului 2017.

Un alt element cu impact asupra mediului înconjurător, și anume Al_2O_3 a fost identificat în toamna anului 2017 și la valori mai ridicate (3,81% masă) în primăvara anului 2018. Un alt element cu grad ridicat de poluare pentru sistemul investigat este HgO care a fost identificat în perioadele de vară și toamnă ale anului 2017. Pe de altă parte, prezența specifică a unor elemente chimice cu impact negativ privind calitatea ecosistemului investigat, ar putea fi atribuită și caracterului acestora de metale grele aeropurtate (Ștefănuț și colab., 2018; Buekers și colab., 2011) care ajung și se depun în apa Lacului Letea pe calea aerului în funcție de viteza și direcția vânturilor.

Figura 1.2.3 ilustrează grafic datele expuse anterior arătând impactul fiecărui element asupra stării ecosistemului și a evoluției (creștere și dezvoltare) microorganismelor din apa lacului.

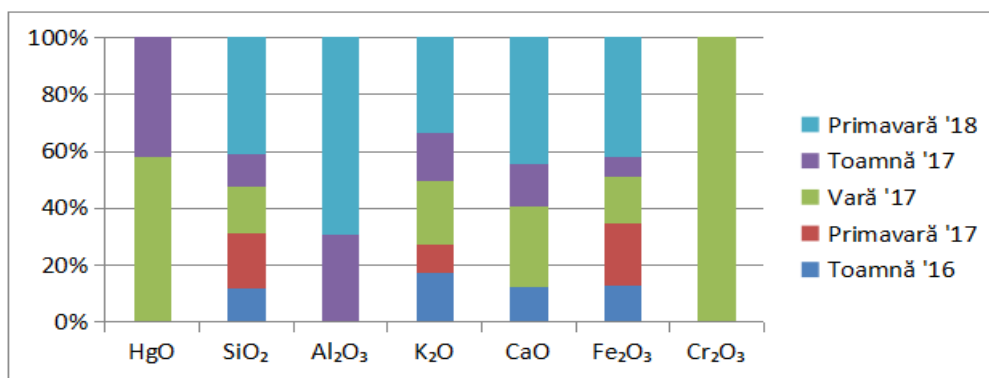


Figura 1.2.3. Prezența elementelor chimice în punctele de prelevare Letea2 (L2) ('16- 2016; '17- 2017; '18- 2018).

În contrast cu punctele de prelevare identificate ca L1 și L2, în punctul de prelevare notat L3 (Letea3) ponderea elementelor identificate prin analiza XRF este diferită în toate sezoanele investigate în cadrul acestei lucrări. Se poate remarca însă că este prezent compusul SiO_2 , similar cu punctele de prelevare L1 și L2 și că este absent compusul Cr_2O_3 , identificat în vara anului 2017 în punctul L2.

În ceea ce privește compusul Fe_2O_3 , care a fost identificat în punctele L1 și L2 în perioada 2016 - 2018, în punctul de prelevare identificat ca L3, acesta fost detectat în probele de apă prelevate în primăvara și vara anului 2017. De asemenea, din acest punct de prelevare, în perioada de primăvară a anului 2018, nu a fost detectată prezența metalelor grele, cum ar fi: HgO , Fe_2O_3 și Cr_2O_3 .

Datele din figura 1.2.4 arată că în primăvara anului 2018, cel mai abundent compus a fost Al_2O_3 (ca efect al impactului antropic și al aeropurtării deșeurilor menajere sub acțiunea vânturilor – capitolul III), iar cea mai slabă concentrație a fost identificată în cazul – SiO_2 , în toamna anului 2016.

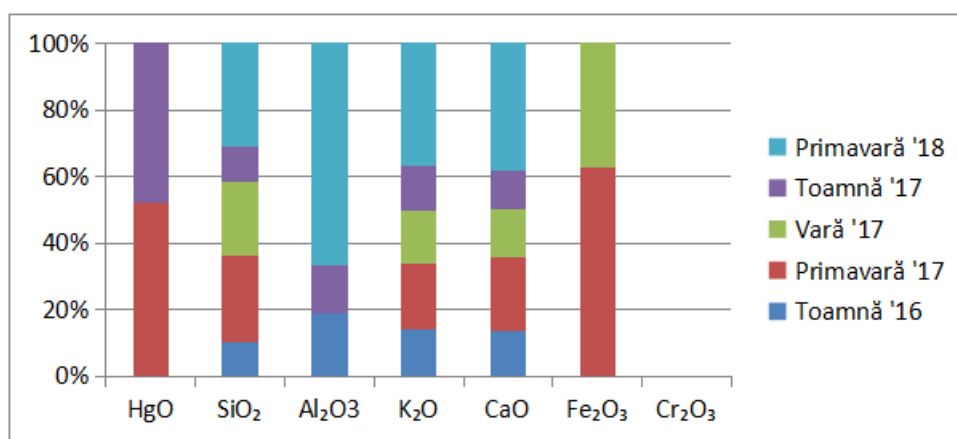


Figura 1.2.4. Prezența elementelor chimice în punctele de prelevare Letea3 (L3) ('16- 2016; '17- 2017; '18- 2018).

Salinitatea depinde de aportul și exportul de apă din ecosistem, astfel încât orice modificare cât de mică a regimului hidrologic determină modificarea naturii lacului. Aportul de apă trebuie să fie în strânsă legătura cu procesul de evaporare.

Din datele prezentate în tabelul 1.2.3, se observă faptul că salinitatea variază de la 7,81 g L⁻¹, valoare înregistrată în primăvara anului 2018, la 46,86 g L⁻¹, valoare înregistrată în toamna anului 2017.

Tabel 1.2.3. Variația sezonieră a conținutului în cloruri.

Punct prelevare	Cloruri (g L ⁻¹)				
	Primăvară		Vară	Toamnă	
	2017	2018	2017	2016	2017
L1	11,36	7,81	18,82	25,56	29,11
L2	12,43	9,59	18,46	25,56	39,05
L3	11,72	9,59	19,88	25,56	46,86

Legenda: L1 - Letea1, L2 - Letea2, L3 - Letea3

Din analiza datelor, se observă faptul că există o similitudine între valorile înregistrate în primăvara anului 2017 și primăvara anului 2018 (Figura 1.2.5). Astfel, în primăvara anului 2017 s-a înregistrat o valoare de $11,8 \text{ g L}^{-1}$ care este apropiată de valoarea obținută în primăvara anului 2018 ($8,9 \text{ g L}^{-1}$). În urma prelevărilor din toamnă, după analiza probelor de apă, s-au obținut valori diferite pentru cei doi ani. În toamna anului 2016, media conținutului în cloruri este de $25,5 \text{ g L}^{-1}$ față de media conținutului din anul 2017 ($38,3 \text{ g L}^{-1}$).

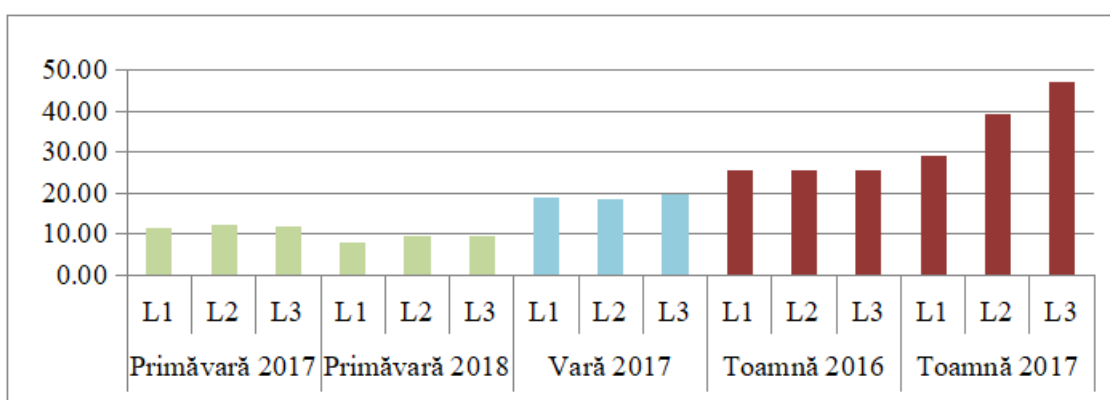


Figura 1.2.5. Variația conținutului în cloruri (g L^{-1}) din probele de apă prelevate în perioada 2016 – 2018.

Caracteristica particulară a acestui lac este variația salinității. O explicație a scăderii salinității din toamnă în primăvară ar fi aportul de apă dulce prin ploi și zăpezi (capitolul III). Lunile de vară sunt caracterizate de o creștere a temperaturilor, inducerea fenomenului de evaporare și o scădere până la absență a ploii (Trotsenko și Khmelenina, 2002). Acest lucru reiese și din analiza datelor meteo de la stația meteorologică din Sulina. Astfel, cele mai ridicate temperaturi s-au înregistrat în luna iulie și cele mai scăzute în luna ianuarie. Cantitățile de precipitații sunt mari în perioada de toamnă comparativ cu alte sezoane. În toamna anilor 2016 și 2018, au fost precipitații mai însemnate cantitativ comparativ cu anul 2018, aspect observat și în valorile clorurilor (Tabel 1.2.3). Pe măsura ce temperaturile din primăvara spre vară au crescut și fenomenul de evaporare s-a intensificat iar precipitațiile au scăzut, s-a observat o creștere a salinității (Tabel 1.2.3).

2. ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN CIRCUITELE BIOGEOCHIMICE ÎN LACUL LETEA

2.1. Materiale și metode

2.1.1. Evidențierea microorganismelor implicate în circuitul biogeochimic al carbonului

Pentru determinarea cantitativă a numărului de bacterii heterotrofe a fost utilizat un mediu solid cu următoarea compoziție (g L^{-1}): extract de levuri, 3; peptonă, 10; NaCl, 5; agar 20.

Sterilizarea s-a efectuat prin autoclavare la 120°C , timp de 30 minute.

Pentru analiză, din probele de apă, au fost realizate diluții seriale, două repetiții per diluție. Un volum de 1 ml din fiecare diluție a fost transferat în picături pe întreaga suprafață a unei plăci Petri, după care a fost adăugat mediu de cultură lichefiat și adus la $55\text{-}60^{\circ}\text{C}$ (Cojoc și colab., 2013).

Pentru determinarea numărului de bacterii heterotrofe, plăcile Petri au fost incubate la 37°C timp de 48 de ore, după care au fost cuantificate (Halder și colab., 2016).

2.1.2. Evidențierea microorganismelor implicate în circuitul biogeochimic al azotului

2.1.2.1. Bacterii amonificatoare

Pentru determinarea numărului de bacterii amonificatoare a fost utilizat un mediu de cultură cu următoarea compoziție (g L^{-1}): asparagină, 0,2; soluție de oligoelemente (H_3BO_3 , 2,8; $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0,2; $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,75; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,24; $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$, 0,04); soluție standard Winogradski (K_2HPO_4 , 5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 2,5; NaCl, 2,5; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, 0,05 g; MnSO_4 , 0,05; apă distilată, 1000 ml) 50 ml.

Mediul (5 ml) a fost distribuit în eprubete și s-a sterilizat prin autoclavare -se la 20°C , 30 minute (Lazăr și colab., 2004).

Din probele supuse analizei, au fost efectuate în triplicate diluții seriale zecimale. Din fiecare diluție, 0,2 ml s-au transferat în cele trei eprubete cu mediu de cultură. Incubarea acestora s-a efectuat la 28°C pentru o perioadă de 15 zile (Lazăr și colab., 2004).

După perioada de incubare s-au adăugat 1-2 picături de reactiv Nessler, iar în eprubetele în care s-a observat apariția unei culori galben-portocalie, reacția a fost considerată pozitivă (Lazăr și colab., 2004).

2.1.2.2. Bacterii denitrificatoare

Pentru determinarea numărului de bacterii denitrificatoare a fost utilizat mediul Pochon cu următoarea compoziție (g L^{-1}): KNO_3 , 2; soluție salină standard Winogradski (K_2HPO_4 , 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,5; NaCl , 2,5; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, 0,05; MnSO_4 , 0,05; apă distilată, 1000 ml); carbonat de calciu, 5; glucoză, 10; apă distilată, 950 ml.

Mediul a fost sterilizat la 110°C , 30 minute (Lazăr și colab., 2004).

Din probele investigate au fost efectuate diluții zecimale în triplicat. Un volum de 0,2 ml din fiecare diluție a fost transferat în eprubetele care conțin 2,5 ml mediu de cultură. Eprubetele s-au incubat pentru o perioadă de 7-15 zile, la o temperatură de 28°C (Lazăr și colab., 2004).

După incubare, s-au adăugat reactivii Griess I și Griess II, iar apariția unei culori roșii a dus la concluzia unui rezultat pozitiv (Lazăr și colab., 2004).

2.1.3. Evidențierea microorganismelor implicate în circuitul biogeochimic al sulfului

Pentru determinarea cantitativă a numărului de bacterii sulfat-reducătoare a fost utilizat mediul de cultură Postgate cu compoziția (g L^{-1}) următoare: fosfat de potasiu, 0,5; clorură de amoniu, 1; sulfat de sodiu, 0,5; sulfat de magneziu, 2; lactat de calciu, 3,5.

Sterilizarea mediului s-a realizat la 120°C , timp de 30 de minute. După sterilizare, la 500 ml mediu s-a adăugat extract de levuri 5% 10 ml, FeSO_4 5% 5 ml, Na_2S 1% 2 ml, NaHCO_3 10% 1-5 ml până când pH-ul a fost de 7,2-7,4 (Lazăr și colab., 2004).

Din probele de apă au fost efectuate diluții zecimale în triplicate, iar din acestea 2 ml au fost transferați în eprubete sterile. Ulterior, în fiecare eprubetă a fost adăugat mediu în coloana înaltă, iar eprubetele au fost incubate timp de 7 zile la 28°C (Lazăr și colab., 2004).

Apariția unui precipitat negru de FeS este un răspuns pozitiv, lipsa precipitatului reprezentând un răspuns negativ (Lazăr și colab., 2004).

2.1.4. Evidențierea microorganismelor specifice lacurilor saline- cazul Lacului Letea (microorganisme halofile/halotolerante)

Pentru determinarea cantitativă a numărului de microorganisme halofile/halotolerante, s-a folosit un mediu de cultură cu următoarea compoziție (g L⁻¹): yeast extract, 10; proteos-peptonă, 5; glucoză 1; NaCl, 100; MgCl₂·6H₂O, 7; MgSO₄·7H₂O, 9,6; CaCl₂·2H₂O, 0,36; KCl, 2; NaHCO₃ 0,06; NaBr 0,026; agar 20 (Ventosa și colab., 1989).

Din probele de apă și sediment supuse analizei, s-au realizat diluții seriale (10⁻¹-10⁻⁴) în apă fiziologică sterilă (1 ml probă se suspendă în 9 ml apă fiziologică sterilă). În plăci Petri, au fost repartizate câte 1 ml din probă și diluțiile acestora, peste care a fost adăugat mediul de cultură. Testele s-au realizat în duplicat, iar incubarea s-a efectuat la 30°C, timp de 7 zile.

2.2. Rezultate și discuții

Rolul microorganismelor în procesul de degradare a substraturilor este extrem de important. Date din literatură arată că bacteriile heterotrofe reprezintă componenta semnificativă a buclei microbiene cu rol în asigurarea productivității întregului ecosistem (Besemer și colab., 2005).

Determinarea numărului **bacteriilor heterotrofe** (unități formatoare de colonii) s-a realizat prin însămânțarea probelor pe mediu agarizat. Din datele centralizate în tabelul 2.2.1, numărul cel mai mic de bacterii heterotrofe a fost determinate în probele de apă prelevate în vara anului 2017 (3,3x10¹ U.F.C./mL), iar numărul cel mai mare s-a înregistrat în primăvara anului 2017 (3,1x10³ U.F.C./mL). Începând cu primăvara anului 2017, numărul bacteriilor heterotrofe scade, și se menține această tendință pe tot parcursul anului.

Tabel 2.2.1. Dinamica sezonieră (primăvara, vară și toamnă) a numărului bacteriilor heterotrofe.

Punct prelevare	U.F.C./ mL				
	Primăvară		Vară 2017	Toamnă	
	2017	2018		2016	2017
L1	3,1x10³	18x10 ²	3,4x10 ¹	1,71x10 ²	7,2x10 ¹
L2	7x10 ²	6x10 ²	8,5x10 ¹	2,06x10 ²	1,5x10 ²
L3	8,5x10 ²	12x10 ²	3,3x10¹	1,49x10 ²	1,3x10 ²

Legendă: L1 - Letea1, L2 - Letea2, L3 - Letea3

Datele înregistrate în figura 2.2.1 evidențiază prezența bacteriilor heterotrofe în probele de apă prelevate de-a lungul anilor 2017 și 2018. Dacă în primăvara anului 2017, coloniile erau mai mari ca suprafață și mai numeroase, pe măsura derulării sezoanelor se observă o scădere atât a numărului cât și a morfologiei acestora.

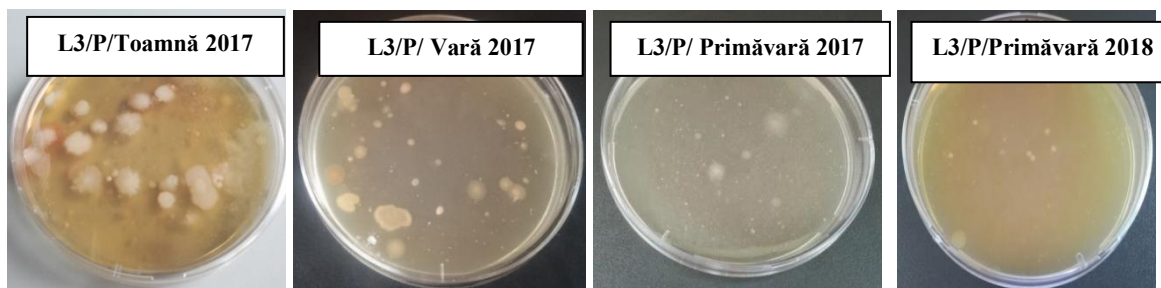


Figura 2.2.1. Prezența bacteriilor heterotrofe izolate din probele de apă prelevate în punctul L3 (Letea3), în sezoanele de primăvara, vară, toamnă (2017 și 2018).

Circuitul azotului în natură presupune patru etape: fixarea azotului molecular, amonificarea, nitrificarea (nitritarea și nitraterea) și denitrificarea (Zarnea, 1994).

Din analiza datelor obținute și prezentate în tabelul 2.2.2 reiese faptul că cele mai multe bacterii amonificatoare au fost identificate în primăvara anului 2018 (140x10² cel./mL) și cele mai puține în toamna anului 2017 (2,5 cel./mL). Valori asemănătoare s-au obținut în sezonul de primăvară atât în anul 2017 cât și în anul 2018. Se observă o creștere a numărului de bacterii amonificatoare în perioada de toamnă și de primăvară urmată de o scădere în sezonul de vară.

Tabel 2.2.2. Dinamica sezonieră (primăvară, vară, toamnă) a numărului bacteriilor amonifcatoare.

Punct prelevare	MPN				
	Primăvară		Vară 2017	Toamnă	
	2017	2018		2016	2017
L1	11x10 ³	140x10 ²	2,5x10	1,5x10 ²	2,5
L2	11x10 ³	140x10 ²	2,5x10	9,5x10 ²	2,5
L3	2,5x10 ³	45x10 ²	2,5x10	9,5x10 ²	2,5

Legendă: L1 - Letea1, L2 - Letea2, L3 - Letea3

Din datele obținute în urma analizelor efectuate și centralizate în tabelul 2.2.3 se constată faptul că în toamna anului 2017, bacteriile denitrifcatoare au fost în cel mai mare număr (11x10² cel./mL). În primăvara anului 2017, acestea nu s-au mai putut pune în evidență și se observă astfel faptul că bacteriile denitrifcatoare sunt abundente în perioada anului cu temperaturi mai scăzute (toamna), numărul lor menținându-se mic și relativ constant în restul perioadelor din an.

Tabel 2.2.3. Dinamica sezonieră (primăvară, vară, toamnă) a numărului bacteriilor denitrifcatoare.

Punct prelevare	MPN				
	Primăvară		Vară 2017	Toamnă	
	2017	2018		2016	2017
L1	0	45	4,5	4x10	11x10 ²
L2	0	110	4,5	20	15x10 ¹
L3	0	140	9,5	20	11x10 ²

Legendă: L1 - Letea1, L2 - Letea2, L3 - Letea3

Din datele prezentate în tabelul 2.2.4 se observă faptul că cel mai mare număr s-a înregistrat în primăvara anului 2017 (4,5x10² cel./mL). Numărul acestora determinat din probele de apă prelevate din Lacul Letea este relativ scăzut și constant, excepție făcând proba Letea1 (L1) din toamna anului 2016.

Tabel 2.2.4. Dinamica sezonieră (primăvară, vară, toamnă) a numărului de bacterii sulfat-reducătoare.

Punct prelevare	MPN				
	Primăvară		Vară	Toamnă	
	2017	2018	2017	2016	2017
L1	4,5x10 ²	2,5	4,5	9,5x10	7,5
L2	4,5x10 ²	2,5	2,5	2,5	7,5
L3	4,5x10 ²	2,5	9,5	2,5	2,5

Legendă: L1 - Letea1, L2 - Letea2, L3 - Letea3

Rezultatele prezentate în tabelul 2.2.5 demonstrează evoluția numărului de **bacterii halofile**, în perioada octombrie 2016 - aprilie 2018. Cel mai mare număr de unități formatoare de colonii a fost în primăvara anului 2017 acesta variind între 2,1x10³ U.F.C./mL în punctul de prelevare Letea3 (L3) și 3,7x10³ în punctul de prelevare Letea1 (L1). Temperatura apei în această perioadă a fost de 5,7⁰C iar pH-ul de 9,61 unități. În primăvara următoare (anul 2018), s-a înregistrat cel mai mic număr de bacterii halofile, 280 U.F.C./mL, în punctele de prelevare Letea1 (L1) și Letea2 (L2). Temperatura apei a fost în această perioadă de 19,9⁰C, iar valoarea pH de 9,46 unități.

Tabel 2.2.5. Dinamica sezonieră (primăvară, vară, toamnă) a numărului de bacterii halofile.

Punct prelevare	UFC / mL				
	Primăvară		Vară	Toamnă	
	2017	2018	2017	2016	2017
L1	3,7x10 ³	280	4,2x10 ²	770	1,7x10 ²
L2	3,6x10 ³	280	4,1x10 ²	410	1,9x10 ²
L3	2,1x10 ³	350	1,4x10 ³	560	2,3x10 ²

Legendă: L1-Letea1, L2- Letea2, L3-Letea3

Rezultatele obținute centralizate și prezentate în figura VI.2.2 arată faptul că, după primăvara anului 2017, numărul bacteriilor halofile scade. Dacă în primăvara anului 2017,

dimensiunile coloniilor erau reduse, în perioada următoare, are loc o creștere în suprafață a coloniilor și o diminuarea a diversității bacteriilor, numărul lor menținându-se în mod constant destul de redus.

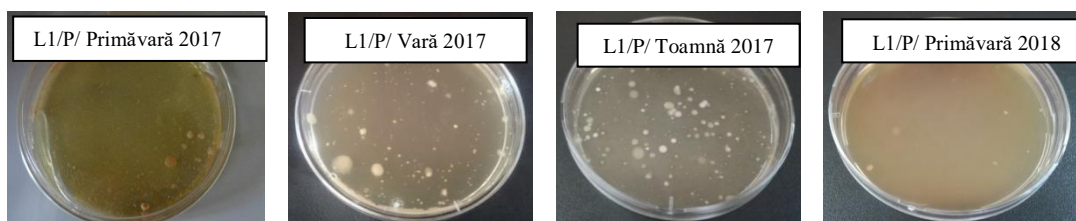


Figura 2.2.2. Imagini cu colonii de bacterii halofile din punctul de prelevare Letea1 (L1) (P-probă).

3. CARACTERIZAREA BACTERIILOR HALOFILE

3.1. Materiale și metode

3.1.1. Caracterizarea morfologică a bacteriilor halofile

Colorația Gram este o metodă de a diferenția taxonomic bacteriile pe baza afinităților tinctoriale (Roohi și colab., 2012). După fixarea culturii bacteriene, frotiul se colorează cu violet de gențiană; colorantul reacționează cu componentele acide din citoplasmă formând un complex stabil intracelular după tratarea cu soluția Lugol. În cazul bacteriilor Gram-pozitive, acest complex insolubil la contactul alcool acetonă, nu se decolorează. Bacteriile Gram-negative, neformând acest complex stabil, se decolorează. Ulterior, bacteriile Gram negative trebuie recolorate cu alt colorant de contrast (fuxina) (Lazăr și colab., 2004; Rhode, 2011).

Metoda de colorație Gram (descrisă în anul 1884), totuși este consumatoare de timp, costisitoare, iar reactivii sunt înlocuiți frecvent. S-a observat că aceleași rezultate sunt obținute și cu ajutorul unui tratament cu o soluție de 3% KOH (Buck, 1982).

Pe o lamă de sticlă, se pune o picătură de 3% KOH. Cu ajutorul unei anse sterile, de pe mediul de creștere se ia o cantitate mică de cultură de 24 ore, care se transferă în soluția de KOH. După amestecare, se verifică consistența prin ridicarea ansei la 1 cm distanță de lamă.

Formarea de stringuri certifică prezența bacteriilor Gram negative, absența stringurilor fiind caracteristică bacteriilor Gram- pozitive (Buck, 1982).

Testul are la bază diferența chimică a peretelui celular bacterian dintre bacteriile Gram-pozitive și Gram-negative. Astfel, în prezența soluțiilor alcaline, peretele celular al bacteriilor gram-negative este afectat (Davis și colab., 1968).

3.1.2. Caracterizarea biochimică a bacteriilor halofile

Capacitatea unui tulpini bacteriene de a sintetiza **oxidază** se evidențiază cu ajutorul testului Kovacs. Acest test presupune oxidarea fenil diaminei în indofenol oxidază, în prezența oxigenului atmosferic, cu formarea unei culori violet închis (indofenolul). Cultura microbiană trebuie să fie proaspătă (18- 24 ore). Este considerată reacție pozitivă schimbarea imediată sau în maxim 30 de secunde a culorii. Dacă nu apare nici o schimbare sau culoarea rămâne roz deschis/ violet, atunci răspunsul este considerat negativ.

Catalaza este o enzimă sintetizată de multe bacterii aerobe și facultativ anaerobe și care are rolul de a cataliza descompunerea peroxidului de hidrogen (H_2O_2) în apă și oxigen. În urma contactului unei tulpinei cu peroxidul de hidrogen, se consideră reacție pozitivă prezența bulelor de gaz (Azhar și colab., 2014).

3.1.3. Încadrarea taxonomică a izolatelor într-un Domeniu

Pentru încadrarea taxonomică într-un domeniu al lumii vii, bacteriile selectate au fost însămânțate prin tehnica striurilor pe mediu MH 10% NaCl suplimentat, în două variante, cu cloramfenicol (0,002%) și dezoxicolat de sodiu (0,004%). Plăcile au fost incubate la o temperatură de 30°C, timp de 48 ore (Oren, 1991).

3.1.4. Influența salinității asupra creșterii unor tulpini bacterine

Pentru a evidenția creșterea tulpinilor bacteriene în funcție de salinitate, s-a folosit un mediu de cultură cu următoarea compoziție ($g L^{-1}$): NaCl, 100; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 7;

MgSO₄·7H₂O, 9,6; CaCl₂·2H₂O, 0,36; KCl, 2; NaHCO₃ 0,06; NaBr 0,026; yeast extract, 10; proteose peptonă, 5; glucoză 1; agar 20 (Halder și colab., 2006).

Însămânțarea s-a realizat prin tehnica epuizării ansei, iar plăcile au fost incubate la 37⁰ C, timp de 48 ore.

3.2. Rezultate și discuții

Din probele de apă prelevate, au fost realizate diluții seriale zecimale. Probele și diluțiile s-au însămânțat pe mediu specific prin încorporarea în mediu. După incubare și determinarea numărului de celule viabile (Rasooli et al., 2016), au fost selectate randomic 105 izolate.

Izolatele bacteriene selectate au fost purificate prin pasaje succesive și caracterizate din punct de vedere morfologic. Pentru punerea în evidență a diversității microorganismelor izolate pe mediu MH solid, au fost selectate colonii de: *culoare* alb, crem, roz, galben, portocaliu, cărămiziu; cu *marginea* întregă, radiară, ondulată sau neregulată; *formă* circulară sau neregulată; *profil* plat, convex, umbonat, plat ridicat; *suprafață* lucioasă sau rugoasă.

S-a constatat faptul că din 105 izolate descrise, o mare parte dintre microorganismele selectate (23) nu am mai putut fi cultivate.

Pe baza afinităților tinctoriale a peretelui celular (metoda colorației Gram), cele 72 culturi pure izolate din probele de apă și 10 culturi pure izolate din sediment au fost clasificate ca fiind Gram - negative și Gram - pozitive. S-a observat faptul că în toamna anului 2016, au fost izolate doar bacterii Gram - negative. În toamna anului 2017, au fost izolate atât bacterii Gram - pozitive cât și bacterii Gram - negative, numărul acestora din urmă fiind dominant.

În ceea ce privește capacitatea de a produce oxidază și catalază, s-a observat o similitudine între sezoane. Astfel, în toamna anului 2016 și toamna anului 2017, s-au identificat izolate ce au răspuns pozitiv, predominant, la testul oxidazei. În probele de apă prelevate în primăvara anilor 2017 și 2018 au predominat izolate producătoare atât de oxidază cât și de catalază. În sezonul de vară, dintre izolatele selectate, trei au răspuns pozitiv la ambele teste, iar două negativ.

Din 82 de izolate provenite din probele de apă și sediment, 70 au fost producătoare de oxidază, 43 de catalază și 35 izolate au răspuns pozitiv la ambele teste.

Din numărul total de izolate, 83% au fost oxidazo-pozitive și 52% au fost catalazo-pozitive (Figura 3.2.1).

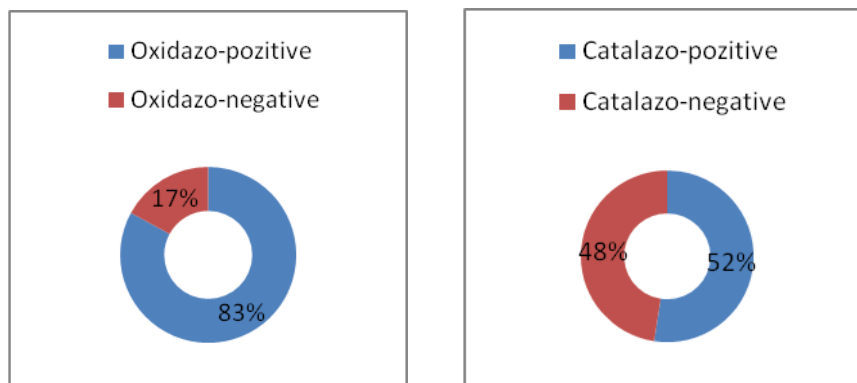


Figura 3.2.1. Încadrarea izolatelor selectate în funcție de răspunsul la testul oxidază-catalază.

Pentru a încadra izolatele într-un domeniu (*Bacteria* sau *Archaea*), mediul MH a fost suplimentat cu dezoxicolat de sodiu (0,004%) și cloramfenicol (0,002%). După efectuarea testelor, s-a observat o creștere a izolatelor pe mediu suplimentat cu dezoxicolat de sodiu, ceea ce le încadrează în domeniul *Bacteria*. Acțiunea cloramfenicolului asupra bacteriilor halofile este de a le inhiba creșterea și dezvoltarea (Oren, 1991; Ghosh și colab., 2010).

Pentru a le încadra într-un interval de salinitate, culturile testate au fost însămânțate pe mediu MH cu salinități diferite (1M, 2M, 3M, 4M), inclusiv în absența NaCl.

Din analiza datelor și folosindu-se clasificarea lui Kushner și Kamekura (1988), izolatele din probele de apă și sediment prelevate din Lacul Letea se împart în halotolerante și moderat halofile. În primăvara anilor 2017 și 2018, au fost izolate bacterii cu o creștere accentuată pe mediu fără NaCl.

În general, s-a observat o incapacitate a izolatelor selectate de a se dezvolta în prezența NaCl 4M, excepție făcând 3 izolate identificate în primăvara anului 2017, 1 izolat identificat în vara anului 2017, 1 izolat indentificat în toamna anului 2017 și 5 izolate identificate în primăvara anului 2018. Marea majoritate a izolatelor s-au dezvoltat în intervalul de salinitate 0 – 3 M (un număr de 49) (Figura 3.2.2).

0M	1M	2M	3M	4M	Numărul de izolate
----	----	----	----	----	--------------------

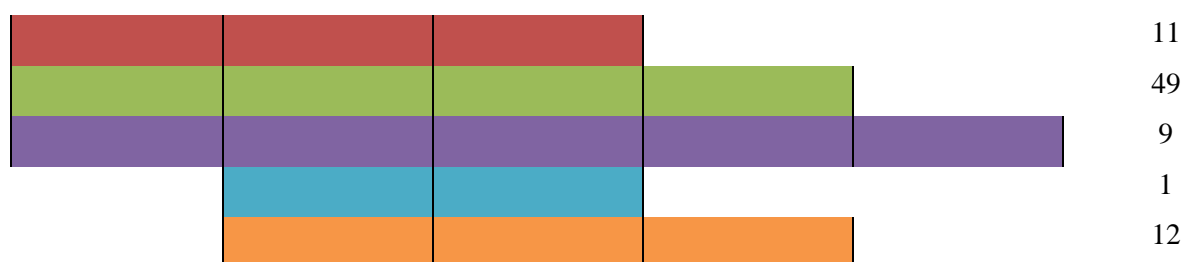


Figura 3.2.2. Creșterea izolatelor selectate într-un anumit interval de salinitate.

CAPITOLUL 4. SCREENING-UL UNOR IZOLATE PRODUCĂTOARE DE ENZIME EXTRACELULARE DIN CLASA HIDROLAZELOR

4.1. Materiale și metode

S-a utilizat un mediu MH cu următoarea compoziție (g L^{-1}): yeast extract, 10; NaCl, 100; $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 7; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 6; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,36; KCl, 2; NaHCO_3 , 0,06; NaBr, 0,026; agar, 20; la care s-a adăugat un substrat caracteristic fiecărei activități enzimatică, la concentrații diferite de NaCl (0M-4M).

4.1.1. Hidroliza amidonului

Capacitatea unor tulpini de a degrada mediul de cultură suplimentat cu amidon a fost evidențiată prin însămânțarea în spoturi a unui mediu MH la care s-au adăugat 2 g de amidon solubil.

Plăcile astfel însămânțate au fost incubate 48 ore la 28°C prin inundarea plăcilor cu soluție Lugol (I_2/KI), activitatea amilolitică s-a observat prin apariția unui halou în jurul tulpinii (Rohban și colab., 2009).

4.1.2. Hidroliza cazeinei

Pentru a pune în evidență activitatea proteazică, s-a însămânțat, în spoturi, mediul MH descris anterior la care s-a adăugat cazeină 1%.

Apariția unui inel de precipitare, în jurul soptului, după incubare 48 ore la 28°C , indică prezența unei activități proteolitice (Enache și Kamekura, 2010).

4.1.3. Hidroliza esterazelor

4.1.3.1. Hidroliza Tween 80

Prin adăugarea monooleatului de sorbitol (Tween 80) la mediul MH agarizat se poate observa activitatea esterazică a tulpinilor selectate. Ele vor fi însămânțate, în spot și apoi incubate la 28°C timp de 48 ore. Prezența cristalelor de oleat de calciu în jurul bacteriilor certifică existența Tween-esterazei (Rohban, 2008).

4.1.3.2. Hidroliza tributirinei

Pentru evidențierea activității lipazice s-a folosit mediu MH suplimentat cu tributirină 1%. Însămânțarea s-a realizat sub formă de spot, iar incubarea s-a efectuat la 28°C timp de 48 ore. Apariția unei zone clare în jurul coloniei indică prezența activității lipazice (Kumar și colab., 2012).

4.1.4. Hidroliza carboximetil-celulozei (CMC)

Pentru evidențierea activității celulazice s-a folosit mediul MH (descriș anterior) suplimentat cu carboximetil-celuloza (Rohban și colab., 2009).

4.1.5. Hidroliza inulinei

Inulinazele pot fi puse în evidență prin folosirea unui mediu MH având inulina singura sursă de carbon. Mediul a fost însămânțat în spot, iar incubarea s-a efectuat la 28° timp de 48 ore. Prezența haloului din jurul culturii bacteriene indică existența activității inulinazice (Babavalian și colab., 2014). După 48h la 28° și inundarea plăcilor cu soluție Lugol (I₂/KI), activitatea inulinazică s-a observat prin apariția unui halou în jurul tulpinii.

4.1.6. Hidroliza gelatinei

Pentru evidențierea gelatinezelor, mediul MH descris anterior a fost suplimentat cu 150g L⁻¹ gelatină (Zarnea și colab., 1992).

După inocularea mediului prin înțeparea mediului cu ansa, acesta a fost incubat la 30⁰ C timp de 24 ore. Ulterior, după incubare, probele au fost ținute în frigider timp de 10 minute. Apariția fenomenului de lichefiere a mediului a pus în evidență producerea gelatinazelor.

4.2. Rezultate și discuții

După ce au fost izolate, descrise, caracterizate și purificate, izolatele au fost testate în vederea identificării capacității de a sintetiza enzime extracelulare cu posibil potențial biotehnologic. Astfel, dintre culturile bacterine izolate și purificate, numai 49 au prezentat cel puțin o activitate enzimatică.

În **toamna** anului 2016, au fost identificate opt izolate cu capacitatea de a sintetiza inulaze (7), esteraze (7) și celulaze (1). De asemenea, s-a observat faptul că nici un izolat nu a degradat mediul suplimentat cu amidon.

În **primăvara** anului 2017, izolatele au prezentat activitate amilolitică (2), inulinazică (2), celulazică (4), esterazică (5) și proteolitică (12). Dacă în toamna anului 2016, activitatea inulinazică a predominat, în primăvara anului 2017, izolatele au avut predominant activitate proteolitică. Din 14 izolate cu capacitate de a sintetiza enzime extracelulare, șase izolate au degradat un singur tip de substrat, cinci izolate au degradat mediul suplimentat cu două tipuri de substrat, iar trei izolate au degradat trei tipuri de substrat. Deși patru izolate au avut capacitatea de a sintetiza cazeină, totuși raza de hidroliză era destul de mică (0,1 cm). Nici un izolat nu a degradat mediul suplimentat cu tributirină.

În **vara** anului 2017, au fost izolate 11 culturi bacteriene cu activitate enzimatică extracelulară. Toate cele 11 izolate au avut capacitatea de a degrada mediul suplimentat cu inulină. Opt izolate au prezentat și activitate proteolitică iar trei izolate s-au evidențiat și prin activitate amilolitică. Din cele 11 izolate, trei au sintetizat un singur tip de enzime (inulaze), cinci izolate au degradat mediul suplimentat cu două tipuri de substrat (inulină și cazeină), iar

trei izolate au degradat trei tipuri de substrat (inulină, cazeină și amidon). La fel ca în primăvara anului 2017, nici în vara aceluiași an nu s-au identificat izolate cu capacitatea de a sintetiza esterase și celulaze. În același timp, nici un izolat nu a degradat mediul suplimentat cu tributirină.

În **toamna** anului 2017, au fost identificate 7 izolate producătoare de enzime extracelulare, activitatea predominantă fiind cea proteolitică (5 izolate). Se remarcă prezența a trei izolate capabile să degradeze mediul suplimentat cu Tween 80. Tulpina C3L2-1 prezintă o activitate enzimatică extrem de complexă, fiind capabilă să degradeze mediul suplimentat cu cazeină, amidon, Tween 80 și inulină. Cel de-al doilea izolat cu activitate enzimatică extracelulară combinată este C3L1-3, ce prezintă capacitate de a sintetiza proteaze și esterase. Nu s-a izolat nici o cultură microbiană capabilă să degradeze mediul suplimentat cu tributirină.

Din probele prelevate în **primăvara** anului 2018, nouă izolate au prezentat activitate proteolitică, amilolitică și celulazică. S-a observat faptul că au predominat izolatele capabile să sintetizeze proteaze. Tulpina C4L1-4 a sintetizat și enzime amilolitice. Nu au fost identificate izolate cu activitate esterazică și inulinazică. Nu s-a izolat nici o cultură microbiană capabilă să degradeze mediul suplimentat cu tributirină.

De remarcat, este faptul că de-a lungul celor cinci sezoane, nu s-au izolat culturi bacteriene capabile să degradeze mediul suplimentat cu gelatină.

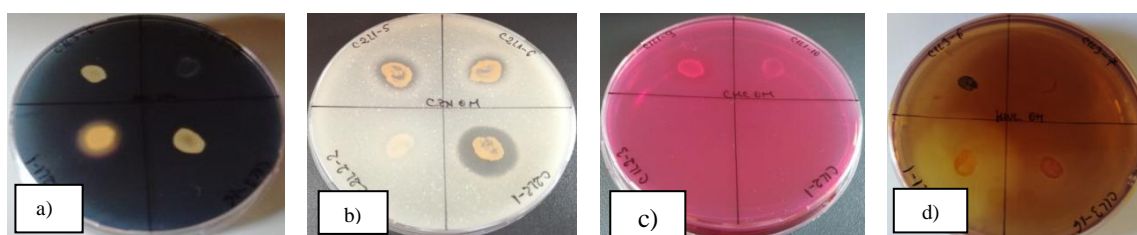


Figura 4.2.1. Evidențierea capacității unor izolate de a degrada mediul suplimentat cu: amidon (a), cazeină (b), CMC (c), inulină (d).

5. ÎNCADRAREA TAXONOMICĂ A UNOR BACTERII HALOFILE INVESTIGATE

5.1. Materiale și metode

5.1.1. Extracția ADN

Pentru extracția ADN s-a folosit kitul DNeasy Blood&Tissue; respectându-se protocolul de lucru al producătorului. După extracție și purificare s-a realizat amplificarea 16S rRNA prin reacția de polimerizare în lanț. Pentru această etapă au fost selectate randomic 8 tulpini, detaliate în tabelul VIII.2.1.

Pentru aceasta s-au folosit amorsele universale pentru bacterii: 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) și 1492R (GCTTACCTTGTTACGACTT). Amestecul pentru PCR a conținut: 1 μl DNA, 12,5 μl GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix2x, 1 μl pentru fiecare primer (10 μl), 9,5 μl apă fără nucleaze, într-un volum final de 25 μl. Amplificarea s-a realizat în Eppendorf Mastercycler pro S urmându-se următorii pași: incubare (95°C pentru 2 minute), denaturare (35 cicluri de 30 secunde, la 95°C), aliniere (54°C pentru 30 secunde), elongarea la 72°C pentru 90 secunde și o singură elongare finală la 72°C pentru 5 minute (Ruginescu și colab., 2018). Produșii PCR au fost purificați folosindu-se QIAquick PCR purification kit.

5.1.2. Analiza secvenței ARNr 16S

Produșii purificați au fost trimiși la o companie comercială, pentru secvențiere - CeMIA SA (Grecia). Secvențele obținute au fost comparate cu secvențele din baza de date folosindu-se programul NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5.2. Rezultate și discuții

În funcție de intensitatea activității hidrolitice, au fost selectate opt tulpini bacteriene pentru investigații ulterioare (o tulpină bacteriană – toamnă 2016; cinci tulpini bacteriene – primăvară 2017; două tulpini bacteriene – vară 2017). Tulpinile bacteriene alese pentru identificare au fost halotolerante. Patru tulpini (C1L1-2, C1L1-4, C2L1-1, C2L2-5) prezintă capacitatea de a sintetiza două tipuri diferite de enzime extracelulare. Tulpina C1L1-9

prezintă capacitatea de a hidroliza mediul suplimentat cu cazeină, carboximetil celuloză și Tween 80.

Bacteriile halofile ce prezintă capacitate hidrolitică multiplă sunt implicate în numeroase procese biotehnologice (Rasooli și colab., 2016).

Folosindu-se tehnica de secvențiere a genei care codifică sinteza rARN 16S (Amoozegar și colab., 2008), după protocolul descris anterior, au fost identificate cele opt tulpini bacteriene (Tabel VIII.2.1).

Tabelul 5.2.1 conține informații cu privire la cel mai apropiat taxon filogenetic conform numărului de identificare GenBank. Izolatele au fost identificate ca aparținând genurilor: *Marinobacter*, *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Bacillus*, *Halomonas* și *Salinivibrio*.

Tabel 5.2.1. Afilierea taxonomică a celor opt tulpini bacteriene izolate din Lacul Letea.

Izolate	Cel mai apropiat taxon de izolat (GenBank accession number)	Similaritate (%)
CNL1-9	<i>Marinobacter</i> sp. ME108 (AJ302707.1)	99
C1L1-2	<i>Halobacillus</i> sp. 4TMC2 (MK251570.1)	99
C1L1-4	<i>Virgibacillus</i> sp. Bac332 (CP033046.1)	98
C1L1-6	<i>Marinobacter</i> sp. M71 (FM992844.1)	99
C1L1-9	<i>Bacillus zhangzhouensis</i> c9 (MK696234.1)	99
C1L3-9	<i>Halomonas</i> sp. ALS9(KU714727.1)	98
C2L1-1	<i>Salinivibrio</i> sp. JSM 114060 (JX220752.1)	98
C2L2-5	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AB116 (KY646049.1)	98

Arborele a fost construit prin metoda probabilității maxime. Este redată similaritatea $\geq 70\%$. Rata de 0.02 arată rata de substituție la 1000 de variante de reconstrucție.

Rezultatele prezentate în figura 5.2.2 arată că cele 8 tulpini investigate, având proprietatea de a hidroliza cel puțin două sau mai multe tipuri de substraturi organice se grupează filogenetic la șase genuri de microorganisme moderat halofile sau halotolerante, respectiv: *Marinobacter*, *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Bacillus*, *Halomonas* și *Salinivibrio*.

Tulpina C1L3-9 prezintă un grad de similaritate de 99% cu specii ale genului *Halomonas*, dar se grupează separate în cadrul arborelui filogenetic. Similar, tulpinile C1L1-6 și C1L1-9 se grupează cu membrii ai genului *Marinobacter*, dar separate de aceștia cât și între

ele. Același aspect poate fi observant și pentru tulpinile C2L2-5 și C2L2-1 care se grupează cu membrii ai genului *Salinivibrio*. Spre deosebire de primele două cazuri, aceste două tulpini formează un grup individual între ele cu o valoare a probabilității maxime de 83%.

Tulpina C1L1-9 se grupează cu membrii ai genului *Bacillus* cu o probabilitate maximă de 100%.

Tulpina C1L1-4 se poziționează împreună cu membrii aparținând genului *Virgibacillus* cu o probabilitate maximă de 98%, iar tulpina C1L1-2 cu aceeași probabilitate maximă se regăsește împreună cu membri ai genului *Halobacillus*.

Analizând datele prezentate în figura 5.2.2 se pot observa două grupuri filogenetic distincte. Unul, cu o probabilitate maximă de 84% este alcătuit din membrii genurilor *Halomonas*, *Marinobacter* și *Salinivibrio*. În cadrul acestui grup se regăsesc cinci dintre tulpinile investigate.

Celălalt grup, cu o probabilitate maximă de 100% cuprinde genurile *Bacillus*, *Virgibacillus* și *Halobacillus*, iar trei dintre tulpinile analizate se regăsesc în acest grup.

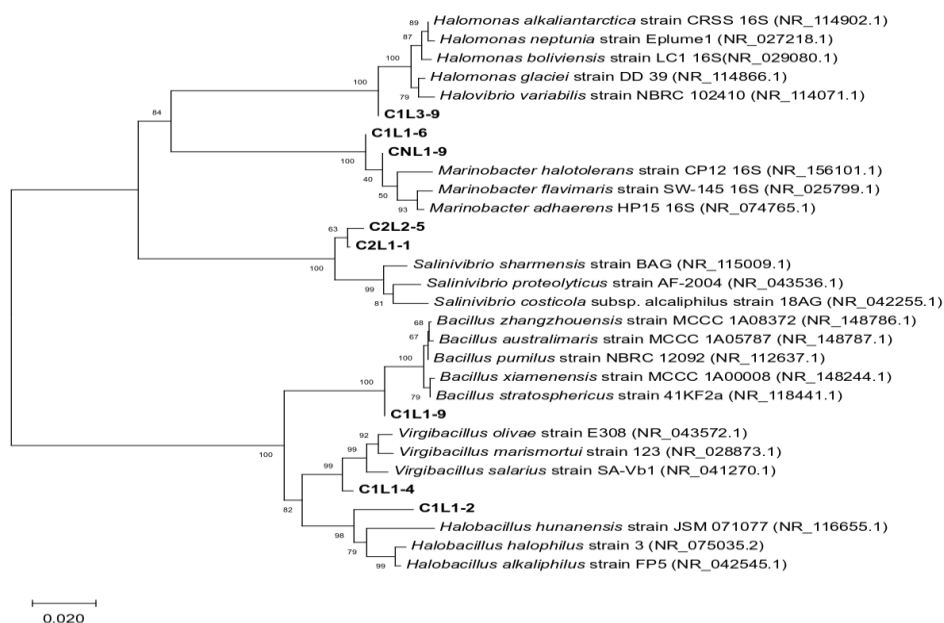


Figura 5.2.2. Arborele filogenetic construit pe baza secvențelor parțiale 16S rARN demonstrând poziția tulpinilor investigate între speciile genurilor *Marinobacter*, *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Bacillus*, *Halomonas* and *Salinivibrio*. Arborele a fost construit prin metoda probabilității maxime. Este redată similaritatea $\geq 70\%$. Rata de 0.02 arată rata de substituție la 1000 de variante de reconstrucție.

Rezultatele anterioare sunt susținute și de datele privind intervalul de salinitate în care se pot dezvolta tulpinile investigate precum și necesarul de NaCl pentru o dezvoltare optimă. Astfel, tulpinile care se încadrează în grupul I din structura arborelui filogenetic (Figura 5.2.2) se dezvoltă între 0-3M NaCl cu un optim de creștere la 1M. În cel de-al doilea grup se regăsesc tulpinile care au un optim de dezvoltare în intervalul similar de salinitate dar concentrația optimă de sare pentru creștere tinde către 0M NaCl, în condițiile în care din compoziția mediului nu au fost eliminate alte săruri de sodiu.

CONCLUZII GENERALE

- Lacul Letea prezintă o salinitate care variază sezonier. Din toamnă până în primăvară, salinitatea scade datorită aportului de apă dulce provenit din zăpezi și ploi. Primăvara are loc o concentrare a salinității datorită fenomenului de evaporare și a cantităților mici de precipitații.
- Conținutul în cloruri variază de la 8,9 g/L (primăvara anului 2018) la 38,3 g/L (toamna anului 2017).
- Valoarea de pH variază între 8,7 unități (vara anului 2017) și 10,4 unități (toamna anului 2018).
- Cel mai mare număr de bacterii halofile s-a înregistrat în primăvara anului 2017, acesta variind între $2,1 \times 10^3$ C.F.U./mL în punctul de prelevare Letea 3 și $3,7 \times 10^3$ C.F.U./mL în punctul de prelevare Letea1. În celelalte sezoane, numărul de bacteriile halofile s-a menținut relativ scăzut în mod constant.
- Numărul cel mai mic de bacterii heterotrofe a fost determinat în probele de apă prelevate în vara anului 2017 ($3,3 \times 10^1$ U.F.C./mL), iar cel mai mare număr de microorganisme heterotrofe a fost cuantificat în probele din primăvara anului 2017 ($3,1 \times 10^3$ U.F.C./mL). Din primăvara anului 2017, numărul bacteriilor heterotrofe scade, rămânând scăzut relativ constant în tot timpul anului.

- Cel mai mare număr de bacterii amonificatoare a fost identificat în primăvara anului 2018 (140×10^2 cel./mL) și cel mai mic în toamna anului 2017 (2,5 cel./ mL), valori asemănătoare obținându-se în sezonul de primăvară atât în anul 2017 cât și în anul 2018. S-a observat o creștere a numărului de bacterii amonificatoare de-a lungul toamnei și primăverii urmată de o scădere în sezonul de vară.
- În toamna anului 2017, bacteriile denitrificatoare au înregistrat cel mai mare număr (11×10^2 cel./mL), iar în primăvara anului 2017, nu s-au putut identifica. Se observă faptul că bacteriile denitrificatoare sunt abundente în perioada anului cu temperaturi mai scăzute (toamnă - iarnă), numărul lor menținându-se mic, relativ constant în restul timpului.
- Cel mai mare număr de bacterii sulfat-reducătoare s-a înregistrat în primăvara anului 2017 ($4,5 \times 10^2$ cel./mL). S-a constatat faptul că numărul de bacterii sulfat reducătoare determinat din probele de apă prelevate din Lacul Letea este relativ scăzut și constant, excepție făcând proba Letea1 (L1) din toamna anului 2016.
- Din 105 bacterii halofile descrise, după realizarea pasajelor succesive în scopul obținerii de culturi pure, 82 de izolate au putut fi cultivate și supuse ulterior, testelor.
- Din cele 82 de izolate provenite din probele de apă și sediment, 70 au răspuns pozitiv la testul pentru oxidază, 43 pentru catalază și 35 izolate au răspuns pozitiv la ambele teste.
- Toate izolatele aparțin domeniului *Bacteria*.
- În funcție de intervalul la care se dezvoltă în prezența NaCl, izolatele din probele de apă prelevate din Lacul Letea se împart în halotolerante (69) și moderat halofile (13).
- A fost efectuat screening-ul celor 82 de izolate în vederea identificării capacității de producere a enzimelor extracelulare. Astfel, un număr de 49 de izolate au prezentat activitate enzimatică (16 izolate - activitate esterazică; 22 izolate - activitate

inulinazică; 36 izolate – activitate proteolitică; șapte izolate – activitate amilolitică; șapte izolate – activitate celulozică).

- În funcție de intensitatea activității hidrolitice, au fost selectate opt tulpini bacteriene pentru investigații ulterioare (o tulpină bacteriană – octombrie 2016; cinci tulpini bacteriene – aprilie 2017; două tulpini bacteriene – iulie 2017). Tulpinile bacteriene alese pentru identificare sunt halotolerante. Patru tulpini (C1L1-2, C1L1-4, C2L1-1, C2L2-5) prezintă capacitatea de a sintetiza două tipuri diferite de enzime extracelulare. Tulpina C1L1-9 prezintă capacitatea de a hidroliza mediul suplimentat cu cazeină, carboximetil celuloză și Tween 80.

- Analiza 16S rARN a demonstrat că tulpinile CNL1-9 și C1L1-6 aparțin genului *Marinobacter*, tulpina C1L1-2 aparține genului *Halobacillus*, C1L1-4 aparține genului *Virgibacillus*, tulpina C1L1-9 aparține genului *Bacillus*, tulpina C1L3-9 aparține genului *Halomonas*, tulpinile C2L1-1 și C2L2-5 aparțin genului *Salinivibrio*.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. **Amoozegar M.A., Salehghamari E., Khajeh K., Mahbube K., Naddal S.,** 2008. Production of an extracellular thermohalophilic lipase from a moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. Strain SA-2. *Journal of Basic Microbiology*, 48, 160-167.
2. **Antón J., Oren A., Benloch S., Rodríguez-Valera F., Amann R., Rosselló-Mora R.,** 2002. *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel extreme halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 485–491.
3. **Azhar M., Uniyal V., Chauhan N., Rawat S.D.,** 2014. Isolation and biochemical characterization of Halophiles from Sahastradhara region, Dehradun, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3, 12, 753-760.
4. **Baati H., Amdouni R., Gharsallah N., Sghir A., Ammar E.,** 2010. Isolation and characterization of moderately halophilic bacteria from Tunisian solar saltern. *Current Microbiology*, 60, 157-161.
5. **Babavalian H., Amoozegar M.A., Zahraei S., Rohban R., Shakeri F., Moghaddam M.M.,** 2014. Comparison of bacterial biodiversity and enzyme production in three hypersaline lakes; Urmia, Howz-Soltan and Aran- Bidgol. *Indian Journal Microbiology*, 54, 444-449.
6. **Besemer K., Moesender M.M., Arrieta J.M.,** 2005. Complexity of bacterial communities in a river floodplain system (Danube Austria). *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2, 609-620.

7. **Cernat R., Lazăr V.**, 2011. Taxonomia și biodiversitatea microorganismelor. Note de curs și lucrări practice, Editura Univresității din București, București.
8. **Cojocaru D.C., Olteanu Z., Ciornea E., Oprică L., Cojocaru S.**, 2007. Enzimologie generală, Editura Tehnopress, Iași.
9. **Enache M., Kamekura M.**, 2010. Hydrolytic enzymes of halophilic microorganisms and their economic value. *Romanian Journal of Biochemistry*, 47, 1, 47–59.
10. **Foti M.J., Sorokin D. YU., Zacharova E.E., Pimenov N.V., Kuenen J.G., Muyz G.**, 2008. Bacterial diversity and activity along a salinity gradient in soda lakes of the Kulunda Steppe (Altai, Russia). *Extremophiles*, 12, 133–145.
11. **García M.T., Mellado E., Ostos J.C., Ventosa, A.**, 2004. *Halomonas organivorans* sp. nov., a Moderate Halophile Able to Degrade Aromatic Compounds. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 54, 1723-1728.
12. **Gâstescu P., Știucă R.**, 2008. Delta Dunării – rezervație a biosferei. Editura CD PRESS, București.
13. **Grant W.D., Jones B.E.**, 2016. Bacteria, Archaea and Viruses of Soda Lakes. (In) Soda Lake of East Africa. M. SCHAGERL (Eds.). *Springer International Publishing*, Switzerland, 97-147.
14. **Halder D., Dutta P., Mondal A., Malini Basul M.**, 2016. Isolation and Characterization of Halophilic Bacteria from Sundarban Soil. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research*, 2, 4, 442-450.
15. **Heidari H.R.K., Amoozegar M.A., Hajjghasemi M., Ziaee A.A., Ventosa A.**, 2008. Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from moderately halophilic bacterium *Halobacillus karajensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 1, 21-7.
16. **Heidari H.R.K., Ziaee A.A., Amoozegar M.A.**, 2006. Purification and biochemical characterization of a protease secreted by the *Salinivibrio* sp. strain AF-2004 and its behavior in organic solvents. *Extremophiles*, Springer, 11, 2, 237-43.
17. **Kumar S., Karan R., Kapoor S., Singh S.P., Khare S.K.**, 2012. Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 4, 1595-1603.
18. **Lazăr V., Măruțescu L.G., Chifiriuc M.C.**, 2016. Microbiologie general și aplicată. Editura Universității din București,
19. **Liu Y., Lai Q., Du J., Shao. Z.**, 2016. *Bacillus zhangzhouensis* sp. nov. and *Bacillus australimaris* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 1193–1199.
20. **Marinescu D.**, 2010. Tratat de dreptul mediului. Ediția a IV-a, revăzută și adăugită. Universul Juridic, București, 330-368.
21. **Margesin R., Schinner F.**, 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5, 73–83.
22. **Mesbah N.M., Abou-El-Ela S.H., Wiegel J.**, 2007. Novel and unexpected prokaryotic diversity in water and sediments of the alkaline, hypersaline lakes of the Wadi and Natrun, Egypt. *Microbial Ecology*, 54, 598–616.
23. **Minegishi H.**, 2013. Halophilic, Acidophilic, and Haloacidophilic Prokaryotes. (In) J. Seckbach, A. Oren, H. Stan-Lotter (eds.), *Polyextremophiles: Life Under Multiple Forms of Stress, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, Springer Science + Business Media Dordrecht, 27, 201–213.

24. **Moldoveanu M., Florescu L., Cojoc R., Neagu S., Bezirtzoglou E., Păceșilă I., Enache M., 2020.** The assessment of biotic composition related to environmental extremes conditions in natural salted Lake Letea. *Romanian Biotechnological Letters*, 25, 3, 1641-1650.
25. **Moore J.N., 2016.** Recent desiccation of Western Great Basin Saline Lakes: Lessons from Lake Abert, Oregon, U.S.A., *Science of the Total Environment*, 554-555, 142-154.
26. **Nanu C., Bozagievici R., 2013.** Importanța zonelor umede. (In) “Manual de... Delta Dunării”. Editura Centrul de informare tehnologică Delta Dunării, Tulcea.
27. **Neagu S., Enache M., Cojoc R., 2014.** Extracellular hydrolytic activities of halophilic microorganisms isolated from Balta Albă salt lake. *Romanian Biotechnological Letters*, 19, 1, 8951-8958.
28. **Nielsen S.S., 2017.** Sodium Determination Using Ion-Selective Electrodes, Mohr Titration, and Test Strips. (In) *Food Analysis Laboratory Manual. Food Science Text Series*, Springer, Cham.
29. **Oren A., 2008.** Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4-2.
30. **Popescu Teodosiu G., Dumitru L., Faghi A.-M., 2008.** Calitatea apelor de suprafață din bazinul râurilor Jijia și Prut. Stare microbiologică. (In) *Bazinul hidrografic Prut: Diagnosticul stării ecologice resursei naturale de apă*, Editura Universității din Suceava, 195-252.
31. **Rasooli M., Amoozegar M.A., Sepahy A.A., Babavalian H., Tebyanian H., 2016.** Isolation, Identification and Extracellular Enzymatic Activity of Culturable Extremely Halophilic Archaea and Bacteria of IncheBoroun Wetland. *International Letters of Natural Sciences*, 56, 40-51.
32. **Roberts M.F., 2005.** Organic Compatible Solutes of Halotolerant and Halophilic Microorganisms. *Aquatic Biosystems*, 1, 5.
33. **Rohban R., Amoozegar M.A., Ventosa A., 2009.** Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 333-340.
34. **Roohi A., Ahmed I., Iqbal M., Jamil M., 2012.** Preliminary isolation and characterization of halotolerant and halophilic bacteria from salt mines of Karak, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 44, 365-370.
35. **Sanchez-Porro, C., Martin, S., Mellado, E., Ventosa, A., 2003.** Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 295-300.
36. **Sârbu A., Anastasiu P., Smarandache D., 2013.** Habitate acvatice din Delta Dunării – repere în evaluare și monitorizare (In) “Manual de... Delta Dunării”, Editura Centrul de informare tehnologică Delta Dunării, Tulcea.
37. **Sorokin D.Y., Melton E.D., Overmars L., Vavourakis C.D., Muyzer G., 2014.** Microbial diversity and biochemical cycling in soda lakes. *Extremophiles*, 18, 791-809.
38. **Tripathi C.K.M., Tripathi D., Praveen V., Bihari V., 2007.** Microbial diversity - Biotechnological and industrial perspectives. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45, 326-332.
39. **Ventosa A., 2006.** Unusual microorganisms from unusual habitats: hypersaline environments. (In) *Prokaryotic Diversity-Mechanisms and Significance*; Logan, N.A., Lppin-Ascott, H.M., Oyston, P.C.F., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 223-253.

40. **Yin J., Chen J.-C., Wu Q., Chen G.-Q.**, 2014. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnology Advances*, 33, 7, 1433-1442.
41. **Zarnea G.**, 1994. *Tratat de microbiologie generală*. Editura Academiei Române. București, Vol. V, 778-821.

Lista lucrărilor științifice publicate în tematica tezei de doctorat

1. **Lucaci A.I.**, Moldoveanu M., Florescu L., Cojoc R., Neagu S., Ruginescu R., Enache M., 2019. The seasonal dynamics of the cultivable microbial communities in Letea saline lake. *AgroLife Scientific Journal*, 8, 1, 160-166.
2. Ruginescu R., Purcarea C., Dorador C., Lavin P., Cojoc R., Neagu S., **Lucaci I.**, Enache M., 2019. Exploring the hydrolytic potential of cultured halophilic bacteria isolated from the Atacama Desert. *FEMS Microbiology Letters*, 336, 17.
3. **Lucaci A.I.**, Neagu N., Cojoc R., Ruginescu R., Ardelean I., Enache M., 2021. Benefits of understanding the enzymatic activities in saline Lake Letea in the Danube Delta. *Romanian Biotechnological Letters* – în curs de publicare.