



ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biologie București

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

IDENTIFICAREA UNOR TULPINI NOI DE MICROORGANISME
HALOFILE ȘI HALOTOLERANTE PRODUCĂTOARE DE ENZIME
HIDROLITICE CU IMPORTANȚĂ BIOTEHNOLOGICĂ

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

Acad. Octavian POPESCU

DOCTORAND:

Robert Marian RUGINESCU

2022

CUPRINS

INTRODUCERE	5
-------------------	---

I. PARTEA TEORETICĂ

CAPITOLUL 1

BIOLOGIA MICROORGANISMELOR HALOFILE: PREZENTARE GENERALĂ	8
---	----------

1.1 SCURT ISTORIC PRIVIND STUDIUL MICROORGANISMELOR HALOFILE	8
1.2 RĂSPÂNDIREA MICROORGANISMELOR HALOFILE	12
1.2.1 Distribuția spațială a comunităților de microorganisme halofile	12
1.2.2 Tipuri de habitate hipersaline.....	14
1.3 DIVERSITATEA TAXONOMICĂ ȘI METABOLICĂ A HALOFILELOR	17
1.3.1 Halofilele din Domeniul <i>Archaea</i>	17
1.3.2 Halofilele din Domeniul <i>Bacteria</i>	20
1.3.3 Halofilele din Domeniul <i>Eukarya</i>	24
1.4 ADAPTĂRI STRUCTURALE ȘI FIZIOLOGICE ALE MICROORGANISMELOR HALOFILE	25
1.4.1 Strategia de adaptare osmotică „ <i>salt-in</i> ”	26
1.4.2 Proteomul halofilelor	27
1.4.3 Strategia de adaptare osmotică „ <i>salt-out</i> ”	29
1.5 CLASIFICAREA MICROORGANISMELOR HALOFILE.....	32

CAPITOLUL 2

IMPORTANȚA BIOTEHNOLOGICĂ A MICROORGANISMELOR HALOFILE	34
---	-----------

2.1 IMPORTANȚA HALOFILELOR ÎN PROCESE TEHNOLOGICE TRADIȚIONALE	34
2.2 IMPORTANȚA HALOFILELOR ÎN PROCESE TEHNOLOGICE MODERNE	36
2.2.1 Producerea industrială a β -carotenului.....	36
2.2.2 Producerea industrială a ectoinei.....	37
2.3 POTENȚIALUL BIOTEHNOLOGIC AL HALOFILELOR ȘI AL METABOLIȚILOR ACESTORA.....	37
2.3.1 Enzimele halorezistente	38
2.3.1.1 Amilaze.....	39
2.3.1.2 Celulaze	42
2.3.1.3 Xilanaze.....	44
2.3.1.4 Pectinaze	46
2.3.1.5 Inulinaze.....	47
2.3.1.6 Lipaze.....	48
2.3.1.7 Proteaze.....	50
2.3.2 Biopolimeri	51
2.3.3 Bacteriorodopsina.....	53
2.3.4 Biodegradarea unor compuși toxici/poluanți.....	53
2.3.5 Alte aplicații potențiale	54

II. PARTEA EXPERIMENTALĂ

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRIILOR	55
--	-----------

CAPITOLUL 3

STUDIUL DIVERSITĂȚII TAXONOMICE ȘI FIZIOLOGICE A MICROORGANISMELOR HALOFILE ȘI HALOTOLERANTE IZOLATE DIN MEDII NATURALE SALMASTRE, SALINE ȘI HIPERSALINE	56
---	-----------

3.1 MATERIALE ȘI METODE	56
3.1.1 Prelevarea probelor și determinarea parametrilor fizico-chimici	56
3.1.1.1 Apă și sedimente din lacuri sărate din România.....	56
3.1.1.2 Apă din Marea Neagră	58
3.1.1.3 Roci de sare din deșertul Atacama.....	59
3.1.2 Cultivarea și estimarea abundenței microorganismelor halofile și halotolerante	59
3.1.2.1 Medii de cultură	59
3.1.2.2 Tehnici de cultivare și izolare în cultură pură	61
3.1.2.3 Determinarea Unităților Formatoare de Colonii	62
3.1.2.4 Analiza microscopică a rocilor de sare ca indicator al prezenței microorganismelor	62
3.1.3 Caracterizarea fenotipică a izolatelor microbiene	63
3.1.3.1 Determinarea caracterelor morfologice	63
3.1.3.2 Determinarea unor proprietăți biochimice	63
3.1.3.3 Evaluarea halofiliei/halotoleranței izolatelor.....	64
3.1.4 Testarea capacității izolatelor microbiene de a produce enzime hidrolitice	65
3.1.4.1 Medii de cultură	65
3.1.4.2 Tehnici de inoculare și condiții de incubare.....	66
3.1.4.3 Metode de evidențiere a activităților hidrolitice	67
3.1.4.4 Evaluarea semcantitativă a activităților enzimatiche.....	68
3.1.5 Identificarea genotipică și analiza filogenetică a tulpinilor selectate	68
3.1.5.1 Extracția ADN-ului genomic.....	69
3.1.5.2 Amplificarea secvențelor ARNr 16S și ITS1-5.8S-ITS2	70
3.1.5.3 Verificarea electroforetică a ampliconilor și purificarea lor	71
3.1.5.4 Secvențializarea ampliconilor și analiza filogenetică	72
3.1.5.5 Depunerea secvențelor în bazele de date internaționale	72
3.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	73
3.2.1 Descrierea mediilor eșantionate	73
3.2.1.1 Lacurile sărate din România	73
3.2.1.2 Marea Neagră.....	74
3.2.1.3 Deșertul Atacama	75
3.2.2 Densitatea microorganismelor halofile/halotolerante cultivate.....	78
3.2.2.1 Abundența microorganismelor în probele de apă și sedimente din lacurile sărate.....	78
3.2.2.2 Abundența microorganismelor în probele de apă din Marea Neagră	80
3.2.2.3 Abundența microorganismelor în probele de sare din deșertul Atacama	81
3.2.3 Caracteristici fenotipice ale izolatelor microbiene	82
3.2.3.1 Bacterii, arhee și microfungi din lacurile sărate	82
3.2.3.2 Bacterii din Marea Neagră	86
3.2.3.3 Bacterii din deșertul Atacama.....	87
3.2.4 Activitățile hidrolitice extracelulare ale izolatelor microbiene	88
3.2.4.1 Potențialul hidrolitic al izolatelor obținute din lacurile sărate.....	88
3.2.4.2 Potențialul hidrolitic al izolatelor obținute din Marea Neagră	96

3.2.4.3 Potențialul hidrolitic al izolatelor obținute din deșertul Atacama.....	99
3.2.5 Încadrarea filogenetică a tulpinilor selecționate	100
3.2.5.1 Tulpini bacteriene, arheene și microfungice izolate din lacurile sărate	100
3.2.5.2 Tulpini bacteriene izolate din Marea Neagră	106
3.2.5.3 Tulpini bacteriene izolate din deșertul Atacama.....	109
3.3 CONCLUZII.....	110
CAPITOLUL 4	
STUDIUL ACTIVITĂȚII HIDROLAZELOR PRODUSE DE TULPINILE HALOFILE ȘI HALOTOLERANTE SELECȚIONATE	
112	
4.1 MATERIALE ȘI METODE	112
4.1.1 Metode de determinare cantitativă a activităților enzimice	112
4.1.2 Determinarea condițiilor optime de cultivare și sinteză a enzimelor	119
4.1.3 Concentrarea și cuantificarea proteinelor extracelulare	121
4.1.4 Caracterizarea proprietăților catalitice ale enzimelor	122
4.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	123
4.2.1 Evaluarea cantitativă a activităților enzimice.....	123
4.2.2 Studiul activității proteazelor produse de <i>Bacillus</i> sp. AM N P1.17	127
4.2.3 Studiul activității esterazelor produse de <i>Bacillus</i> sp. BA N P3.3	134
4.2.4 Studiul activității xilanazelor produse de <i>Bacillus</i> sp. BA N P1.4	137
4.2.5 Studiul activității celulazelor produse de <i>Bacillus</i> sp. AM N P1.17	139
4.3 CONCLUZII.....	141
CAPITOLUL 5	
EVALUAREA PRELIMINARĂ A EFICACITĂȚII ESTERAZELOR HALOTOLERANTE ÎN BIOCURĂȚAREA PICTURILOR MURALE	
142	
5.1 MATERIALE ȘI METODE	142
5.1.1 Realizarea modelelor experimentale	142
5.1.2 Pregătirea gelurilor și încorporarea soluției enzimatiche	143
5.1.3 Aplicarea tratamentului de biocurățare	144
5.1.4 Metode de evaluare calitativă a eficacității biocurățării	144
5.2 REZULTATE	145
5.2.1 Caracteristicile hidrogelurilor.....	145
5.2.2 Rezultatele evaluării calitative a eficacității biocurățării	146
5.3 DISCUȚII.....	148
5.4 CONCLUZII.....	149
CONCLUZII GENERALE.....	150
LISTA PUBLICAȚIILOR	152
BIBLIOGRAFIE.....	153

INTRODUCERE

Enzimele sunt componente ubicuitare ale organismelor vii care au rolul de a cataliza reacțiile metabolice la viteze suficient de mari pentru a susține viața. Pe lângă funcțiile biologice vitale, enzimele au multiple utilizări comerciale: biocatalizatori în procese industriale (de exemplu, în industria alimentară, pentru conversia amidonului în glucoză), agenți terapeutici (de exemplu, pentru îndepărtarea cheagurilor de fibrină din sânge), reactivi analitici (de exemplu, pentru detectarea glucozei în sânge) și instrumente de manipulare a celulelor și materialului genetic (de exemplu: lizozimul, enzimele de restricție).

Piața globală a enzimelor, evaluată la peste 11 miliarde USD în 2021, este dominată de hidrolaze, în particular de proteaze, amilaze, lipaze și celulaze. Microorganismele sunt principalele surse din care se obțin aceste enzime datorită avantajelor economice, tehnice și etice pe care le prezintă în comparație cu organismele animale și vegetale.

Dintre diversele surse microbiene de enzime hidrolitice, o atenție din ce în ce mai mare din partea comunității științifice este acordată microorganismelor izolate din ecosistemele caracterizate prin condiții de mediu extreme. Enzimele acestor microorganisme extremofile, deși îndeplinesc aceleași funcții ca ale moleculelor omoloage produse de microorganismele non-extremofile, prezintă proprietatea de a-și menține activitatea catalitică în condiții fizico-chimice severe care, în general, inhibă biocatalizatorii uzuali. Datorită acestei caracteristici, enzimele produse de microorganismele extremofile sunt utile în numeroase aplicații biotehnologice care implică, spre exemplu, temperaturi foarte ridicate sau scăzute, valori extreme ale pH-ului și salinitate ridicată.

Din grupul microorganismelor extremofile, halofilele sunt adaptate să supraviețuiască în medii saline și sunt clasificate, în funcție de gradul în care tolerează/necesită diferite concentrații de sare, în: extrem-halofile (cresc optim la 2,5–5,2 M), moderat-halofile (cresc optim la 0,5–2,5 M), slab-halofile (cresc optim la 0,2–0,5 M) și halotolerante (nu necesită săruri pentru supraviețuire, dar le tolerează în concentrații relativ mari, chiar și de 2,5 M). Enzimele extracelulare sintetizate atât de microorganismele halofile, cât și de cele halotolerante, au evoluat astfel încât să își mențină integritatea structurală și funcțiile catalitice în spectre largi de salinitate. Principalele adaptări structurale pe care aceste macromolecule le-au dobândit sunt reprezentate de conținutul crescut de aminoacizi cu caracter acid și frecvența redusă a aminoacizilor hidrofobi.

Mai multe studii realizate în ultimii ani au propus utilizarea enzimelor halorezistente în diverse aplicații biotehnologice care implică condiții saline, precum: producerea

biocombustibililor, prelucrarea unor alimente, bioremedierea mediilor hipersaline și biocurățarea picturilor murale afectate de fenomenul de eflorescență. Cu toate acestea, în prezent, enzimele halorezistente nu sunt produse la scară largă în vederea comercializării.

Studiile dedicate explorării diversității microorganismelor din mediile ostile/extreme au un rol esențial atât pentru identificarea unor noi enzime cu proprietăți speciale (precum activitate și stabilitate în condiții extreme multiple), cât și pentru descoperirea unor noi producători mai eficienți ai acestor biocatalizatori. Numeroase medii saline, atât din România cât și din alte părți ale lumii, nu au fost încă investigate din această perspectivă. Drept consecință, pentru identificarea unor noi tulpini de microorganisme capabile să sintetizeze enzime cu adaptări structurale și funcționale unice, este necesară direcționarea cercetărilor microbiologice către ecosistemele ne-/puțin explorate.

În acest context, **scopul prezentei teze de doctorat** a constat în investigarea diversității microorganismelor din diverse ecosisteme saline pentru crearea unei colecții de noi tulpini halofile și halotolerante de bacterii, arhee și microfungi capabile să producă hidrolaze cu proprietăți utile în procesele biotehnologice care implică condiții de salinitate ridicată.

Cercetările efectuate în vederea îndeplinirii scopului propus s-au bazat pe cinci obiective principale: 1) prelevarea unor eșantioane de apă, sedimente și sare din șapte medii cu salinități diferite (cinci lacuri sărate din România, două zone din Marea Neagră și un habitat extrem din deșertul Atacama), 2) cultivarea, izolarea și identificarea taxonomică a tulpinilor halofile și halotolerante de bacterii, arhee și microfungi, 3) testarea potențialului tulpinilor de a produce diverse enzime hidrolitice extracelulare (glicozidaze, esteraze și proteaze), 4) cuantificarea activității hidrolazelor produse de tulpinile selecționate și determinarea proprietăților catalitice ale unora dintre acestea, 5) evaluarea preliminară a eficacității esterazelor halorezistente, produse de una dintre tulpinile din colecția constituită, în procese de biocurățare a picturilor murale.

Prezenta lucrare este structurată în cinci capitole, dintre care primele două sunt dedicate stadiului actual al cunoașterii în domeniul halofilelor. În *Capitolul 1* se pune accent pe diversitatea taxonomică și metabolică a microorganismelor halofile, precum și pe adaptările structurale și fiziologice pe care acestea le-au dobândit pentru a supraviețui în mediile caracterizate de concentrații crescute de săruri. În *Capitolul 2* se pune în evidență importanța biotehnologică a microorganismelor halofile și enzimelor halorezistente prin prezentarea atât a aplicațiilor tehnologice în care acestea sunt utilizate în prezent, cât și a aplicațiilor potențiale.

Următoarele trei capitole reprezintă partea de contribuție personală. *Capitolul 3* descrie studiul diversității taxonomice și fiziologice a tulpinilor halofile și halotolerante izolate din cele șapte medii investigate. *Capitolul 4* cuprinde studiul activității hidrolazelor produse de unele tulpini halofile și halotolerante selecționate din colecția de laborator. *Capitolul 5* prezintă evaluarea preliminară a eficacității esterazelor halorezistente într-o aplicație practică care implică condiții saline, și anume biocurățarea picturilor murale.

În final, sunt prezentate concluziile generale ale cercetărilor, lista publicațiilor rezultate în urma cercetării științifice din programul de studii doctorale și referințele bibliografice.

I. PARTEA TEORETICĂ

CAPITOLUL 1

BIOLOGIA MICROORGANISMELOR HALOFILE: PREZENTARE GENERALĂ

Halofilele sunt un grup heterogen de organisme extremofile adaptate supraviețuirii și chiar prosperării în habitate hipersaline, neprielnice pentru majoritatea formelor de viață de pe planeta noastră (Oren, 2002).

Lumea halofilelor este foarte diversificată, reprezentanți ai acestui grup de organisme găsimu-se în toate cele trei domenii de clasificare a formelor de viață: *Archaea*, *Bacteria* și *Eukarya*. Imensa diversitate filogenetică se reflectă atât în potențialul halofilelor de a se adapta la o gamă largă de habitate dominate de condiții diferite de salinitate, cât și în varietatea mare de procese fiziologice de obținere a energiei și carbonului necesare pentru creștere. În acest sens, pe lângă a prezenta necesități și toleranțe ionice (minime, optime și maxime) variabile, taxonii halofili utilizează căi metabolice foarte diversificate (respirația aerobă sau anaerobă; nutriția heterotrofă, fototrofă sau chemoautotrofă) pentru a-și asigura existența în cele mai neprielnice medii (Oren, 2011).

Arheele din clasa *Halobacteria* (încregătura *Euryarchaeota*) au fost cele mai intens studiate, fiind considerate *extrem-halofile prin excelență*. În prezent, această clasă este divizată în trei ordine (*Halobacteriales*, *Haloferacales* și *Natrialbales*) care cuprind 60 de genuri și 267 de specii.

Bacteriile halofile sunt reprezentate de un număr foarte mare de specii incluse în numeroase ramuri filogenetice. În prezent, dintre cele 35 de încregături ale domeniului *Bacteria*, 12 (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Balneolaeota*, *Cyanobacteria*, *Fibrobacteres*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Rhodothermaeota*, *Spirochaetes*, *Tenericutes*, *Thermotogae*, *Verrucomicrobia*) cuprind reprezentanți moderat- sau extrem-halofili și mult mai multe includ taxoni halotoleranți care au capacitatea de a crește atât în prezența, cât și în absența sărurilor (Parte, 2018).

Dintre formele de viață eucariote, diverse specii de microalge, microfungi, protozoare și chiar macroorganisme din regnul *Animalia* au fost identificate în unele dintre cele mai saline medii de pe Pământ (McGenity și Oren, 2012).

CAPITOLUL 2

IMPORTANȚA BIOTEHNOLOGICĂ A MICROORGANISMELOR HALOFILE

Halofilele, spre deosebire de alte grupuri de microorganisme extremofile, sunt utilizate într-un număr mic de aplicații practice. Unele procese tehnologice în care sunt implicate microorganismele halofile sunt vechi de secole și au existat cu mult timp înainte ca aspectele microbiologice ce stau la baza lor să fie înțelese. Două exemple de astfel de tehnologii sunt fabricarea sării prin evaporarea apei marine și obținerea unor alimente asiatice prin fermentație. De asemenea, microorganismele halofile sunt întrebuințate în două tehnologii moderne de mare succes: 1) producerea de β -caroten utilizând tulpini ale algei verzi unicelulare *Dunaliella* și 2) producerea de ectoină utilizând specii bacteriene moderat-halofile (Oren, 2010).

Pe lângă procesele biotehnologice în care sunt întrebuințate în prezent microorganismele halofile, numeroase aplicații potențiale au fost sugerate în ultimii ani. Dintre cele mai promițătoare, unele se bazează pe capacitatea halofilelor de a sintetiza compuși de tipul enzimelor, pigmentilor și biopolimerilor, iar altele rezultă din potențialul unor specii microbiene de a degrada *in situ* diverse substanțe poluante/toxice (Oren, 2002).

Halofilele reprezintă surse promițătoare de enzime hidrolitice cu valoare biotehlogică de tipul proteazelor, lipazelor, esterazelor, amidazelor, celulazelor, xilanazelor, pectinazelor, inulinazelor și nucleazelor. Aceste enzime halorezistente, spre deosebire de cele sintetizate de microorganismele termofile și alcalofile, nu sunt (în prezent) produse la scară largă în vederea comercializării. Numeroase studii realizate în ultimii ani demonstrează însă că acești biocatalizatori prezintă o enormă aplicabilitate practică, putând fi utilizați pentru eficientizarea acelor procese biotehnologice în care condițiile hipersaline cauzează inactivarea rapidă a enzimelor uzuale (Amoozegar și colab., 2017).

II. PARTEA EXPERIMENTALĂ

Contribuții originale la identificarea unor tulpini noi de microorganisme halofile și halotolerante producătoare de enzime hidrolitice cu importanță biotehnologică

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRILOR

Odată cu creșterea cererii de enzime cu proprietăți catalitice speciale (stabilitate la valori extreme de temperatură, pH, salinitate etc.), numeroase cercetări au fost direcționate către bioprospectarea microorganismelor din mediile dominate de condiții fizico-chimice extreme. Din grupul microorganismelor extremofile, halofilele prezintă capacitatea de a sintetiza enzime active în prezența concentrațiilor ridicate de săruri și uneori chiar și în condiții poliextreme, motiv pentru care acești biocatalizatori au fost propuși spre a fi utilizați în diverse aplicații în care condițiile saline cauzează inactivarea enzimelor uzuale.

În acest context, **scopul** prezentei teze de doctorat a constat în investigarea diversității microorganismelor din diverse medii saline pentru crearea unei colecții de noi tulpini halofile și halotolerante de bacterii, arhee și microfungi, capabile să producă hidrolaze cu proprietăți utile în procesele biotehnologice care implică condiții de salinitate ridicată.

Obiectivele principale ale cercetărilor au fost următoarele:

1. Prelevarea unor eșantioane de apă, sedimente și sare din ecosisteme saline ale căror comunități de microorganisme au fost slab studiate din punct de vedere al potențialului de a sintetiza enzime hidrolitice.
2. Izolarea tulpinilor halofile și halotolerante de bacterii, arhee și microfungi din eșantioanele prelevate și identificarea taxonomică a acestora.
3. Investigarea potențialului tulpinilor izolate de a sintetiza enzime hidrolitice extracelulare de interes biotehnologic (glicozidaze, esteraze și proteaze).
4. Cuantificarea activității hidrolazelor produse de tulpinile selecționate și determinarea proprietăților catalitice ale unora dintre acestea.
5. Evaluarea preliminară a eficacității utilizării esterazelor halorezistente în procese de biocurățare a picturilor murale.

CAPITOLUL 3

STUDIUL DIVERSITĂȚII TAXONOMICE ȘI FIZIOLOGICE A MICROORGANISMELOR HALOFILE ȘI HALOTOLERANTE IZOLATE DIN MEDII NATURALE SALMASTRE, SALINE ȘI HIPERSALINE

3.1 MATERIALE ȘI METODE

3.1.1 Prelevarea probelor și determinarea parametrilor fizico-chimici

3.1.1.1 Apă și sedimente din lacuri sărate din România

Probele de apă și sedimente (nămol) au fost prelevate în august 2019 din cinci lacuri naturale localizate în Câmpia Română: lacul Amara (AM), lacul Balta Albă (BA), lacul Căineni Băi (CB), Lacul Sărat Movila Miresii (MM) și Lacul Sărat Brăila (BSL) (Figura 3.1). Parametrii fizico-chimici ai apei (temperatură, pH, oxigen dizolvat, potențial oxido-reducător, salinitate, conductivitate electrică) au fost măsurați *in situ* cu un multiparametru portabil Hanna HI-98194.

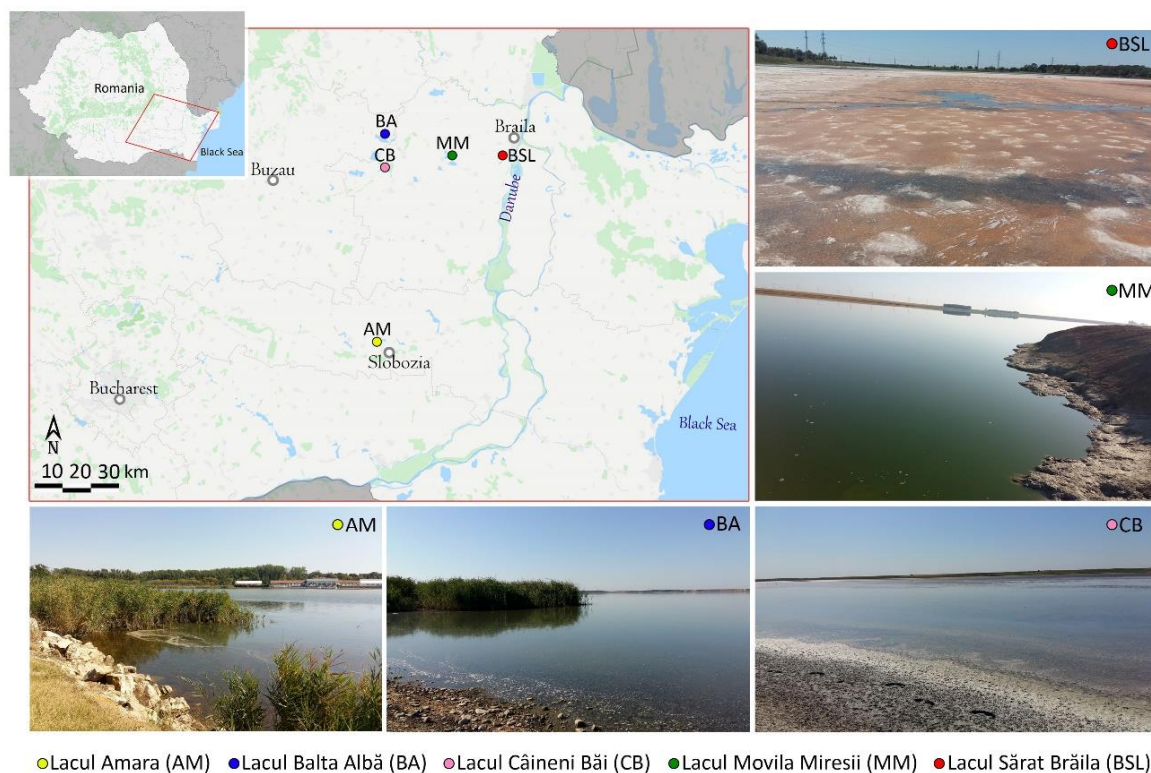


Figura 3.1. Locațiile geografice și fotografiile de ansamblu ale celor cinci lacuri eșantionate (modificată după Ruginescu și colab., 2020).

3.1.1.2 Apă din Marea Neagră

Probele de apă au fost colectate în aprilie 2021 din două zone de litoral: Eforie Nord și Cap Aurora (Figura 3.2).

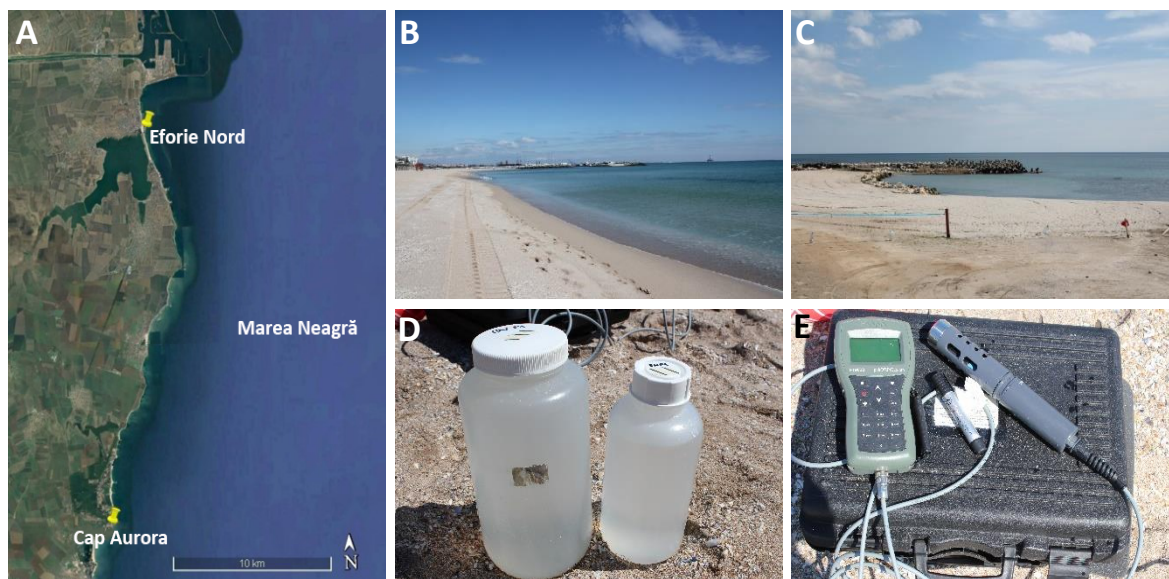


Figura 3.2. Colectarea probelor de apă din Marea Neagră. (A) Imagine satelitară a zonelor eșantionate; (B) Zonă prelevare Eforie Nord; (C) Zonă prelevare Cap Aurora; (D) Recipiente cu probe de apă; (E) Sondă multiparametrică Hanna.

3.1.1.3 Roci de sare din deșertul Atacama

Probele reprezentate de roci de sare au fost prelevate în noiembrie 2018 din regiunea Antofagasta (Chile), localizată la aproximativ 60 km de orașul San Pedro de Atacama. Mai multe fragmente au fost desprinse mecanic (cu ajutorul unei spatule sterile) din crusta de sare de la suprafața solului și depozitate în recipiente sterile din plastic.

3.1.2 Cultivarea și estimarea abundenței microorganismelor halofile și halotolerante

Cultivarea microorganismelor halofile și halotolerante (bacterii, arhee și microfungi) din eșantioanele de apă, sedimente și sare a implicat utilizarea a patru tipuri de medii de cultură complexe (MH, JCM-168, MA și ES) cu salinități cuprinse între 3,4% și 22% (g/v).

3.1.4 Testarea capacității izolatelor microbiene de a produce enzime hidrolitice

Potențialul tulpinilor halotolerante, slab-halofile și moderat-halofile de a sintetiza enzime hidrolitice (proteaze, lipaze, glicozidaze) a fost determinat prin cultivarea pe medii MH cu 10% săruri (în cazul tulpinilor izolate din lacurile sărate și deșertul Atacama) sau medii ES (în cazul tulpinilor izolate din Marea Neagră) din care sursele de carbon convenționale (glucoza și compusul proteoză-peptonă) au fost înlocuite cu diferite

substraturi de interes (proteine, lipide, polizaharide). În acest sens, activitatea proteolitică a fost pusă în evidență prin degradarea cazeinei sau a gelatinei, activitatea lipolitică a fost testată pe substratul Tween 80 (Polisorbat 80) iar activitățile glicozidice (producerea de amilaze, pectinaze, celulaze, xilanaze, inulinaze) au fost detectate prin hidroliza amidonului, pectinei, carboximetil-celulozei (CMC), xilanului și inulinei.

Capacitatea tulpinilor extrem-halofile de a produce enzime hidrolitice a fost testată pe medii de cultură JCM-168 din care acizii casamino au fost înlocuiți cu substraturile proteice, lipidice și polizaharidice menționate mai sus.

3.1.5 Identificarea genotipică și analiza filogenetică a tulpinilor selectate

Tulpinile bacteriene, arheene și microfungice care au prezentat caractere fenotipice distincte (trăsături morfo-culturale și proprietăți biochimice, grad de halofilie/halotoleranță, profilurile hidrolazelor extracelulare) au fost selectate în vederea identificării la nivel de gen/specie prin metode moleculare. Acestea au implicat: 1) extracția ADN-ului genomic, 2) amplificarea *in vitro* prin tehnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a genei ce codifică pentru ARNr 16S (în cazul tulpinilor bacteriene și arheene) sau a secvenței ITS1-5.8S-ITS2 (în cazul tulpinilor microfungice), 3) secvențializarea ampliconilor, 4) compararea secvențelor obținute cu cele prezente în baza de date *GenBank* și identificarea gradului de similitudine dintre acestea. Relațiile filogenetice dintre tulpinile investigate în prezenta lucrare și speciile de referință au fost stabilite prin realizarea de arbori filogenetici.

3.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII

3.2.1 Descrierea mediilor eșantionate

3.2.1.1 Lacurile sărate din România

În România, lacurile atalasohaline (a căror geneză nu este legată de mediul marin) sunt larg răspândite. Cinci lacuri sărate (Amara, Balta Albă, Căineni Băi, Movila Miresii, Lacul Sărat Brăila) din regiunea de Sud-Est a țării (Câmpia Română) au fost selectate pentru a fi investigate în cadrul prezentei lucrări. Conform datelor din literatura de specialitate, particularitățile lor hidrochimice sunt extrem de dinamice, variind sezonier în funcție de condițiile climatice (Gâștescu, 1971).

Parametrii fizico-chimici determinați la momentul prelevării probelor (august 2019) au fost prezentați în tabelul 13.

Tabel 13. Proprietățile fizico-chimice ale lacurilor eșantionate^{1,2} (după Ruginescu și colab., 2020).

Lac	pH	T (°C)	DO (mg/L)	ORP (mV)	EC (mS/cm)	Salinitate (g/kg)	Cloruri (g/L)
AM	8,81 ± 0,3	25,49 ± 0,03	11,54 ± 1,29	12,67 ± 2,27	19,05 ± 0,25	11,31 ± 0,15	3,54 ± 0,07
BA	10,16 ± 0,25	24,4 ± 0,0	3,86 ± 0,19	-158 ± 17,9	20,78 ± 0,18	12,36 ± 0,11	5,52 ± 0,07
CB	9,03 ± 0,23	29,96 ± 0,88	2,53 ± 1,81	-220 ± 58,1	52,8 ± 8,98	35,67 ± 5,85	17,91 ± 0,87
MM	10,15 ± 0,26	22,87 ± 0,09	2,12 ± 0,51	-94,7 ± 16,7	107,8 ± 0,2	>70 *	38,52 ± 0,54
BSL	8,05 ± 0,09	36,67 ± 2,75	0,71 ± 0,57	-339 ± 43,9	168,1 ± 4,9	>70 *	150,5 ± 5,9

¹Datele sunt prezentate ca medie ± deviație standard (n = 3). ²Abrevieri: T-Temperatură; DO-Oxigen Dizolvat; ORP-Potențial Oxido-Reducător; EC-Conductivitate Electrică. * Valori peste limita de detecție a aparatului de măsurare.

3.2.1.2 Marea Neagră

Proprietățile fizico-chimice ale apei Mării Negre la momentul prelevării probelor (aprilie 2021) au fost prezentate în tabelul 14. Măsurătorile *in situ* au indicat valori relativ apropiate de temperatură, pH, salinitate și conductivitate electrică în cele șase locații eșantionate (Tabel 14).

Tabel 14. Proprietățile fizico-chimice ale apei Mării Negre¹.

Zonă	T (°C)	pH	DO (mg/L)	EC (mS/cm)	Salinitate (g/kg)
Eforie Nord	9,3 ± 0,2	9,4 ± 0,2	4,8 ± 1	29,1 ± 0,1	18,01 ± 0,08
Cap Aurora	11,3 ± 0,4	9,2 ± 0,3	9,9 ± 0,9	28,9 ± 0,2	17,87 ± 0,14

¹Datele sunt prezentate ca medie ± deviație standard (n = 3). ²Abrevieri: T-Temperatură; DO-Oxigen Dizolvat; EC-Conductivitate Electrică.

3.2.1.3 Deșertul Atacama

Deșertul Atacama este localizat pe coasta de vest a Americii de Sud, în nordul statului Chile, întinzându-se pe o lungime de aproximativ 1000 km între Munții Anzi și Oceanul Pacific. Descriș ca fiind „cea mai aridă regiune imaginabilă”, deșertul Atacama se caracterizează printr-o cantitate medie anuală de precipitații mult mai redusă (2 mm/an) decât a altor deșerturi aride precum Gobi (194 mm/an) sau Sahara (20–100 mm/an) (Azua-Bustos și colab., 2012; Drees și colab., 2006).

Probele prelevate și studiate din punct de vedere microbiologic au fost reprezentate de roci compuse aproape în totalitate din NaCl (Kampf și colab., 2005). Geneza acestor formațiuni este legată de evaporarea continuă a apelor subterane (datorită climatului hiperarid) și antrenarea sărurilor din sol la suprafața acestuia (Finstad și colab., 2016).

3.2.2 Densitatea microorganismelor halofile/halotolerante cultivate

3.2.2.1 Abundența microorganismelor în probele de apă și sedimente din lacurile sărate

Densitatea microorganismelor halofile și halotolerante cultivate a variat considerabil în cele cinci ecosisteme (Figura 3.6). Variații semnificative ale numărului de Unități Formatoare de Colonii (UFC) au fost observate și între diferitele locații ale aceluiași lac.

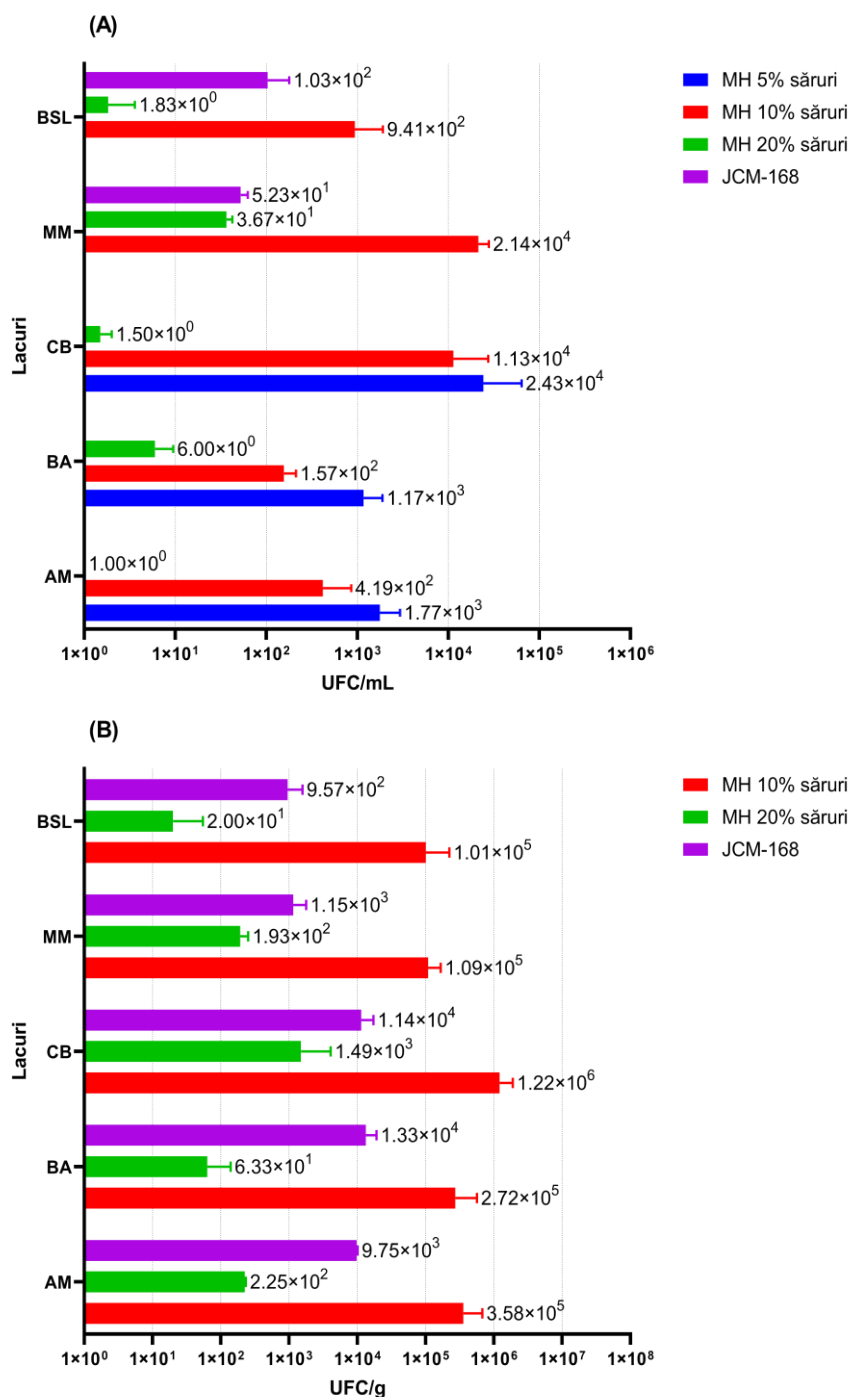


Figura 3.6. Abundența microorganismelor halofile/halotolerante cultivate din cele cinci lacuri, exprimată în Unități Formatoare de Colonii (UFC) per 1 mL de apă (A) sau 1 g de sediment (B). Valorile afișate reprezintă media de UFC determinate în trei locații diferite ale fiecărui lac, iar barele indică deviația standard.

3.2.2.2 Abundența microorganismelor în probele de apă din Marea Neagră

Densitatea bacteriilor heterotrofe cultivate a fost mai mare în probele de apă din zona Cap Aurora ($2,2 \times 10^3$ – $1,32 \times 10^4$ UFC/mL) decât în cele din zona Eforie Nord ($2,8 \times 10$ – $9,3 \times 10^2$ UFC/mL). Comparând cele două medii de cultură utilizate, s-a constatat că numărul de UFC/mL a fost mai mare pe mediul cu apă de mare (ES) decât pe mediul MA. Considerând că mediul MA prezintă un conținut de săruri de 3,42%, reprezentând o valoare aproape dublă față de cea a apei din Marea Neagră (1,8%), este posibil ca salinitatea relativ crescută a acestuia să fie responsabilă de inhibarea dezvoltării unor specii halosensibile.

3.2.2.3 Abundența microorganismelor în probele de sare din deșertul Atacama

În probele de sare din deșertul Atacama, densitatea microorganismelor cultivate a variat semnificativ în funcție de mediul de cultură utilizat, valoarea cea mai ridicată ($1,6 \times 10^5 \pm 2,1 \times 10^4$ UFC/g) fiind detectată pe mediul MH cu 10% săruri. Densități mai reduse au fost obținute pe mediile de cultură MH 20% ($5,8 \times 10^4 \pm 3,4 \times 10^3$ UFC/g) și JCM 168 ($1,2 \times 10^4 \pm 3,1 \times 10^3$ UFC/g).

3.2.3 Caracteristici fenotipice ale izolatelor microbiene

3.2.3.1 Bacterii, arhee și microfungi din lacurile sărate

o Gradul de halofilie/halotoleranță a izolatelor

Un total de 244 de colonii microbiene cu morfologii relativ distincte (182 colonii bacteriene, 22 colonii arheene și 40 colonii de microfungi) au fost izolate în culturi pure și testate pentru capacitatea de a crește la diferite concentrații de sare. Majoritatea (141 izolate; 57,8%) au crescut pe medii de cultură cu salinități cuprinse între 0 și 2 M NaCl (optim la 0–1 M) și au fost astfel clasificate ca halotolerante. Unele dintre aceste izolate, în special cele obținute din lacul hipersalin BSL, au prezentat capacitatea de a crește lent (>10 zile de incubare) chiar și pe mediile de cultură cu 3–3,5 M NaCl și au fost astfel considerate ca fiind halotolerante extreme. O fracțiune semnificativ mai mică a fost constituită din izolate microbiene moderat-halofile (75 izolate; 30,7%) și extrem-halofile (28 izolate; 11,5%) a căror creștere a fost dependentă de prezența unor concentrații crescute de săruri în mediul de cultură. În timp ce majoritatea moderat-halofilelor au crescut în intervalul de salinitate 0,5–3 M NaCl (optim la 0,5–1 M), cele mai multe extrem-halofile s-au dezvoltat pe medii cu salinități cuprinse între 2 și 4,5 M NaCl (optim la 2–3,5 M) (Figura 3.10).

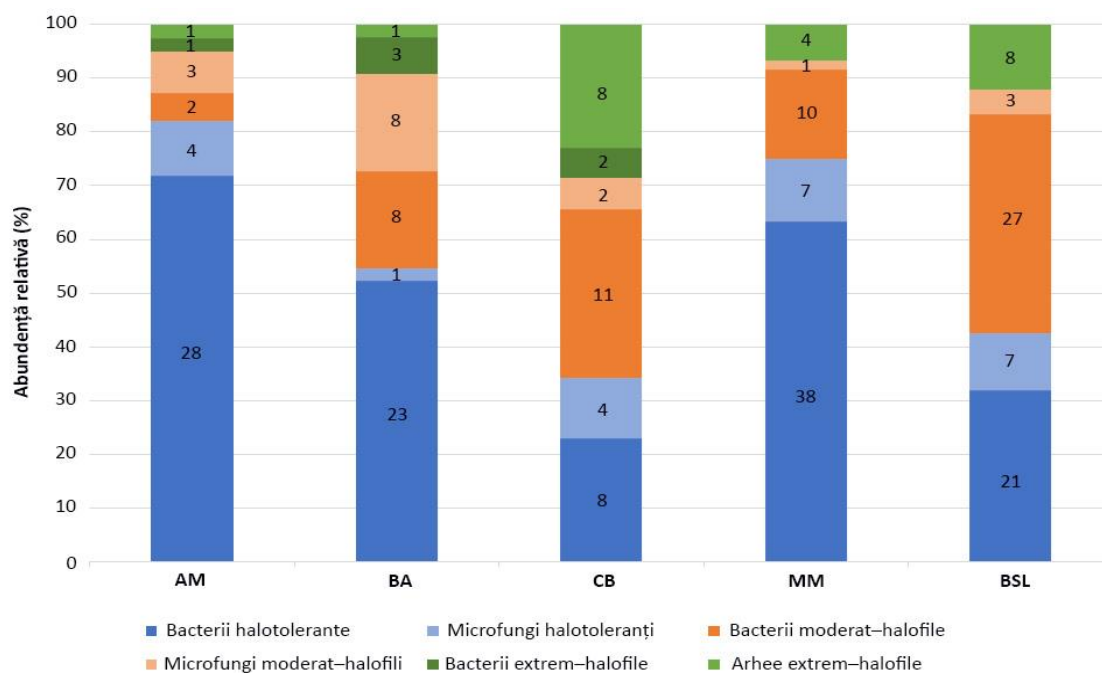


Figura 3.10. Abundența relativă a izolatelor halofile și halotolerante obținute din cele cinci lacuri investigate. Numerele din interiorul coloanelor histogramei indică numărul de izolate microbiene. Modificat după Ruginescu și colab., 2020.

3.2.3.2 Bacterii din Marea Neagră

o Gradul de halofilie/halotoleranță a tulpinilor

Din 64 de tulpini bacteriene izolate și identificate taxonomic din probele de apă din Marea Neagră, 47 (73%) au necesitat săruri pentru a crește, încadrându-se astfel în grupul microorganismelor halofile. În funcție de concentrația de săruri care a asigurat creșterea optimă a tulpinilor, majoritatea (38 tulpini; 59%) au fost clasificate ca slab-halofile (optim $\leq 3,4\%$ săruri) și doar 9 tulpini (14%) au fost încadrate în categoria moderat-halofilelor (optim $> 3,4\%$ săruri). Celelalte 17 tulpini (27%), deși au crescut în absența sărurilor, au prezentat capacitatea de a le tolera în concentrații relativ crescute (până la 7–15%, g/v), fiind astfel clasificate ca halotolerante.

3.2.3.3 Bacterii din deșertul Atacama

În ciuda numărului relativ mare de UFC obținute din probele de sare din deșertul Atacama, diversitatea morfologică a coloniilor a fost limitată, majoritatea având forme rotunde, margini regulate, dimensiuni medii, pigmentație crem, suprafețe lucioase și profiluri convexe. Doar 23 de colonii aparent distincte au fost selectate pentru a fi purificate. Toate izolatele bacteriene au fost clasificate ca moderat-halofile, majoritatea crescând în intervalul de salinitate 0,5–4 M NaCl (optim la 0,5–2 M).

3.2.4 Activitățile hidrolitice extracelulare ale izolatelor microbiene

3.2.4.1 Potențialul hidrolitic al izolatelor obținute din lacurile sărate

În timp ce 87 de izolate (36%) nu au prezentat potențialul de a degrada niciunul dintre cele șase substraturi testate, majoritatea (157 izolate; 64%) au produs una sau mai multe categorii de enzime. Enzimele produse cel mai frecvent au fost proteazele și lipazele, iar distincții clare în ceea ce privește tipul și numărul activităților hidrolitice extracelulare au fost observate între izolatele bacteriene, arheene și microfungice.

Din cele 182 de izolate bacteriene, 72 au fost identificate taxonomic. Acestea au fost încadrate în trei clase: *Bacilli* (58,3%), *Gammaproteobacteria* (40,3%) și *Actinobacteria* (1,4%) (a se vedea subcapitolul 3.2.5.1). Potențialul hidrolitic al tulpinilor din clasa *Bacilli* (genurile *Bacillus*, *Virgibacillus*, *Salinicoccus*, *Marinococcus*, *Halobacillus*, *Planococcus*, *Thalassobacillus* și *Salimicrobium*) a fost mult mai mare comparativ cu cel al tulpinilor din clasa *Gammaproteobacteria* (genurile *Halomonas*, *Salinivibrio*, *Vibrio*, *Idiomarina* și *Psychrobacter*). În acest sens, majoritatea tulpinilor din clasa *Bacilli* au produs proteaze (78%) și lipaze (66%), urmate de xilanaze (52%), amilaze (47%), celulaze (40%) și pectinaze (19%). Pe de altă parte, tulpinile din clasa *Gammaproteobacteria* au produs în proporții mai reduse în special lipaze (31%) și proteaze (20%) (Tabel 18).

Tabel 18. Distribuirea în clase a tulpinilor bacteriene producătoare de hidrolaze din lacurile sărate.

Clasă (Nr. tulpini)	Proteaze Nr. tulpini (%)	Lipaze Nr. tulpini (%)	Amilaze Nr. tulpini (%)	Celulaze Nr. tulpini (%)	Xilanaze Nr. tulpini (%)	Pectinaze Nr. tulpini (%)
<i>Gammaproteobacteria</i> (29)	6 (20,7)	9 (31)	2 (6,9)	1 (3,4)	3 (10,3)	2 (6,9)
<i>Bacilli</i> (42)	33 (78,6)	28 (66,7)	20 (47,6)	17 (40,5)	22 (52,4)	8 (19)
<i>Actinobacteria</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0

Tulpinile din genul *Bacillus* au fost în general halotolerante și au prezentat activități hidrolitice superioare celorlalți taxoni izolați. Acestea au sintetizat combinații de trei sau mai multe enzime. Mai mult decât atât, șase tulpini (denumite BSL P1.8, MM P1.8A, AM P2.6, AM N P1.17, BA N P2.7, CB N P1.6) au prezentat capacitatea de a degrada toate cele șase substraturi testate (Figura 3.15).

Comparativ cu izolatele bacteriene, potențialul celor 22 de reprezentări arheene de a produce hidrolaze extracelulare a fost mai limitat. În acest sens, singurele enzime hidrolitice produse de un număr redus de izolate au fost amilazele (patru izolate; 18%) și celulozele (două izolate; 9%). Cea mai promițătoare tulpină, din punct de vedere al intensității activităților hidrolitice, a fost *Haloterrigena turkmenica* MM N EP2.5 (Figura 3.16).

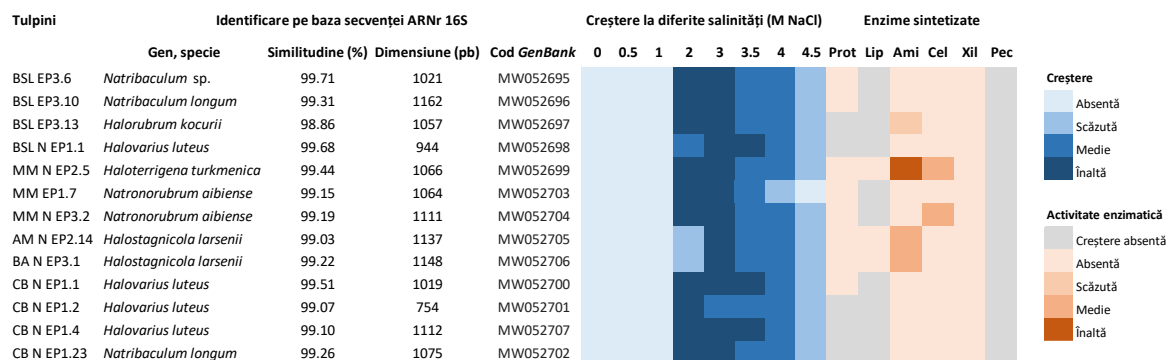


Figura 3.16. Reprezentare grafică care corelează filogenia tulpinilor arheene izolate din lacurile sărate cu capacitatea de a crește la diferite salinități și nivelul activităților hidrolitice. Abrevieri: Prot (proteaze), Lip (lipaze), Ami (amilaze), Cel (celuloze), Xil (xilanaze), Pec (pectinaze), pb (perechi de baze).

Dintre cele 40 de izolate microfungice, 30 (75%) au produs pectinaze, 17 (42,5%) au produs celuloze, 15 (37,5%) au produs proteaze, 14 (35%) au produs xilanaze, 13 (32,5%) au produs lipaze și doar 6 izolate (15%) au sintetizat amilaze. Tulpinile microfungice care au prezentat cele mai promițătoare activități hidrolitice au aparținut genurilor *Aspergillus*, *Penicillium* și *Emericellopsis*.

3.2.4.2 Potențialul hidrolitic al izolatelor obținute din Marea Neagră

Din cele 64 de tulpini bacteriene izolate din Marea Neagră, 53 (82,8%) au prezentat potențialul de a degrada cel puțin unul din șase substraturi testate. Enzimele sintetizate cel mai frecvent au fost cele din categoria lipazelor (60,9%). Acestea au fost urmate de enzimele amilolitice (43,7%), proteolitice (42,2%), celulozolice (31,2%), pectinolitice (21,9%) și xilanolitice (17,2%). Nu au fost observate diferențe semnificative ale tipurilor de activități enzimatică în funcție de locațiile geografice din care au fost izolate tulpinile bacteriene.

În urma identificării taxonomice a celor 64 de tulpini bacteriene, acestea au fost încadrate în șase clase: *Gammaproteobacteria* (42,2%), *Alphaproteobacteria* (9,4%), *Betaproteobacteria* (3,1%), *Flavobacteriia* (23,5%), *Bacilli* (15,6%) și *Actinobacteria* (6,2%) (Tabel 19).

Tulpinile bacteriene care au prezentat cele mai intense activități hidrolitice au aparținut genurilor *Pseudoalteromonas*, *Paraglaciecola*, *Polaribacter*, *Aquimarina*, *Cellulophaga*, *Bacillus*, *Metabacillus*, *Isoptericola* și *Streptomyces*.

Tabel 19. Distribuirea în clase a tulpinilor producătoare de hidrolaze din Marea Neagră.

Clasă (Nr. tulpini)	Proteaze Nr. tulpini (%)	Lipaze Nr. tulpini (%)	Amilaze Nr. tulpini (%)	Celulaze Nr. tulpini (%)	Xilanaze Nr. tulpini (%)	Pectinaze Nr. tulpini (%)
<i>Gammaproteobacteria</i> (27)	8 (29,6)	22 (81,5)	10 (37)	7 (25,9)	4 (14,8)	4 (14,8)
<i>Alphaproteobacteria</i> (6)	0	3 (50)	0	0	0	0
<i>Betaproteobacteria</i> (2)	0	0	0	0	0	0
<i>Flavobacteriia</i> (15)	8 (53,3)	9 (60)	7 (46,6)	9 (60)	4 (26,6)	1 (6,6)
<i>Bacilli</i> (10)	9 (90)	3 (30)	9 (90)	2 (20)	1 (10)	6 (60)
<i>Actinobacteria</i> (4)	2 (50)	2 (50)	2 (50)	2 (50)	2 (50)	3 (75)

3.2.4.3 Potențialul hidrolitic al izolatelor obținute din deșertul Atacama

Din cele 23 de izolate bacteriene obținute din probele de sare din deșertul Atacama, majoritatea (19 izolate) au prezentat capacitatea de a sintetiza enzime lipolitice. Un număr mai redus de izolate bacteriene au produs pectinaze (11 izolate), proteaze (un izolat) sau celulaze (un izolat). Niciuna dintre acestea nu a prezentat însă potențialul de a hidroliza amidonul, gelatina sau inulina.

Opt din cele 23 de tulpini bacteriene izolate din probele de sare din deșertul Atacama au fost selectate pe baza caracterelor fenotipice și identificate la nivel de gen/specie prin secvențializarea genei ADNr 16S. Pe baza secvențelor obținute, tulpinile au fost încadrate în două genuri: *Halomonas* (șapte tulpini) și *Idiomarina* (o tulpină).

CAPITOLUL 4

STUDIUL ACTIVITĂȚII HIDROLAZELOR PRODUSE DE TULPINILE HALOFILE ȘI HALOTOLERANTE SELECȚIONATE

4.1 MATERIALE ȘI METODE

4.1.1 Metode de determinare cantitativă a activităților enzimatic

4.1.1.1 Testarea activității proteazice

Principiul metodei: Degradarea enzimatică a proteinelor conduce la eliberarea de peptide și aminoacizi, printre care și tirozină. Aceasta din urmă interacționează cu reactivul Folin-Ciocalteu și generează cromatofori de culoare albastră, cuantificabili prin măsurarea spectrofotometrică a densității optice (Cupp-Enyard, 2008).

4.1.1.2 Testarea activității esterazice

Principiul metodei: Degradarea enzimatică a *p*-NPB conduce la eliberarea *p*-nitrofenolului care prin deprotonare formează cromoforul *p*-nitrofenolat. Acesta din urmă este cuantificabil prin măsurarea densității optice (Pliego și colab., 2015).

4.1.1.3 Testarea activității lipazice

Principiul metodei: Hidroliza enzimatică a uleiului conduce la eliberarea de acizi grași care pot fi cuantificați prin titrare cu o soluție alcalină (NaOH) în prezența unui indicator de pH (fenolftaleină) (Gupta și colab., 2003).

4.1.1.4 Testarea activității xilanazice

Principiul metodei: Xiloza eliberată în urma hidrolizei enzimatică a xilanului prezintă proprietatea de a reduce acidul 3,5-Dinitrosalicilic la acid 3-amino-5-nitrosalicilic. Acesta din urmă, datorită culorii roșiatice, poate fi cuantificat prin măsurarea densității optice la lungimea de undă de 540 nm (Miller, 1959).

4.1.1.5 Testarea activității celulazice

Principiul metodei: Hidroliza enzimatică a carboximetilcelulozei conduce la eliberarea de glucoză care prezintă proprietatea de a reduce acidul 3,5-Dinitrosalicilic la acid 3-amino-5-nitrosalicilic. Cuantificarea acestuia din urmă se realizează prin măsurarea densității optice ($\lambda=540$ nm) (Miller, 1959).

4.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII

4.2.1 Evaluarea cantitativă a activităților enzimaticе

Tulpinile bacteriene și microfungice care în urma estimărilor semicantitative (subcapitolul 3.2.4) s-au remarcat prin activități hidrolitice promițătoare și care, în plus, au prezentat caracteristici fiziologice favorabile proceselor biotehnologice (viteză de creștere relativ crescută, capacitatea de a crește într-un spectru de salinitate larg, potențialul de a produce multiple enzime hidrolitice) au fost selecționate pentru a fi supuse evaluărilor cantitative ale activităților enzimaticе.

4.2.1.1 Activitatea proteazică

Dintre tulpinile testate, *Bacillus* sp. BA N P2.7 (61 U/mL), *Bacillus* sp. MM P1.8A (55 U/mL), *Bacillus* sp. AM N P1.17 (47 U/mL) și *Salinivibrio* sp. MM N P1.3 (45 U/mL) au prezentat cele mai intense activități proteolitice. Celelalte tulpini bacteriene și microfungice testate au prezentat activități proteolitice relativ slabe, cuprinse între 1,2 și 7,6 U/mL (Tabel 20).

Tabel 20. Rezultatele determinărilor cantitative ale activității proteazice a tulpinilor selecționate, în condițiile de cultivare și testare specificate.

Tulpină	Condiții de cultivare				Condiții de testare a activității proteazice			Activitate proteazică (U/mL)
	Mediu de cultură	Temp. (°C)	Agitare (rpm)	Timp (zile)	Temp. (°C)	Timp (min)	pH	
<i>Bacillus</i> sp. MM P1.8A	MH modificat (0,5 M NaCl, 1% cazeină), pH 7	30	140	3	37	20	7,5	55,7 ± 6,4
<i>Bacillus</i> sp. AM N P1.17				3				47,5 ± 4,4
<i>Bacillus</i> sp. BA N P2.7				3				61,2 ± 2,7
<i>Salinicoccus</i> sp. BSL N P1.1				3				1,2 ± 0,3
<i>Salinivibrio</i> sp. MM N P1.3				3				45 ± 0,7
<i>Virgibacillus</i> sp. BSL N P1.8				2				1,9 ± 0,2
<i>Marinococcus</i> sp. BA N EP1.1				6			1,3	
<i>Nocardiopsis</i> sp. BSL P1.X2				7			4,3 ± 0,6	
<i>Penicillium</i> sp. BSL FP3.2				5			7,6 ± 0,1	
<i>Aspergillus</i> sp. BSL FP1.2				5			1 ± 0,1	
<i>Idiomarina</i> sp. AD-6	MH modificat (1 M NaCl, 1% cazeină), pH 7,2	28		4			7,5	1,8 ± 0,76

4.2.1.2 Activitatea esterazică

Rezultatele testărilor (Tabel 21) au evidențiat că cea mai intensă activitate a fost produsă de tulpina *Bacillus* sp. BA N P3.3 (0,175 U/mL).

Tabel 21. Rezultatele determinărilor cantitative ale activității esterazice a tulpinilor selecționate, în condițiile de cultivare și testare specificate.

Tulpină	Condiții de cultivare				Condiții de testare a activității esterazice			Activitate esterazică (mU/mL)
	Mediu de cultură	Temp. (°C)	Agitare (rpm)	Timp (zile)	Temp. (°C)	Timp (min)	pH	
<i>Bacillus</i> sp. BA N P2.7	MH modificat (0,5 M NaCl, 1% Tween 80) pH 7	30	140	4	37	15	7,5	38,4 ± 0,8
<i>Bacillus</i> sp. BA N P1.2				4				23,9 ± 0,9
<i>Bacillus</i> sp. BA N P3.3				4				175 ± 7,1
<i>Bacillus</i> sp. BA N P3.8				4				17 ± 0,1
<i>Bacillus</i> sp. AM N P1.17				4				44 ± 0,8
<i>Bacillus</i> sp. CB N P1.6				4				31,4 ± 0,6
<i>Bacillus</i> sp. MM P1.8A				4				25,7 ± 0,2
<i>Salinivibrio</i> sp. MM N P1.3				4				17,4 ± 0,1
<i>Salinivibrio</i> sp. CB P1.1				4				15,4 ± 0,2
<i>Psychrobacter</i> sp. AM P2.5				4				2,8 ± 0,1
<i>Penicillium</i> sp. BSL FP3.2				5				30,4 ± 1
<i>Penicillium</i> sp. MM FP1.4				5				63,7 ± 3,6

4.2.1.3 Activitatea lipazică

Activitatea lipazică a fost determinată în lichidul de cultură a 12 tulpini microbiene selecționate anterior pentru potențialul de a descompune compusul Tween 80 (Tabel 21). Rezultatele determinărilor titrimetrice au evidențiat că doar două tulpini au prezentat capacitatea de a sintetiza enzime lipolitice extracelulare care să hidrolizeze uleiul de măsline. Acestea au fost reprezentate de *Bacillus* sp. AM N P1.17 și *Penicillium* sp. MM FP1.4 (Tabel 22). Celelalte tulpini testate au produs enzime capabile să cliveze legăturile esterilor cu structură chimică relativ simplă (solubili în apă) precum compusul Tween 80 și *p*-NPB, dar nu și substraturile lipidice mai complexe precum trigliceridele (insolubile în apă).

Tabel 22. Rezultatele determinărilor cantitative ale activității lipazice a tulpinilor microbiene, în condițiile de cultivare și testare specificate.

Tulpină	Condiții de cultivare				Condiții de testare a activității lipazice			Activitate lipazică (U/mL)
	Mediu de cultură	Temp. (°C)	Agitare (rpm)	Timp (zile)	Temp. (°C)	Timp (min)	pH	
<i>Bacillus</i> sp. AM N P1.17	MH modificat (0,5 M NaCl, 0,5% Tween 80 și 1% ulei măsline) pH 7	30	140	3	37	30	7,5	2,83 ± 0,17
<i>Penicillium</i> sp. MM FP1.4								2,66 ± 0,16

4.2.1.4 Activitatea xilanazică

Dintre cele 10 tulpini microbiene testate, activitatea xilanazică cea mai intensă a fost produsă de *Bacillus* sp. BA N P1.4 (29 U/mL) (Tabel 23).

Tabel 23. Rezultatele determinărilor cantitative ale activității xilanazice a tulpinilor selecționate, în condițiile de cultivare și testare specificate.

Tulpină	Condiții de cultivare				Condiții de testare a activității xilanazice			Activitate xilanazică (U/mL)	
	Mediu de cultură	Temp. (°C)	Agitare (rpm)	Timp (zile)	Temp. (°C)	Timp (min)	pH		
<i>Bacillus</i> sp. BSL P2.1	MH modificat (0,5 M NaCl, 1% xilan) pH 7	30	140	3	37	10	7,5	1,8	
<i>Bacillus</i> sp. MM P1.8A				3				2,3 ± 0,1	
<i>Bacillus</i> sp. MM P2.8				3				16,2 ± 0,5	
<i>Bacillus</i> sp. BA N P1.4				3				29,2 ± 0,2	
<i>Bacillus</i> sp. AM N P1.17				3				9 ± 0,4	
<i>Nocardiosis</i> sp. BSL P1.X2				4				2,4 ± 0,1	
<i>Penicillium</i> sp. BSL FP3.2				5				4	
<i>Emericellopsis</i> sp. MM FP1.2				5				5,1 ± 0,5	
<i>Emericellopsis</i> sp. SED MM2				5				15	0,85
<i>Emericellopsis</i> sp. SED A1				5				15	1,1

4.2.1.5 Activitatea celulazică

Dintre cele 8 tulpini microbiene selecționate pentru potențialul de a produce enzime celulozolitice extracelulare, *Bacillus* sp. AM N P1.17 a prezentat activitatea cea mai intensă (0,075 U/mL). Acesta a fost urmată de tulpina *Penicillium* sp. BSL FP3.2 (0,062 U/mL), a cărei activitate celulazică a fost cu aproximativ 17% mai scăzută decât cea a tulpinii AM N P1.17 (Tabel 24).

Tabel 24. Rezultatele determinărilor cantitative ale activității celulazice a tulpinilor selecționate, în condițiile de cultivare și testare specificate.

Tulpină	Condiții de cultivare				Condiții de testare a activității celulazice			Activitate celulazică (mU/mL)
	Mediu de cultură	Temp. (°C)	Agitare (rpm)	Timp (zile)	Temp. (°C)	Timp (min)	pH	
<i>Bacillus</i> sp. BSL P2.1	MH modificat (0,5 M NaCl, 0,5% CMC) pH 7	30	140	3	37	30	7	55,1 ± 0,8
<i>Bacillus</i> sp. MM P2.8				3				46,7 ± 0,1
<i>Bacillus</i> sp. AM N P1.17				3				75,6 ± 3,1
<i>Bacillus</i> sp. BA N P1.4				3				57,9 ± 0,8
<i>Bacillus</i> sp. BA N P1.2				3				37,7 ± 0,6
<i>Bacillus</i> sp. CB N P1.6				3				53,3 ± 1,2
<i>Penicillium</i> sp. BSL FP3.2				5				62,4 ± 0,4
<i>Aspergillus</i> sp. MM FP1.1				5				47,1 ± 0,7

4.2.2 Studiul activității proteazelor produse de *Bacillus* sp. AM N P1.17

4.2.2.2 Condițiile optime pentru sinteza proteazelor

Activitatea enzimatică în lichidul de cultură a înregistrat cel mai înalt nivel atunci când tulpina a fost cultivată timp de 72 h la 30 °C, într-un mediu al cărui pH inițial a fost ajustat la valoarea 8. Sinteza proteazelor a fost influențată semnificativ de timpul de incubare. În acest sens, activitatea proteazică a crescut de la 18,6 U/mL după 24 h la 44,9 U/mL după 48 h și la 50,4 U/mL după 72 h. Comparând aceste rezultate cu cinetica de creștere a tulpinii, s-a constatat că activitatea proteazică a atins nivelul maxim în faza staționară de creștere a culturii bacteriene (Figura 4.6).

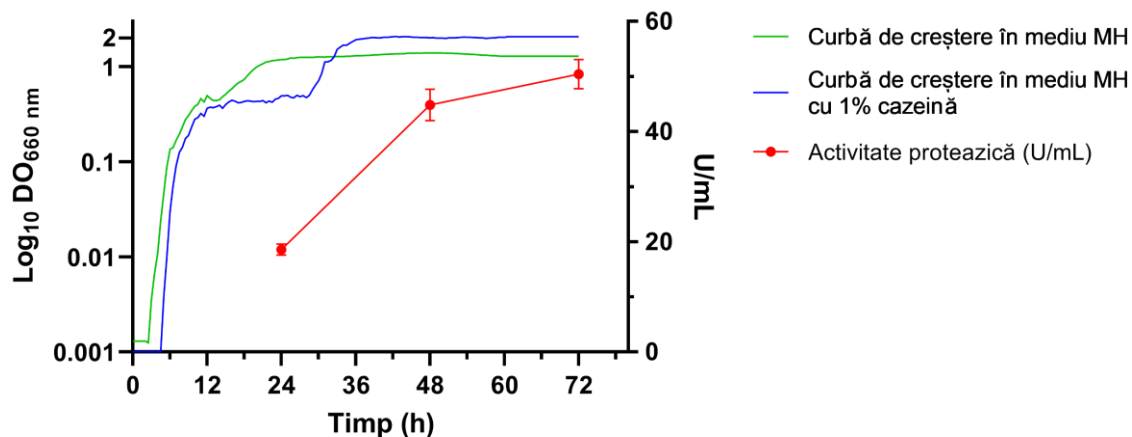


Figura 4.6. Influența sursei de carbon/azot asupra dinamicii de creștere a tulpinii *Bacillus* sp. AM N P1.17, corelată cu nivelul activității proteazice în lichidul de cultură.

4.2.2.3 Proprietățile catalitice ale proteazelor

În condițiile standard de testare (37 °C, pH 8), activitatea proteazică specifică în lichidul de cultură a fost de 1,75 U/mg. În urma concentrării enzimelor prin precipitare cu acetonă, activitatea enzimatică a fost potențată la 11,6 U/mg (Tabel 25).

Tabel 25. Purificarea parțială a proteazelor produse de tulpina *Bacillus* sp. AM N P1.17.

Etapă	Activitate proteazică totală (U)	Concentrație proteine (mg)	Activitate specifică (U/mg)	Randament (%)	Factor de purificare
Lichid de cultură	47,5	27,1	1,75	100	1
Precipitare cu acetonă	22	1,9	11,6	46,3	6,6

Proteazele au prezentat activitate catalitică în intervale relativ largi de temperatură (20–80 °C) și pH (6–10). Activitățile cele mai intense au fost detectate la 50–70 °C și pH 8 (Figura 4.7 A, B). Deși proteazele au acționat optim la temperaturi ridicate, acestea nu au fost stabile în timp la temperaturi de peste 20 °C (Figura 4.7 D). În ceea ce privește efectul salinității, s-a observat că proteazele sunt active în intervalul 0–1 M NaCl (Figura 4.7 C).

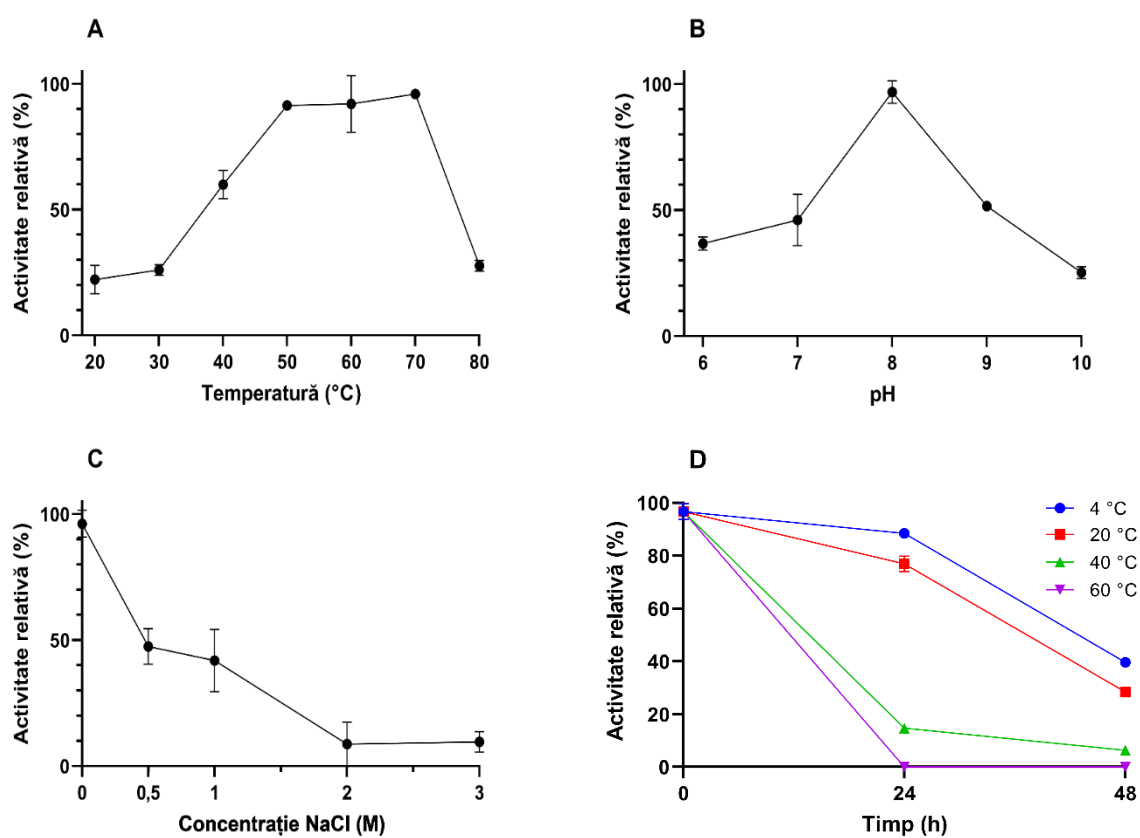


Figura 4.7. Efectul temperaturii (A), pH-ului (B) și concentrației de NaCl (C) asupra activității proteazelor; (D) Efectul temperaturii asupra stabilității proteazelor.

4.2.3 Studiul activității esterazelor produse de *Bacillus* sp. BA N P3.3

4.2.3.2 Proprietățile catalitice ale esterazelor

În condițiile de testare stabilite (37 °C, pH 7,5), activitatea esterazică specifică în lichidul de cultură a fost de 0,016 U/mg, iar în precipitatul proteic, aceasta a fost de 7,75 ori mai intensă (0,124 U/mg) (Tabel 26).

Tabel 26. Purificarea parțială a esterazelor produse de tulpina *Bacillus* sp. BA N P3.3.

Etapă	Activitate esterazică totală (U)	Concentrație proteine (mg)	Activitate specifică (U/mg)	Randament (%)	Factor de purificare
Lichid de cultură	0,175	10,75	0,016	100	1
Precipitare cu acetonă	0,06	0,485	0,124	34	7,75

Esterazele au acționat în intervale largi de temperatură (20–80 °C) și salinitate (0–4 M NaCl), la pH neutru și alcalin. Enzimele au fost stabile pentru cel puțin 48 h la temperaturi cuprinse între 4 °C și 40 °C, dar au fost inactivate rapid la ≥ 60 °C (Figura 4.11).

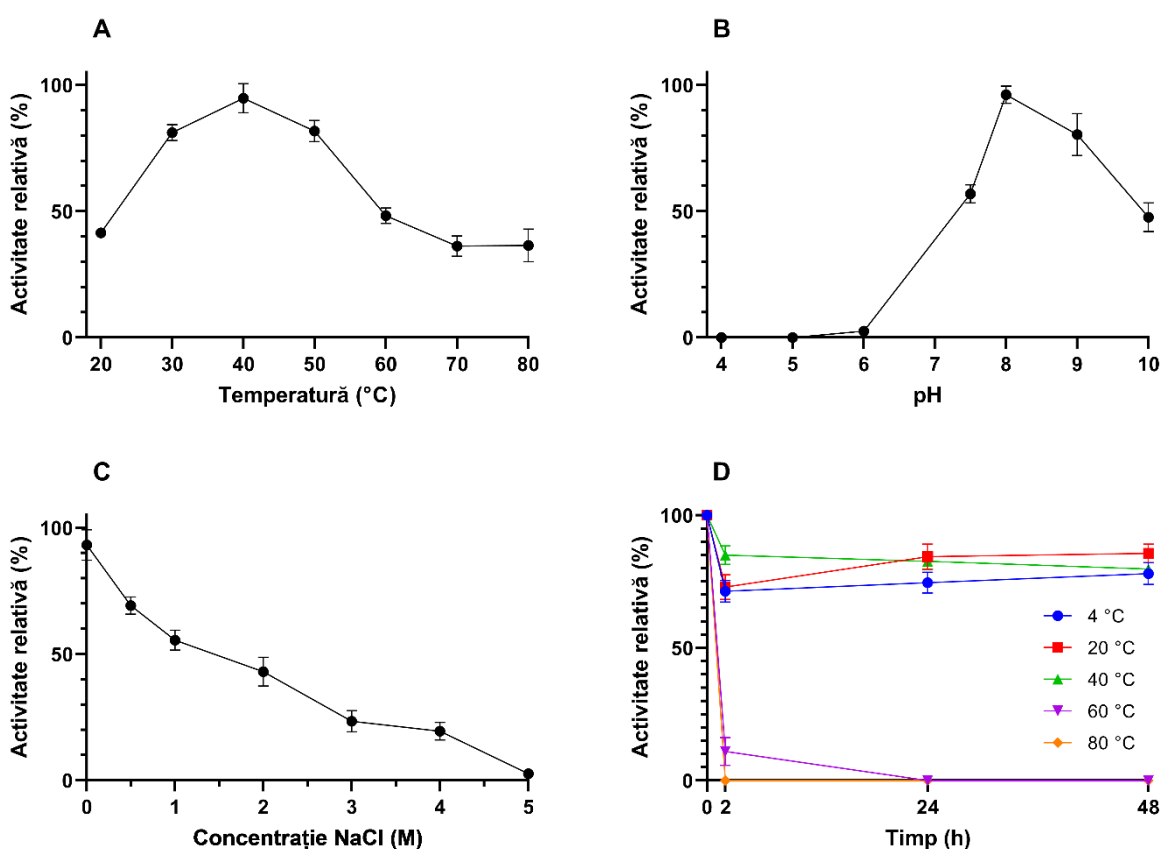


Figura 4.11. Efectul temperaturii (A), pH-ului (B) și concentrației de NaCl (C) asupra activității esterazelor purificate parțial; (D) Efectul temperaturii asupra stabilității esterazelor.

4.2.4 Studiul activității xilanazelor produse de *Bacillus* sp. BA N P1.4

4.2.4.2 Proprietățile catalitice ale xilanazelor

În condițiile de temperatură și pH alese (37 °C, pH 7), activitatea specifică a xilanazelor în lichidul culturii bacteriene a fost de 2,43 U/mg, iar în urma concentrării proteinelor prin precipitare cu acetonă, aceasta a fost de 11,3 U/mg (Tabel 27).

Tabel 27. Purificarea parțială a xilanazelor produse de tulpina *Bacillus* sp. BA N P1.4.

Etapă	Activitate xilanazică totală (U)	Concentrație proteine (mg)	Activitate specifică (U/mg)	Randament (%)	Factor de purificare
Lichid de cultură	29,2	12	2,43	100	1
Precipitare cu acetonă	21	1,86	11,3	72	4,65

Xilanazele au fost active în condiții variate de temperatură (20–80 °C), pH (5–10) și salinitate (0–5 M NaCl). Enzimele au fost stabile între 4 și 40 °C pentru cel puțin 42 h, dar și-au pierdut rapid activitatea catalitică la ≥ 60 °C (Figura 4.13).

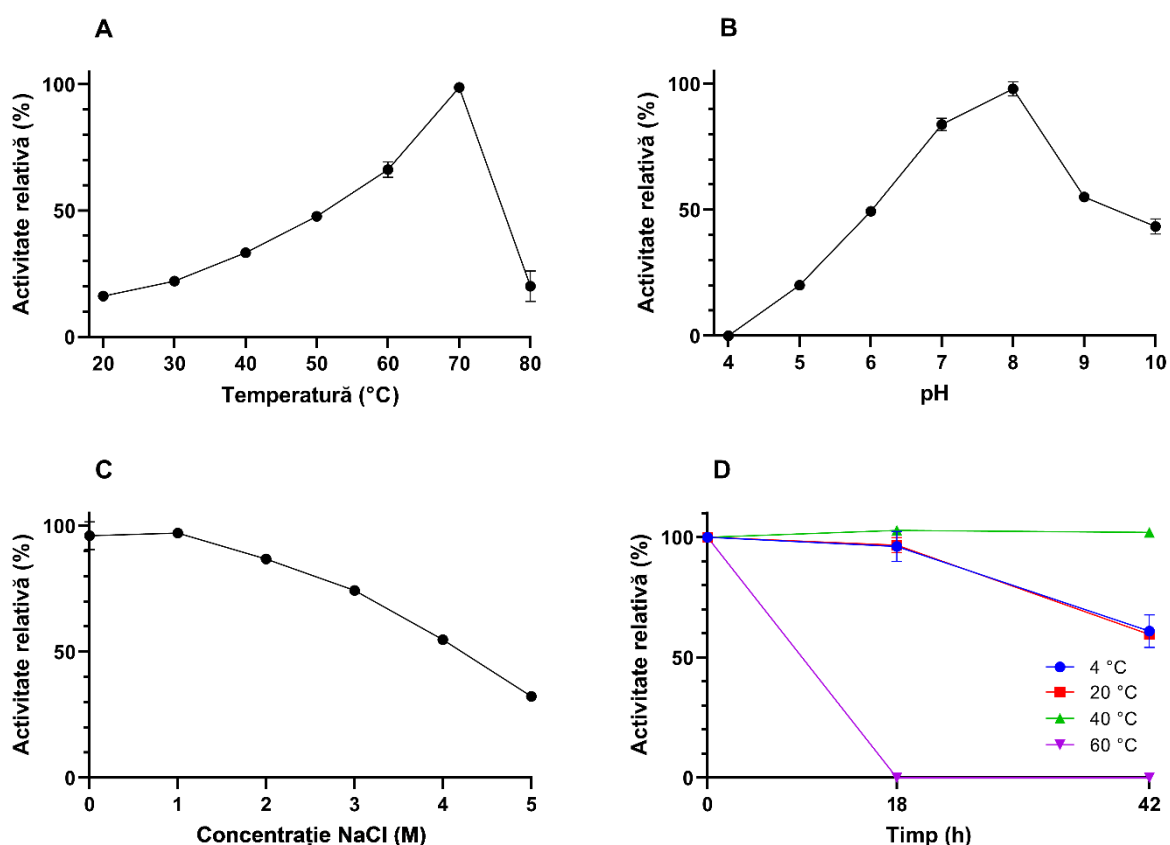


Figura 4.13. Efectul temperaturii (A), pH-ului (B) și concentrației de NaCl (C) asupra activității xilanazelor produse de *Bacillus* sp. BA N P1.4; (D) Efectul temperaturii asupra stabilității xilanazelor.

4.2.5 Studiul activității celulelor produse de *Bacillus* sp. AM N P1.17

4.2.5.2 Proprietățile catalitice ale celulelor

Enzimele celulozolitice din lichidul de cultură au prezentat o activitate specifică de 0,008 U/mg (la 37 °C, pH 7), aceasta fiind potențată la 0,032 U/mg în urma concentrării prin precipitare cu acetonă (Tabel 28).

Tabel 28. Purificarea parțială a celulelor produse de tulpina *Bacillus* sp. AM N P1.17.

Etapă	Activitate celulozică totală (U)	Concentrație proteine (mg)	Activitate specifică (U/mg)	Randament (%)	Factor de purificare
Lichid de cultură	0,071	8,66	0,008	100	1
Precipitare cu acetonă	0,043	1,33	0,032	60,5	4

Celulele au fost active la temperaturile din intervalul 20–80 °C (optim 70 °C), la pH 4–10 (optim 7) și la concentrații de NaCl cuprinse între 0 și 5 M (optim 0 M). Enzimele au fost stabile între 4 și 40 °C pentru cel puțin 48 h. În plus, după 2 h de incubare la 60 °C, acestea au reținut 73% din activitatea maximă, dar și-au pierdut complet activitatea după 24 h (Figura 4.14).

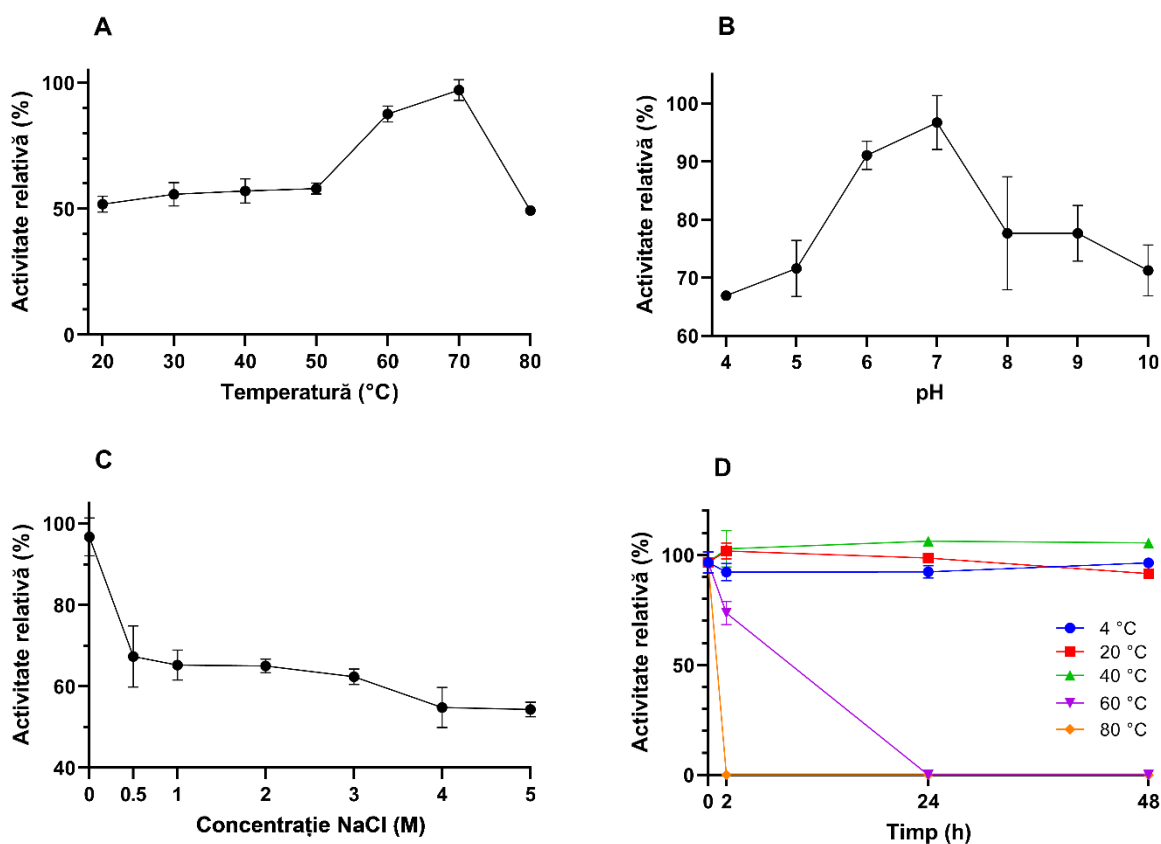


Figura 4.14. Efectul temperaturii (A), pH-ului (B) și concentrației de NaCl (C) asupra activității celulelor produse de *Bacillus* sp. AM N P1.17; (D) Efectul temperaturii asupra stabilității celulelor.

CAPITOLUL 5

EVALUAREA PRELIMINARĂ A EFICACITĂȚII ESTERAZELOR HALOTOLERANTE ÎN BIOCURĂȚAREA PICTURILOR MURALE

5.1 MATERIALE ȘI METODE

5.1.1 Realizarea modelelor experimentale

Eficacitatea utilizării esterazelor halotolerante produse de tulpina bacteriană *Bacillus* sp. BA N P3.3 în curățarea picturilor murale a fost evaluată utilizând modele de laborator reprezentate de cărămizi pictate și îmbătrânite artificial (Figura 5.1). După uscare, pe fiecare model experimental s-au aplicat prin pensulare în trei straturi: rășină acrilică Paraloid B-72, ulei de floarea soarelui și ceară topită.

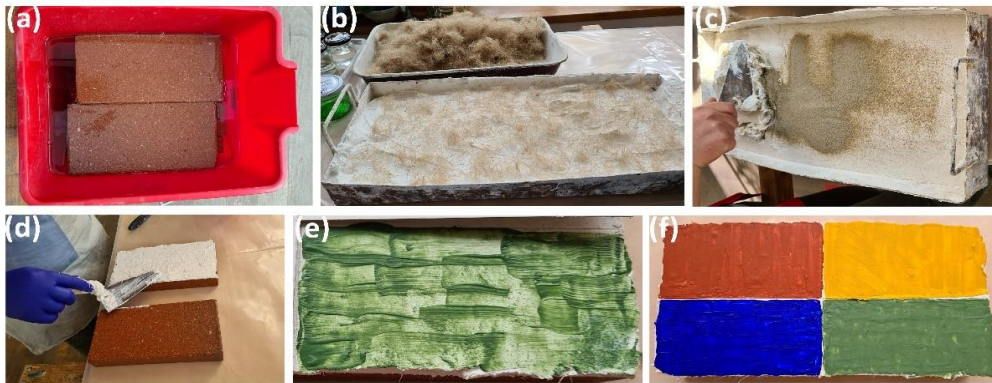


Figura 5.1. Etapele pregătirii modelelor experimentale.

5.1.2 Pregătirea gelurilor și încorporarea soluției enzimatică

Soluția enzimatică utilizată în cadrul experimentelor de biocurățare a fost reprezentată de proteinele extracelulare obținute prin precipitare cu acetonă din lichidul de cultură al tulpinii *Bacillus* sp. BA N P3.3.

Procesul de biocurățare s-a bazat pe încorporarea soluției enzimatică în hidrogeluri și aplicarea acestui amestec pe suprafețele modelelor de laborator îmbătrânite artificial. Patru tipuri de geluri polizaharidice reprezentate de Vanzan NF-C (Vanderbilt Minerals), Gellano Kelcogel (C.T.S.), Agarart (C.T.S.) și Klucel (Ashland) au fost preparate și evaluate în funcție de patru criterii: 1) posibilitatea încorporării enzimelor în gel evitând inactivarea acestora de către temperaturile înalte necesare dizolvării polizaharidului, 2) ușurința aplicării

pe suprafețele de interes, 3) posibilitatea îndepărtării complete fără afectarea stratului pictural și 4) penetrabilitatea redusă în porii suprafețelor pictate.

5.1.3 Aplicarea tratamentului de biocurățare

Hidrogelurile cu enzime încorporate s-au aplicat pe suprafețele modelelor experimentale, în careuri de 6,25 cm² (Figura 5.2). Modelele experimentale au fost incubate la temperatura camerei, timp de 5 h sau 10 h. Succesiv, hidrogelurile au fost îndepărtate cu ajutorul unei spatule, iar suprafețele tratate au fost curățate de reziduurile rămase (urme de gel, soluție enzimatică, produși de hidroliză).

În paralel cu amestecurile Hidrogel-Enzimă, au fost pregătite și hidrogeluri care au conținut exclusiv soluția tampon. Acestea au reprezentat martorii negativi și au fost aplicate pe suprafețele modelelor experimentale prin metodele descrise mai sus.

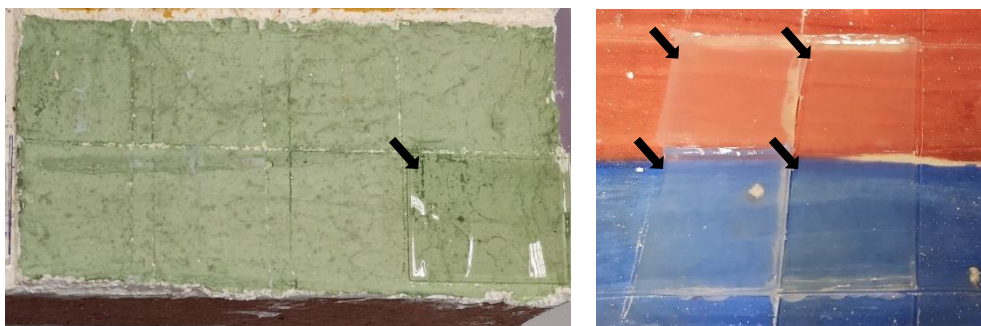


Figura 5.2. Aplicarea hidrogelurilor (Agarar și Gellano Kelcogel) pe modele experimentale.

5.1.4 Metode de evaluare calitativă a eficacității biocurățării

Modificările morfologice determinate de hidroliza rășinii acrilice Paraloid B-72, a uleiului sau a cerii au fost examinate la microscopul optic digital sau la microscopul electronic de baleiaj (SEM).

5.2 REZULTATE

5.2.1 Caracteristicile hidrogelurilor

- Produsul Vanzan NF-C nu necesită temperaturi ridicate pentru a se dizolva, neexistând astfel riscul inactivării termice a enzimelor. Acesta se aplică și se îndepărtează relativ ușor, dar este parțial absorbit în porii suportului.
- Produsul Gellano Kelcogel necesită temperaturi ridicate (>80 °C) pentru a se dizolva, motiv pentru care enzimele nu pot fi adăugate în amestec decât în momentul în care

temperatura a scăzut la aproximativ 50 °C. Încorporarea enzimelor în gel este dificilă deoarece acesta din urmă solidifică relativ repede la temperaturi mai mici de 60 °C.

- Produsul Agarart necesită de asemenea temperaturi ridicate pentru dizolvare, dar solidificarea este mai lentă și are loc la o temperatură mai scăzută decât în cazul produsului Gellano Kelcogel. Această caracteristică permite înglobarea mai facilă a enzimelor, fără a exista riscul inactivării termice a acestora. Aplicarea și îndepărtarea de pe suprafețele murale se fac cu ușurință.

- Produsul Klucel prezintă avantajul că dizolvarea se realizează la temperaturi scăzute și astfel nu există riscul degradării enzimelor. Totuși, există și următoarele dezavantaje: a) necesită timp îndelungat (~24 h) pentru dizolvare, b) trebuie utilizate cantități mari pentru obținerea consistenței semisolide, c) îndepărtarea necesită spălări repetate cu vată umezită în apă deoarece pătrunde în porii suportului.

5.2.2 Rezultatele evaluării calitative a eficacității biocurățării

Suprafețele modelelor de laborator tratate cu esteraze înglobate în hidrogeluri au prezentat modificări morfologice asociate hidrolizei parțiale a celor trei tipuri de depuneri. Îndepărtarea depunerilor de rășină acrilică și ulei a fost mai accentuată decât în cazul depunerilor de ceară. Examinările prin microscopie optică au demonstrat că suprafețele tratate cu esteraze au prezentat un grad mai redus de reflexie a luminii decât suprafețele martorilor negativi. De asemenea, analizele SEM au pus în evidență diferențe semnificative ale texturii suprafețelor tratate de cele netratate. În cazul depunerilor de rășină acrilică Paraloid B-72 s-au observat compuși cu forme neregulate rezultați în urma procesului de hidroliză.

Rezultatele biocurățării nu au variat semnificativ în funcție de tipul de pigment aplicat (roșu, albastru, galben sau verde). Totuși, în cazul modelelor experimentale peste care s-a aplicat ulei vegetal, straturile picturale de culoare roșie și galbenă au devenit foarte casante și s-au desprins de pe suport după aplicarea hidrogelurilor. În aceste cazuri, biocurățarea nu a putut fi evaluată corect. Modelele experimentale peste care au fost aplicate rășină acrilică și ceară s-au caracterizat printr-o bună aderare a pigmentilor la suport.

Timpul de contact a enzimelor încorporate în hidrogeluri cu suprafața modelelor experimentale a reprezentat un parametru important al procesului de biocurățare. În acest sens, s-a constatat că după 10 h de expunere, depunerile au fost hidrolizate pe zone mai extinse comparativ cu tratamentele de 5 h.

CONCLUZII GENERALE

Considerând importanța biotehnologică a enzimelor halorezistente, creșterea cererii acestor molecule pe piața globală și nevoia curentă a unor producători mai eficienți ai acestor biocatalizatori, cercetările întreprinse în cadrul prezentei teze de doctorat s-au axat pe izolarea și identificarea unor tulpini noi de microorganisme halofile și halotolerante capabile să sintetizeze hidrolaze cu aplicabilitate practică. În vederea îndeplinirii acestui scop, șapte medii ale căror comunități de microorganisme au fost slab studiate anterior din punct de vedere al potențialului de a produce enzime hidrolitice (cinci lacuri sărate din România, ecosistemul Mării Negre și un habitat extrem din deșertul Atacama) au fost eșantionate și supuse studiilor de bioprospectare.

Concluziile cercetărilor efectuate în cadrul prezentei lucrări au fost următoarele:

1. Din eșantioanele de apă, sedimente și sare prelevate din șapte ecosisteme salmastre, saline și hipersaline, s-au obținut 331 de izolate microbiene halofile și halotolerante, dintre care 269 (81,3%) de izolate bacteriene, 40 (12,1%) de izolate microfungice și 22 (6,6%) de izolate arheene.

2. Rezultatele experimentelor de determinare a potențialului celor 331 de izolate microbiene de a hidroliza diferite tipuri de compuși (proteine, lipide, polizaharide) au relevat faptul că 230 (69,5%) dintre acestea au produs cel puțin una dintre enzimele extracelulare de interes (proteaze, lipaze, amilaze, celulaze, xilanaze sau pectinaze). Rezultatele estimărilor semicantitative ale activităților hidrolitice au condus la selecționarea a 133 de tulpini (112 bacteriene, 16 microfungice și 5 arheene) cu cele mai intense activități catalitice, acestea alcătuind colecția de laborator.

3. Identificarea taxonomică a tulpinilor bacteriene din colecția de laborator a permis încadrarea acestora în 39 de genuri distribuite în șase clase: *Bacilli* (50 de tulpini), *Gammaproteobacteria* (40 de tulpini), *Flavobacteriia* (15 tulpini), *Actinobacteria* (4 tulpini) și *Alphaproteobacteria* (3 tulpini). Tulpinile de microfungi au fost încadrate în trei genuri din clasele *Eurotiomycetes* (12 tulpini) și *Sordariomycetes* (4 tulpini), iar tulpinile arheene au fost clasificate în patru genuri din clasa *Halobacteria*.

4. Rezultatele cuantificării activității proteazelor, esterazelor/lipazelor, celulazelor și xilanazelor extracelulare produse de 25 de tulpini bacteriene și microfungice au arătat că tulpinile halotolerante din genul *Bacillus* au prezentat cele mai intense activități hidrolitice.

5. Studiarea principalelor proprietăți catalitice ale proteazelor, esterazelor, celulazelor și xilanazelor produse de trei tulpini selecționate din genul *Bacillus* a condus la constatarea că enzimele își păstrează activitatea catalitică atât în prezența unor concentrații relativ crescute de săruri, cât și în intervale largi de temperatură și pH. Aceste proprietăți conferă enzimelor o importanță practică deosebită, putând fi utilizate în aplicațiile biotehnologice care implică condiții fizico-chimice dure.

6. Rezultatele evaluării preliminare a eficacității esterazelor halorezistente, produse de una dintre tulpinile din colecția de laborator, în procese de biocurățare a picturilor murale au fost promițătoare. În acest sens, s-a constatat că enzimele înglobate în hidrogelul Agarart au îndepărtat parțial depunerile de ulei vegetal, ceară și rășină acrilică de pe suprafețele modelelor experimentale îmbătrânite artificial. Cu toate acestea, sunt necesare cercetări mai aprofundate în sensul optimizării procesului de biocurățare pentru a asigura îndepărtarea uniformă și completă a acestor depuneri care afectează adesea calitatea estetică a picturilor murale.

Rezultatele obținute încurajează continuarea și extinderea cercetărilor asupra tulpinilor halofile și halotolerante din colecția constituită în cadrul prezentei teze de doctorat. Pe de o parte, tulpinile halotolerante din genul *Bacillus* care, la nivel de laborator, s-au caracterizat prin rate rapide de creștere și prin activități hidrolitice intense ar putea fi testate la nivel de stație pilot. Pe de altă parte, tulpinile halofile care au prezentat rate de creștere lente ar putea fi supuse tehnicilor de inginerie genetică pentru clonarea și supraexprimarea genelor ce codifică enzimele de interes.

De asemenea, colecția de tulpini bacteriene, arheene și microfungice oferă oportunitatea de a efectua în viitor numeroase alte studii de bioprosectare. În acest sens, se intenționează testarea capacității tulpinilor de a produce diferiți compuși de interes biotehnologic (poli- β -hidroxialcanoți, polizaharide, bacteriorodopsină, antibiotice), precum și a potențialului acestora de a descompune diferite substanțe toxice (hidrocarburi, solvenți organici, compuși organofosforici) în vederea stabilirii eficacității utilizării tulpinilor în procese de bioremediere a mediilor hipersaline sau în procesele de epurare a efluenților industriali salini.

LISTA PUBLICAȚIILOR REZULTATE ÎN URMA CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE DIN PROGRAMUL DE STUDII DOCTORALE

Articole publicate din conținutul tezei de doctorat în reviste cotate ISI

- **Ruginescu R.**, Enache M., Popescu O., Gomoiu I., Cojoc R., Batrinescu-Moteau C., Maria G., Dumbravician M., Neagu S., **2022**. Characterization of some salt-tolerant bacterial hydrolases with potential utility in cultural heritage bio-cleaning. *Microorganisms* 10, 644; <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030644>; **IF 4,128**
- **Ruginescu R.**, Gomoiu I., Popescu O., Cojoc R., Neagu S., Lucaci I., Batrinescu-Moteau C., Enache M., **2020**. Bioprospecting for Novel Halophilic and Halotolerant Sources of Hydrolytic Enzymes in Brackish, Saline and Hypersaline Lakes of Romania. *Microorganisms* 8, 1903; doi:10.3390/microorganisms8121903; **IF 4,128**
- **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 Microbiol. Lett.* 366, fnz224; <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz224>; **IF 2,742**

Alte articole, din subiecte conexe cu cel al tezei

- Ojovan B., Catana R., Neagu S., Cojoc R., Lucaci A.I., Marutescu L., Florescu L., **Ruginescu R.**, Enache M., Moldoveanu M., 2021. Metabolic Potential of Some Functional Groups of Bacteria in Aquatic Urban Systems. *Fermentation* 7(4):242. DOI: 10.3390/fermentation7040242; **IF 3,975**
- Cojoc L.R., Enache M.I., Neagu S.E., Lungulescu M., Setnescu R., **Ruginescu R.**, Gomoiu I., 2019. Carotenoids produced by halophilic bacterial strains on mural paintings and laboratory conditions, *FEMS Microbiol. Lett.* 366, fnz243, <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz243>; **IF 2,742**
- Gomoiu I., Radvan R., Ghervase L., Mohanu I., Enache M., Neagu S., **Ruginescu R.**, Cojoc R., 2020. Cleaning of mural paintings and mortars: review. *Rev. Rom. Mat.* 50(4):485–492; **IF 0,563**
- Gomoiu I., Enache M., Neagu S., **Ruginescu R.**, Dumbravician M., Radvan R., Ghervase L., Mohanu I., Cojoc R., 2021. Green biotechnologies used in the restoration of mural painting and lithic support. *Rev. Rom. Mat.* 51(4):495–504; **IF 0,563**
- Lucaci A.I., Neagu S., Cojoc R., **Ruginescu R.**, Ardelean I., Enache M., 2021. Benefits of understanding the enzymatic activities in saline Lake Letea in the Danube Delta. *Rom. Biotech. Lett.* 26(2):2448–2454. DOI: 10.25083/rbl/26.2/2448.2458.
- 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 Sci. J.* 8(1):160–166.
- **Ruginescu R.M.**, Cojoc R., Enache M., Lazar V., 2018. Preliminary Characterization of a Cellulase Producing Bacterial Strain Isolated from a Romanian Hypersaline Lake. *J Environ Prot* 9, 1066–1081. <https://doi.org/10.4236/jep.2018.910066>.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Amoozegar M.A., Safarpour A., Noghahi K.A., Bakhtiary T., Ventosa A., 2019. Halophiles and Their Vast Potential in Biofuel Production. *Front Microbiol.* 10, 1895.
2. Amoozegar M.A., Siroosi M., Atashgahi S., Smidt H., Ventosa A., 2017. Systematics of *Haloarchaea* and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. *Microbiology* 163, 623-645.
3. Azua-Bustos A., Urrejola C., Vicuna R., 2012. Life at the dry edge: microorganisms of the Atacama Desert. *FEBS Lett.* 586, 2939-2945.
4. Cupp-Enyard C., 2008. Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. *JoVE.* 19. <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=899>, doi: 10.3791/899.
5. DasSarma S., DasSarma P., 2015. Halophiles and their enzymes: Negativity put to good use. *Curr Opin Microbiol.* 25, 120-126.
6. Drees K.P., Neilson J.W., Betancourt J.L., Quade J., Henderson D.A., Pryor B.M., Maier R.M., 2006. Bacterial community structure in the hyperarid core of the Atacama Desert, Chile. *Appl Environ Microbiol* 72, 7902-7908.
7. Enache M., Itoh T., Kamekura M., Teodosiu G., Dumitru L., 2007. *Haloferax prahovense* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a Romanian salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57, 393-397.
8. Finstad K., Pfeiffer M., McNicol G., Barnes J., Demergasso C., Chong G., Amundson., 2016. Rates and geochemical processes of soil and salt crust formation in Salars of the Atacama Desert, Chile. *Geoderma* 284, 57-72.
9. Galinski E.A., 1995. Osmoadaptation in Bacteria. *Adv Microb Physiol* 37, 273-328.
10. Gâstescu P., 1971. Lacurile din România-limnologie regională, Editura Academiei Republicii Socialiste România, București.
11. Gomoiu I., Radvan R., Ghervase L., Mohanu I., Enache M., Neagu S., Ruginescu R., Cojoc R., 2020. Cleaning of mural paintings and mortars: Review. *Rev Rom Mat* 50 (4), 485-492.
12. Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A., Oren A., 2018. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiol Rev.* 42 (3), 353-375.
13. Gupta R., Rathi P., Gupta N., Bradoo S., 2003. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37, 63-71.
14. Kampf S.K., Tyler S.W., Ortiz C.A., Munoz J.F., Adkins P.L., 2005. Evaporation and land surface energy budget at the Salar de Atacama, Northern Chile. *J Hydrol* 310, 236-252.
15. Kumar V., Satyanarayana T., 2014. Production of thermo-alkali-stable xylanase by a novel polyextremophilic *Bacillus halodurans* TSEV1 in cane molasses medium and its applicability in making whole wheat bread. *Bioprocess Biosyst Eng.* 37, 1043-1053.
16. Li X., Yu H.Y., 2013. Halostable cellulase with organic solvent tolerance from *Haloarcula* sp. LLSG7 and its application in bioethanol fermentation using agricultural wastes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 40, 1357-1365.
17. McGenity T.J., Oren A., 2012. Hypersaline Environments. În: *Life at Extremes: Environments, Organisms and Strategies for Survival.* Bell E.M. (ed.), CAB International, 402-437.
18. Menasria T., Monteoliva-Sánchez M., Benammar L., Benhadj M., Ayachi A., Hacène H., Gonzalez-Paredes A., Aguilera M., 2019. Culturable halophilic bacteria inhabiting Algerian saline ecosystems: A source of promising features and potentialities. *World J Microbiol Biotechnol.* 35, 132.
19. Miller G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
20. Oren A., 2002. Halophilic Microorganisms and their Environments. Seckbach J. (ed.), Kluwer Academic Publishers.
21. Oren A., 2002. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28, 56-63.
22. Oren A., 2010. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ Technol* 31, 825-834.
23. Oren A., 2011. Diversity of Halophiles. În: *Extremophiles Handbook.* Horikoshi K. (ed.), Springer, 310-324.
24. Parte A.C., 2018. LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *Int J Syst Evol Microbiol.* 68, 1825-1829; doi: 10.1099/ijsem.0.002786; Accesat în perioada Noiembrie-Decembrie 2019.
25. Pliego J., Mateos J.C., Rodriguez J., Valero F., Baeza M., Femat R., Camacho R., Sandoval G., Herrera-López E.J., 2015. Monitoring lipase/esterase activity by stopped flow in a sequential injection analysis system using p-nitrophenyl butyrate. *Sensors* 15, 2798-2811.
26. Quesada E., Ventosa A., Rodriguez-Valera F., Megias L., Ramos-Cormenzana A., 1983. Numerical Taxonomy of Moderately Halophilic Gram-negative Bacteria from Hypersaline Soils. *J. Gen. Microbiol* 129, 2649-2657.
27. Rohban R., Amoozegar M.A., Ventosa A., 2009. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolases from Howz Soltan Lake, Iran. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36, 333-340.

28. 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 Microbiol. Lett.* 366, fnz224.
29. Ruginescu R., Gomoiu I., Popescu O., Cojoc R., Neagu S., Lucaci I., Batrinescu-Moteau C., Enache M., 2020. Bioprospecting for Novel Halophilic and Halotolerant Sources of Hydrolytic Enzymes in Brackish, Saline and Hypersaline Lakes of Romania. *Microorganisms* 8, 1903; doi:10.3390/microorganisms8121903.
30. Sánchez-Porro C., Mellado E., Bertoldo C., Antranikian G., Ventosa A., 2003. Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76. *Extremophiles* 7, 221-228.
31. Sánchez-Porro C., Martín S., Mellado E., Ventosa A., 2003b. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *J. Appl. Microbiol.* 94, 295–300.
32. Schubert B.A., Lowenstein T.K., Timofeeff M.N., Parker M.A., 2010. Halophilic Archaea cultured from ancient halite, Death Valley, California. *Environ Microbiol* 12, 440–454.
33. Siglioccolo A., Paiardini A., Piscitelli M., Pascarella S., 2011. Structural adaptation of extreme halophilic proteins through decrease of conserved hydrophobic contact surface. *BMC Struct Biol.* 11, 50.
34. Tadeo X., López-Méndez B., Trigueros T., Laín A., Castaño D., Millet O., 2009. Structural basis for the aminoacid composition of proteins from halophilic archaea. *PLoS Biol.* 7 (12), e1000257.
35. Teather R.M., Wood P.J., 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol.* 43, 777-780.
36. Vauclare P., Natali F., Kleman J.P., Zaccai G., Franzetti B., 2020. Surviving Salt Fluctuations: Stress and Recovery in *Halobacterium salinarum*, an Extreme Halophilic Archaeon. *Sci. Rep.* 10, 3298.
37. Ventosa A., de la Haba R.R., Sánchez-Porro C., Papke R.T., 2015. Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach. *Curr Opin Microbiol.* 25, 80-87.
38. Ventosa A., Márquez M.C., Sánchez-Porro C., de la Haba R.R., 2012. Taxonomy of Halophilic Archaea and Bacteria. In: *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms*. Vreeland R.H. (ed.), Springer Science+Business Media Dordrecht, 59-80.
39. Ventosa A., Nieto J.J., 1995. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World J Microb Biot.* 11, 85-94.
40. Ventosa A., Nieto J.J., Oren A., 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62 (2), 504-544.
41. Vidyasagar M., Prakash S., Litchfield C., Sreeramulu K., 2006. Purification and characterization of a thermostable, haloalkaliphilic extracellular serine protease from the extreme halophilic archaeon *Halogeometricum borinquense* strain TSS101. *Archaea* 2, 51-57.
42. Vreeland R.H., Piselli A.F. Jr, McDonnough S., Meyers S.S., 1998. Distribution and diversity of halophilic bacteria in a subsurface salt formation. *Extremophiles* 2 (3), 321-331.
43. Wainø M., Ingvorsen K., 2003. Production of b-xylanase and b-xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*. *Extremophiles* 7, 87-93.
44. Walia A., Guleria S., Mehta P., Chauhan A., Parkash J., 2017. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *3 Biotech.* 7, 11.
45. Wang C.Y., Chan H., Lin H.T., Shyu Y.T., 2010. Production, purification and characterisation of a novel halostable xylanase from *Bacillus* sp. NTU-06. *Ann Appl Biol* 156, 187-197.
46. Wang C.Y., Hsieh Y.R., Ng C.C., Chan H., Lin H.T., Tzeng W.S., Shyu Y.T., 2009. Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio* sp. strain NTU-05. *Enzyme Microb. Technol.* 44, 373-379.
47. Yu H.Y., Li X., 2015. Alkali-stable cellulase from a halophilic isolate, *Gracilibacillus* sp. SK1 and its application in lignocellulosic saccharification for ethanol production. *Biomass and Bioenergy* 81, 19-25.
48. Zhang G., Li S., Xue Y., Mao L., Ma Y., 2012. Effects of salts on activity of halophilic cellulase with glucomannanase activity isolated from alkaliphilic and halophilic *Bacillus* sp. BG-CS10. *Extremophiles.* 16, 35-43.
49. Zhang W., Xu H., Wu Y., Zeng J., Guo Z., Wang L., Shen C., Qiao D., Cao Y., 2018. A new cold-adapted, alkali-stable and highly salt-tolerant esterase from *Bacillus licheniformis*. *Int J Biol Macromol.* 111, 1183-1193.
50. Zhou J., Peng M., Zhang R., Li J., Tang X., Xu B., Ding J., Gao Y., Ren J., Huang Z., 2015. Characterization of *Sphingomonas* sp. JB13 exo-inulinase: a novel detergent-, salt-, and protease-tolerant exo-inulinase. *Extremophiles.* 19, 383-393.