

Avizat



Dr. Cristina Purcărea
Director de proiect

Raport final de activitate

Perioada implementare: 3 ianuarie 2021 – 31 decembrie 2023

Proiectul cu titlul „**Biosenzor portabil cuplat cu drona de prelevare pentru determinarea in situ a poluanților apelor marine – MOBILTOX**”

Contract: 224/2021

Codul proiectului: ERANET-MARTERA-MOBILTOX-2

Proiectul MOBILTOX a avut ca scop dezvoltarea unei platforme mobile pentru evaluarea calității apei de mare din porturi și zone de coastă afectate de activități agricole și industriale, oferind un sistem simplu de informare despre toxicitatea generală și efectele specifice induse de unii poluanți (erbicide). Aceste informații duale oferă un sistem de avertizare atât pentru autorități cât și pentru industrii și activități agricole apropiate de apă.

Obiectivele științifice și tehnologice generale ale proiectului la nivel de consorțiu au urmărit:

- Dezvoltarea unui biosenzor microbial robust pentru evaluarea generală a toxicității din mediile marine pe baza unui set de 10 specii bacteriene reprezentative pentru apa mării.
- Dezvoltarea unui biosenzor foarte sensibil pentru detectarea contaminării specifice a apei cu inhibitori ai fotosintezei precum erbicidele și metalele grele pe baza unor noi preparate de fotosistem II (PSII) din microorganisme fototrofe active la temperaturi scăzute și halotolerante.
- Dezvoltarea unui dispozitiv automat de monitorizare care să integreze prelevarea probelor cu ajutorul unei drone și dezvoltarea unei platforme de detecție mobilă pentru efectuarea celor două tipuri de analiză.

În acest context, **obiectivele prevăzute pentru partenerul IBB** (proiect MOBILTOX-2) au vizat producerea și caracterizarea funcțională a biocomponentelor microbiene pentru dezvoltarea și validarea platformei și au cuprins:

- (O1) Izolarea și caracterizarea bacteriilor utilizate ca element de recunoaștere în senzorii de toxicitate totală și de detecție a erbicidelor*
- (O2) Selectarea setului de tulpini bacteriene pentru senzorul de toxicitate totală, obținerea biocatalizatorului și dezvoltarea electrozilor ficționalizați cu PSII din microorganisme active la temperaturi scăzute*

(O3) *Producerea și caracterizarea funcțională a biocomponentelor pentru dezvoltarea și validarea platformei de monitorizare a poluanților marini*

Obiectivele IBB au fost realizate în totalitate prin furnizarea componentei bacteriene Coordonatorului (Universitatea din Nantes) care a dezvoltat biosenzorul microbian, și a componentei fototrofe (tilacoide, preparate PSII) partenerului ICB care a dezvoltat și optimizat modulul electrochimic de analiză a erbicidelor. În cadru proiectului, Universitatea din Nantes împreună cu partenerul Bathymetrie Drone sunt responsabile de integrarea în platforma automată a componentelor și de colectare a probelor de apă.

Activitățile realizate au asigurat îndeplinirea 100% a obiectivelor propuse. Acestea au cuprins:

- 1. Izolarea, identificarea și caracterizarea funcțională a unor bacterii heterotrofe din Marea Neagră**
 - au fost colectate probe de apă din zona litorală a Mării Negre, locațiile Eforie Nord și Cap Aurora.
 - au fost izolate 93 de tulpini bacteriene heterotrofe din probele colectate și identificate taxonomic prin secvențierea genei ARNr 16S.
 - tulpinile bacteriene selectate au fost caracterizate din punct de vedere al ratei de creștere și al gradului de halotoleranță.
- 2. Selectarea setului de tulpini bacteriene marine utilizate în senzorul de toxicitate totală**
 - în vederea selectării tulpinilor reprezentative, a fost efectuată secvențierea Illumina 16S ARNr a comunității bacteriene totale din locația Eforie Nord.
 - pe baza caracteristicilor funcționale ale tulpinilor izolate și a distribuției taxonomice a comunităților bacteriene din Marea Neagră, au fost selectate 5 tulpini din genul *Pseudomonas* pentru potențiala utilizare ca biocomponente în senzorii de monitorizare a toxicității globale de către partenerii francezi.
- 3. Producerea de seturi bacteriene și a biocomponentului PSII pentru dezvoltarea platformei de analiză a poluanților marini**
 - tulpinile bacteriene marine selectate au prezentat o stabilitate ridicată prin păstrare la -80°C în mediu de cultură lichid și glicerol timp de 20 luni cu conservarea proprietăților funcționale (sensibilitatea la compuși chimici poluanți) testate de către partenerii francezi.
 - pentru producerea membranelor tilacoide și a complexului PSII a fost utilizată preponderent tulpina *Coccomyxa subellipsoidea* LT4 izolată din gheața din peștera Scărișoara; testări preliminare au fost efectuate folosind cianobacteriile *Synechocystis* sp. PCC 6803 și *Synechococcus elongatus* PCC 7942.
- 4. Caracterizarea funcțională a seturilor bacteriene pentru validarea platformei de analiză a poluanților marini în Marea Neagră**
 - cele 5 tulpini bacteriene selectate din genul *Pseudomonas* au fost caracterizate fiziologic de către doctoranda Eva Delaunay (partener GEPEA) în perioada vizitei de lucru la IBB, iar rezultatele obținute privind potențialul lor de a fi utilizate în constituția unor biosenzori pentru detectarea poluanților din apele marine vor fi raportate de către partenerii francezi.
- 5. Obținerea unor tulpini fototrofe izolate din medii reci și saline**
 - au fost cultivate și izolate microorganisme fototrofe din probe de gheață colectate din Peștera Scărișoara.
 - două izolate au fost identificate prin secvențiere Sanger a genei ARNr 16S mitocondriale, indicând un procent de identitate ridicat (>99%) cu specia *Coccomyxa subellipsoidea*.
 - au fost determinate condițiile optime de cultivare ale tulpinii psihrotrofe *Coccomyxa subellipsoidea* LT4.

- au fost pregătite loturi de celule proaspete intacte și celule permeabilizate din microalga *Coccomyxa subellipsoidea* LT4 în vederea testării preliminare a sensibilității la eribicide de către partenerul ICB
- pentru analize comparative au fost obținute loturi de celule proaspete intacte și celule permeabilizate din cianobacteriile *Synechocystis* sp. PCC 6803 și *Synechococcus elongatus* PCC 7942 testate de partenerul ICB
- 6. Obținerea complexului enzimatic PSII din cianobacteria *Synechococcus elongatus***
 - s-au pregătit 3 loturi de celule proaspete, 3 loturi de tilacoide și 3 loturi de complex PSII din cianobacteria *Synechococcus elongatus* PCC 7942 în vederea testării activității fotosintetice și a sensibilității la erbicide de către partenerul ICB.
 - suplimentar, în scop comparativ, au fost pregătite loturi de celule intacte și celule permeabilizate din cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803.
- 7. Izolarea complexului enzimatic PSII din bacterii active la temperaturi scăzute**
 - au fost preparate 2 loturi de celule proaspete, 2 loturi de tilacoide și 2 loturi de complex PSII din microalga psihrotrofă *Coccomyxa subellipsoidea* LT4 izolată din gheața din Peștera Scărișoara.
 - s-a optimizat protocolul de izolare a membranelor tilacoide din microalga *C. subellipsoidea* LT4 în vederea obținerii cantității maxime de clorofilă din biomasa utilizată.
- 8. Caracterizarea funcțională a fracțiilor PSII din bacterii active la temperaturi scăzute**
 - sensibilitatea preparatelor biologice (celule, tilacoide, PSII) din microalga psihrotrofă *C. subellipsoidea* LT4 la diferiți compuși chimici poluanți (ex. erbicide – diuron) a fost evaluată electrochimic de către partenerul ICB, iar rezultatele sunt raportate de către acesta.
 - pentru mărirea stabilității preparatelor biologice, acestea au fost liofilizate în prezenta stabilizatorilor zaharoză sau trehaloză și ulterior livrate partenerului ICB în vederea testării stabilității.
- 9. Producerea biocomponentului PSII activ la temperaturi scăzute pentru dezvoltarea electrozilor ficționalizați**

Întrucât preparatele PSII au fost instabile din punct de vedere al activității fotosintetice și au prezentat concentrație foarte redusă de clorofilă, s-a decis ca dezvoltarea senzorului de analiză a toxicității poluanților din apele marine să se efectueze utilizând membranele tilacoide. Acestea din urmă au fost mult mai stabile în timp, iar randamentul de izolare a fost, de asemenea, mult mai mare comparativ cu al preparatelor PSII.

 - Pentru dezvoltarea electrozilor funcționalizați au fost preparate 23 loturi de tilacoide și 2 loturi de PSII din microalga psihrotrofă *C. subellipsoidea* LT4 izolată din gheața din Peștera Scărișoara.
- 10. Caracterizarea funcțională a fracțiilor PSII utilizate pentru validarea platformei de analiză a poluanților marini în Marea Neagră**
 - Preparatele tilacoide liofilizate au fost stabile pentru cel puțin 3 luni pentru validare.
 - Caracteristicile funcționale care vizează sensibilitatea la erbicid au fost analizate de către partenerul ICB.
- 11. Diseminarea rezultatelor.**
 - Activitățile de diseminare au cuprins publicarea a 7 articole ISI (3 Q1, 2 Q2, Q4), dintre care 2 în evaluare și un articol în curs de elaborare, depunerea a 2 cereri de brevet OSIM și 19 participări la conferințe naționale (8) și internaționale (11), cu 13 prezentări orale și 6 postere (detaliat la rezultate)

Informațiile referitoare la proiect au fost distribuite prin site-ul web creat și actualizat: <https://www.ibiol.ro/proiecte/ERANET/MARTERA/MOBILTOX-2/index.html>.

Au fost realizate, de asemenea, activități pentru **dezvoltarea profesională a tinerilor**, constând în stagii de cercetare în IBB pentru studenți străini, atât în cadrul consorțiului acestui proiect (doctoranzi), cât și pentru promovarea cercetării pentru studenți pre-doctorali (anul II):

- Eva Delaunay, studentă doctorandă la Universitatea Nantes, Franța
- Victor Briot, student anul II la Universitatea Sorbonne, Paris, Franța (03.07.2023 - 31.08.2023)

Rezultatele obținute în cadrul acestui proiect au constituit un capitol important din teza de doctorat a domnului Robert Ruginescu (SCOSAAR, 20.04.2022), membru în echipa IBB, contribuind la dezvoltarea profesională a tinerilor cercetători. <https://ibiol.ro/doctorat/anunt/ruginescu.html>

Rezultatele prevazute au fost livrate în totalitate, conform tabelului următor, cu obținerea de date și rezultate suplimentare.

Rezultate asumate	Rezultate livrate	Comentarii
Tulpini bacteriene halofile sau halotolerante izolate din Marea Neagră	Obținerea unei colecții de 93 de tulpini bacteriene din Marea Neagră, <u>caracterizare funcțională și identificarea diversității comunității bacteriene marine prin secvențiere Illumina a genei 16S ARNr</u>	Realizat conform planului <u>și livrabile suplimentare</u>
Raport asupra afilierii taxonomice și caracteristicilor funcționale ale tulpinilor marine izolate	Identificare taxonomică prin secvențiere Sanger a genei 16S ARNr a izolatelor bacteriene	Realizat conform planului
Bacterii fototrofe izolate din medii reci și saline	Obținerea de microorganisme fototrofe din gheața de peșteră din Scarisoara (microalga <i>Coccomyxa subellipsoidea</i>) și a cianobacteriei <i>Synechococcus elongatus</i> adaptată la stres salin	Realizat conform planului
Fracții izolate de PSII din <i>Synechococcus elongatus</i>	Obținerea de complexe enzimatic PSII, <u>membrane tilacoidale și celule proaspete și permeabilizate</u> din cianobacteriile <i>S. elongatus</i> și din <u>tulpina comercială <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803</u>	Realizat conform planului <u>și livrabile suplimentare</u>
Fracții izolate de PSII din tulpini fototrofe provenind din medii reci și saline	Fracții de PSII din microalga <i>C. subellipsoidea</i> izolată din gheața de peșteră din Scărișoara și din cianobacteria <i>S. elongatus</i>	Realizat conform planului
Raport asupra stabilității complexelor PSII din bacterii active la temperaturi scăzute	Raport asupra stabilității complexelor PSII izolate din microalga <i>C. subellipsoidea</i>	Realizat conform planului

Set de tulpini bacteriene selecționat pentru platforma de analiză	Set de tulpini bacteriene din Marea Neagră selecționat pentru platforma de analiză	Realizat conform planului
Complexe enzimatice PSII din bacterii izolate din medii reci și saline	6 batch-uri de complexe enzimatice PSII, membrane tilacoidale și celule proaspete din <i>C. subellipsoidea</i> și 9 batch-uri de complexe enzimatice PSII, membrane tilacoidale și celule proaspete din <i>Synechococcus elongatus</i> pentru dezvoltarea de biosenzori	Realizat conform planului
Raport asupra caracteristicilor funcționale ale ansamblului biocomponentelor din platforma de analiză	Raport asupra stabilității și activității tulpinilor bacteriene marine selectate și a complexelor enzimatice din microorganismele fototrofe	Realizat conform planului
Articole științifice (3)	6 articole ISI (3Q1, 2Q2, Q4), 1 articol în pregătire, 2 aplicații brevet OSIM, 19 conferințe (13 prezentări orale, 6 postere)	Realizat conform planului și livrabile suplimentare

În cadrul proiectul MOBILTOX-2 au fost obținute **6 produse noi**:

1. Colecție de tulpini bacteriene din Marea Neagră
2. Tulpină de microalgă *Coccomyxa subellipsoidea* izolată din gheața de pesteră din Ghețarul Scărișoara
3. Secvențe tulpini bacteriene din Marea Neagră 16S ARNr depuse în GenBank
4. Secvențe ale comunităților bacteriene din Marea Neagră Illumina 16S ARNr depuse în GenBank (BioProject PRJNA875633)
5. Preparate purificate de membrane tilacoidale din microalga *Coccomyxa subellipsoidea* izolată din gheața de pesteră din Ghețarul Scărișoara
6. Complex enzimatic PSII izolat din tulpina de microalgă *Coccomyxa sp.* izolată din gheața de peșteră

Rezultatele activităților de diseminare au cuprins:

Articole ISI (7)

1. Ruginescu R, Lavin P, Iancu L, Menabit S, Purcarea C (2022) Bioprospecting for novel bacterial sources of hydrolytic enzymes in the Black Sea. *Microorganisms*. 10, 2468. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122468> (Q2)
2. Menabit S, Iancu L, Pavel AB, Popa A, Lupascu N, Purcarea C (2022) Molecular identification and distribution of insect larvae in the Lower Sector of the Danube River. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 51(1) 74-89. <https://doi.org/10.26881/oahs.2022.1.07> (Q4)
3. Menabit S, Begun T, Teacă A, Mureșan M, Lavin P, Purcarea, C (2022) DNA Barcoding and Distribution of Gastropods and Malacostracans in the Lower Danube Region. *Diversity*, 14, 533. <https://doi.org/10.3390/d14070533> (Q2)

4. Iancu L, Angelescu IR, Paun VI, Henriquez-Castillo C, Lavin P, Purcarea C (2021) Microbiome pattern of *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) and feeding substrate in the presence of the foodborne pathogen *Salmonella enterica*. *Sci Rep* 11, 15296. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94761-w> (Q1)
5. Menabit S, Lavin P, Begun T, Mureșan M, Teacă A, Purcarea C. First screening of bacteria assemblages associated with the marine polychaete *Melinna palmata* Grube, 1870 and adjacent sediments. *Frontiers in Marine Science*. (În evaluare) (Q1)
6. Purcarea C., Ruginescu R., Banciu R.M., Vasilescu A. Extremozymes-based biosensors for environmental pollution monitoring: recent developments. *Biosensors* Manuscript ID: 2769221 (În evaluare) (Q1)
7. Andreea Ftodiev, Robert Ruginescu, Roberta Banciu, Szilveszter Gaspar, Cristina Purcarea, Alina Vasilescu. The photosynthetic activity and sensitivity to pollutants of the microalga *Coccomyxa subellipsoidea* LT4 from Scarisoara ice cave. (În pregătire)

Cereri de brevet (2)

1. Ruginescu Robert Marian, Vasilescu Alina Mihaela, Cristina Purcarea. Metodă optimizată de izolare a membranelor tilacoide din microalga *Coccomyxa subellipsoidea* LT4. Aplicație patent OSIM Nr. A/00671, 09.11.2023
2. Vasilescu Alina Mihaela, Ftodiev Andreea Iuliana, Banciu Roberta Maria, Ruginescu Robert, Purcarea Cristina. Metodă de detecție în ape a poluanților inhibitori ai fotosintezei bazată pe biosenzor electrochimic cu tilacoide din *Coccomyxa subellipsoidea* LT4. Aplicație patent OSIM Nr. A/00780, 04.12.2023

Conferințe (19) – 11 internaționale și 8 naționale – (13 prezentări orale și 6 postere)

Atribuirea și exploatarea de către IBB a drepturilor de proprietate intelectuală asupra rezultatelor obținute s-au efectuat conform prevederilor stabilite în „Consortium Agreement” dintre toți partenerii proiectului MOBILTOX. Aplicațiile de brevete naționale depuse nu au implicat partenerii externi, aceștia neparticipând la obținerea rezultatelor. Produsele obținute în proiect în urmă activităților IBB au atins TRL 3 și nu sunt comercializabile în această fază.

Impactul rezultatelor obținute

Colecția de noi tulpini bacteriene (93) obținute din Marea Neagră constituie o sursă importantă de microorganisme moderat halofile cu potențial aplicativ atât prin utilizarea celulelor întregi („whole cell”) cât și a biomoleculelor acestora (enzime, metaboliți secundari) pentru dezvoltarea de biosenzori sau ca biocatalizatori în diverse aplicații industriale, de bioremediere sau biotehnologii.

Identificarea taxonomică a comunităților bacteriene din apă Mării Negre de pe litoralul românesc prin secvențiere Illumina a genei 16S ARNr aduce un aport suplimentar în determinarea distribuției spațiale a microbiomului marin în acest habitat, cu importanță atât pentru cercetarea fundamentală privind rolul său bioecologic și impactul poluării antropice asupra acestui ecosistem, cât și pentru identificarea și exploatarea de noi surse microbiene marine în scopuri aplicative.

Obținerea **unei noi tulpini de microalgă adaptată la temperaturi scăzute** (*Coccomyxa subellipsoidea* LT4) provenind din gheața de peștera are consecințe semnificative pentru cercetarea

aplicativă și fundamentală. Rezultatele obținute care vizează izolarea și caracterizarea membranelor tilacoide din această microalgă (care face obiectul unei aplicații de brevet național) și a complexului fotosintetic PSII promovează o nouă metodă de obținere a acestor preparate microbiene stabile care pot fi utilizate atât în biosensing cât și ca biocalizator în reacții bazate pe inhibiția activității fototrofe. Această metodă contribuie la extinderea utilizării în biosensing a biocomponentelor provenind din organisme extremofile ale căror caracteristici distincte (stabilitatea, activitatea și specificitatea ridicate) aduc beneficii în monitorizarea mediului în condiții specifice de temperatura, salinitate și în prezența unor compuși inhibitori.

De asemenea, acest rezultat constituie prima identificare și izolare a unei microalge extremofile din gheața perenă din Peștera Scărișoara, cu deschiderea unei direcții de studiu asupra rolului biogeochimic și adaptării la temperaturi scăzute a acestor microorganisme fototrofe în medii glaciare.

RAPORT SINTETIC AL REZULTATELOR PROIECTULUI MOBILTOX-2

Proiectul ERANET-MARTERA-MOBILTOX a urmărit obținerea unei platforme mobile robuste pentru măsurarea simplă și rapidă a toxicității apei marine, bazată pe două componente originale: (1) un biosenzor microbial compus dintr-un set de tulpini bacteriene marine pentru evaluarea generală a toxicității apei pe baza inhibiției respirației și (2) un biosenzor enzimatic utilizând preparate ale fotosistemului II din microorganisme fototrofe active la temperaturi scăzute pentru detectarea erbicidelor ca inhibitori ai fotosintezei.

În calitate de partener al consorțiului, am obținut, caracterizat și produs cantitățile necesare de biocomponente microbiene utilizate pentru dezvoltarea și validarea platformei, constând într-o serie de tulpini bacteriene izolate din Marea Neagră și preparate fotosintetice (membrane tilacoide și complexe fotosintetice PSII) dintr-o microalgă izolată din gheața perenă din peștera Scărișoara și din două tulpini de cianobacterii de colecție. Cele două componente microbiene au fost utilizate de partenerii proiectului pentru dezvoltarea biosenzorului bacterian (GEPEA, Franța) și a senzorului fototrof (ICB, România), împreună cu utilizarea unei platforme mobile pentru colectarea probelor de apă pentru analizat (drona) dezvoltată de partenerul Bathymetrie Drone, Franța.

În urma implementării proiectului MOBILTOX-2 au fost obținute 6 produse noi, iar rezultatele au fost diseminate prin 6 articole publicate în jurnale ISI cu vizibilitate ridicată și un articol în curs de redactare, 2 aplicații de brevet OSIM și prin participarea la 19 conferințe naționale și internaționale.

