

Proiectul 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

Raport științific Etapa 1/2021

Obiectiv 1: Izolarea și caracterizarea bacteriilor utilizate ca element de recunoaștere în senzorii de toxicitate totală și de detecție a erbicidelor

Activitatea 1.1. Izolarea, identificarea și caracterizarea funcțională a unor bacterii heterotrofe din Marea Neagră

1.1.1 Colectarea probelor de apă din Marea Neagră

- Probele de apă au fost colectate din două zone ale litoralului românesc (Eforie Nord și Cap Aurora) în urma unei expediții care a avut loc în Aprilie 2021. În fiecare din cele două zone, trei locații situate la 10-100 m una față de cealaltă au fost eșantionate, totalizând șase probe de apă.
- Probele (5 L din fiecare locație) au fost prelevate în recipiente de plastic sterile de la suprafața apei, la o distanță de 2-3 m față de mal. Acestea au fost depozitate în lăzi frigorifice pe parcursul transportului la laborator în București. Experimentele microbiologice au fost realizate în decurs de 24 h de la prelavare.
- Parametrii fizico-chimici ai apei de mare mășurați *in situ* cu o sondă Hanna HI98194 au indicat valori relativ apropiate de temperatură (9-12°C), pH (8.8-9.6), conductivitate electrică (28-29 mS/cm) și salinitate (17,6-18 g/kg). Oxigenul dizolvat a prezentat valori mai ridicate în zona Cap Aurora în intervalul 9,17-11,2 mg/L față de Eforie Nord unde concentrațiile au variat în intervalul 3,4-5,71 mg/L.

1.1.2 Cultivarea și izolarea bacteriilor heterotrofe din probele de apă

- În vederea cultivării bacteriilor heterotrofe, un volum de 1 mL din fiecare eșantion de apă a fost utilizat pentru inoculare în două medii de cultură adecvate dezvoltării microorganismelor marine: mediul *Marine Agar* și mediul *Enriched Seawater Agar*. Pentru pregătirea acestuia din

urmă, apa de mare a fost filtrată prin membrane MF-Millipore (Merck) cu diametrul porilor de 0,22 μm , utilizând un sistem de filtrare cu pompă de vacuum (Merck, Millipore). Însămânțarea s-a realizat în triplicat pentru fiecare eșantion.

- Mediile lichide inoculate au fost incubate la 28°C timp de 6 zile. Concentrația biomasei rezultate s-a determinat prin numărarea coloniilor și exprimarea rezultatelor în unități formatoare de colonii per mL de probă (UFC/mL).
- Coloniile bacteriene care au prezentat aspecte morfologice relativ distincte au fost purificate prin realizarea a patru pasaje succesive pe aceleași medii utilizate în etapa de cultivare inițială.
- Densitatea bacteriilor heterotrofe cultivate a fost mai mare în probele de apă din zona Cap Aurora (între $2,9 \times 10^3$ și $1,2 \times 10^4$ UFC/mL) decât în cele din zona Eforie Nord (între $6,5 \times 10^2$ și 9×10^2 UFC/mL). Aceste rezultate pot fi explicate de faptul că eșantioanele din zona Cap Aurora au fost prelevate din locații lagunare mai puțin expuse valurilor și curenților marini.
- Un total de 93 de colonii bacteriene au fost selectate pe baza caracterelor morfologice și izolate. Majoritatea lor au prezentat forme circulare cu margini regulate, profil convex/plat și pigmentație galbenă, crem sau albă.
- Din cele 93 de tulpini bacteriene identificate taxonomic, 49 au fost obținute din probele de apă prelevate din Eforie Nord, iar 44 au provenit din eșantioanele prelevate din Cap Aurora.

1.1.3 Identificarea taxonomică a tulpinilor bacteriene

- Cele **49 de tulpini din Eforie Nord** au aparținut la 24 de genuri diferite, încadrate în cinci clase, respectiv Alphaproteobacteria (10,2%), Gammaproteobacteria (34,7%), Flavobacteriia (26,5%), Bacilli (20,4%) și Actinobacteria (8,2%). La rândul lor, aceste cinci clase au aparținut filurilor Proteobacteria (44,9%), Bacteroidetes (26,5%), Firmicutes (20,4%) și Actinobacteria (8,2%).
- Cele **44 de tulpini din Cap Aurora** au aparținut la 24 de genuri diferite, încadrate în șase clase: Alphaproteobacteria (9,1%), Betaproteobacteria (6,8%), Gammaproteobacteria (45,5%), Flavobacteriia (29,5%), Bacilli (6,8%) și Actinobacteria (2,3%). Acestea au aparținut la patru încrengături, respectiv Proteobacteria (61,4%), Bacteroidetes (29,5%), Firmicutes (6,8%) și Actinobacteria (2,3%).

1.1.4 Determinarea ratei de creștere a tulpinilor izolate

- Rata de creștere a tulpinilor bacteriene heterotrofe izolate din Marea Neagră a prezentat largi variații între 0,039 și 0,756. Dintre acestea, tulpinile cu rata de creștere $>0,2$, aparținând genurilor *Shewanella*, *Enterovibrio*, *Pseudomonas*, *Marinomonas*, *Marinobacter*, *Psychrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Ahrensia*, *Roseobacter*, *Litoreibacter*, *Hydrogenophaga*, *Flavobacterium*, *Aquimarina*, *Cellulophaga*, *Zobellia*, *Wenyingzhuangia*, *Salinicoccus*, *Bacillus*, *Metabacillus*, *Jeotgalibacillus*, *Halobacillus*, *Peribacillus*, *Micrococcus*, *Salinibacterium*, au fost selectate pentru testări suplimentare ale proprietăților funcționale în vederea identificării candidaților optimi pentru platforma de monitorizare a toxicității apei marine (obiectiv general al proiectului MOBILTOX).

1.1.5 Determinarea gradului de halotoleranță a tulpinilor izolate

- Capacitatea tulpinilor bacteriene de a crește la diferite valori ale salinității a fost determinată prin cultivarea pe medii de cultură solide conținând 0-15% (g/v) săruri.
- Testele de salinitate au evidențiat 21 de tulpini halotolerante (care cresc atât în absența sărurilor cât și la salinități relativ crescute) și 45 de tulpini halofile (care necesită săruri pentru a crește), dintre care 37 tulpini slab-halofile (care cresc optim la 2,9-3,4% săruri) și 8 tulpini moderat-halofile (care cresc optim la $>3,4\%$ săruri).

Activitatea 1.2. Obținerea unor tulpini fototrofe izolate din medii reci și saline

- Pentru a cultiva și izola bacterii fototrofe din medii reci, două probe de gheață (S-20 și 400) colectate anterior din Peștera Scărișoara au fost utilizate ca inocul. În timp ce proba S-20 a fost prelevată de la suprafața unui ghețar expus razelor solare, proba 400 a fost colectată dintr-un strat localizat la 1125,5 cm sub suprafața blocului de gheață.
- Cele două probe de gheață au fost ținute la 4°C timp de 24 h pentru a permite dezghețarea, după care au fost filtrate prin membrane MF-Millipore (Merck) cu diametrul porilor de 0,22 μm , utilizând un sistem de filtrare cu pompă de vacuum (Merck, Millipore). Fiecare filtru a fost tăiat în patru părți egale. Două dintre acestea au fost utilizate pentru a inocula două baloane Erlenmeyer conținând fiecare 50 mL de mediu de cultură BG-11, iar celelalte două au fost depozitate la -20°C. Incubarea s-a realizat la 15 °C, în condiții de iluminare și agitare constante.

- Mediile de cultură inoculate cu proba S-20 au dobândit o pigmentație verde după aproximativ 40 de zile de incubare, sugerând că microorganismele fototrofe au atins o densitate relativ crescută. Prin pasarea acestor culturi lichide pe mediu BG-11 solid, s-a constatat că rata de creștere a microorganismelor fototrofe este relativ lentă, necesitând cel puțin 20 de zile de incubare la 15 °C pentru a obține colonii vizibile macroscopic. Izolarea acestora este în curs.
- Turbiditatea mediilor de cultură inoculate cu proba 400 a crescut foarte puțin pe parcursul celor 40 de zile de incubare, nedobândind pigmentație verde. Considerând că proba 400 a fost colectată dintr-un strat de gheață lipsit de lumină și oxigen timp de aproximativ 400 de ani, este posibil ca nicio specie fototrofă să-și fi menținut viabilitatea.

Activitatea 1.3. Obținerea complexului enzimatic PSII din *Synechococcus elongatus*

1.3.1 Testarea preliminară a activității fotosintetice a tulpinii *Synechocystis* sp. PCC 6803

- Într-o primă etapă, s-a determinat activitatea fotosintetică a celulelor (atât nepermeabilizate cât și permeabilizate) de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Această tulpină a fost cultivată în 200 mL mediu BG-11, la 28 °C, în condiții de iluminare și agitare constante, până când densitatea optică a culturii a atins valoarea 1 ($DO_{663\text{ nm}}=1$), corespunzătoare sfârșitului fazei logaritmice de creștere. Biomasa a fost obținută prin centrifugare la 7500 rpm, timp de 15 min și a fost resuspendată în 50 mM HEPES/NaOH (pH 7,5). Peste 8 mL de suspensie s-a adăugat 0,05 mL EDTA (200 mM) și 1 mL lizozim (90 mg/mL). După 15-20 min de incubare la 37°C, mixtura a fost centrifugată timp de 10 min la 7500 rpm, iar sedimentul de celule permeabilizate a fost spălat de șapte ori cu tampon HEPES/NaOH 50 mM (pH 7,5).
- Atât probele permeabilizate cât și biomasa proaspătă au fost transportate pe gheață la Centrul Internațional de Biodinamică (București), unde partenerii din cadrul proiectului au testat activitatea fotosintetică. Experimentul a fost repetat de mai multe ori, în diferite condiții de testare.

1.3.2 Izolarea membranelor tilacoidale din *Synechococcus elongatus* PCC 7942

- Pentru obținerea membranelor tilacoide continand complexul PSII, tulpina *Synechococcus elongatus* PCC 7942 a fost cultivată timp de 7-8 zile la 30°C, în condiții de agitare și iluminare constante. În momentul în care cultura a atins sfârșitul fazei logaritmice de creștere (OD_{663}

$\eta_{\text{m}}=0,8-1$), s-a centrifugat la 9000 rpm timp de 15 min, la 4°C, pentru a obține sedimentul celular.

- Biomasa obținută în 2 L de cultură a fost resuspendată în 16 mL de tampon HEPES/NaOH 50 mM (pH 7,5) și lizată cu 2 mL lizozim (90 mg/mL). Amestecul de reacție a fost incubat la 37°C timp de 20 min pentru a favoriza permeabilizarea celulelor, după care a fost centrifugată la 7100 g, timp de 8 min. După spălare de 3 ori cu tampon HEPES/NaOH 50 mM (pH 7,5) și tampon A (5 mM MES, 10 mM MgCl_2 , 5 mM CaCl_2 , 20% glicerol; pH 6), sedimentul celular a fost resuspendat în 10 mL tampon B (tampon A suplimentat cu 1 mM Benzamidină, 1 mM Acid ϵ -amino-N-caproic, 1 mM Pefabloc și 0,1% sulfobetaină 10).
- Suspensia obținută a fost repartizată în 10 tuburi de 2 mL prevăzute cu bile metalice de diferite dimensiuni (innuSPEED Lysis Tubes, Analytik Jena). Liza celulară s-a realizat prin 10 cicluri de omogenizare într-un dispozitiv SpeedMill PLUS (Analytik Jena) timp de 2 min fiecare (1 min omogenizare și 1 min răcire).
- Lizatul celular rezultat a fost preluat în într-un flacon de 15 mL. Celulele nelizate au fost sedimentate prin centrifugare timp de 5 min la 1000 g. Supernatantul rezultat a fost ultracentrifugat la 40.000 g timp de 30 min pentru separarea membranelor tilacoidale.
- Fracția conținând complexul PSII din membranele tilacoide a fost resuspendată în 10 mL tampon C (tampon A suplimentat cu 10 mM CaCl_2) și transportate pe gheață la Centrul Internațional de Biodinamică (București) pentru testarea activității fotosintetice după imobilizare.

Activitatea 1.4 Diseminarea rezultatelor

Site web <https://www.ibiol.ro/proiecte/ERANET/MARTERA/MOBILTOX/index.html>

Articole (3)

1. Bucur B, Purcarea C, Andreescu S, Vasilescu A (2021) Addressing the Selectivity of Enzyme Biosensors: Solutions and Perspectives. *Sensors*, 21, 3038. <https://doi.org/10.3390/s21093038> (Q1)
2. Iancu L, Angelescu IR, Paun VI, Henriquez-Castillo C, Lavin P, Purcarea C (2021) The microbiome profile of *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) and feeding

substrate in the presence of the foodborne pathogen *Salmonella enterica*. *Scientific Reports*. 11, 15296. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94761-w> (Q1)

3. Menabit S, Iancu L, Pavel AB, Popa A, Lupascu N, Purcarea C. Distribution and molecular identification of insect larvae in the Lower Sector of the Danube River. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, [acceptat](#)

Conferințe (3)

1. **28th International Karstological School Classical Karst “Regional Karstology – Local and General Aspects within International Year of Karst and Caves”** 14-18 iunie, 2021, Slovenia (online)
Paun VI, Lavin P, Chifiriuc C, Purcarea C. Ancient antimicrobial resistance in Scarisoara ice cave. [Poster](#)
2. **Ziua Internațională a Microorganismelor (ZIM2021)**. Bucuresti, 17 septembrie 2021
Ruginescu R, Iancu L, Purcarea C. *Novel bacterial strains isolated from the Black Sea as potential bioindicators of seawater pollution*. [Poster](#)
3. **A 61-a Sesiune Anuala de Comunicări Științifice a Institutului de Biologie**. Bucuresti, 10 decembrie 2021.
Ruginescu R, Gomoiu I, Enache M, Neagu S, Cojoc R, Batrinescu-Moteau C, Iancu L, Purcarea C. *Diversitatea microorganismelor halofile si halotolerante izolate din medii acvatice saline si potentialul lor biotehlogic*. [Prezentare orală](#).

Colecție de tulpini bacteriene izolate din Marea Neagră (93 tulpini)

Secvențe 16S ARNr bacterian depuse în GenBank

Întâlniri de lucru ale consorțiului (3) – 02.04.2021, 27.05.2021, 14.10.2021