

Raport științific Etapa 2/2022

Contract: 224/2021

Codul proiectului: ERANET-MARTERA-MOBILTOX-2

Proiectul Biosenzor portabil cuplat cu drona de prelevare pentru determinarea in situ a poluanților apelor marine - MOBILTOX

Obiectiv 2: *Selectarea setului de tulpini bacteriene pentru senzorul de toxicitate totală, obținerea biocatalizatorului și dezvoltarea electrozilor funcționalizați cu PSII din bacterii active la temperaturi scăzute*

Activitatea 2.1 Izolarea complexului enzimatic PSII din bacterii active la temperaturi scăzute

Consoțiul de microorganisme care s-a dezvoltat din probele de gheață colectate din Peștera Scărișoara pe mediu de cultură BG-11 lichid la 15 °C în condiții de iluminare și agitare constante (Figura 1A) s-a caracterizat printr-o densitate de 3.07×10^7 Unități Formatoare de Colonii (UFC)/mL, dintre care numărul coloniilor producătoare de pigmenți clorofilieni (fototrofe) a fost de 1.67×10^7 UFC/mL (Figura 1B).

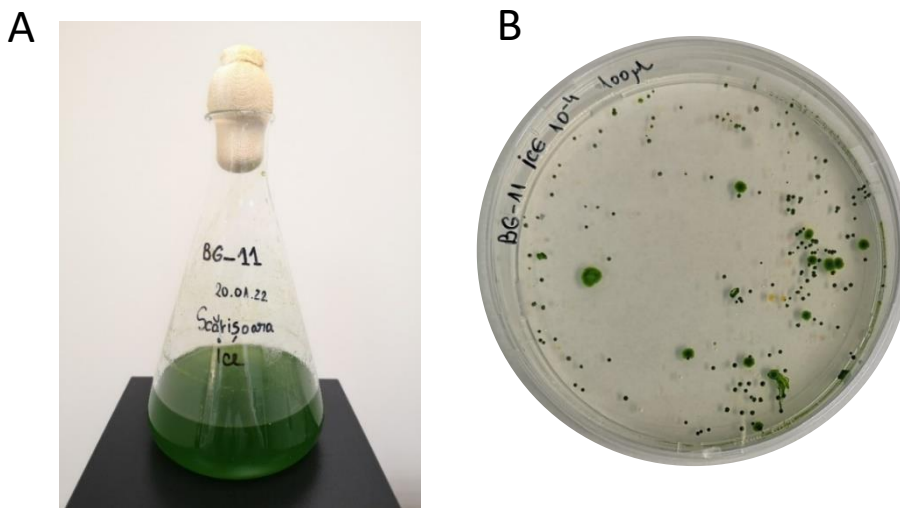


Figura 1. Consoțiul de microorganisme fototrofe dintr-o probă de gheață din Peștera Scărișoara. (A) Cultură în mediu BG-11 lichid după o perioadă de incubare de 50 de zile la 15 °C în condiții de iluminare și agitare constante; (B) Cultură pe mediu BG-11 solid, obținută prin inocularea a 100 μL din cultura lichidă (diluție 10^{-4}).

Coloniile izolate în culturi pure prin pasaje succesive pe mediu de cultură BG-11 solid au prezentat morfologii asemănătoare (formă rotundă, dimensiuni mici, ușor convexe, pigmentație verde), iar două dintre acestea (denumite LT1 și LT4) au fost recultivate pe mediu BG-11 lichid timp de 20 zile la 15 °C în condiții de iluminare și agitare constante în vederea obținerii de biomasă pentru izolarea ADN-ului genomic și identificarea taxonomică.

Biomasa a fost obținută prin centrifugarea a 10 mL cultură la 9000 g, timp de 10 min. Sedimentul celular astfel obținut a fost resuspendat într-o soluție care să favorizeze liza peretelui celular (20 mM Tris-HCl, pH 8; 2 mM EDTA; 1,2% Triton X-100; 20 mg/mL lizozim), transferat în tuburi prevăzute cu bile metalice de diferite dimensiuni (innuSPEED Lysis Tubes, Analytik Jena) și incubat pe termobloc cu agitare (900 rpm), la 37 °C, timp de 60 min. Succesiv, liza celulară a fost definitivată prin 10 cicluri de omogenizare într-un dispozitiv SpeedMill PLUS (Analytik Jena) timp de 2 min fiecare (1 min omogenizare și 1 min răcire). În continuare, pentru izolarea ADN-ului genomic a fost utilizat kitul *Quick-DNA Fungal/Bacterial* (Zymo Research), urmând instrucțiunile producătorului. Pentru verificarea concentrației și purității ADN-ului extras, s-a utilizat un spectrofotometru BioDrop UV/VIS.

Amplificarea prin PCR a genei ce codifică pentru ARNr 16S s-a realizat în volum final de 50 μ L, fiecare reacție conținând: 1x Taq Buffer-KCl, 0,2 mM dNTP Mix, 0,2 μ M primer 27F, 0,2 μ M primer 1518R, 1,5 mM MgCl₂, 1,25 U Taq Polimerază și 50-77 ng ADN genomic. Secvențele primerilor utilizați sunt: 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (27F) și 5'- AGGAGGTGATCCAGCCGC-3' (1518R) (Giovannoni et al., 1996). Reacția a constat într-o etapă de denaturare inițială a ADN-ului (3 min la 95°C), urmată de 30 de cicluri de amplificare (30 s denaturare la 95°C, 30 s aliniere primeri la 55°C, 90 s polimerizare la 72°C) și o etapă de polimerizare finală (5 min la 72°C).

Ampliconii obținuți în urma reacției PCR au fost vizualizați prin electroforeză în gel de agaroză 1% (g/v) și comparați cu un marker de greutate moleculară *O'GeneRuler 1kb* (Fermentas). Succesiv, ampliconii au fost purificați utilizând kitul *QIAquick PCR Purification* (Qiagen), conform protocolului furnizat de către producător.

Secvențierea ampliconilor a fost realizată de către firma Macrogen (Olanda). Cromatogramele rezultate au fost vizualizate și editate cu ajutorul programului CodonCode Aligner. Compararea secvențelor obținute cu cele ale speciilor din baza de date GenBank s-a făcut cu algoritmul BLASTN.

ADN-ul genomic izolat din tulpina LT1 a avut concentrația de 50 ng/μL și raportul $A_{260/280}$ 1.72, iar cel obținut din tulpina LT4 a avut concentrația de 77 ng/μL și raportul $A_{260/280}$ 1.75. Electroforeza în gel de agaroză a produșilor de amplificare PCR a confirmat integritatea ampliconilor ARNr cu dimensiuni de 1500 pb (Figura 2).

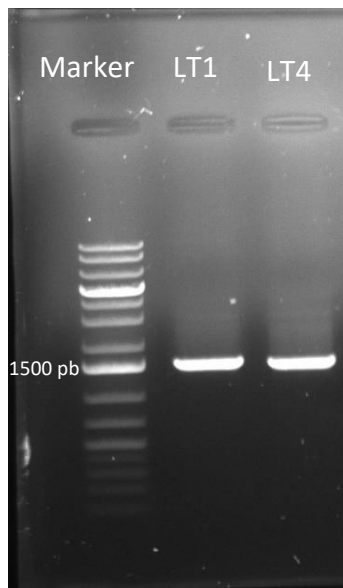


Figura 2. Electroforeza în gel de agaroză a ampliconilor ARNr 16S ai tulpinilor LT1 și LT4.

Secvențele ARNr 16S ale tulpinilor fototrofe LT1 și LT4 au prezentat grad ridicat de asemănare (Tabel 1) cu secvența omoloagă a cloroplastului microalgei *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 (cod de acces GenBank: HQ693844). Această specie a fost izolată din Antarctica și este adaptată la temperaturi scăzute (Blanc et al., 2012), fapt care sugerează că tulpinile înrudite LT1 și LT4 izolate dintr-un eșantion de gheață din Peștera Scărișoara prezintă de asemenea adaptări ale complexului proteic PS II care le permit să desfășoare procesul fotosintetic la temperaturi reduse. Această trăsătură poate fi utilă în crearea biosenzorului de detectarea a poluanților în mediul marin (scopul prezentului proiect), în care temperatura este în general sub valoarea de 20 °C.

Tabel 1. Identificarea taxonomică a tulpinilor fototrofe din Peștera Scărișoara

Cod tulpină	Dimensiune secvență ARNr 16S (pb)	Grad de asemănare cu secvențe omoloage din <i>GenBank</i> (%)	Cod acces <i>GenBank</i>
LT1	1371	99.85% <i>Coccomyxa subellipsoidea</i> C-169	OP090555
LT4	1319	100% <i>Coccomyxa subellipsoidea</i> C-169	OP090554

Tulpina fototrofă *Coccomyxa subellipsoidea* LT4 a fost cultivată în mediu BG-11 lichid, la 20 °C în condiții de iluminare și agitare constante pentru obținerea de biomasă din care să se extragă membranele tilacoidale și complexul proteic PS II. Cultivarea s-a realizat în baloane Erlenmeyer de 500 mL și 750 mL, fiecare conținând 250-375 mL mediu lichid (Figura 3). Incubarea a fost efectuată până când densitatea optică (DO) a culturii la 660 nm a fost de ~0,9 (aproximativ 14 zile), această valoare corespunzând, în general, sfârșitului fazei logaritmice de creștere a culturii.

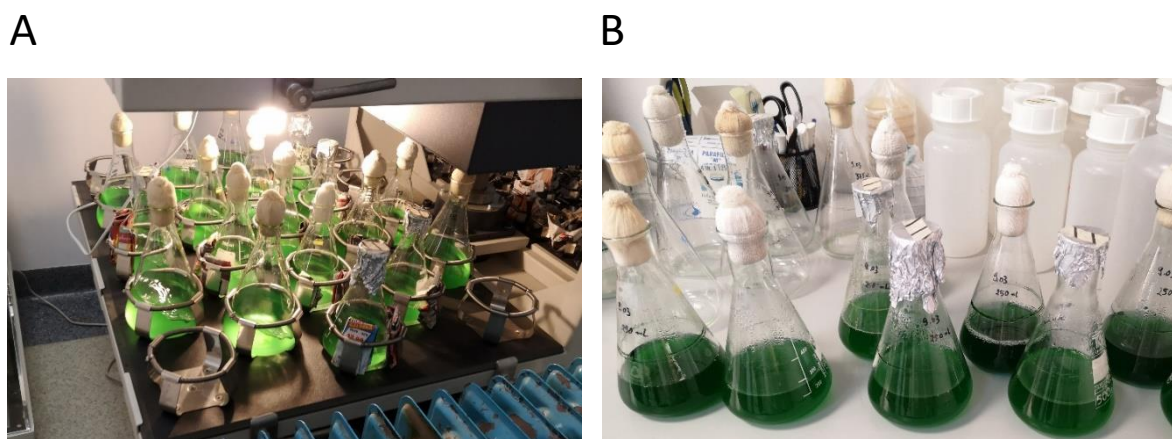


Figura 3. Cultivarea tulpinii *Coccomyxa subellipsoidea* LT4. Fotografii pe parcursul incubării (A) și la finalul perioadei de incubare (B).

Pentru obținerea biomasei celulare, cultura a fost centrifugată la 8000 g, timp de 10 min, la 4 °C (Figura 4). După sedimentarea celulelor, tuburile au fost învelite în folie de aluminiu pentru a împiedica ca lumina să inactiveze complexul PS II. De asemenea, toate etapele succesive au fost realizate pe gheață.

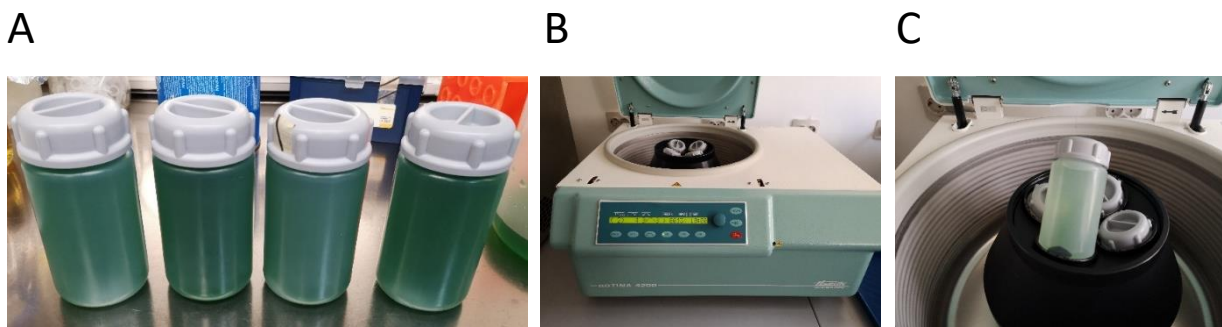


Figura 4. Obținerea de biomasă din cultura *Coccomyxa subellipsoidea* LT4. (A) Repartizarea culturii în flacoane de 250 mL; (B) Centrifugare; (C) biomasa celulară după etapa de centrifugare

Pentru a determina concentrația de clorofilă (Chl), s-au amestecat 10 µL de biomasă resuspendată în 25 mL Buffer A (compoziție prezentată mai jos), cu 90 µL apă distilată și 900 µL metanol 100%. Amestecul a fost vortexat și incubat la frigider timp de 15-20 min. Tuburile au fost centrifugate la viteză maximă (~17.000 g) timp de 5 min, iar DO a supernatantului a fost măsurată la $\lambda = 665,2$ nm, 652 nm și 750 nm, utilizând un spectrofotometru Specord 210 Plus (Analytik Jena). Din valorile DO_{665,2} și DO₆₅₂ s-a scăzut DO₇₅₀.

Pe baza valorilor obținute, concentrația de Chl a fost calculată conform formulei (Porra, 2002):

$$\text{Chl } (\mu\text{g/mL}) = (16,29 \times \text{DO}_{665,2} - 8,54 \times \text{DO}_{652}) \times 100$$

Obținerea membranelor tilacoidale s-a realizat conform protocolului descris de Vavilin (2011), cu unele modificări:

- Biomasa obținută în etapa anterioară se resuspendă în 25 mL Buffer A (50 mM MES-NaOH, pH 6; 10 mM MgCl₂; 5 mM CaCl₂; 25% (v/v) glicerol) pentru a se spăla de mediul de cultură;
- Celulele se sedimentează prin centrifugare la 8000 g, timp de 10 min, la 4 °C (Figura 5A).
- Biomasa celulară se resuspendă în 7 mL Buffer B (1 mM acid aminocaproic, 1 mM AEBSF, 1 mM benzamidină în Buffer A);
- Amestecul se repartizează în tuburi de 2 mL *innuSPEED Lysis tubes X* (Analytik Jena) prevăzute cu *beads*-uri cu diametre diferite (0.4-0.6; 1.4-1.6 mm);
- Pentru liza celulelor a fost utilizat omogenizatorul *SpeedMill PLUS* (Analytik Jena); au fost aplicate 20-25 de cicluri de omogenizare (30 secunde fiecare); între fiecare ciclu, probele au fost răcite pe gheață timp de 2-3 min (Figura 5B,C);
- Conținutul tuburilor de 2 mL se repartizează într-un flacon de 50 mL; se centrifughează la 1000 g, 5-6 min pentru îndepărtarea celulelor nelizate și a *beads*-urilor; se preia supernatantul;
- Membranele tilacoidale se sedimentează prin ultracentrifugare la 120.000 g, 20 min;
- Se resuspendă membranele tilacoidale în 50 mL Buffer C (10 mM CaCl₂ în Buffer A);
- Membranele tilacoidale se sedimentează prin ultracentrifugare la 120.000 g, 20 min;
- Se resuspendă membranele tilacoidale într-un volum minim de Buffer C;

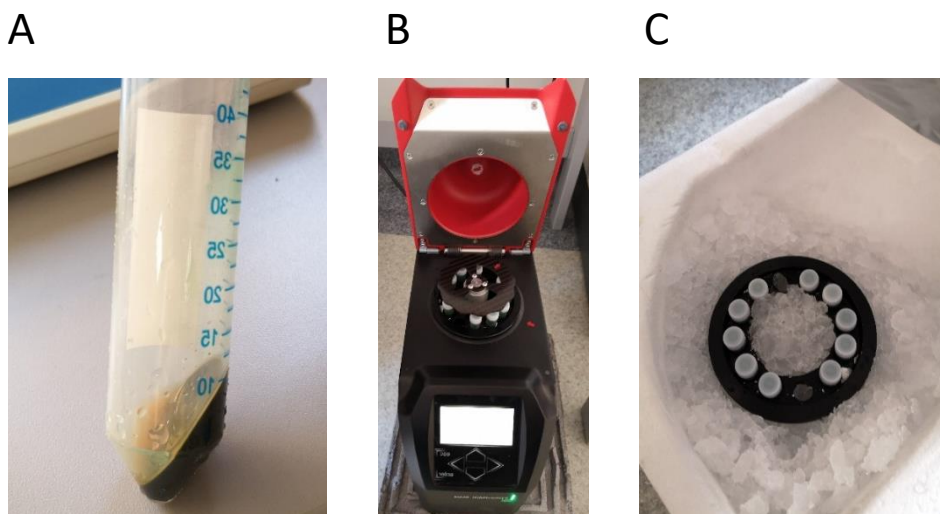


Figura 5. Liza celulelor în vederea izolării membranelor tilacoidale. **(A)** Biomasă celulară; **(B)** Liza celulelor în omogenizatorul *SpeedMill PLUS*; **(C)** Răcirea probelor pe gheață, între etapele de omogenizare.

Preparatele de membrane tilacoidale și de cultura microbiană proaspătă au fost transportate pe gheață la Centrul Internațional de Biodinamică București (ICB), unde partenerii din cadrul proiectului au testat activitatea fotosintetică, au imobilizat probele pe electrozi pentru crearea de biosenzori și au testat stabilitatea acestora în diferite condiții fizico-chimice.

Izolarea complexului PS II din membranele tilacoidale s-a efectuat conform următorului protocol:

- Se diluează membranele tilacoidale la concentrația de Chl = 1 mg/mL folosind Buffer C;
- Se adaugă 0,35% (g/v) Sulfobetaina-12 sau 1% (g/v) Beta-D-Maltosidă (detergenți) pentru extracția complexului PS II din membrane (Morschel și Schatz, 1987; Rogner et al., 1990);
- Se incubează 30 min, cu agitare, în întuneric, pe gheață;
- Se centrifughează: 140.000 g, 40 min și se preia supernatantul care conține complexul proteic PS II solubilizat;
- Se încarcă supernatantul pe gradient de sucroză (10-40%) și se centrifughează la 140.000 g, 16 h, la 4 °C; Soluția tampon în care se pregătește gradientul de sucroză conține: 20 mM MES, 10 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂, 0.5 M Manitol, pH 6.5 (Buffer X).

- Se preleva banda de culoare verde închis care conține complexul PS II (Figura 6);

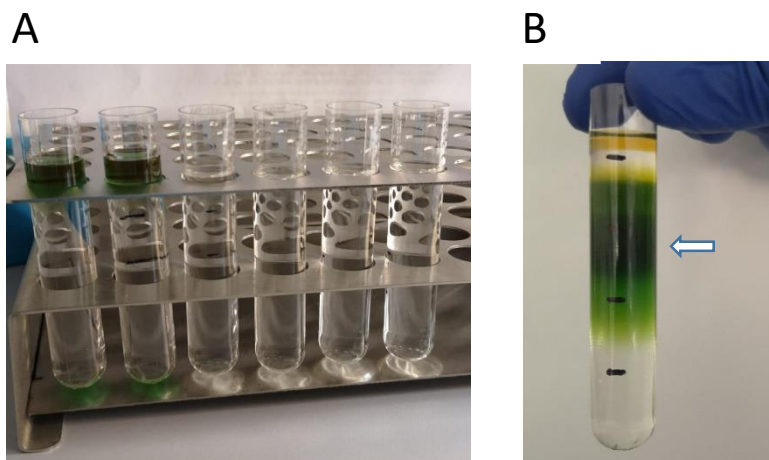


Figura 6. Izolarea complexului proteic PS II din membranele tilacoidale. (A) Încărcarea probelor pe gradientul de sucroză; (B) Probe migrate în gradientul de sucroză după ultracentrifugare. Săgeata indică banda care conține complexul proteic PS II.

- Se concentrează complexul PS II prin amestecarea probei cu un volum echivalent de PEG 8000 (concentrație 25%, g/v) în Buffer X; după o perioadă de incubare de 30 min pe gheață, se centrifughează 30 min la 40.000 g;
- Se aruncă supernatantul și se resuspendă sedimentul într-un volum minim de Buffer X;

Pentru izolarea membranelor tilacoidale și complexului proteic PS II din specia cianobacteriană *Synechococcus elongatus* PCC 7942, stabila în mediu salin prin sinteza de soluții compatibile (Liang et al., 2020), a fost urmat protocolul utilizat pentru specia *Coccomyxa subellipsoidea* LT4.

Fracțiunile PS II rezultate din ambele tulpini au fost caracterizate din punct de vedere al stabilității și transportate pe gheață la ICB, unde partenerii din cadrul proiectului au testat activitatea fotosintetică, au imobilizat probele pe electrozi pentru crearea de biosenzori și au testat stabilitatea acestora în diferite condiții fizico-chimice.

Activitatea 2.2 Caracterizarea stabilității fracțiilor PSII din bacterii active la temperaturi scăzute

Stabilitatea celulelor, membranelor tilacoidale și complexului proteic PS II rezultate din tulpinile fototrofe *Coccomyxa subellipsoidea* LT4 și *Synechococcus elongatus* PCC 7942 a fost testată în următoarele condiții:

- Biomasa celulară proaspătă, obținută prin centrifugarea culturilor care au atins sfârșitul fazei logaritmice de creștere (OD 660 nm ~0,9), a fost resuspendată în mediu de cultură BG-11 suplimentat cu 10% (v/v) glicerol sau 3% (v/v) DMSO și păstrat la -80 °C timp de 3, 7 și 30 zile.
- Membranele tilacoidale obținute din biomasă celulară proaspătă au fost resuspendate într-un tampon adecvat menținerii activității fotosintetice a complexului PS II (Vavilin, 2011) care a avut în compoziția sa 50 mM MES-NaOH, pH 6; 10 mM MgCl₂; 5 mM CaCl₂ și 25% (v/v) glicerol. Preparatele au fost păstrate la -80 °C timp de 7 și 30 zile.
- Complexul proteic PS II solubilizat din preparate tilacoidale proaspete sau congelate la -80 °C timp de ~30 zile a fost resuspendat în două tampoane. Primul a avut în compoziția sa 50 mM MES-NaOH, pH 6; 10 mM MgCl₂; 15 mM CaCl₂ și 25% (v/v) glicerol (Vavilin, 2011), iar cel de-al doilea a fost compus din 20 mM MES, pH 6.5; 10 mM MgCl₂; 20 mM CaCl₂ și 0.5 M Manitol (Rogner et al., 1990). Preparatele au fost păstrate la -80 °C timp de 7 și 30 zile.

De asemenea, a fost testată stabilitatea preparatelor PS II concentrate cu 25% PEG-8000 (Vavilin, 2011) prin comparație cu preparatele neconcentrate.

Activitatea fotosintetică a diferitelor preparate biologice (biomasă celulară, membrane tilacoidale și PS II) păstrate la -80 °C pentru diferite intervale de timp și în prezența compușilor stabilizatori (glicerol, DMSO, manitol) a fost testată de către partenerul ICB. Celulele proaspete, precum și preparatele subcelulare (tilacoide, PS II) obținute din biomasă celulară proaspătă au manifestat sensibilitate crescută la compușii chimici care inhibă procesul de fotosinteză (ex. diuron). Prin comparație, sensibilitatea preparatelor păstrate la -80 °C a scăzut semnificativ, având o stabilitate redusă atât în absența cât și în prezența de compuși chimici stabilizatori (rezultate prezentate de partenerul ICB). De asemenea, stabilitatea fracțiilor PS II concentrate în prezența PEG-8000 a fost redusă în comparație cu cea a complexului neconcentrat după purificare.

Rezultatele obținute în cadrul activității 2.2 au indicat faptul că preparatele subcelulare (tilacoide, PS II) utilizate în crearea biosenzorilor au prezentat activitate optimă în absența incubării la temperaturi scăzute (-20°C și -80°C), a diferiților aditivi (10-25% glicerol, 3% DMSO, 25% PEG-8000 sau 0,5 M manitol) atât a preparatelor cât și a biomei celulare inițiale.

Activitatea 2.3 Selectarea setului de tulpini bacteriene marine utilizate în senzorul de toxicitate totală

Pentru crearea biosenzorului de toxicitate totală de către partenerii de la Universitatea Nantes, a fost selectat un set de tulpini bacteriene heterotrofe, reprezentative pentru zona litorală a Mării Negre, cu caracteristici de creștere avantajoase (multiplicare rapidă, rezistență la salinitatea mediului marin și la temperaturi relativ reduse). În acest sens, s-a determinat profilul taxonomic al comunității bacteriene din zona Eforie Nord prin izolarea ADN-ului genomic total, secvențierea Illumina a ampliconilor ARNr 16S și analiza bioinformatică a datelor obținute. Protocolul de lucru a constat în următoarele etape:

- Probele de apă din Marea Neagră (zona Eforie Nord) colectate anterior au fost filtrate prin filtre MF-Millipore având diametrul porilor de 0.22 μ M (Merck, Darmstadt, Germania) utilizând un sistem de filtrare cu pompă de vacuum (Merck, Darmstadt, Germania);
- Din biomasa microbiană colectată pe filtre s-a extras ADN-ul genomic total utilizând un kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Hilden, Germany), conform metodei descrise de Djurhuus et al. (2017) care a inclus o etapă de liză a celulelor în tuburi innuSPEED Lysis Tubes X (Analytik Jena, Jena, Germany) utilizând omogenizatorul SpeedMill PLUS Cell (Analytik Jena, Jena, Germany);
- Amplificarea și secvențierea ampliconilor regiunii V3-V4 a genei ARNr 16S au fost efectuate de compania Macrogen (Coreea de Sud). În procesul de amplificare a fost utilizată perechea de primeri 341F/805R (Takahashi et al., 2014). Secvențierea s-a efectuat utilizând platforma Illumina MiSeq 300PE;
- Secvențele brute obținute au fost depuse în baza de date NCBI Sequence Read Archive, având codul de acces PRJNA875633.
- Prelucrarea bioinformatică a secvențelor s-a realizat utilizând pachetul dada2 v1.8 implementat în programul R v4.0.2. Primerii au fost înlăturați folosind *cutadapt* v4.1, iar secvențele au fost filtrate (`truncLen = c(230, 160)`, `maxN=0`, `maxEE=c(2,2)`, `truncQ=2`, `rm.phix=TRUE`, `compress=TRUE`, `multithread=TRUE`). Încadrarea filogenetică a secvențelor *Amplicon Sequence Variants* (ASV) s-a efectuat în baza de date Silva 16S rRNA v138. Analiza comunității bacteriene s-a efectuat în programul R utilizând pachetul *phyloseq*.

În urma secvențierii Illumina și prelucrării bioinformaticice a datelor au fost obținute 34.750 secvențe care au fost atribuite unui număr de 2345 ASV-uri unice. Identificarea filogenetică a acestora din urmă a evidențiat o comunitate bacteriană complexă, compusă din 185 de genuri încadrate în 46 de clase și 24 de filumuri (Figura 7).

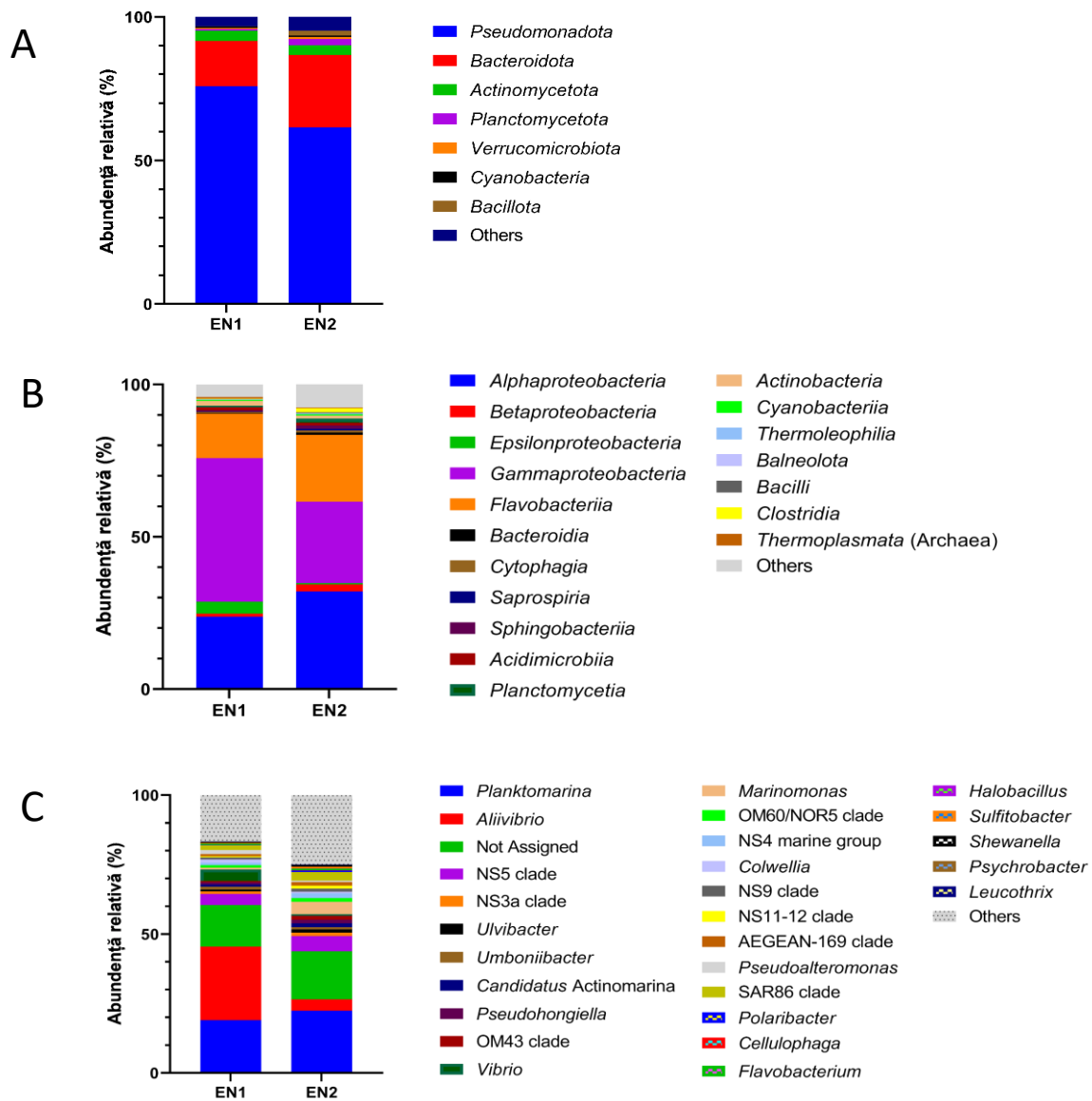


Figura 7. Structura comunității bacteriene din zona Eforie Nord a Mării Negre la nivel de filum (A), clasă (B) și gen (C).

Analiza structurii comunității bacteriene din probele de apă din Marea Neagră (Figura 7) a evidențiat dominanța taxonilor din filumul *Pseudomonadota* (abundență relativă 68,6%), urmat de

Bacteroidota (20,5%). La nivel de clasă, au fost predominanți taxonii Gammaproteobacteria (36,9%), Alphaproteobacteria (27,8%) și Flavobacteriia (18,3%), iar la nivel de gen au dominat taxonii *Planktomarina* (19-22%) și *Aliivibrio* (26%).

Luând în considerare structura comunității bacteriene din zona litorală a Mării Negre și caracteristicile de creștere (timp de dublare, temperatura de creștere, halotoleranță) ale tulpinilor bacteriene heterotrofe izolate din probele de apă colectate din locațiile Eforie Nord și Cap Aurora, au fost selectate 20 de tulpini bacteriene aparținând claselor Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria și Flavobacteriia (Tabel 2) pentru a fi testate de către partenerii de la Universitatea Nantes, Franța.

Tabel 2. Tulpini bacteriene marine selectate din colecția de laborator

Clasa	Tulpină selectată	Timp de dublare (h)	Interval toleranță săruri (% NaCl)	Interval temperaturi de creștere (°C)
Gammaproteobacteria	<i>Shewanella aestuarii</i> SWA EN P1.5	2,3	2,9-3,4	4-35
	<i>Marinomonas rhizomae</i> MA EN P2.10	1,31	3,4-10	4-40
	<i>Marinomonas</i> sp. MA EN P3.3	1,58	2,9-7	4-30
	<i>Marinomonas</i> sp. SWA CA P1.15	2,08	2,9-7	4-35
	<i>Pseudoalteromonas marina</i> SWA EN P1.7	3,28	2,9-10	4-35
	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SWA EN P2.3	3,52	2,9-10	4-40
	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SWA CA P1.16	1,96	2,9-7	4-30
	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SWA CA P1.4	2,68	2,9-10	4-55
	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. MA CA P1.8	2,89	0-10	4-40
	<i>Pseudoalteromonas arctica</i> MA CA P1.5	2,32	2,9-7	4-30
	<i>Marinobacter lipolyticus</i> SWA CA P3.5-2	1,76	3,4-10	4-50
	<i>Psychrobacter</i> sp. MA CA P3.1	2,1	0-10	4-40
Alpha	<i>Ahrensia kielensis</i> SWA CA P1.21	2,36	2,9-10	4-40
	<i>Litoreibacter</i> sp. MA CA P2.3	2,24	2,9-7	4-40
	<i>Roseobacter</i> sp. SWA CA P1.10	2,28	3,4-7	4-40
Flavobacteriia	<i>Flavobacterium</i> sp. SWA EN P2.6	1,7	2,9-3,4	4-30
	<i>Aquimarina intermedia</i> SWA EN P3.1	2,42	3,4-7	4-35
	<i>Cellulophaga baltica</i> SWA EN P1.16	3,3	3,4	4-35
	<i>Cellulophaga fucicola</i> SWA EN P1.9-1	3,1	3,4-7	4-35
	<i>Zobellia</i> sp. MA EN P3.4	2,77	2,9-7	4-40

(Alpha): Alphaproteobacteria

Activitatea 2.4 Producerea biocomponentului PSII activ la temperaturi scăzute pentru dezvoltarea electrozilor funcționalizați - fază preliminară

În cadrul Activității 2.1 au fost obținute mai multe batch-uri de celule proaspete, membrane tilacoidale și PS II atât din tulpina *Coccomyxa subellipsoidea* LT4 izolată dintr-o probă de gheață din Peștera Scărișoara, cât și din tulpina de colecție *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Unele dintre batch-urile obținute au fost detaliate în Tabelele 3 și 4.

În cazul tulpinii *Coccomyxa subellipsoidea* LT4, pornind de la un volum de cultură de 2,7 L, se obțin în general aproximativ 3 g de biomasă umedă din care se izolează membrane tilacoidale corespunzând concentrației de clorofilă (Chl) de 8,22 mg. Din acestea din urmă se izolează complexul PS II corespunzând concentrației de Chl de 0,86 mg (Tabel 3).

Tabel 3. Batch-uri de celule proaspete, membrane tilacoidale și PS II din tulpina *Coccomyxa subellipsoidea* LT4.

Nr.	Volum cultură (L)	Biomasă celulară (g)	Chl biomasă		Chl tilacoide		Chl PS II	
			mg/mL	total mg	mg/mL	total mg	mg/mL	total mg
1	2,76	3	-	-	1,37	8,22	0,54	0,864
2	1,2	1	-	-	0,083	0,249	0,01	0,07

(Chl): Clorofilă

În cazul tulpinii *Synechococcus elongatus* PCC 7942, pornind de la un volum de cultură de 1-5 L, se obțin în general 1,3-3,6 g de biomasă umedă din care se izolează membrane tilacoidale corespunzând concentrației de clorofilă (Chl) de 6-18,9 mg. Din acestea din urmă se izolează complexul PS II corespunzând concentrației de Chl de 0,13-0,34 mg (Tabel 4).

Tabel 4. Batch-uri de celule proaspete, membrane tilacoidale și PS II din tulpina de referință *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

Nr.	Volum cultură (L)	Biomasă celulară (g)	Chl biomasă		Chl tilacoide		Chl PS II	
			mg/mL	total mg	mg/mL	total mg	mg/mL	total mg
1	5	3,64	1,61	47,45	2,7	18,9	0,33	0,138
2	1	1,29	0,241	6,02	0,683	2,93	0,34	0,34
3	1	1,4	0,285	7,12	0,88	3,7	-	-
4	-	-	-	-	-	-	0,559	0,89

(Chl): Clorofilă

Cele trei tipuri de preparate (membrane tilacoidale si complex PSII purificat) obținute din cele doua specii microbiene fototrofe au fost utilizate in continuare de partenerul ICB pentru dezvoltarea de biosenzori pe baza inhibiției fotosintezei.

Activitatea 2.5 Diseminarea rezultatelor

Articole (2)

1. 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)
2. Bioprospecting for novel bacterial sources of hydrolytic enzymes in the Black Sea. Ruginescu R, Lavin P, Iancu L, Menabit S, Purcarea C. *Microorganisms*. *in evaluate* (Q2)

Conferințe (7)

1. **13th International Congress on Extremophiles**. Loutraki, Grecia, 18-22 septembrie 2022.
Ruginescu R, Iancu L, Vasilescu A, Purcarea C. *Diversity and hydrolytic potential of marine bacteria from the Black Sea*. [Poster](#)
2. **International Symposium BIODYNAMICS - A TRANSDISCIPLINARY APPROACH “The tale of cellular dynamics, from observation to application via knowledge”**. Bucuresti, 19-21 mai 2022
Banciu RA, Vasilescu A, Gaspar S, Ruginescu R, Purcarea C. *Thylakoids from cyanobacteria Synechococcus PCC 7942: AFM characterization and the effect of diuron on photosynthesis*. [Poster](#)
3. **Conferinta de Microbiologie “G. Zarnea”**. Bucuresti, 29 septembrie 2022.
Ruginescu R, Iancu L, Menabit S, Lavin P, Vasilescu A, Purcarea C. *Investigarea diversității și proprietăților funcționale ale comunităților bacteriene din zona litorală a Mării Negre*. [Prezentare orală](#).
4. **International Workshop “Enzyme biosensors: catalytic activity, inhibition and beyond”**. Bucuresti, 25 octombrie 2022
Ruginescu R, Lavin P, Iancu L, Menabit S, Vasilescu A, Purcarea C. *Screening and characterization of new marine bacteria for sea water pollution monitoring*. [Prezentare orală](#).
5. **International Workshop “Challenges of the 21st Century: Assessments, Approaches, Perspectives”**. Moeciu, Romania, 4-6 noiembrie 2022
Ruginescu R, Iancu L, Menabit S, Lavin P, Vasilescu A, Purcarea C. *Exploring the taxonomic diversity and physiological properties of bacterial communities in the littoral zone of the Black Sea*. [Poster](#)

6. New Trends on Sensing- Monitoring-Telediagnosis for Life Sciences, NT SMT-LS 2022. Braşov, Romania, 8-10 septembrie 2022

Ruginescu R., Vasilescu A., Banciu R.M., Gaspar S., Purcarea C. From whole cyanobacterial cells of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 to PSII: the effect of diuron on photosynthesis. [Poster](#)

7. 5th International Conference on Microbial Biotechnology. Chisinau, Republica Moldova, 12-13 octombrie 2022

Ruginescu R., Gomoiu I., Neagu S., Cojoc R., Lucaci I., Batrinescu-Moteau C., Enache M. Bioprospecting for novel bacterial sources of salt-tolerant enzymes with biotechnological applications. [Prezentare orală](#).

Produse (2)

1. Tulpină de microalgă *Coccomyxa subellipsoidea* izolată din gheața de peșteră din Ghețarul Scărișoara
2. Secvențe Illumina 16S ARNr bacterian depuse în GenBank (BioProject PRJNA875633)

Întâlniri de lucru ale consorțiului (4) – 07.04.2022, 28.09.2022, 27.10.2022, 18.11.2022

Rezultate asumate	Rezultate livrate	Comentarii
1. Fracții izolate de PSII din tulpini fototrofe provenind din medii reci și saline	Fractii de PSII din microalga <i>Coccomyxa subellipsoidea</i> izolată din gheața de peșteră din Scărișoara și din cianobacteria <i>Synechococcus elongatus</i> adaptata la stres salin	Realizat conform planului
2. Raport asupra stabilitatii complexelor PS II din bacterii active la temperaturi scăzute	Raport asupra stabilitatii complexelor PSII izolate din microalga <i>C. subellipsoidea</i> izolată din gheața de peșteră	Realizat conform planului
3. Set de tulpini bacteriene selectionat pentru platforma de analiza	Set de tulpini bacteriene selectionat pentru platforma de analiza	Realizat conform planului
4. 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> .	Realizat conform planului
5. Articol științific	2 articole ISI (Q2, Q4), 7 conferințe, 2 produse (set secvențe nucleotidice, tulpina microbiana fototrofa)	Livrabile suplimentare

Referințe

1. Giovannoni SJ, Rappé MS, Vergin KL, Adair NL. 16S rRNA genes reveal stratified open ocean bacterioplankton populations related to the Green Non-Sulfur bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jul 23;93(15):7979-84. doi: 10.1073/pnas.93.
2. Blanc G, Agarkova I, Grimwood J, Kuo A, Brueggeman A, Dunigan DD, Gurnon J, Ladunga I, Lindquist E, Lucas S, Pangilinan J, Pröschold T, Salamov A, Schmutz J, Weeks D, Yamada T, Lomsadze A, Borodovsky M, Claverie JM, Grigoriev IV, Van Etten JL. The genome of the polar eukaryotic microalga *Coccomyxa subellipsoidea* reveals traits of cold adaptation. *Genome Biol*. 2012 May 25;13(5):R39. doi: 10.1186/gb-2012-13-5-r39.
3. Porra RJ. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynth Res*. 2002;73(1-3):149-56. doi: 10.1023/A:1020470224740.
4. Vavilin DV. Methods for the isolation of functional photosystem II core particles from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Methods Mol Biol*. 2011;684:29-40. doi: 10.1007/978-1-60761-925-3_4.
5. Mörschel E, Schatz GH. Correlation of photosystem-II complexes with exoplasmatic freeze-fracture particles of thylakoids of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Planta*. 1987 Oct;172(2):145-54. doi: 10.1007/BF00394582.
6. Rögner M, Nixon PJ, Diner BA. Purification and characterization of photosystem I and photosystem II core complexes from wild-type and phycocyanin-deficient strains of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *J Biol Chem*. 1990 Apr 15;265(11):6189-96.
7. Liang Y, Zhang M, Wang M, Zhang W, Qiao C, Luo Q, Lu X. Freshwater Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 Adapts to an Environment with Salt Stress via Ion-Induced Enzymatic Balance of Compatible Solutes. *Appl Environ Microbiol*. 2020 Mar 18;86(7):e02904-19. doi: 10.1128/AEM.02904-19.
8. Djurhuus, A.; Port, J.; Closek, C.J.; Yamahara, K.M.; Romero-Maraccini, O.; Walz, K.R.; Goldsmith, D.B.; Michisaki, R.; Breitbart, M.; Boehm, A.B.; Chavez, F.P. Evaluation of Filtration and DNA Extraction Methods for Environmental DNA Biodiversity Assessments across Multiple Trophic Levels. *Front. Mar. Sci*. 2017, 4, 314. doi: 10.3389/fmars.2017.00314
9. Takahashi, S.; Tomita, J.; Nishioka, K.; Hisada, T.; Nishijima, M. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PLoS ONE* 2014, 9, e105592. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105592>

Rezumat ERANET-MARTERA-MOBILTOX-2, Etapa 2/2022

În cadrul etapei 2/2022 a proiectului ERANET-MARTERA-MOBILTOX-2 s-a urmărit izolarea complexului fotosintetic PSII din tulpini de microorganisme fototrofe active la temperaturi scăzute. În acest sens, s-a izolat o tulpină microbieniă fototrofă din gheața din Peștera Scărișoara, care în urma identificării taxonomice prin secvențierea genei ARNr 16S a indicat un grad ridicat de similaritate cu tulpina de microalgă antarctică *Coccomyxa subellipsoidea* C-169. Această nouă tulpină, precum și tulpina cianobacteriană de colecție *Synechococcus elongatus* PCC 7942, au fost utilizate pentru izolarea membranelor tilacoidale și a complexului fotosintetic PSII, preparate care au fost livrate partenerilor de la Centrul Internațional de Biodinamică București (ICB) pentru dezvoltarea de biosenzori bazați pe inhibarea procesului de fotosinteză. Testele de stabilitate ale fracțiilor PSII au indicat o rezistență scăzută la congelare, concentrare și la prezența diferiților compusi, cu preferință pentru preparatele purificate netratate suplimentar.

În vederea selectării unui set de tulpini bacteriene reprezentative pentru realizarea senzorului microbial s-a determinat structura comunității bacteriene din apele litorale ale Marii Negre, zona Eforie Nord, prin secvențiere Illumina ARNr 16S. Rezultatele obținute au evidențiat o comunitate bacteriană complexă, compusă din 185 de genuri încadrate în 46 de clase (în principal Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria și Flavobacteriia) și 24 de filumuri. Pe baza reprezentativității taxonomice obținute și a caracteristicilor funcționale ale tulpinilor bacteriene izolate din acest habitat (Etapa 1/2021) au fost selectate 20 de tulpini bacteriene pentru a fi testate de către partenerul francez (Universitatea Nantes).

Activitățile desfășurate în cadrul acestei etapei au condus la publicarea a 2 articole ISI, participarea la 7 conferințe științifice și obținerea unei noi tulpini microbiene fototrofe izolate din gheața din Peștera Scărișoara și a unui set de secvențe nucleotidice depuse în GenBank. În concluzie, livrabilele prevăzute pentru această etapă au fost realizate în integralitate.

Director de Proiect
Dr. Cristina Purcărea

24.11.2022

