

REZUMAT

al tezei de doctorat intitulată:

CERCETĂRI PRIVIND POTENȚIALUL BIODEGRADATIV AL UNOR MICROORGANISME ÎN BIOREMEDIERE

Elaborată de drd. Andreea DOBRE sub îndrumarea științifică a Prof. Univ.

Dr. Petruța Călina CORNEA

Cuvinte cheie: *Bacillus*, *bioremediere*, *fitaze*, *plante*, *zinc*

Poluarea mediului înconjurător a atins cote alarmante în ultimul secol din cauza dezvoltării antropice agresive față de ecosistemele pe care le populează. Exploatarea abuzivă și irațională a resurselor naturale, dezvoltarea de practici industriale nesustenabile și lipsa axării pe cercetarea și implementarea unor mijloace durabile de manipulare a resurselor Terrei au dus la crearea unui viitor aflat sub auspicii nefaste. Pentru reducerea poluării mediului înconjurător s-au dezvoltat practici de bioremediere care presupun utilizarea organismelor capabile să solubilizeze, fixeze, asimileze, etc. anumiți produși toxici. Biotehnologiile au adus un beneficiu major practicilor de bioremediere prin corelarea științelor vieții cu tehnologia, astfel încât să rezulte produse și servicii specifice și optime bioremedierii siturilor poluate. Principalii agenți utilizați în bioremediere sunt microorganismele, care la rândul lor pot fi supuse practicilor biotehnologice în vederea potențării caracteristicilor utilizabile în depoluarea siturilor contaminate.

Pornind de la informațiile din literatura de specialitate, scopul lucrării prezente este studiul unor microorganisme implicate în bioremedierea solurilor poluate cu compuși organici și anorganici ai fosforului și zincului care totodată sunt capabile să potențeze/protejeze dezvoltarea plantelor.

Experimentele derulate pe parcursul celor doi ani de studiu s-au realizat în laboratoarele Facultății de Biotehnologii a USAMV din București și în Institutul de Cercetare – Dezvoltare pentru Științe Biologice București. Teza de doctorat intitulată “CERCETĂRI PRIVIND POTENȚIALUL BIODEGRADATIV AL UNOR MICROORGANISME ÎN BIOREMEDIERE” cuprinde 7 capitole, desfășurate pe un număr de 137 pagini cuprinzând 15 tabele, 51 figuri și 156 de referințe bibliografice.

Primul capitol, UTILIZAREA BIOTEHNOLOGIILOR ÎN PROCESELE DE BIOREMEDIERE a vizat studiul literaturii de specialitate privind implicarea biotehnologiilor în bioremedierea solurilor și apei prin utilizarea microorganismelor, făcându-se referire la beneficiile rizoremedierii, ca alternativă la tehnologiile clasice de remediere a siturilor poluate.

Al doilea capitol, BIOREMEDIEREA SOLURILOR POLUATE CU FOSFOR, a descris stadiul actual al cercetării privind subiectul tezei și anume impactul poluării cu fosfor și tehnicile de bioremediere specifice dezvoltate până în prezent. În plus au fost sintetizate problemele existente în ceea ce privește acest aspect. FITAZELE, al treilea capitol al lucrării prezente, descrie principalele enzime implicate în solubilizarea compușilor organici ai fosforului, utilizate ca agenți de bioremediere. Este realizat un studiu amplu în ceea ce privește clasificarea, sursele de fitaze, condițiile și modul de acțiune al acestora. Cel de-al patrulea capitol, BIOREMEDIEREA SITURILOR POLUATE CU METALE GRELE dezvoltă impactul metalelor grele asupra mediului înconjurător, axându-se specific pe poluarea cu compușii zincului. Totodată vizează și implicarea microorganismelor în bioremedierea acestor siturilor contaminate cu astfel de poluanți. Capitolul cinci descrie importanța lucrării de cercetare prezente, precum și scopul, obiectivele și aspectul inovator al lucrării. Caracterul inovator al tezei constă în viziunea globală abordată în ceea ce privește studiul microorganismelor utilizabile în bioremediere. S-a plecat de la ideea că microorganismele care se dezvoltă în condiții naturale de stres si-au dezvoltat deja un sistem de rezistență. Astfel că prelevarea de sol din diferite zone eventual poluate cu fosfor și alți agenți poluatori precum metalele grele, este un demers logic în izolarea de microorganisme capabile să bioremedieze situri poluate. Pe lângă acest aspect, a fost studiată, desigur, și abilitatea de a potența dezvoltarea plantelor de cultură. Soluri cu depozite de reziduuri produse de suine, rizosfera unor plante de cultură, soluri poluate cu hidrocarburi petroliere sau terenuri agricole, compostul au fost sursele de izolare alese în vederea identificării microorganismelor indigene de interes. Plecând de la aceste afirmații, scopul tezei de doctorat a fost studiul unor microorganisme izolate din surse variate care au capacitatea de a bioremedia solurile poluate de compuși organici și anorganici de fosfor și zinc și care totodată au capacitatea de a potența/proteja dezvoltarea plantelor.

Obiectivele propuse în cadrul tezei se referă la:

- Izolarea din diverse surse naturale a unor microorganisme capabile de solubilizarea fosforului și/sau a zincului din compuși insolubili;
- Caracterizarea noilor izolate microbiene în privința particularităților de biosolubilizare și examinarea unor mecanisme implicate în acest proces (biosinteza de fitaze, producerea de acizi organici);
- Evaluarea activității antifungice a unor izolate bacteriene cu proprietăți de solubilizare a fosforului, utilizabile drept agenți de biocontrol pentru diverși fungi fitopatogeni (*Pythium debaryanum*, *Phytophthora infestans* etc);
- Cuantificarea activității fitazice a izolatelor microbiene selectate și optimizarea parametrilor cinetici.

Pentru atingerea acestor obiective, în capitolul șase, MATERIALE ȘI METODE, au fost detaliate materialele și metodele utilizate în demersul cercetării prezente. În capitolul șapte au fost revelate REZULTATELE ȘI DISCUȚIILE aferente scopului și obiectivelor lucrării de cercetare, punându-se accentul pe corelarea între sursele de izolare, speciile identificate și proprietățile acestora utile atât în bioremedierea solurilor contaminate cu compușii organici și anorganici ai fosforului, precum și ai compușilor anorganici ai zincului. Pentru atingerea primului obiectiv s-a recurs la selectarea microorganismelor în funcție de sursa de izolare. Astfel, în cadrul acestei lucrări au fost utilizate microorganisme identificate în prealabil, care fac parte din Colecția de Microorganisme a Catedrei de Genetică a Facultății de Biotehnologii, USAMVB. La această serie de microorganisme a fost adăugat un număr de bacterii izolate, în cadrul desășurării tezei, de la nivelul solurilor cu depozite de gunoi de suine amintite mai devreme. Următorul pas a constat în identificarea abilității microorganismelor de a solubiliza atât acidul fitic, cât și a formelor anorganice ale fosforului. Astfel au fost selectate o serie de bacterii care fie prezintă ambele proprietăți, fie doar una dintre ele. Numeroase medii specifice, dintre care sunt amintite PSM, NBRIY, NBRIP, PVK, etc au fost utilizate în cadrul acestei etape. Ulterior s-a pus accentul pe capacitatea de bacteriilor de a secreta acizi organici implicați fie în solubilizarea fosforului anorganic, fie în scăderea pH-ului mediului selectiv astfel încât să permită activarea enzimelor sintetizate de aceste microorganisme. Este de menționat faptul că majoritatea microorganismelor studiate în cadrul acestei teze fac parte din genul *Bacillus* care este recunoscut pentru capacitatea sa de a sintetiza fitaze precum și pentru abilitatea de a potența dezvoltarea plantelor. După această etapă au fost identificate bacteriile capabile să inhibe dezvoltarea unor microorganisme care sunt cunoscuți drept fitopatogeni extrem de agresivi. Aceștia sunt *Pythium debaryanum*, *Phytophthora infestans*. Totodată a fost identificată capacitatea microorganismelor de a sintetiza proteaze și de a solubiliza oxidul de zinc. Pentru oxidul de zinc a fost utilizată o serie medii specifice care au inclus coloranți direcționați pe sublinierea haloului specific. În studiul identificării microorganismelor capabile să sintetizeze fitaze au fost incluse și bacterii lactice acide datorită controversei legate de această abilitate. În urma studiilor efectuate au fost identificate bacterii aparținând genului *Lactobacillus* care au prezentat o ridicată activitate enzimatică, permițând consolidarea teoriei conform căreia LAB pot degrada acidul fitic și sărurile acestuia. În vederea determinării activității enzimactice a bacteriilor au fost selectate inițial microorganisme izolate din solul cu depozite de gunoi de suine. În final, s-a efectuat un studiu comparativ între 5 surse de izolare, 2 specii de *Bacillus*, *B. amyloliquefaciens* și *B. subtilis* și 2 bacterii izolate din compost care aparțin genului *Bacillus*. Pentru determinarea activității catalitice a fost utilizată metoda standard și anume molibdate-blue method, însă în urma unui studiu amplu al literaturii de specialitate, au fost compilate opt

variante ale acesteia cu privire la identificarea parametrilor optimi de reacție. Condițiile de reacție luate în studiu au fost: pH neutru, 37°C, 30 min, pH neutru 50°C, 20 min, pH acid (5.5), 37°C, 30 min, pH acid (5.5), 50°C, 20 min. Toate aceste patru variante au fost efectuate în prezența sau absența inductorului.

În final, lucrarea de cercetare descrie CONCLUZIILE GENERALE edificate în urma demersului de cercetare aferent. Punându-se inițial accentul pe sursa de izolare ca determinant al capacității hidrolitice a fosforului, s-a demonstrat că izolatele bacteriene care au avut ca sursă soluri poluate cu gunoi de suine au prezentat această proprietate. Totodată, evaluarea unor tulpini izolate din alte surse de izolare (rizosfera unor plante de cultură, soluri puternic poluate cu hidrocarburi) au demonstrat capacitatea acestora de a solubiliza atât compușii fosforului organici, cât și cei anorganici. Cele mai notabile rezultate au fost obținute de 7.1, BW, BIR, BPA, OS15, OS17, B3, B4, B5, B6, toate aparținând genului *Bacillus* și An (*Aspergillus niger*). În ceea ce privește caracterizarea acestor tulpini, capacitatea acestora de a solubiliza fosforul anorganic B3, B4, OS15, BPA, BIR, BW, OS17, ATCC 6633, 35 și 10 au dat cele mai bune rezultate, în urma experimentelor pe PVK și NBRIP. Teoria conform căreia acizii organici sunt implicați în solubilizarea fosforului anorganic a putut fi validată prin utilizarea coloranților indicator de pH. Totodată, în urma analizei pe mediul PSM a fost evidențiată capacitatea tulpinilor BIR, BPA, ICPC, OS15, OS17, BW, 10 și 35 de a hidroliza enzimatic fosforul organic. Firește, această observație nu exclude posibilitatea hidrolizei fosforului de către fosfatazele potențial sintetizate de acestea, implicarea acizilor organici în acest proces fiind redusă. Însă producerea de acizi organici poate fi implicată într-o altă caracteristică a tulpinilor bacteriene și anume solubilizarea zincului anorganic, utilizarea indicatorilor de pH a ducând la evidențierea unor halouri clare în cazul tulpinilor BPA, B4, ATCC 6633, 32 și 35. De asemenea, majoritatea tulpinilor implicate în studiu au demonstrat capacitatea de a sintetiza proteaze. Tulpinile caracterizate în cadrul acestui demers științific au fost testate în ceea ce privește utilitatea acestora drept agenți de biocontrol împotriva unor fitopatogeni. Tulpinile B3, B4, 9, 10, 12, 30, 32 și 35 au avut efect inhibitor clar față de *Phytophthora infestans*, prin metoda culturii duale în condiții *in vitro*. Aceste bacterii au avut de asemenea efect și în condiții controlate la nivel de cameră climatică, drept tratament de prevenție aplicat pe tomate. Față de *P. debaryanum*, filtratele de cultură provenite de la tulpinile 9, 10 și B3 au evidențiat o ușoară reducere a diametrului culturii fungice cu 24%, 12%, respectiv 10%. Efecte inhibitoare mai clare față de acest fitopatogen au fost evidențiate în cazul tulpinilor bacteriene notate B5, B6, BPA și BW (prin confruntare directă). În ceea ce privește cuantificarea activității enzimatice și optimizarea parametrilor de reacție, a fost testată o serie de tulpini bacteriene studiate în cadrul tezei, la care au fost adăugate tulpini bacteriene lactice. Dintre patru tulpini bacteriene lactice, tulpina

Lactobacillus plantarum Lpl a înregistrat activitatea enzimatică cea mai ridicată. Acest fapt determină aplicabilitatea acestora în ceea ce privește reducerea acidului fitic sau a sărurilor acestuia din produsele alimentare de natură vegetală, acesta fiind cunoscut drept agent antinutritiv. Dintre izolatele din soluri cu depozite de dejecții de suine, tulpinile 10, 9, 35 și 12 au înregistrat cele mai mare valori ale activității enzimactice. În urma studiilor de optimizare a parametrilor cinetici ai fitazelor s-au determinat valorile optime de pH, temperatură, timp de reacție și prezență a inductorilor, demonstrându-se variația atât în funcție de specie, cât și intraspecific. Astfel, cea mai înaltă activitate enzimatică a fost evidențiată de tulpina *B. subtilis* ATCC 6633, urmată de *Bacillus* sp.B3, apoi de *B. subtilis* 10 și *B. amyloliquefaciens* BW. Ultimele poziții în ceea ce privește activitatea fitazică au fost ocupate de tulpina *Bacillus* sp. B4 și *B.amyloliquefaciens* OS15.

Rezultatele obținute pot contribui la dezvoltarea cunoașterii în domeniu și pot sta la baza realizării unor tehnologii eficiente de bioremediere, bazate pe utilizarea unor microorganisme naturale, cu proprietăți benefice variate. Astfel că în urma studiului bacteriilor indigene în cadrul acestei lucrări de cercetare, s-a ajuns la concluzia că au un potențial impact benefic asupra mediului înconjurător, sectorului financiar și sănătății omului, animalelor și plantelor.

Rezultatele obținute în urma demersului științific din cadrul prezentei teze de doctorat au fost valorificate printr-o publicație ISI pe subiectul tezei și două în domeniu, 3 articole BDI și încă trei în domeniu, plus participarea la numeroase conferințe științifice.