

RÉSUMÉ

de la thèse de doctorat intitulée:

SÉLECTION ET CARACTÉRISATION DE SOUCHES MICROBIENNES PRODUISANT DES MÉTABOLITES UTILES DANS LES PROCESSUS BIOTECHNOLOGIQUES

Doctorat: **MICU Georgiana**

Coordinateur scientifique: **Prof. Univ. Dr. CORNEA Petruța Călina**

MOTS-CLÉS: L-asparaginase, protection des plantes, activité antifongique, mycotoxines, biofilm

La plupart des microorganismes jouent un rôle important dans l'environnement, contribuant à diverses industries telles que l'alimentation, la médecine et l'agriculture. De nombreux microorganismes sont capables de produire des composés biologiquement actifs précieux, notamment des enzymes. Les enzymes sont des structures protéiques présentes dans le corps humain et animal, dans les plantes et dans les microorganismes. Ces composés peuvent catalyser des réactions fondamentales pour les fonctions métaboliques normales.

La L-asparaginase joue un rôle important en médecine. Elle est considérée comme l'une des enzymes les plus étudiées, avec un accent actuel sur de nouvelles sources capables de la produire sous forme la plus pure possible. Les recherches théoriques sont exposées dans deux chapitres traitant des sujets liés à la L-asparaginase et à l'obtention de composés biologiquement actifs importants en agriculture.

Dans le premier chapitre, ce travail se concentre sur les aspects théoriques et pratiques de la L-asparaginase. Cette enzyme est particulièrement importante pour le domaine médical, car elle aide à traiter diverses maladies néoplasiques et est utilisée avec succès dans les régimes de chimiothérapie. Son utilité est très élevée et la demande mondiale augmente continuellement. En pratique, la L-asparaginase est produite par la bactérie *Escherichia coli*, mais un inconvénient majeur de cette méthode est que l'enzyme produite entraîne à la fois des effets bénéfiques et des effets secondaires graves. Ces réactions indésirables sont dues au fait que l'enzyme n'est pas produite sous une forme pure, entraînant une contamination par d'autres enzymes similaires.

En plus de son utilité en médecine, la L-asparaginase est également utilisée dans l'industrie alimentaire. Cette enzyme aide à réduire les composés de Maillard formés dans les produits alimentaires riches en amidon. Elle réduit l'acrylamide, un composé toxique qui se forme dans les aliments riches en glucides cuits à haute température. L'importance de l'enzyme a été soulignée dans divers produits alimentaires traités thermiquement. Dans certains essais, l'enzyme a maintenu son activité après plusieurs

cycles d'utilisation, démontrant son potentiel pour des applications industrielles à grande échelle.

Les recherches théoriques soulignent que la L-asparaginase est principalement produite par des bactéries, mais aussi par certaines plantes. Cette enzyme, isolée de différentes sources, possède des paramètres physico-chimiques et cinétiques spécifiques, la plus proche de la forme sécrétée par *Escherichia coli* étant sélectionnée. Ces études théoriques renforcent l'idée que les sources microbiennes présentent des caractéristiques prometteuses pour obtenir une enzyme plus pure.

Le deuxième chapitre de la recherche théorique aborde l'importance de différents microorganismes produisant la L-asparaginase en agriculture. Ce domaine fait face à plusieurs problèmes principalement dus au changement climatique. L'un des aspects importants aidant l'agriculture est l'obtention de composés antimicrobiens grâce aux microorganismes. Ces composés visent à réduire ou même à éliminer les contaminants des plantes.

Une série de composés étudiés ont démontré au fil du temps une forte activité antifongique et antibactérienne, suggérant leur potentiel d'utilisation dans la lutte biologique contre les maladies des plantes. Ces activités sont cruciales pour développer des alternatives écologiques aux pesticides chimiques traditionnels. Les contributions personnelles sont exposées dans deux chapitres basés sur tous les résultats de la recherche théorique. Les objectifs de recherche du premier chapitre comprenaient : 1) Isoler de nouveaux microorganismes capables de produire de la L-asparaginase sans autres composés contaminants; 2) Évaluer la capacité des microorganismes isolés à produire l'enzyme d'intérêt en utilisant des méthodes qualitatives et quantitatives.

La première partie du travail fournit une base pour comprendre le mode d'action, les méthodes d'obtention et l'importance de la L-asparaginase, tandis que la partie pratique valide le potentiel des microorganismes testés à produire cette enzyme. Les objectifs spécifiques comprenaient l'évaluation des possibilités d'obtenir de la L-asparaginase en la plus grande quantité possible à partir de nouvelles sources biologiques sans contenir d'autres enzymes contaminantes. Les microorganismes testés provenaient à la fois de la collection de la Faculté de Biotechnologie et de nouveaux isolats de sol. Ils ont été cultivés sur des milieux de culture spécifiques pour évaluer leur potentiel à produire l'enzyme d'intérêt. Les expériences ont été complétées par une quantification de la production d'enzyme utilisant une méthode spectrophotométrique.

Lors des expériences pratiques du troisième chapitre, des bactéries du genre *Streptomyces*, des rhizobactéries, des bactéries endophytes, des levures et des fongueuses ont été testés pour obtenir de la L-asparaginase sans glutaminase, uréase ou NaNO_3 . La capacité des microorganismes sélectionnés à produire l'enzyme d'intérêt a été évaluée à l'aide de méthodes rapides qualitatives et quantitatives. Ces méthodes ont permis une évaluation plus détaillée du potentiel de production de chaque souche microbienne. Les résultats ont été standardisés en suivant la quantification enzymatique dynamique sur plusieurs jours, montrant que la plus grande quantité enzymatique a été produite par les *Streptomyces* (2 souches), *Bacillus* (4 souches), bactéries endophytes (2 souches) et nouveaux isolats de sol GM1, GM3 et GM18.

La deuxième partie de la recherche a démarré à partir des résultats du premier chapitre pratique, se concentrant sur l'évaluation des applications potentielles des souches microbiennes produisant des enzymes biomédicales dans la protection des plantes. Cela a conduit à deux objectifs secondaires: 1) Déterminer la capacité des souches bactériennes sélectionnées à produire des métabolites inhibant le développement des phytopathogènes; 2) Tester les propriétés de stimulation de la croissance et du développement des plantes des souches sélectionnées.

En plus de produire de la L-asparaginase, le quatrième chapitre a évalué les souches sélectionnées pour leur capacité à produire des composés inhibant le développement des phytopathogènes et aidant à la stimulation de la croissance des plantes. Ces études ouvrent la voie à l'utilisation de ces microorganismes en agriculture, contribuant à des cultures plus saines et plus productives.

Les souches bactériennes sélectionnées ont été testées pour leur activité antimicrobienne contre les pathogènes des plantes courants. Les résultats ont montré que certaines souches, en particulier celles du genre *Bacillus*, présentaient une activité antimicrobienne significative. Ces souches ont inhibé la croissance de pathogènes tels que *Fusarium graminearum*, un pathogène du blé, en produisant des composés biologiquement actifs avec des effets antifongiques. *Bacillus* GM3 a montré une forte activité antifongique, inhibant la croissance de tous les champignons testés, avec des effets durant toute la période d'incubation.

L'activité antifongique des microorganismes est attribuée à leurs propriétés naturelles permettant la production de divers composés. Ces composés agissent sur les champignons par différents mécanismes, y compris la compétition pour les nutriments, l'antibiose (production de biosurfactants et/ou d'antibiotiques) et la synthèse d'enzymes hydrolytiques. De plus, certains microorganismes peuvent stimuler la croissance des plantes en synthétisant des phytohormones, en produisant des sidérophores, en fixant l'azote, en solubilisant le phosphate et en produisant des métabolites secondaires aux effets complexes. L'évaluation génétique de la capacité de la souche bactérienne GM3 à produire des biosurfactants a montré qu'elle possède les gènes *ituD*, *fen*, *bmyA* et *ituA* responsables de la synthèse de composés agricoles précieux.

Déterminer la capacité des souches bactériennes à produire des métabolites antifongiques a suggéré que les souches sélectionnées pouvaient décomposer les parois cellulaires fongiques en sécrétant des composés hydrolytiques (protéases, chitinases, cellulases), avec une bonne production observée chez les souches GM3, GM12 et GM21. De plus, l'impact de la souche bactérienne GM3 sur la production de mycotoxines a été étudié, révélant qu'elle réduit significativement les niveaux de zéaralénone et d'ochratoxine.

Le quatrième chapitre s'est également concentré sur la formation de biofilm par les bactéries sélectionnées, soulignant leur capacité à coloniser les racines des plantes et à les protéger contre le stress. Les expériences ont montré que les bactéries testées pouvaient former des biofilms solides, renforçant leur capacité de colonisation et de protection des plantes. Cette capacité est cruciale pour l'application biotechnologique

de ces bactéries en agriculture, assurant une symbiose efficace et durable entre bactéries et plantes.

Les souches bactériennes testées ont non seulement contribué à la protection des plantes, mais aussi amélioré les taux de germination et de développement des plantes. Un autre aspect important de la recherche était d'évaluer l'impact du traitement bactérien sur la germination et le développement des plantes. Les graines de blé traitées avec la souche bactérienne GM3 ont germé rapidement (taux de 95%) et produit des plantes vigoureuses, tandis que celles traitées avec le pathogène *Fusarium graminearum* ont montré un taux de germination plus faible (61,6%) et des plantes faibles. Ces résultats soulignent le potentiel des bactéries sélectionnées pour stimuler la croissance des plantes et les protéger contre les pathogènes. La souche *Bacillus* sp. GM3 peut être considérée comme une bonne option pour la lutte biologique contre les pathogènes fongiques et la stimulation de la croissance des plantes, offrant une alternative durable aux fongicides chimiques et promouvant l'agriculture écologique.

Sur la base des résultats obtenus, la souche *Bacillus* sp. GM3 est considérée comme un candidat prometteur pour les applications de protection des plantes. Cependant, des informations supplémentaires sont nécessaires sur les mécanismes impliqués dans son activité antifongique et son potentiel de biostimulation.

Toutes les recherches se sont concentrées sur la mise en évidence du potentiel des souches microbiennes à produire de la L-asparaginase de haute pureté avec des applications prometteuses dans le domaine médical et à utiliser ces souches dans la protection des plantes. Ces résultats soulignent l'importance d'isoler et de caractériser en détail les microorganismes pour maximiser les bénéfices biotechnologiques.

À la fin du travail, des conclusions générales de tous les chapitres sont présentées, résumant les éléments de nouveauté et une série de recommandations pour les recherches futures. Les recherches futures peuvent se concentrer sur l'optimisation des processus de production et de purification de la L-asparaginase, conduisant à un produit à haut rendement et efficace.

Dans l'ensemble, les recommandations soulignent le potentiel biotechnologique des souches bactériennes sélectionnées produisant de la L-asparaginase pour la protection et la stimulation de la croissance des plantes. Le besoin de poursuivre les recherches est explicite pour mieux comprendre les mécanismes impliqués et optimiser l'application de ces microorganismes en agriculture.