

**ACADEMIA ROMÂNĂ**  
**INSTITUTUL DE BIOLOGIE BUCUREȘTI**

**TEZĂ DE DOCTORAT**

**REZUMAT**

***BACTERII MODERAT HALOFILE ȘI HALOTOLERANTE  
DIN HABITATE SALINE: FIZIOLOGIE, BIOCHIMIE,  
BIONANOTEHNOLOGIE***

**Conducător Științific:**

**CS I DR. CODREANU-BĂLCESCU DOINA**

**Doctorand:**

**COJOC LUCIA ROXANA**

**BUCUREȘTI**

**2017**

## CUPRINS

<b>INTRODUCERE.....</b>	<b>6</b>
<b>CAPITOLUL I. SCURT ISTORIC PRIVIND CERCETĂRILE ASUPRA BACTERIILOR HALOFILE ȘI HALOTOLERANTE DIN HABITATE SALINE ÎN ROMÂNIA.....</b>	<b>8</b>
<b>CAPITOLUL II. PARTICULARITĂȚI ECOLOGICE ALE BACTERIILOR HALOFILE ȘI HALOTOLERANTE DIN HABITATE SALINE.....</b>	<b>8</b>
<b>II. 1. Habitate saline acvatice</b>	
<b>II. 2. Habitate saline terestre</b>	
<b>II. 3. Alte tipuri de habitate hipersaline</b>	
<b>CAPITOLUL III. STRUCTURA CELULARĂ A BACTERIILOR HALOFILE.....</b>	<b>8</b>
<b>CAPITOLUL IV. CONSIDERAȚII PRIVIND TAXONOMIA ȘI NOMENCLATURA BACTERIILOR HALOFILE.....</b>	<b>8</b>
<b>CAPITOLUL V. DIVERSITATEA FIZIOLOGICĂ ȘI BIOCHIMICĂ A BACTERIILOR HALOFILE ȘI HALOTOLERANTE.....</b>	<b>9</b>
<b>V.1. Fiziologia bacteriilor halofile</b>	
<b>V.2. Diversitatea biochimică a bacteriilor halofile</b>	
<b>V.3. Enzime sintetizate de bacteriile halofile</b>	
<b>CAPITOLUL VI. STRATEGII DE ADAPTARE ALE BACTERIILOR HALOFILE LA CONDIȚII HIPERSALINE.....</b>	<b>9</b>
<b>VI.1. Strategia „sărurilor interne”</b>	
<b>VI.2. Strategia „soluțiilor compatibile”</b>	
<b>CAPITOLUL VII. APLICAȚII BIONANOTEHNOLOGICE ALE BACTERIILOR MODERAT HALOFILE ȘI HALOTOLERANTE.....</b>	<b>9</b>
<b>VII.1. Bacteriile moderat halofile și halotolerante în prepararea produselor alimentare</b>	
<b>VII.2. Producerea de carotenoizi</b>	
<b>VII.3. Potențialul de biodegradare al bacteriilor halofile</b>	
<b>VII.4. Biosinteza de enzime</b>	
<b>VII.5. Aplicațiile biotehnologice ale osmoliților</b>	
<b>VII.6. Producerea de biopolimeri de către bacteriile halofile</b>	
<b>VII.7. Obținerea de hibridi biomolecule-nanomateriale și sinteza de nanoparticule</b>	
<b>VII.8. Producerea de substanțe antimicrobiene</b>	
<b>OBIECTIVELE CERCETĂRILOR ORIGINALE</b>	
<b>CAPITOLUL VIII. IZOLAREA, SELECTAREA ȘI CARACTERIZAREA UNOR TULPINI BACTERIENE DIN PROBE DE CRISTALE DE SARE DIN PERETELE MINEI UNIREA (SLĂNIC PRAHOVA).....</b>	<b>9</b>
<b>VIII.1. Izolarea unor tulpini de microorganisme halofile</b>	
<b>VIII.2. Caracterizarea morfologică a tulpinilor halofile izolate</b>	
<b>VIII.3. Selectarea tulpinilor de bacterii halofile</b>	
<b>VIII.4. Izolarea ADN genomic total și amplificarea PCR a genelor ARNr 16S</b>	
<b>VIII.5. Testarea capacității tulpinilor investigate de a crește în anaerobioză</b>	
<b>VIII.6. Stabilirea intervalului de salinitate pentru creșterea tulpinilor selectate</b>	

- VIII.7. Influența temperaturii asupra creșterii tulpinilor bacteriene izolate
  - VIII.8. Determinarea pH-ului optim pentru creștere
  - VIII.9. Testarea sensibilității la antibiotice
  - VIII.10. Încadrarea filogenetică a unora dintre tulpinile bacteriene izolate, pe baza secvenței ARNr 16S
  - VIII.11. Evaluarea capacității de sinteză a unor enzime extracelulare
  - VIII.12. Estimarea procentului de tulpini producătoare de amilază și proteinază din probele de cristal de sare
  - VIII.13. Determinarea cantitativă a activității  $\alpha$ -amilazei în intervalul de salinitate 0M-5,2M
  - VIII.14. Determinarea cantitativă a activității lipazice în intervalul de salinitate 0M-5M
  - VIII.15. Determinarea activităților enzimatică ale tulpinilor studiate utilizând sisteme microtest API
    - VIII.15.1. Identificarea prezenței enzimelor constitutive cu teste API ZYM
    - VIII.15.2. Determinarea activităților enzimatică cu teste API 20E
  - VIII.16. Evaluarea capacității de a forma biofilme a tulpinilor bacteriene izolate
- Concluzii

**CAPITOLUL IX. IZOLAREA, SELECTAREA ȘI CARACTERIZAREA UNOR TULPINI DE BACTERII HALOFILE ȘI HALOTOLERANTE DIN LACUL HIPERSALIN BAIA BACIULUI (SLĂNIC PRAHOVA).....10**

- IX.1. Izolarea unor tulpini de microorganisme halofile
  - IX.2. Caracterizarea morfologică a tulpinilor halofile izolate din Baia Baciului
  - IX.3. Selectarea tulpinilor de bacterii moderat halofile și halotolerante
  - IX.4. Stabilirea intervalului de salinitate în care are loc creșterea tulpinilor selectate
  - IX.5. Influența temperaturii asupra creșterii tulpinilor bacteriene investigate
  - IX.6. Determinarea pH-ului optim pentru creștere
  - IX.7. Testarea sensibilității la antibiotice
  - IX.8. Evaluarea capacității de sinteză a unor enzime
  - IX.9. Determinarea activităților enzimatică ale tulpinilor studiate utilizând sisteme microtest API
    - IX.9.1. Identificarea prezenței enzimelor constitutive cu teste API ZYM
    - IX.9.2. Determinarea activităților enzimatică la tulpina BB6 cu teste API 20E
  - IX.10. Încadrarea filogenetică a unora dintre tulpinile bacteriene izolate pe baza secvenței ARNr 16S
  - IX.11. Evaluarea capacității de sinteză a unor exopolizaharide
  - IX.12. Influența compoziției mediului de cultură asupra sintezei exopolizaharidelor
  - IX.13. Influența temperaturii asupra sintezei de exopolizaharide în cazul tulpinii halotolerante BB6
  - IX.14. Analiza structurală și determinarea stabilității termice a polimerului produs de tulpina halotolerantă BB6
  - IX.15. Evaluarea capacității de a forma biofilme a tulpinilor bacteriene izolate
- Concluzii

**CAPITOLUL X. IZOLAREA, SELECTAREA ȘI CARACTERIZAREA UNOR TULPINI DE BACTERII MODERAT HALOFILE ȘI HALOTOLERANTE DIN LACURILE BALTA ALBĂ (JUD.**

<b>BUZĂU), AMARA (JUD. IALOMIȚA), MOVILA MIRESEI (JUD. BRĂILA) ȘI OCNELE MARI (JUD. VÂLCEA).....</b>	<b>10</b>
<b>X.1.</b> Izolarea unor tulpini de microorganisme halofile și halotolerante	
<b>X.2.</b> Caracterizarea morfologică a tulpinilor bacteriene moderat halofile și halotolerante izolate din lacurile Balta Albă, Amara, Movila Miresei și Ocnele Mari	
<b>X.3.</b> Stabilirea intervalului de salinitate pentru creșterea tulpinilor bacteriene selectate	
<b>X.4.</b> Capacitatea tulpinilor bacteriene izolate de a produce indol și hidrogen sulfurat	
<b>X.5.</b> Evaluarea capacității de sinteză a amilazelor	
Concluzii	
<b>CAPITOLUL XI. IZOLAREA, SELECTAREA ȘI CARACTERIZAREA UNOR TULPINI DE BACTERII HALOFILE DIN MORTAR DE INTERVENȚIE DE LA MĂNĂSTIREA HUMOR (JUDEȚUL SUCEAVA).....</b>	<b>10</b>
<b>XI.1.</b> Izolarea unor tulpini de microorganisme halofile	
<b>XI.2.</b> Caracterizarea morfologică a tulpinilor de microorganisme halofile izolate din mortar de la Mănăstirea Humor	
<b>XI.3.</b> Selectarea tulpinilor de bacterii moderat halofile și halotolerante	
<b>XI.4.</b> Stabilirea intervalului de salinitate și a valorii optime de salinitate pentru creșterea tulpinilor bacteriene investigate	
<b>XI.5.</b> Determinarea pH-ului optim pentru creștere	
<b>XI.6.</b> Influența temperaturii asupra creșterii tulpinilor bacteriene 5 Hum și Act H	
<b>XI.7.</b> Testarea sensibilității tulpinii halotolerante 5 Hum la antibiotice	
<b>XI.8.</b> Evaluarea capacității de sinteză a unor enzime de către tulpinile izolate	
<b>XI.9.</b> Identificarea prezenței enzimelor constitutive la tulpina 5 Hum prin teste API ZYM	
<b>XI.10.</b> Caracterizarea tulpinilor izolate prin tehnici de biologie moleculară	
<b>XI.11.</b> Testarea capacității inhibitorii a unor soluții coloidale de nanoparticule de argint și aur asupra creșterii tulpinilor bacteriene izolate	
<b>XI.12.</b> Determinarea valorii C.M.I. a soluțiilor coloidale de nanoparticule de Ag	
<b>XI.13.</b> Extracția pigmentilor sintetizați de tulpina halotolerantă 5 Hum	
<b>XI.14.</b> Evaluarea capacității de a forma biofilme a tulpinilor bacteriene izolate	
Concluzii	
<b>CONCLUZII GENERALE.....</b>	<b>11</b>
<b>LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE, DIN TEMATICA TEZEI DE DOCTORAT</b>	
<b>BIBLIOGRAFIE.....</b>	<b>13</b>

## **CUVINTE CHEIE:**

CONDIȚII EXTREME

POLIEXTREMOFIL

ACTIVITĂȚI HIDROLITICE COMBINATE

HABITATE SALINE

HALIT

EXOPOLIMER

EFLORESCENȚE

BIOFILM

MINA UNIREA

LACUL BAIA BACIULUI

BIODETERIORARE

BIOPIGMENTAȚIE ROZ

MĂNĂSTIREA HUMOR

APLICABILITATE BIOTEHNOLOGICĂ

NANOPARTICULE DE ARGINT

PIGMENTI CAROTENOIZI

## INTRODUCERE

Multă vreme s-a considerat că unele habitate, precum izvoarele fierbinți, deșerturile și lacurile hipersaline, calotele glaciare și abisurile oceanelor sunt sterile. Cercetările din ultimii 15 ani au demonstrat că acestea sunt populate de o mare varietate de microorganisme „extremofile”, capabile să-și mențină procesele vitale și chiar să se dezvolte în condiții extreme de mediu. Există și microorganisme adaptate la mai multe tipuri de stres de mediu, reunite sub denumirea generală de „poliextremofile”.

Studierea acestor cazuri nu demonstrează doar principiile de funcționare ale vieții în mediile ostile, ci oferă totodată și argumente asupra naturii vieții în sine și asupra proprietăților primelor organisme, de a coloniza Terra într-un moment în care condițiile erau cu mult mai ostile decât cele tolerate de majoritatea formelor de viață care populează în prezent planeta.

Unele din aceste microorganisme extremofile nu pot supraviețui în condiții moderate, preferate de majoritatea organismelor vii, prezentând un grad scăzut de adaptabilitate la condițiile variabile de mediu, în timp ce altele manifestă o flexibilitate mai mare. În această ultimă categorie se încadrează și *bacteriile moderat halofile*, care cresc optim la 0,5 – 2,5M NaCl. Un grup aparte este alcătuit din *bacteriile halotolerante*, capabile să crească la concentrații de sare care depășesc cu mult limita de 0,5M, dar a căror valoare optimă de salinitate este mult mai scăzută (mai mică de 0,2M NaCl). Multe microorganisme descrise inițial ca halotolerante sunt de fapt moderat halofile și viceversa.

Chiar dacă au fost mai puțin studiate, comparativ cu microorganismele extrem halofile, bacteriile moderat halofile și halotolerante populează o gamă largă de habitate acvatice, terestre, dar și unele produse alimentare conservate prin sărare.

Aceste bacterii prezintă un deosebit potențial aplicativ în domeniul biotehnologic, nu doar prin producerea unor compuși de interes industrial (enzime, polimeri), ci și datorită unor proprietăți fiziologice ce pot facilita exploatarea lor în interes industrial (rezistența la concentrații ridicate de NaCl, fapt ce minimizează riscul de contaminare și cerințele nutriționale simple).

\*\*\*

Prezenta teză de doctorat aduce **contribuții** la cunoașterea **potențialului adaptativ** al bacteriilor moderat halofile și halotolerante în condiții extreme de mediu (stres osmotic), cât și a **importanței aplicative**, ce rezultă din capacitatea de sinteză a unor biomolecule precum enzimele

extracelulare halofile, exopolimerii, pigmentii carotenoizi. Cunoașterea anumitor caracteristici legate de fiziologia acestor microorganisme contribuie la înțelegerea naturii halofiliei și halotoleranței.

**Sursa de izolare** a tulpinilor de bacterii halofile și halotolerante a fost reprezentată de diferite tipuri de medii saline din România, de origine naturală sau antropică, după cum urmează: peretele de sare al Minei Unirea (Slănic Prahova), mortar de intervenție de pe peretele Mănăstirii Humor (Suceava), precum și lacurile Baia Baciului (Slănic Prahova), Balta Albă (jud. Buzău), Amara (jud. Ialomița), Movila Miresei (jud. Brăila) și Ocele Mari (jud. Vâlcea). Cu excepția monumentului istoric investigat, majoritatea situsurilor de prelevare a probelor sunt localizate în partea de sud-est a României, în zona subcarpatică a Carpaților Meridionali și de Curbură.

Principalele **direcții de studiu** abordate au vizat *izolarea și selectarea* unor tulpini bacteriene halofile și halotolerante din variate habitate saline, *aspecte de fiziologie celulară* (testarea capacității de creștere în anaerobioză, stabilirea intervalului și a valorii optime de salinitate pentru creștere, determinarea intervalului de temperatură și de pH în care se desfășoară creșterea, evaluarea capacității de a sintetiza exopolizaharide și de a forma biofilme), cât și aspecte referitoare la *particularitățile metabolice* ale acestora (sinteza de enzime hidrolitice extracelulare halofile: amilaze, lipaze, esteraze, proteaze). Totodată, s-a avut în vedere *selectarea unor tulpini* de bacterii moderat halofile și halotolerante *capabile să sintetizeze enzime hidrolitice extracelulare și exopolizaharide* cu potențial aplicativ.

În cazul Mănăstirii Humor s-a urmărit *stabilirea originii biopigmentației roz* pe pictura murală, precum și testarea unor soluții coloidale de nanoparticule de aur și argint, în scopul stabilirii unei strategii pentru decontaminarea zonelor afectate de biodeteriorare, precum și a unui tratament de prevenție a colonizărilor viitoare.

În vederea izolării și caracterizării tulpinilor bacteriene halofile și halotolerante au fost utilizate **tehnic** de *microbiologie clasică* (estimarea numărului de unități formatoare de colonii, izolarea tulpinilor pe medii de cultură artificiale și purificarea acestora, selectarea bacteriilor halofile și halotolerante pe medii cu inhibitori specifici), *de microscopie* (optică și SEM), *de biochimie* (evaluarea prin metode calitative și cantitative a sintezei de enzime extracelulare), *de spectroscopie* (UV-VIS, FT-IR - spectrometrie în infraroșu cuplată cu transformata Fourier, XRF - fluorescență de raze X), *de analiză termică* (DSC - calorimetrie cu scanare diferențială), *de biologie moleculară* (extracție ADN genomic, determinarea concentrației de ADN, amplificare PCR a genei pentru ARNr 16S, electroforeză în gel de agaroză, analiza secvenței ARNr 16S și construirea arborilor filogenetici).

\*\*\*

Lucrarea de față este structurată în două părți și conține 75 figuri, din care 72 în partea de contribuții originale și 28 tabele, din care 26 în partea a doua.

**Prima parte (capitolele I-VII)** prezintă stadiul actual al cercetărilor în domeniu, cuprinzând informații generale cu privire la particularitățile fiziologice și biochimice ale bacteriilor moderat halofile și halotolerante, precum și potențialul lor aplicativ.

Cea de-a **doua parte (capitolele VIII-XI)** prezintă contribuțiile originale, constituite din rezultatele obținute în studiul bacteriilor moderat halofile și halotolerante izolate din diferite tipuri de habitate saline din România, reprezentând subiectul tezei de doctorat. Fiecare capitol ce conține rezultatele cercetărilor proprii este organizat în mai multe subcapitole, iar fiecare dintre acestea prezintă materialele și metodele utilizate, rezultatele originale și discuțiile, precum și concluziile. Lucrarea se încheie cu un capitol de concluzii generale. Bibliografia conține 306 titluri de lucrări publicate în reviste de profil din țară și străinătate și este precedată de lista lucrărilor autoarei din tematica tezei de doctorat.

**Capitolul I** cuprinde un scurt istoric privind cercetările asupra bacteriilor halofile și halotolerante din habitate saline în România. Primele preocupări legate de studiul comunităților microbiene din habitate hipersaline s-au referit la lacul sărat Techirghiol (Țuculescu și colab., 1965). La Institutul de Biologie București al Academiei Române, aceste studii, inițiate sub conducerea Acad. Prof. G. Zarnea, au fost continuate și dezvoltate în ultimii 20 ani.

În **capitolul II** sunt redată particularitățile ecologice ale bacteriilor halofile și halotolerante din habitate saline. Există două tipuri de medii importante din punct de vedere biologic, în care factorul de salinitate interacționează cu populațiile microbiene, și anume: solul și apa. Acestea li se adaugă o serie de habitate mai puțin obișnuite, precum: unele specii de plante și animale de deșert, unele alimente conservate prin sărare, sau chiar unele picturi murale.

**Capitolul III** cuprinde informații legate de structura celulară a bacteriilor halofile și halotolerante, evidențiind doar caracteristicile speciale ale constituenților celulari, deoarece bacteriile halofile au multe trăsături comune cu reprezentanții nehalofili înrudiți.

**Capitolul IV** conține considerații privind taxonomia și nomenclatura bacteriilor halofile. Acestea sunt prezente în 8 filumuri: *Actinobacteria*, *Bacterioidetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* și *Thermotogae* și, cu excepția ordinului *Halanaerobiales* (alcătuit doar din bacterii halofile) și a familiei *Halomonadaceae* (alcătuită aproape în exclusivitate din specii halofile), se află într-o strânsă relație filogenetică cu reprezentanții nehalofili înrudiți.



În **capitolul V** sunt incluse aspecte privitoare la diversitatea fiziologică și biochimică a bacteriilor halofile și halotolerante. Majoritatea bacteriilor halofile prezintă cerințe nutriționale complexe la salinități înalte. Acestea pot utiliza ca sursă de carbon și energie atât substraturile nutritive uzuale, cât și alți compuși greu de degradat (hidrocarburi, compuși organici halogenați). Diversitatea tipurilor metabolice ale bacteriilor halofile scade odată cu creșterea salinității. Printre bacteriile halofile se numără reprezentanți ce constituie modele de viață heterotrofă aerobă și anaerobă, ca și de fototrofie oxigenică și anoxigenică, cu nutriție autotrofă, fotoheterotrofă și chemolitotrofă.

În **capitolul VI** sunt descrise cele două strategii de adaptare ale bacteriilor halofile prin care acestea supraviețuiesc stresului osmotic generat de prezența unor concentrații mari de sare în mediu: strategia „sărurilor interne” (salt-in) și strategia „soluțiilor compatibili”.

În **capitolul VII** este prezentat potențialul bionanotehologic al bacteriilor moderat halofile și halotolerante. Multe dintre acestea produc diverși compuși de interes (osmoprotectori, enzime, polimeri și pigmenti), care își găsesc aplicabilitatea în domenii precum: medicină, industria alimentară, a celulozei și hârtiei, farmaceutică, cosmetică, agrochimică, textilă și în bioremedierea apelor reziduale și a mediilor poluate. Combinarea biomoleculilor sintetizate de bacteriile halofile și halotolerante cu diferite nanomateriale prezintă interes pentru procesele de diagnoză, marcarea celulară, alcătuirea de biosenzori.

În **capitolul VIII** este descrisă metodologia pe care am utilizat-o pentru izolarea, selectarea și caracterizarea unor tulpini bacteriene din probe de cristale de sare din peretele Minei Unirea (Slănic Prahova), precum și rezultatele obținute. Dintr-un număr total de 13 tulpini bacteriene halotolerante izolate, majoritatea s-au dezvoltat la temperaturi scăzute (12-15°C) și în condiții de întuneric, demonstrând o bună adaptare la condițiile de microclimat oferite de habitatul de origine. Analiza BLAST a secvențelor ARNr 16S a indicat similitudinea tulpinii halotolerante 1/9 cu *Bacillus subtilis* AJ276351, în procent de 100% și a tulpinii 1/12 cu *Virgibacillus halodenitrificans* AY543168, iar tulpinile 1/2 și 1/6 au grupat din punct de vedere filogenetic cu speciile *Bacillus licheniformis*, respectiv *Paraliobacillus quinghaiensis*.

Dintre acestea, tulpina *Bacillus subtilis* 1/9 a prezentat capacitatea de a hidroliza toate cele 6 substraturi enzimatic testate, iar tulpinile 1/1, *Bacillus licheniformis* 1/2 și *Virgibacillus halodenitrificans* 1/12 au sintetizat lipaze halofile, active la concentrații crescute de sare (NaCl 3M), cu potențial biotehologic în industriile: farmaceutică, agrochimică, oleochimică etc.

**Capitolul IX** se referă la izolarea, selectarea și caracterizarea unor tulpini de bacterii halofile și halotolerante din lacul hipersalin, de origine antropică, Baia Baciului (Slănic Prahova). S-au izolat două tulpini de bacterii moderat halofile și o tulpină halotolerantă și s-a constatat că intervalul de salinitate în care are loc creșterea este mai restrâns, iar valoarea optimă de salinitate este mai scăzută în cazul tulpinilor moderat halofile, comparativ cu cele înregistrate pentru tulpina halotolerantă.

Tulpinile izolate prezintă cel puțin una dintre activitățile hidrolitice extracelulare testate (hidroliza amidonului, gelatinei, cazeinei, compusului Tween 80), iar *Idiomarina loihiensis* BB6 și *Marinobacter lipolyticus* BB49 prezintă activități enzimatiche combinate. Totodată, tulpina bacteriană *Idiomarina loihiensis* BB6 prezintă și capacitatea de a sintetiza un exopolizaharid termostabil, având punctul de topire la 207°C și un conținut bogat în grupări amino și sulfat, caracteristici ce constituie un avantaj pentru utilizarea acestuia în aplicații biotehnologice. Proprietatea de a sintetiza exopolizaharide extracelulare este corelată, în cazul tulpinii *Idiomarina loihiensis* BB6 cu capacitatea acesteia de a forma biofilme.

În **capitolul X** sunt prezentate izolarea, selectarea și caracterizarea unor tulpini de bacterii moderat halofile și halotolerante din lacurile de origine naturală: Balta Albă (Jud. Buzău), Amara (Jud. Ialomița), Movila Miresei (Jud. Brăila) și Ocnele Mari (Jud. Vâlcea). S-a constatat că raportul stabilit între numărul tulpinilor bacteriene moderat halofile și cel al tulpinilor halotolerante izolate este dependent de salinitatea mediului din care acestea au fost izolate. În cazul lacului Balta Albă, numărul relativ mare de tulpini cu activitate amilolitică poate fi corelat cu caracterul poliextremofil al acestui lac, cunoscut fiind faptul că valorile de pH 8-9 și cele de temperatură între 30°C și 37°C favorizează sinteza de amilaze la microorganismele halofile, în general și la bacteriile halofile, în particular.

**Capitolul XI** sintetizează rezultatele cercetărilor proprii, efectuate pentru prima dată în România, privind originea biopigmentației roz pe pictura murală, în pronaosul Mănăstirii Humor (Județul Suceava). S-a efectuat izolarea, selectarea și caracterizarea unor tulpini de bacterii halofile din mortar de intervenție prelevat din zona biodeteriorată, precum și testarea acțiunii inhibitorii a unor suspensii coloidale de nanoparticule de argint și aur, în scopul utilizării lor în strategiile de prevenție a biodeteriorării.

Prin examinarea SEM a probei de mortar de reparație a fost identificată prezența unui consorțiu microbial alcătuit din celule de formă bacilară și celule bacteriene filamentoase, lungi, caracteristice actinomicetelor, ce alcătuiesc o rețea de „hife” la suprafața mortarului. În condiții de laborator fost izolată o tulpină bacteriană halotolerantă, producătoare de pigmenți carotenoizi și

capabilă să formeze biofilme și o tulpină extrem halofilă de graniță, din categoria actinomicetelor. Particularitățile biologice ale tulpinilor bacteriene izolate explică implicarea acestora în procesul de biopigmentație prezent în cazul mănăstirii Humor. Datele obținute demonstrează că tulpina 5 Hum (ce grupează, din punct de vedere filogenetic, cu specia *Halobacillus naozhouensis*, conform analizei secvenței ARNr 16S) crește și se multiplică pe tot parcursul anului, în timp ce dezvoltarea tulpinii Act H are loc numai atunci când temperatura depășește valoarea de 20°C, corespunzător perioadei de primăvară târzie, vară și toamnă timpurie.

## CONCLUZII

1. Tulpinile de *bacterii halotolerante* izolate din cristale de sare din peretele **Minei Unirea (Slănic Prahova)** se dezvoltă în intervale largi de salinitate (0-3M sau 0-4M NaCl), iar majoritatea prezintă capacitatea de a crește la temperaturi scăzute (12-15°C) și în condiții de întuneric, demonstrând o bună adaptare la condițiile de microclimat oferite de habitatul de origine, respectiv Mina Unirea (Slănic Prahova).

2. Tulpinile bacteriene halotolerante izolate din cristale de sare, care grupează, din punct de vedere filogenetic, cu speciile *Bacillus licheniformis* și *Bacillus subtilis*, au capacitatea de a crește *facultativ anaerob* și prezintă *caracter psihrotolerant*.

3. Rezultatele obținute demonstrează că în structura peretelui de sare al Minei Unirea (Slănic Prahova) există microorganisme halotolerante cu o *bogată activitate enzimatică extracelulară*, acestea putând contribui în timp la transformările geochimice ale depozitului de sare.

4. Capacitatea de a *sintetiza esteraze* a celor mai multe dintre tulpinile izolate din cristale de sare recomandă aceste tulpini pentru studii ulterioare privind capacitatea de degradare a lipidelor sau a apelor reziduale în condiții saline.

5. *Activitatea amilazică* constatată în cazul unora dintre tulpinile investigate variază invers proporțional cu salinitatea. *Lipazele halofile* sintetizate sunt active la valori ale concentrației de sare ce depășesc valoarea optimă de creștere a tulpinilor halotolerante producătoare, prezentând potențial biotehnologic în domenii precum industria farmaceutică, agrochimică, oleochimică etc.

6. Din **lacul Baia Baciului**, au fost izolate tulpini Gram-negative, aerobe și facultativ anaerobe, ce grupează, din punct de vedere filogenetic, cu speciile *Idiomarina loihiensis* (halotolerantă) și *Marinobacter lipolyticus* (moderat halofilă) și care prezintă capacitatea de a crește într-un *interval foarte larg de temperatură* (4 - 45°C) și de *pH* (6-9).

7. S-a constatat că tulpina halotolerantă *Idiomarina loihiensis* BB6 se dezvoltă într-un interval de salinitate mult mai larg decât tulpina moderat halofilă *Marinobacter lipolyticus* BB49. Creșterea optimă a tulpinii BB6 are loc la o concentrație mai mare de NaCl decât în cazul tulpinii BB49.

8. Tulpina bacteriană *Idiomarina loihiensis* BB6 prezintă capacitatea de a sintetiza un exopolizaharid termostabil, având punctul de topire la 207°C și un conținut bogat în grupări amino și sulfat, caracteristici ce constituie un avantaj pentru utilizarea acestuia în scopul bioremedierii mediilor poluate și a apelor reziduale.

9. Cercetările efectuate pe probe prelevate din lacurile **Balta Albă (jud. Buzău)**, **Amara (jud. Ialomița)**, **Movila Miresei (jud. Brăila)** și **Ocnele Mari (jud. Vâlcea)** au confirmat rolul salinității ca factor limitant al diversității speciilor bacteriene. *Proporția stabilită între numărul tulpinilor bacteriene moderat halofile și cel al tulpinilor halotolerante izolate este dependentă de salinitatea mediului din care acestea au fost izolate.*

10. Caracterul poliextremofil al lacului Balta Albă (salinitate intermediară și pH alcalin) favorizează dezvoltarea unui număr relativ mare de bacterii halofile cu activitate amilolitică.

11. Prezenta lucrare de doctorat abordează pentru prima dată în România studiul biopigmentației roz pe pictura murală, evidențiindu-se originea bacteriană a procesului de biodeteriorare, prin atribuirea rolului de biodeteriogen tulpinii halotolerante 5 Hum, ce grupează din punct de vedere filogenetic cu specia *Halobacillus naozhouensis*. Aceasta este responsabilă de producerea biopigmentației roz în pronaosul mănăstirii, datorită capacității sale de a sintetiza pigmenți carotenoizi și de a produce biofilme.

12. În urma cercetărilor efectuate s-a constatat că, în cazul **mănăstirii Humor**, factorii de microclimat (temperatură, umiditate relativă), precum și prezența eflorescențelor, favorizează creșterea, multiplicarea bacteriilor halofile și halotolerante, respectiv colonizarea stratului pictural și a mortarelor.

13. S-a constatat eficiența nanoparticulelor de argint obținute din extract de calus de căpșun alb, în inhibarea creșterii tulpinii halotolerante 5 Hum, ceea ce le recomandă pentru a fi utilizate prin încorporarea în mortare structurale sau de reparație, în scopul prevenirii procesului de biodeteriorare.

\*  
\* \*

***Investigarea particularităților fiziologice și biochimice ale tulpinilor bacteriene moderat halofile și halotolerante izolate din diferite tipuri de habitate saline a contribuit la sporirea cunoștințelor referitoare la capacitatea acestora de a supraviețui și de a se multiplica în condiții de stres osmotic, respectiv la înțelegerea naturii halofiliei și halotoleranței.***

***Rezultatele obținute în cadrul tezei de doctorat confirmă versatilitatea metabolismului și capacitatea de sinteză a unor biomolecule (enzime extracelulare halofile, exopolizaharide, pigmenți carotenoizi) de către bacteriile moderat halofile și halotolerante izolate din habitate saline din România, cu aplicabilitate în: medicină, industria alimentară, farmaceutică, agrochimică și în bioremedierea apelor reziduale și a mediilor poluate.***

## BIBLIGRAFIE SELECTIVĂ

1. **Adamiak J., Otlewska A., Gutarowska B., Pietrzak A.**, 2016. Halophilic microorganisms in deteriorated historic buildings: insights into their characteristics. *Acta Biochim. Pol.*, **63**, 2, 335-341.
2. **Arora S. și Vanza M.**, 2017. Microbial approach for bioremediation of saline and sodic soils. In: "Bioremediation of salt affected soils: An Indian perspective", Arora, S., Singh, A.K., Singh, Y.P. (ed.), Springer, 87-100.
3. **Bouchotroch S., Quesada E., del Moral A., Llamas I., Béjar V.**, 2001. *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide – producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 1625–1632.
4. **Cojoc R., Enache M., Codreanu – Bălcescu D.**, 2013. Approaching the halophilic bacteria presence as possible indicator of biological dynamics in hypersaline aquatic environments. *Drobeta – Seria Științele Naturii*, **XXIII**, 31 – 39.
5. **Cojoc R., Merciu S., Popescu G., Dumitru L., Kamekura M., Enache M.**, 2009a. Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal. *Rom. Biotechnol. Lett.*, **14**, 5, 4658-4664.
6. **Cojoc R., Merciu S., Oancea P., Pincu E., Dumitru L., Enache M.**, 2009b. Highly thermostable exopolysaccharide produced by the moderately halophilic bacterium isolated from a man-made young salt lake in Romania. *Pol. J. Microbiol.*, **58**, 4, 289-294.
7. **Corinaldesi C., Barone G., Marcellini F., Dell'Anno A., Danovaro R.**, 2017. Marine microbial-derived molecules and their potential use in cosmeceutical and cosmetic products. *Marine Drugs*, **15**, 118, 1-21.
8. **Enache M., Cojoc R., Kamekura M.**, 2015. Halophilic microorganisms and their biomolecules: approaching into frame of bio(nano)technologies. In: "Halophiles. Biodiversity and sustainable exploitation, Sustainable Development and biodiversity", Maheshwari D.K., Saraf M. (ed.), Springer International Publishing Switzerland, 6, 5, 161-172, Print ISBN - 978-3-319-14594-5, Online ISBN - 978-3-319-14595-2.

9. **Enache M., Neagu S., Cojoc R.**, 2014. Extracellular hydrolases of halophilic microorganisms isolated from hypersaline environments (salt mine and salt lakes). *Scientific Bulletin, Series F. Biotechnologies*, XVIII, 20- 25.
10. **Enache M., Neagu S., Anastasescu C., Cojoc R., Zaharescu M.**, 2014. The effects of silica nanostructures on halotolerant microorganisms isolated from rock salt crystal. In: "*New applications of nanomaterials, series Micro and Nanoengineering*", Ion A.C., Dascălu D., Cârjă G., Ciurea M.L. (ed.), Ed. Academiei Române, 51-59, ISBN 978-973-27-2434-7.
11. **Enache M., Neagu S., Cojoc R.**, 2013. Halophilic microorganisms from Romanian saline environments as a source of extracellular enzymes with potential in agricultural economy. *Agrarian Economy and Rural Development – Realities and Perspectives for Romania*, 4th Edition, 252-257 (CABI).
12. **Gomoiu I., Mohanu D., Radvan R., Dumbravician M., Neagu S.E., Cojoc L.R., Enache M.I., Chelmus A., Mohanu I.**, 2017. Environmental impact on biopigmentation of mural painting. *Acta Phys. Pol. A*, **131**, 1, 48-51.
13. **Gomoiu I., Mohanu D., Mohanu I., Enache M., Serendan C., Cojoc R.**, 2017. Pink discoloration on frescoes from Hurezi monastery, Romania. *J. Cult. Her.*, Elsevier Masson France, **23**, 157-161.
14. **Gomoiu I., Enache M.I., Cojoc R., Mohanu I., Mohanu D.**, 2016. Biodeterioration of wooden churches from Romania. Case studies: The church from Amarasti, Valcea County. In: "*Microbes in the spotlight. Recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms*", Méndez-Vilas (ed.), Brown Walker Press, 51-55, ISBN 978-1-62734-612-2.
15. **de la Haba R.R., Sánchez-Porro C., Márquez M.C., Ventosa A.**, 2011. Taxonomy of halophiles. In: "*Extremophiles handbook*", Horikoshi, K. (ed.) Springer, Tokyo, 255–308.
16. **Kanekar P.P., Deshmukh S.V., Kanekar S.P., Dhakephalkar P.K., Ranjekar P.K.**, 2016. Exopolysaccharides of halophilic microorganisms: an overview. In: "*Industrial biotechnology. Sustainable production and bioresource utilization*", Thangadurai, D., Sangeetha, J. (ed.), Apple Academic Press, 1-28.
17. Moldoveanu M., Florescu L., Parpală L., **Cojoc R.**, Enache M., 2015. Romanian salt lakes: some physical-chemical features and composition of biological communities. *Muzeul Olteniei Craiova, Oltenia. Studii și Comunicări. Științele Naturii*, 31, 1, 205-212.
18. **Neagu S., Cojoc R., Tudorache M., Gomoiu I., Enache M.**, 2016. The lipase activity from moderately halophilic and halotolerant microorganisms involved in bioconversion of waste glycerol from biodiesel industry. *Waste Biomass Valor.*, Springer, 1-7, DOI 10.1007/s12649-016-9793-9.
19. **Neagu S., Cojoc R., Gomoiu I., Enache M.**, 2016. The production of lipases and decarboxylases by halophilic bacteria able to grow in the presence of waste glycerol. *Muzeul Olteniei Craiova, Oltenia. Studii și Comunicări. Științele Naturii*, 33, 1, 137-143.
20. **Neagu S., Enache M., Cojoc R.**, 2014. Extracellular hydrolytic activities of halophilic microorganisms isolated from Balta Albă salt lake. *Rom. Biotechnol. Lett.*, 19, 8951-8958.
21. **Neagu S., Preda S., Anastasescu C., Zaharescu M., Enache M., Cojoc R.**, 2014. The functionalization of silica and titanate nanostructures with halotolerant proteases. *Rev. Roum. Chim.*, 59, 2, 97–103.
22. **Oren A.**, 2002a. Halophilic microorganisms and their environments. In: "*Cellular origin and life in extreme habitats*", Seckbach, J. (ed.), Kluwer Academic Publishers, p. 575.

23. **Oren A.**, 2002b. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 1, 56–63.
24. **O’Toole G.A.**, 2011. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, **47**, 2437.
25. **Păceșilă I., Cojoc R., Enache M.**, 2014. Evaluation of halobacterial extracellular hydrolytic activities in several natural saline and hypersaline lakes from Romania. *Br.Biotechnol. J.*, 4, 5, 541-550.
26. **Piñar G., Ettenauer J., Sterflinger K.**, 2014. ‘La vie en rose’: A review of the rosy discoloration of subsurface monuments. In: *”The conservation of Subterranean Cultural Heritage”*, Saiz-Jimenez Editors, 113-124.
27. **Rohban R., Amoozegar M.A., Ventosa A.**, 2009. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 333-340.
28. **Sahoo S., Roy S., Maiti S.**, 2016. A high salt stable  $\alpha$ -amylase by *Bacillus* sp. MRS6 isolated from municipal solid waste; purification, characterization and solid state fermentation. *Enzyme Engineering*, **5**, 3, 1-8.
29. **Seckbach J. și Rampelotto P.H.**, 2015. Polyextremophiles. In: *”Microbial Evolution under extreme conditions”*, Bakermans, C. (ed.), DeGruyter, 153-170.
30. **Țuculescu I.**, 1965. Biodinamica lacului Techirghiol. Biocenozele și geneza namolului, Ed. Acad. Rom., București, 400 pp.
31. **Ventosa A. și Nieto J.J.**, 1995. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **11**, 85-94.
32. **Ventosa A., Nieto J.J., Oren A.**, 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 2, 504-544.
33. **Ventosa A., Sánchez-Porro C., Martín S., Mellado E.**, 2005. Halophilic *Archaea* and *Bacteria* as a source of extracellular hydrolytic enzymes. In: *”Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria and Eucarya. Cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology”*, Gunde-Cimerman, N., Oren, A., Plemenitaš, A. (ed.), Springer, **9**, 337-354.
34. **Ventosa A., Márquez M.C., Sánchez-Porro C., de la Haba R.R.**, 2012. Taxonomy of Halophilic *Archaea* and *Bacteria*. In: *”Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms”*, Vreeland, R.H. (ed.), Dordrecht: Springer, 59-80.