

UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE INTEGRATIVĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

**Sinteza polihidroxicanoaților de către bacteria extrem
halotolerantă *Halomonas elongata***

Conducător de doctorat
Prof. Dr. Horia Leonard BANCIU

Student doctorand
Adorján CRISTEA

CLUJ-NAPOCA
2021

Cuprins

Rezumatul tezei.....	1
Prefață	3
CAPITOL I	4
Introducere generală.....	4
1. Introducere	4
2. Utilizări actuale și viitoare ale microorganismelor halotolerante și halofile	5
3. Producția de polihidroxiclcanoți de către <i>Halomonas</i> spp.....	7
4. Mecanismul molecular de sinteză a PHA	10
5. Aplicațiile polihidroxiclcanoților	13
6. Scopul tezei de doctorat	16
7. Referințe.....	17
CAPITOL II.....	24
Producția de polihidroxiclcanoți de către o tulpină extrem halotolerantă <i>Halomonas elongata</i> izolată din lacul meromictic hipersalin Fără Fund (Bazinul Transilvaniei, România)	24
1. Introducere	24
2. Materiale și metode.....	26
2.1. Izolarea și cultivarea tulpinii bacteriene	26
2.2. Caracterizarea fenotipică a tulpinii bacteriene	27
2.3. Amplificarea PCR a genei ARNr 16S, secvențierea, și identificarea taxonomică.....	27
2.4. Amplificarea PCR, clonarea, și secvențierea genei <i>phaC</i>	28
2.5. Caracteristicile de creștere și acumularea de poliesteri.....	28
2.6. Monitorizarea consumului de N și C	29
2.7. Procedura de colorare și vizualizare la microscop	29
2.8. Microscopie electronică de transmisie (TEM).....	30
2.9. Extracția și purificarea PHA	30
2.10. Analiza chimică și fizică a PHA-ului extras	31
2.11. Analiză statistică	32
3. Rezultate	32
3.1. Caracterizarea fenotipică și identificarea tulpinii bacteriene	32
3.2. Detecția microscopică a granulelor de PHA	35
3.3. Acumularea de poliesteri asociată cu creșterea.....	36
3.4. Analiza chimică a PHA-ului produs	37

4. Discuții.....	40
5. Concluzii.....	44
6. Mulțumiri.....	44
7. Referințe.....	45
CAPITOL III.....	51
Producția de poli(3-hidroxi-butirat) din substraturi alternative de carbon de către <i>Halomonas elongata</i> DSM 2581 ^T cultivată în condiții de salinitate ridicată.....	51
1. Introducere.....	51
2. Materiale și Metode.....	53
2.1. Reactivii.....	53
2.2. Mediul de cultură și tulpina de lucru.....	53
2.3. Microscopie.....	54
2.4. Cinetica de creștere și acumulare a PHB.....	54
2.5. Extracția PHA.....	55
2.6. Măsurători analitice.....	55
2.7. Analiză statistică.....	56
3. Rezultate și discuții.....	56
3.1. Caracterizarea și sinteza de poli(3-hidroxi-butirat) folosind surse alternative de carbon.....	56
3.2. Producția de PHB în culturi crescute în baloane Erlenmeyer.....	60
4. Concluzii.....	64
5. Referințe.....	64
CAPITOLUL IV.....	69
Evaluarea mecanică a filmelor turnate de poli(3-hidroxi-butirat) obținute din poliesterul stocat de către <i>Halomonas elongata</i> DSM 2581 ^T	69
1. Introducere.....	69
2. Materiale și Metode.....	70
2.1. Mediul de cultură și tulpina de lucru.....	70
2.2. Producția de PHB și evaluarea chimică.....	71
2.3. Generarea de filme PHA.....	71
2.4. Evaluarea mecanică a filmelor de PHB.....	72
3. Rezultate și discuții.....	72
3.1. Producția de PHB și identificarea chimică.....	72
3.2. Evaluarea mecanică a filmelor de PHA.....	75
4. Concluzii.....	77
5. Mulțumiri.....	78

6. Referințe.....	78
CAPITOLUL V	81
Concluzii generale și perspective.....	81
ANEXE CAPITOL I.....	83
ANEXE CAPITOL III	90
LISTA PUBLICAȚIILOR INCLUSE ÎN TEZĂ CA ȘI CAPITOLE	93
LISTA PUBLICAȚIILOR CARE NU AU FOST INCLUSE ÎN TEZĂ	93
PARTICIPĂRI LA CONFERINȚE INTERNAȚIONALE	94
MEMBRU ÎN PROIECTE DE CERCETARE	96
MULȚUMIRI	97

Cuvinte cheie

Poliesteri, polihidroxiacanoați, halotolerant, *Halomonas*, biodegradabil, termostabil, surse regenerabile, nesteril

Rezumat

Sinteza polihidroxiacanoaților (PHA) la procariote este o trăsătură asociată în general cu factorii de stres, în special limitarea nutrienților. Odată sintetizați, acești poliesteri sunt depozitați în celule și utilizați ulterior ca sursă de carbon și energie. Membrii genului *Halomonas* au fost studiați sistematic pentru potențialul lor aplicativ, inclusiv sinteza de PHA. Producția de ectoină la *H. elongata* este o caracteristică deja exploatată în contrast cu sinteza PHA care este mai puțin studiată la această bacterie.

Această teză de doctorat a avut următoarele scopuri:

- i) să investigheze sinteza PHA la tulpina ambientală *H. elongata* 2FF și să evalueze caracteristicile fizico-chimice ale poliesterului produs.
- ii) să exploreze capacitatea tulpinii tip *H. elongata* DSM 2581^T de a transforma produsele secundare industriale (surse de carbon alternative) în polihidroxibutirat (PHB).
- iii) evaluarea proprietăților mecanice ale filmelor de PHB fabricate din poliesterul de stocare sintetizat de tulpina tip *H. elongata*.

În **Capitolul I** s-au prezentat cunoștințele generale despre structura și sinteza PHA precum și perspectivele în domeniile de interes, cu un accent special pe producția de PHA la *Halomonas* spp.

În **Capitolul II** se descrie izolarea unei specii de *H. elongata* extrem halotolerantă din lacul hipersalin Fără Fund (Bazinul Transilvaniei, România) care poate produce până la 0.95 g/L PHB atunci când este cultivat într-un mediu dublu limitat. Poliesterul produs de tulpina *Halomonas* sp. a fost extrasă și purificată la 96% puritate, având un grad de cristalinitate de 39% și a fost identificată ca fiind PHB. Mai mult, poliesterul sa dovedit a avea proprietăți termice relevante industrial (temperatura de topire (T_m) = 168°C).

Deoarece glucoza este o sursă costisitoare de carbon, următorul pas a fost evaluarea capacității tulpinii tip de *H. elongata* de a produce PHA-uri folosind surse de carbon alternative și ieftine (**Capitolul III**). Materiile prime (sursele de carbon) selectate au fost melasa din trestie de zahăr (SCM), melasa din sfeclă de zahăr (SBM), glicerol, lactoza și siropul din miez de porumb. Substratul preferat pentru producția de PHB la tulpina tip *H. elongata* cultivată la o salinitate de 8% w/v a fost SCM, iar producția maximă a atins 2.36 g/L PHB în 96 de ore cu o rată de productivitate de 0.021 g/L/h.

În **Capitolul IV** explorăm capacitatea tulpinii tip *H. elongata* de a produce PHB în condiții de salinitate ridicată (8% NaCl) și condiții nesterile ca o premisă pentru un proces rentabil financiar. PHB-ul extras a fost utilizat la fabricarea filmelor de PHB. Pe baza metodei de intercalare a soluției au fost fabricate trei tipuri de membrane PHA: o membrană fabricată din PHB extrasă de la tulpina tip de *H. elongata* (PHBh), o altă membrană fabricată din PHB comercial și o a treia membrană generată din polihidroxibutirat-co-hidroxivalerat comercial (PHBV). Filmul de PHBh a prezentat o duritate mai mare (43.78 MPa), modulul lui Young (1.28 GPa), rezistența la tracțiune (9.99 MPa) și alungirea la tracțiune 1.39%, decât cele măsurate pentru filmele fabricate din PHB și PHBV comercial. **Capitolul V** prezintă principalele realizări ale prezentei teze și include concluziile generale și perspectivele descoperirilor noastre.

Am demonstrat fără echivoc faptul că *H. elongata* 2FF poate produce polihidroxibutirat (PHB) atunci când este cultivată în medii cu limitare de nutrienți. Acesta a fost primul raport care a răspuns la întrebarea „ce tip de PHA este produs de *Halomonas elongata*?”. Mai mult, o evaluare chimică și fizică cuprinzătoare a PHB-ului sintetizat de către *Halomonas elongata* a fost raportat de noi.

În cadrul acestei teze am efectuat analize cinetice de creștere pentru această tulpină ambientală și am demonstrat că este capabilă să producă 40% PHB din bio-masa uscată atunci când tulpina este cultivată pe un mediu dublu limitat de nutrienți. Am demonstrat pentru prima dată că *Halomonas elongata* este capabil să transforme substraturile de carbon precum melasa (atât din trestia de zahăr, cât și melasa sfeclei de zahăr), lactoza sau glicerolul în PHB. Descoperirile noastre au demonstrat că această tulpină este un candidat fezabil pentru producerea de PHB din materii prime ce sunt produși secundari industriali. În cele din urmă, am testat pentru prima dată capacitatea acestei tulpini de a produce PHB utilizând glucoza ca sursă de carbon în condiții de cultivare nesterilă.

Ca perspective avem extinderea producției de PHB în bioreactor unde condițiile de cultivare pot fi controlate și optimizate. Evaluarea altor surse de carbon (zer de brânză, amidon, cafea măcinată etc.) pentru producția de PHB utilizând *Halomonas* spp. este necesară pentru a lărgi gama de substraturi ieftine, din punct de vedere economic, care ar putea fi utilizate pentru producția industrială de PHA în condiții de salinitate ridicată. Mai mult, cunoștințe aprofundate cu privire la mecanismele genetice și biochimice ale sintezei PHB în legătură cu metabolismul celular la *H. elongata* și specii înrudite ar putea fi obținute prin aplicarea abordărilor transcriptomice și metabolomice de ultimă generație. Ingineria genetică la *Halomonas* spp. ar putea fi utilizată pentru supraproducția de PHB sau producerea de poliesteri alternativi ca precursori pentru bioplastice.

În concluzie am descris capacitatea unei tulpini ambientale de *H. elongata* de a produce PHB pe un mediu dublu limita de nutrienți, arătând importanța lacurilor saline ca surse naturale pentru microorganisme cu potențial aplicativ. Apoi am demonstrat capacitatea de sinteză a PHB-ului la tulpina tip *H. elongata* crescută pe surse alternative de carbon, sugerând astfel potențialul său de a fi utilizat în următoarea generație de biotehnologie industrială bazată pe microorganisme extremofile. În cele din urmă, am demonstrat că, atunci când tulpina este cultivată în condiții nesterile, *H. elongata* poate produce PHB din glucoză în condiții nesterile. PHB-ul extras se poate utiliza pentru fabricarea filmelor (de bioplastic) cu caracteristici mecanice promițătoare. Pe baza acestor constatări putem afirma că *H. elongata* este un candidat atractiv pentru producția de PHA la scară industrială și, prin urmare, ar putea fi utilizată pentru a dezvolta tehnologii durabile care să respecte principiile unei economii circulare.