

UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA

Facultatea de Biologie și Geologie

Școala Doctorală de Biologie Integrativă

Teză de doctorat

Rezumat

Conducător științific:

Prof. Dr. Marcel PÂRVU

Doctorand:

Cristina Lorena VĂCAR

Cluj-Napoca

2024

UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA

Facultatea de Biologie și Geologie

Școala Doctorală de Biologie Integrativă

Teză de doctorat

Rezumat

**Micromicete implicate în
biodeteriorare și bioremediere**

Conducător științific:

Prof. Dr. Marcel PÂRVU

Doctorand:

Cristina Lorena VĂCAR

Cluj-Napoca

2024

Cuprins

Listă de abrevieri.....	4
Listă de figuri.....	5
Descrierea tezei de doctorat.....	9
CAPITOLUL I.....	11
Date din literatură.....	11
1. Caracteristici biologice ale micromicetelor.....	11
2. Biodeteriorare la lucrări de patrimoniu din interior.....	13
2.1. Factori abiotici.....	14
2.2. Factori biotici.....	15
3. Aplicații ale micromicetelor.....	17
3.1. Aplicații curente.....	17
3.2. Bioremediere.....	18
3.2.1. Provocări ale contaminării cu metale.....	19
3.2.2. Fitoremediere a substraturilor contaminate cu Hg.....	21
3.2.3. Micoremedierea contaminanților metalici, cu accent asupra Hg.....	26
CAPITOLUL II.....	31
Materiale și metode.....	31
1. Comunitatea de fungi biodeteriorativi ai unor picturi pe pânză.....	31
1.1. Izolarea și identificarea fungilor cultivabili de pe picturi pe pânză.....	31
1.2. Caracterizarea profilului enzimatic.....	33
1.3. Capacitatea de solubilizare a pigmentilor.....	34
1.4. Analize statistice.....	35
2. Comunitatea fungică rezistentă la metale dintr-un sit contaminat cu Hg.....	35
2.1. Descrierea sitului și prelevarea probelor de sol.....	35
2.2. Analiza elementală a solului.....	37

2.3. Izolarea micromicetelor și caracterizarea rezistenței la metale.....	37
2.4. Identificarea speciilor și analiza filogenetică.....	38
2.5. Biosorpția Hg ²⁺ din soluție apoasă.....	39
2.6. Analize statistice	40
3. Strategii de rezistență la Hg în izolatul rezistent <i>Fusarium oxysporum</i>	40
3.1. Concentrația minimă inhibitoare a Hg	40
3.2. Capacități de îndepărtare și biosorbție pentru Hg.....	41
3.2.1. Condiții de cultivare	41
3.2.2. Procesarea probelor	42
3.2.3. Analiza probelor	42
3.3. Strategii de rezistență la Cu, Hg, și Zn.....	43
3.3.1. Condiții de cultivare	43
3.3.2. Procesarea și analiza probelor	46
3.4. Analize statistice	47
3.5. Analiza bioinformatică a mercur reductazei fungice prezumtive	47
CAPITOLUL III	49
Rezultate și discuții.....	49
1. Comunitatea de fungi biodeteriorativi ai unor picturi pe pânză.....	49
1.1. Diversitatea fungilor cultivabili	50
1.2. Caracterizarea profilului enzimatic	51
1.3. Capacitatea de solubilizare a pigmentilor	56
2. Comunitatea fungică rezistentă la metale dintr-un sit contaminat cu Hg.....	60
2.1. Concentrații de metale în probele de sol.....	61
2.2. Tipare filogenetice de identitate și rezistență la metale ale fungilor izolați.....	62
2.3. Capacități de îndepărtare și biosorbție pentru Hg ²⁺ din soluție apoasă	71

3. Strategii de rezistență la Hg în izolatul rezistent <i>Fusarium oxysporum</i>	73
3.1. Limita de rezistență la Hg	73
3.2. Capacități de îndepărtare și biosorbție pentru Hg	74
3.3. Strategii de rezistență la Cu, Hg, și Zn.....	80
3.4. Analiza bioinformatică a mercur reductazei fungice prezumtive	90
CAPITOLUL IV	101
Concluzii	101
Diseminare	103
Mulțumiri	106
Bibliografie	107
Anexa 1	130
Anexa 2	131
Anexa 3	132
Anexa 4	133
Anexa 5	134
Anexa 6	135
Anexa 7	136
Anexa 8	137
Anexa 9	138

Cuvinte cheie

Enzime biodeteriorative, solubilizarea pigmentilor, contaminanți metalici, micoremediere, strategii de rezistență la metale, mercur, biovolatilizarea mercurului.

CAPITOLUL I

Date din literatură

Micromicetele reprezintă un grup extrem de divers de ciuperci microscopice, care aduc atât provocări, cât și oportunități pentru umanitate. Micromicetele demonstrează o reziliență remarcabilă în interacțiunile lor abiotice și biotice, adaptându-se la condiții de mediu dificile prin exploatarea unor nișe ecologice foarte diverse. Descoperirea răspunsurilor fungilor în condiții de mediu complexe și valorificarea potențialelor beneficii pot servi la dezvoltarea a numeroase aplicații.

Biodeteriorarea este alterarea ireversibilă a calității obiectelor de importanță pentru umanitate de către diverse organisme și microorganisme (plante, alge, insecte, bacterii, fungi). Biodeteriorarea obiectelor de patrimoniu este un subiect mai puțin popular, dar care poate pune în pericol integritatea operelor de artă de valoare inestimabilă. Conservarea în clădirile de patrimoniu și muzee poate fi o sarcină dificilă, din cauza condițiilor interioare nefavorabile și limitărilor procedurilor de dezinfecție (Fermo and Comite, 2022). Reprezentanții fungici domină compoziția microorganismelor din aerul și suprafețele din mediul muzeal (Skóra *et al.*, 2015). Mai mult, fungii sunt mai problematici decât bacteriile și joacă rolul cel mai important în biodeteriorarea obiectelor din muzee, colecții și biblioteci (Kavkler *et al.*, 2022; Sterflinger and Piñar, 2013). Progrese importante, dar puține, au fost realizate în înțelegerea proceselor metabolice asociate biodeteriorării micromicetelor asupra picturilor pe pânză. Abordarea aspectelor legate de biodeteriorare, cum ar fi speciile implicate și mecanismele de deteriorare, este esențială pentru a contribui la dezvoltarea strategiilor de conservare și a tehnologiilor de dezinfecție în domeniul operelor de patrimoniu.

Bioremedierea este un proces care folosește microorganisme, plante sau enzime pentru a degrada, detoxifica sau elimina contaminanți din diferite substraturi. Metalele sunt principalii contaminanți ce contribuie la contaminarea solului și a apelor subterane în Europa (Panagos *et al.*, 2013). Elemente chimice toxice precum As, Cd, Hg, Pb sau oligoelemente în concentrații toxice, Cu, Fe, Mn, Zn, pot persista indefinit în mediu. Pentru mercur există o preocupare specială în ceea ce privește sănătatea umană, deoarece este foarte mobil în mediu și tinde să se bioacumuleze și să se biomagnifice în cadrul rețelelor trofice. Toxicitatea celulară la Hg se manifestă ca urmare a afinității sale ridicate pentru grupările tiol ale reziduurilor de cisteină prezente în molecule mici, precum glutatioul, sau în enzime, afectând astfel funcționarea acestora. Zonele din jurul punctelor

critice de poluare cu Hg necesită intervenții urgente pentru a restabili siguranța mediului și a reduce efectele adverse asupra sănătății umane.

Tehnicile convenționale de remediere a mercurului, de exemplu, încapsularea, vitrificarea, imobilizarea chimică, depozitarea în gropi de deșeuri sau spălarea solului, implică costuri excesive, muncă intensă și perturbări extreme ale solului (Rajendran *et al.*, 2022). Aceste limitări au încurajat progresul în domeniul bioremedierii, incluzând fitoremedierea, fitoremedierea asistată de microorganisme sau micoremedierea, ca instrumente pentru remedierea ecologică și durabilă a zonelor afectate de poluarea cu metale. Integrarea fitoremedierii și a asistenței microbiene a apărut ca o abordare pentru dezvoltarea de strategii inovatoare și durabile de remediere, fiind alternative rentabile și ecologice la tehnicile convenționale (Wang *et al.*, 2020). Ciupercile micorizante arbusculare și endofitele fungice pot îmbunătăți fitoremedierea mercurului prin promovarea creșterii plantelor și/sau absorbției mercurului, în special în rădăcini, deși mecanismele moleculare implicate în mobilizarea mercurului din sol în plante nu au fost încă elucidate. Aceste funcții sunt esențiale pentru succesul strategiilor de fitoremediere care vizează diminuarea contaminării cu metale a solurilor (Tiodar *et al.*, 2021).

Micoremedierea este un tip de bioremediere care folosește fungi pentru îndepărtarea, degradarea sau reducerea toxicității a numeroși contaminanți din diverse substraturi. Progresul acestei biotehnologii este incipient din cauza cunoașterii insuficiente a mecanismelor de interacțiune dintre ciuperci și metale. Micromicetele filamentose sunt considerate candidați excelenți pentru remedierea contaminanților metalici, deoarece dețin multiple caracteristici relevante pentru astfel de scopuri. Aria suprafeței mari a celulelor, cu diverse grupări funcționale încărcate negativ în structura pereților celulari și producerea de acizi organici cu proprietăți de legare a metalelor, conferă prima linie de protecție împotriva metalelor toxice. În plus, rețelele de hife permit colonizarea matricei poroase a solurilor. La nivel celular, micromicetele dețin multiple sisteme antioxidante, transportatori de metale la nivelul membranei plasmatică și tonoplastului, molecule ce sechestrează metale și enzime ce produc specierea metalelor (Kumar and Dwivedi, 2021). Investigarea interacțiunii metalelor cu micromicete este importantă pentru avansarea cunoștințelor și a aplicațiilor în domeniul micoremedierii contaminanților metalici.

Două tipuri principale de mecanisme susțin supraviețuirea micromicetelor în prezența metalelor toxice sau în exces: pasive/independente de ATP și active/dependente de ATP. Mecanismele pasive împiedică intrarea metalelor în celule prin adsorbția la peretele celular sau

sechestrarea de către metaboliți secretați și sunt adesea asociate cu termenul de biosorbție (Gadd, 2009). Mecanismele active, denumite colectiv bioacumulare, sunt întâlnite intracelular, ca transportatori de metale la nivelul membranei plasmatică, molecule de legare a metalelor în citosol sau compartimentare în vacuole (Fomina and Gadd, 2014).

În plus față de biosorbția pasivă și bioacumularea activă, biovolatilizarea a fost raportată ocazional ca o strategie de rezistență la Hg în ciuperci (Chang *et al.*, 2020; Chang *et al.*, 2019). Mecanismul de detoxifiere a Hg²⁺ prin biovolatilizare a fost descris la bacterii. Mercur reductaza (MerA) este o flavin disulfid oxidoreductază homodimerică citosolică, care folosește nicotinamid adenin dinucleotid (fosfat) (NAD(P)H) ca factor reducător și flavin adenin dinucleotid (FAD) ca cofactor (Lian *et al.*, 2014; Barkay *et al.*, 2003). MerA este enzima responsabilă pentru reducerea catalitică a Hg²⁺, foarte reactiv, la Hg⁰ monoatomic, volatil și relativ inert care poate părăsi ușor mediul intracelular prin difuzie prin membrana celulară, evitând astfel toxicitatea celulară. Cu toate acestea, mecanismul de reducere a Hg²⁺ la ciuperci nu este bine înțeles, deoarece caracterizarea genetică și biochimică detaliată a acestei enzime nu a fost documentată.

Scop și obiective

Scopul cercetării întreprinse în cadrul acestei teze de doctorat a fost să avanseze înțelegerea rolului micromicetelor în procesele divergente de biodeteriorare și bioremediere. Obiectivele principale au fost:

(1) evaluarea diversității micromicetelor și a mecanismelor lor deteriorative implicate în biodeteriorarea picturilor pe pânză;

(2) caracterizarea micromicetelor rezistente la metale pentru potențialul lor de bioremediere a metalelor, cu accent special asupra mercurului (Hg), și stabilirea principalelor strategii de rezistență la metale într-o micromicetă extrem de rezistentă.

CAPITOLUL II

Materiale și metode

1. Comunitatea de fungi biodeteriorativi ai unor picturi pe pânză

Acest studiu s-a concentrat pe analiza diversității comunității fungice cultivabile și a proceselor metabolice implicate în biodeteriorare. Izolatele fungice au fost recuperate de pe cinci picturi pe pânză, datând din secolele XVIII-XX, cuprinzând patru lucrări în ulei pe pânză de la Muzeul de Artă din Cluj-Napoca și o pictură în guașă pe pânză dintr-o colecție privată.

Prelevarea a fost efectuată neinvaziv, în condiții aseptice, iar suporturile de prelevare au fost incubate pe mediu Czapek-Dox agar. Coloniile fungice pure au fost obținute și utilizate pentru identificarea moleculară, precum și pentru screeningul activităților enzimaticice și capacitatea de solubilizare a pigmentilor. Identificarea moleculară a fost realizată folosind regiuni de spacer intern transcris (ITS), factor de elongare a translației-1 (TEF-1) sau lanțul beta de tubulină (Bt2). Screeningul activității enzimaticice a fost efectuat în medii de cultură specifice pentru lipaze, esteraze, lecitinaze, caseinaze, gelatinaze și amilaze și cu benzi de test API ZYM, pentru o serie de 19 enzime. Capacitatea de solubilizare/degradare a pigmentilor a fost evaluată în mediu de cultură în care s-au adăugat individual pigmentii de culori primare, roșu, galben, albastru, alb și negru, folosiți frecvent în picturi. Pentru validarea acidifierii mediului prin secreție de acizi organici, ca posibil mecanism de degradare a pigmentului, a fost adăugat albastru de bromtimol (pH 6 – galben, pH 7.6 - albastru) în mediul de cultură.

2. Comunitatea fungică rezistentă la metale dintr-un sit contaminat cu Hg

Acest studiu a avut ca scop izolarea și caracterizarea micromicetelor cultivabile cu potențial de bioremediere pentru contaminanții metalici. Izolații fungice au fost recuperate din sol de la rizosfera speciilor de plante care colonizează un sit contaminat.

Situl din cadrul studiului, fosta fabrică de produse clorosodice din Turda, județul Cluj, România, cu o contaminare istorică cu Hg, a fost selectat pentru prelevarea de probe de sol. Conținutul elemental al probelor de sol a fost determinat cu un dispozitiv cu fluorescență cu raze X portabil. Micromycetes were recovered from soil samples by a serial dilution method on Czapek-Dox agar medium. Micromicetele au fost recuperate din probele de sol prin metoda diluțiilor seriale pe mediu Czapek-Dox agar. Spectrul de rezistență la metale al izolatelor fungice a fost investigat pentru 56.2 mg L⁻¹ Cd, 63.5 mg L⁻¹ Cu, 10 mg L⁻¹ Hg, 518 mg L⁻¹ Pb, și 490 mg L⁻¹ Zn, adăugate individual în mediu Czapek-Dox agar. Identificarea moleculară a izolatelor rezistente (Indice de Toleranță – TI ≥ 0.5) la metale a fost realizată folosind regiunea ITS. Analiza de Grupare Ierarhică a fost utilizată pentru a compara modelele de rezistență la metale cu filogenia fungilor. Un set de 7 micromciete a fost selectat pentru testul concentrației minime inhibitoare (MIC), în baza rezistenței lor superioare la Hg și/sau multiple metale. Eficacitatea îndepărtării Hg²⁺ și capacitatea de biosorbție a cinci izolate fungice distincte, cu rezistență superioară la Hg, au fost stabilite în soluție aposă contaminată cu 100 mg L⁻¹ Hg²⁺. Concentrația de Hg²⁺ din supernatant

a fost măsurată printr-o metodă de spectrometrie de absorbție atomică cu generare de vapori reci, la intervalele 0,5 h, 2 h, 6 h, 12 h, 24 h și 48 h.

3. Strategii de rezistență la Hg²⁺ în izolatul rezistent *Fusarium oxysporum*

Obiectivele studiului izolatului *F. oxysporum* P2.7 (ID GenBank: MT913528), rezistent la Hg, au inclus: (1) stabilirea concentrației minime inhibitoare pentru Hg în mediu de cultură lichid, (2) stabilirea principalelor strategii de rezistență (extracelulare, intracelulare sau biovolatilizare) la Cu, Hg și Zn, și (3) studiu bioinformatic al mercuric reductaze fungice prezumtive.

Limitele de rezistență la mercur ale izolatului *Fusarium oxysporum* P2.7 au fost evaluate folosind un gradient de concentrații de Hg (0, 60, 80 și 100 mg L⁻¹ Hg) în mediul de cultură.

Principalele strategiile de rezistență la metale ale izolatului *F. oxysporum* P2.7 au fost studiate în mediu de cultură Luria Bertani (LB) cu 250 mg L⁻¹ Cu, 10 și 100 mg L⁻¹ Hg, și 150 mg L⁻¹ Zn. Mediul de cultură filtrat și biomasa, colectate la sfârșitul expunerii de 48 de ore la metale, au fost procesate și analizate pentru conținutul de metale prin metode spectrometrice sau spectrofotometrice. Un sistem de cultură cu aerare activă a fost conceput pentru a capta Hg volatilizat, folosind materialul Anasorb C300 în alcătuirea unor capcane atașate la acest sistem. Pentru a distinge între fracțiile de metale extracelulare și intracelulare, biomasa a fost spălată cu o soluție de HCl 0,1 M, care desorbe fracția extracelulară, și utilizată apoi pentru determinarea metalelor în fracția intracelulară. Posibilele depunerile celulare de Hg au fost investigate în detaliu prin TEM.

Studiul bioinformatic al mercuric reductaze fungice prezumtive a inclus generarea unui arbore filogenetic pentru secvențe proteice ale enzimei în cele trei Domenii, examinarea caracteristicilor cheie pentru activitatea enzimatică în clase distincte de microorganisme și modelarea secvențelor proteice pentru enzima prezumtivă la *Fusarium oxysporum*.

CAPITOLUL III

Rezultate și discuții

1. Comunitatea de fungi biodeteriorativi ai unor picturi pe pânză

Prin tehnici de prelevare non-invazive au fost recuperate douăzeci și unu de colonii fungice, aparținând la unsprezece specii distincte, opt genuri și două îngrengături, respectiv Ascomycota (86%) și Bazidiomycota (14%). Cele mai multe izolate fungice asociate cu picturi în ulei sau guașă au fost reprezentate de genurile *Penicillium*, urmate de *Aspergillus* și *Alternaria*.

Comunitatea fungică izolată a reflectat în mare măsură diversitatea și abundența descrisă în studiile anterioare referitoare la fungii asociați cu picturi pe pânză. În plus, au fost identificate și alte genuri, inclusiv *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Cladosporium*, *Filobasidium*, *Porostereum* și *Trichoderma*. Prezența speciilor identificate a adus îngrijorări cu privire la calitatea aerului interior, implicarea potențială asupra sănătății și conservarea operelor de artă.

Pe baza frecvenței și intensității activităților enzimice analizate, cazeinazele, amilazele și gelatinazele au fost detectate ca principale enzime biodeteriorative, ce pot facilita colonizarea picturilor pe pânză de către ciuperci. Mai mult, activitățile și intensitățile fosfatazei acide, N-acetil- β -glucozaminidazei, naftol-AS-BI-fosfohidrolazei și β -glucozidazei au fost asociate cu un potențial semnificativ în promovarea colonizării fungice și deteriorării picturilor pe pânză, în timp ce esterazele și leucin arilamidaza au fost identificate ca enzime ce pot contribui la procesul de biodeteriorare. Profilul enzimatic detectat pentru ciupercilor izolate a fost similar între cele două tehnici de pictură investigate.

Pentru 61.9% dintre izolatele fungice s-a observat capacitatea de degradare a pigmentului albastru în mediu de cultură, prin formarea unor halouri incolore, transparente, la marginea coloniilor. Printre aceste izolate s-au numărat speciile *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus luchuensis*, *Aureobasidium pullulans*, *Bjerkandera adusta*, *Penicillium chrysogenum* și *Trichoderma citrinoviride*. Incorporarea indicatorului de pH, albastru de bromtimol, în mediul de cultură cu pigment albastru, a indicat o scădere a pH-ului, sub 6, prin formarea unor halouri galbene, transparente la marginea coloniilor cu capacitate de degradare a acestui pigment, în timp ce în zona necolonizată a mediului, pH-ul s-a situat între 6 și 7,6 (Figura 1). Această scădere a pH-ului asociată cu zonele de degradare a pigmentului albastru de la marginea coloniilor fungice, a indicat că secreția de acizi organici este cel mai probabil responsabilă de acest fenomen de biodeteriorare. Acesta este primul studiu care raportează capacitatea de degradare a pigmentului albastru pentru fungi asociați cu picturile pe pânză, probabil datorită secreției de acizi organici. Mecanismul poate fi atribuit complexării acizilor organici secretați cu atomii de Al din structura rețelei exterioare a pigmentului albastru, ce duce la eliberarea cromoforului intern, și astfel la pierderea culorii specifice. Pentru izolatul *T. citrinoviride* MD91F4 s-a observat o modificare distinctă în prezența pigmentilor albastru și alb: dezvoltarea vizibilă a unei nuanțe de galben în colorarea mediului. Această modificare ar putea fi atribuită secreției de sorbicilinoide, polichetide ciclice întâlnite la câteva ascomicete înrudite la distanță, cunoscute pentru culoarea lor distinctă

galben-portocalie și proprietățile antioxidante, și reprezintă un mecanism suplimentar responsabil de biodeteriorare.

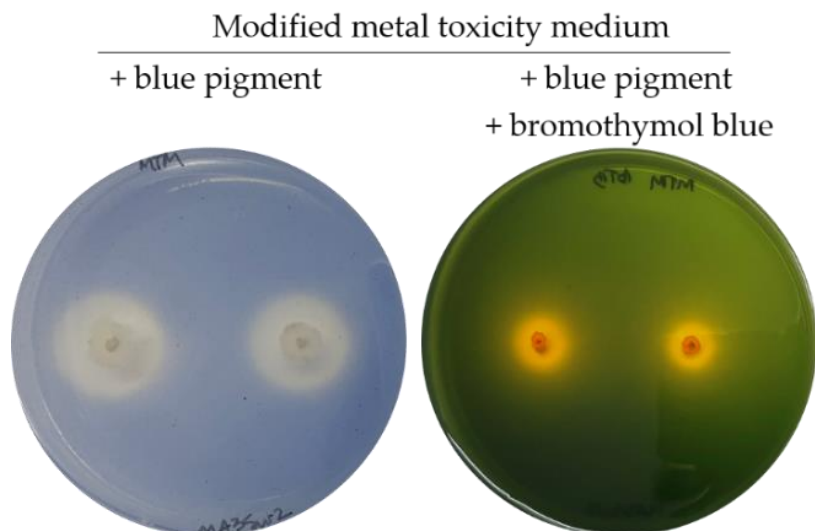


Figura 1. Capacitatea fungilor de a solubiliza pigmentul albastru, într-un mediu de toxicitate metalică modificat, a fost rezultatul secreției de acizi organici, evidențiat prin adăugarea de albastru de bromtimol în mediul care conține pigment albastru (Văcar *et al.*, 2022).

2. Comunitatea fungică rezistentă la metale dintr-un sit contaminat cu Hg

Contaminarea extremă cu Hg la situl studiat a fost confirmată, cu valori ce depășesc pragul de intervenție pentru sol industrial de 3,5 până la 200 de ori. Rezultatele au indicat un risc ecologic extrem de ridicat pentru Hg, risc moderat pentru Pb și risc minim pentru Zn, Cu și Cd, în probele de sol din rizosferă.

Diversitatea celor 32 de izolate fungice cultivabile, cu rezistență moderată sau mai mare (Indice de Toleranță – $TI \geq 0,5$) la cel puțin un metal, a fost ilustrată în Figura 2. Analiza de grupare ierarhică a TIs individuali pentru Hg, Pb, Cu, Zn și Cd a evidențiat dominanța încregăturii Ascomycota în solul puternic contaminat cu Hg și a sugerat o suprapunere în general între tiparele de rezistență la metale și filogenia micromicetelor izolate.

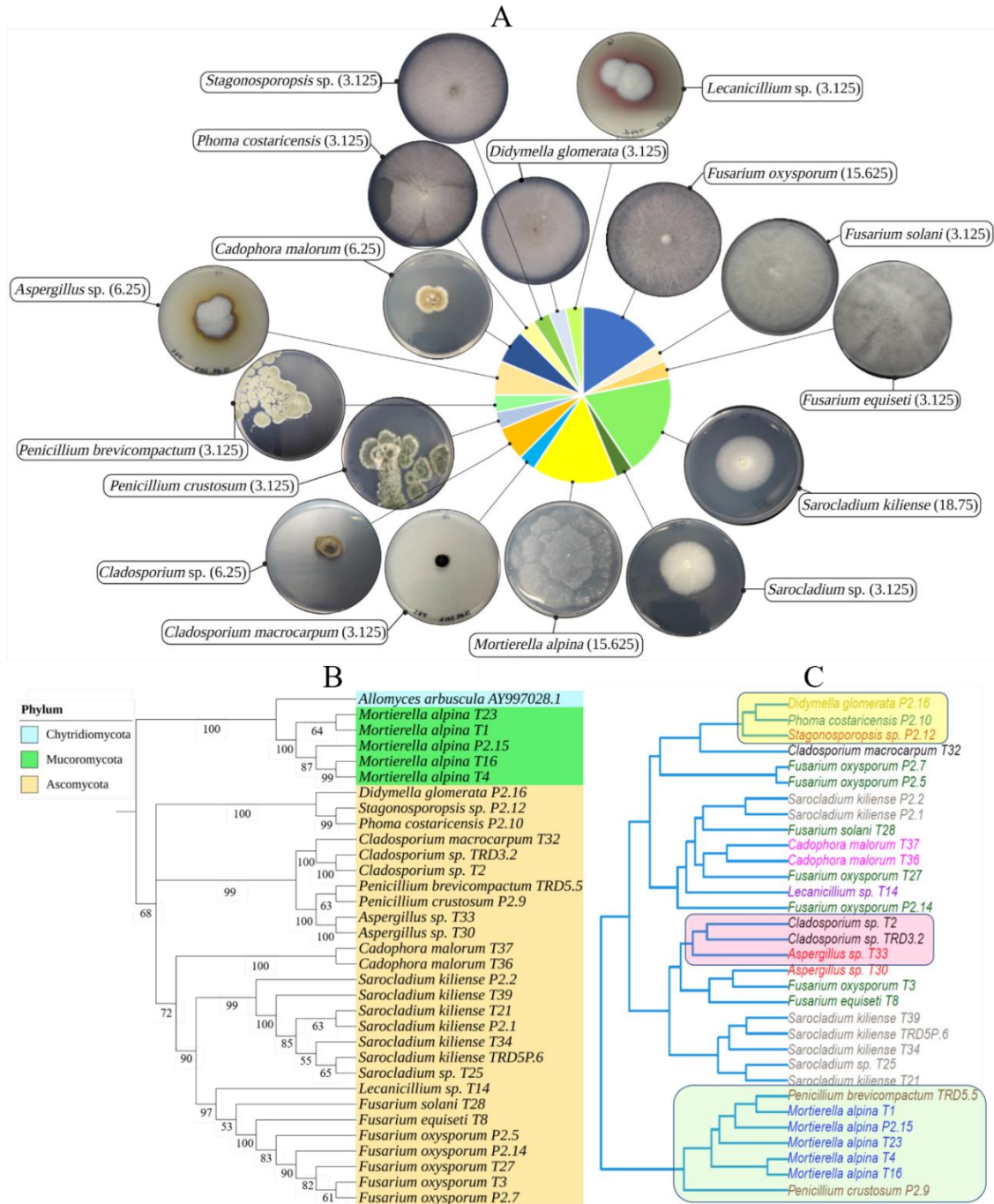


Figura 2. (A) Compoziția comunității fungice izolate și fenotipurile culturilor la 7 zile de creștere pe Czapek-Dox agar, cu procentele speciilor indicate între paranteze (creat cu software-ul BioRender); (B) filogenia speciilor (arbore de tip neighbor-joining) bazată pe secvențele spacerului transcris intern (*Allomyces arbuscula* AY997028.1 a fost utilizat ca outgroup); și (C) dendrograma analizei de grupare ierarhică generată cu indicii individuali de toleranță (Văcar *et al.*, 2021).

Frecvența ridicată a fenotipurilor cu rezistență foarte mare și mare la Hg printre micromicetele investigate a demonstrat presiunea selectivă exercitată de Hg într-un mediu extrem de contaminat. Izolatele cu rezistență superioară la metale joacă probabil un rol ecologic crucial, ca ingineri ecologici *in situ*, reducând biodisponibilitatea acestor elemente și creând microhabitate favorabile pentru creșterea altor microorganisme sensibile. Izolatele *Mortierella alpina*, care aparțin încregăturii Mucoromycota și sunt ocazional simbioți ai plantelor, au fost rar recuperate din probele de sol de rizosferă și au demonstrat sensibilitate la principalii contaminanți, Hg, Pb și Cu. Este posibil ca aceste izolate să fi fost implicate de către speciile de plante indigene în relații simbiotice datorită răspunsului lor chemotactic la exsudatele radiculare, indiferent de profilul lor inferior de rezistență la metale. Prevalența *Fusarium* și a altor genuri identificate, precum *Penicillium*, *Lecanicillium* și *Phoma* în acest studiu, este în concordanță cu raportările anterioare în medii contaminate cu Cu, Pb sau Zn. Acest studiu a raportat noi specii sau genuri de fungi anterior neasociate cu medii contaminate cu Hg, inclusiv *Didymella glomerata*, *Lecanicillium* sp., *Fusarium solani*, *F. equiseti*, *Sarocladium* sp., *Penicillium crustosum*, *P. brevicompactum*, *Cadophora malorum*, *Phoma costaricensis* și *Stagonosporopsis* sp., multe dintre acestea prezentând rezistență foarte mare și mare la Hg.

Izolatele *Fusarium oxysporum* P2.5 și P2.7 au prezentat valori MIC (mg L^{-1}), în mediu solid cu extract de cartof, de 140 și 200 pentru Hg, 2353 și 2092 pentru Zn, și 1568 și 1568 pentru Pb. Izolatul *Phoma costaricensis* P2.10 și izolatul *Cladosporium* sp. TRD3.2 au prezentat valori MIC pentru Hg de 160, în timp ce izolatul *Didymella glomerata* P2.16 a avut o valoare MIC de 200 (mg L^{-1}). Izolatul *Sarocladium kiliense* P2.2 a demonstrat valori MIC de 200 pentru Hg, 1036 pentru Pb, și 381 pentru Cu, în timp ce izolatul *S. kiliense* TRD5P.6 a prezentat valori de 337 și 160 pentru Cd și Hg, respectiv (mg L^{-1}).

Potențialul de îndepărtare și biosorbție a biomasei proaspete dezvoltate de cinci izolate fungice distincte a fost evaluat într-o soluție apoasă cu $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$, în condiții de agitare (120 rpm), pe parcursul unei perioade de contact de 48 de ore (Figura 3). În decurs de 30 de minute, biomasele fungice au îndepărtat între 28% și 52% din Hg^{2+} inițial. Biomasa produsă de *Didymella glomerata* P2.16 a prezentat cea mai mare eficiență de îndepărtare, 93% după 2 ore de incubare. Adsorbția aproape a atins echilibrul, în decurs de 12 ore, pentru biomasa tuturor izolatelor. La finalul perioadei de incubare, eficacitățile de îndepărtare a biomasei fungice proaspete au fost: $97 \pm 0,4\%$ (*D. glomerata*) > $62 \pm 5,1\%$ (*F. oxysporum*) $\approx 61 \pm 3,9\%$ (*Cladosporium* sp.) > $56 \pm$

5,0% (*Phoma costaricensis*) > 47 ± 8,0% (*S. kiliense*) (medie ± interval de încredere de 95%, n = 3). Capacitățile de biosorbție pentru Hg²⁺ au variat între 33,8 ± 5,8 pentru *P. costaricensis* și 54,9 ± 11 mg g⁻¹ masă uscată, pentru *S. kiliense* (medie ± interval de încredere de 95%, n = 3).

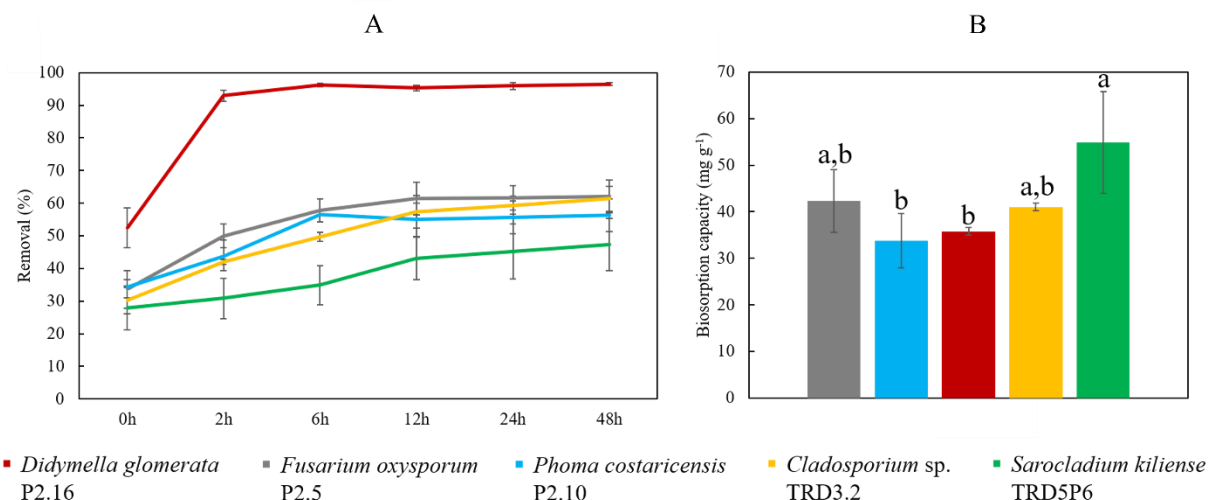


Figura 3. Potențialul de biosorbție al mercurului pentru cinci biomase proaspete de izolate fungice din soluția apoasă cu 100 mg L⁻¹ Hg²⁺ pe parcursul a 48 de ore, cu agitație la 120 rpm: (A) îndepărtare și (B) capacitate de biosorbție; valorile reprezintă medii, barele de eroare reprezintă intervalele de încredere (n = 3, interval de încredere de 95%) și barele cu litere diferite sunt semnificativ diferite (confirmat prin testul Tukey, p < 0,017) (Văcar *et al.*, 2021).

3. Strategii de rezistență la Hg²⁺ în izolatul rezistent *Fusarium oxysporum*

Valoarea MIC pentru Hg, reprezentând concentrația de Hg în mediu la care creșterea fungică este oprită, a fost de 100 mg L⁻¹ Hg în mediu lichid cu extract de cartof (PDB) pentru izolatul *Fusarium oxysporum* P2.7.

Capacitățile de îndepărtare și de biosorbție (Q) a Hg²⁺ pentru biomasa izolatului *Fusarium oxysporum* P2.7 au fost de 81,53% și, respectiv, 9,66 mg Hg²⁺ g⁻¹ masă uscată, în 200 mL de mediu LB cu 100 mg L⁻¹ Hg²⁺ adăugat, timp de 48 de ore, la 28°C, cu agitație la 120 rpm. Din fracția totală de Hg care a interacționat cu biomasa, 47,57% a fost îndepărtat prin imobilizare extracelulară, 30,4% prin acumulare intracelulară și posibil 22,03% prin biovolatilizare.

Micrografiile TEM au evidențiat structura tipică a peretelui celular pentru hifele control (Figura 4A). Peretele celular al hifelor tratate cu Hg²⁺ (Figura 4B, C) pare să își piardă integritatea, deoarece stratul de manoproteine a fost mai puțin electrondens decât în celulele control, indicând o dezintegrare parțială a acestui strat. Alte semne de toxicitate a Hg observate au fost detașarea

completă a membranei plasmatice de peretele celular sau dezintegrare organitelor cu membrane. Remarcabil, granule electrondense, cu diametre cuprinse între 11 și 60 nm, au fost observate la nivelul stratului exterior de manoproteine al peretelui celular, la exteriorul membranei plasmatice și în interiorul celulei în regiunea organitelor dezintegrate, numai în celulele tratate cu Hg^{2+} . Este probabil ca granulele electrondense să reprezinte agregate de Hg^0 , datorită formei lor circulare, sau alte compuși de Hg, deoarece acestea au fost observate numai în celulele tratate cu Hg^{2+} și par a fi asociate cu semne de toxicitate celulară în principalele componente celulare.

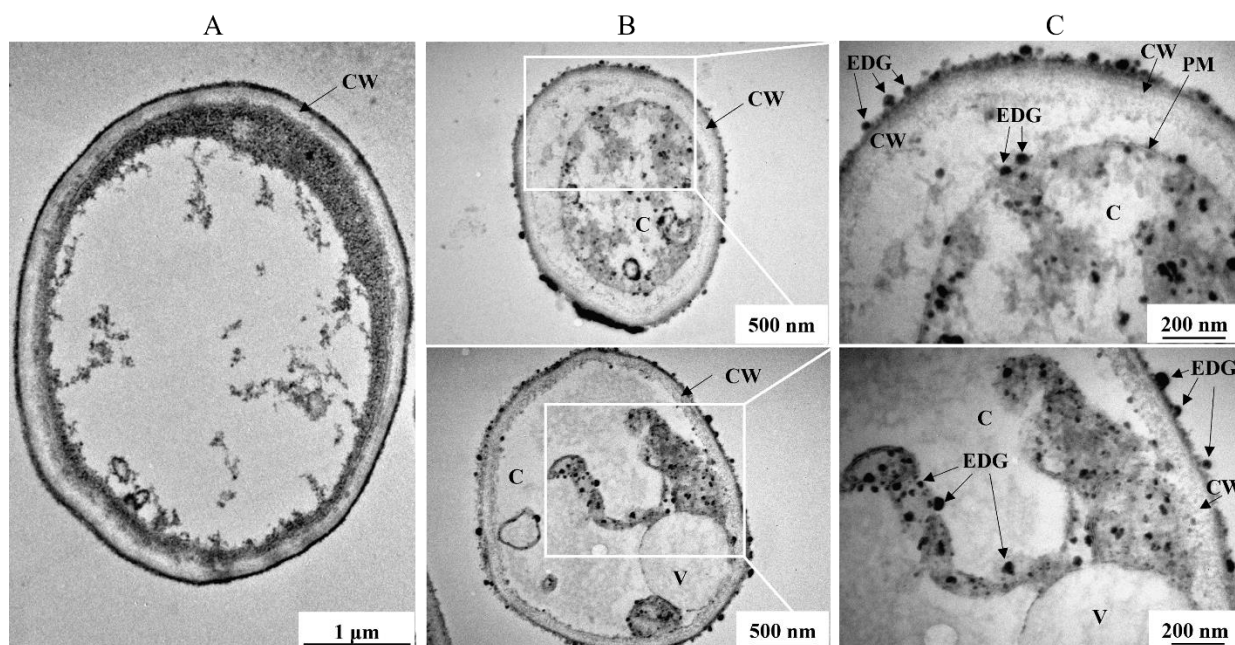


Figura 4. Micrografii TEM pentru secțiuni transversale ale (A) celulei control de *Fusarium oxysporum* P2.7 și (B) ale unor celule tratate cu $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$ timp de 48 de ore în mediu de cultură LB, detaliate în (C) inserții; CW - perete celular, V - vacuolă, C - citoplasmă, PM - membrană plasmatică, EDG - granule electrondense.

Concentrațiile de Hg din mediul de cultură la sfârșitul experimentului (48 ore) cu izolatul *Fusarium oxysporum* P2.7 în volum de cultură de 50 ml cu 10 și $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$ și 120 rpm, au fost statistic semnificativ mai mici ($p < 0,001$) în tratamentul inoculat decât în cel neinoculat, la ambele concentrații inițiale de Hg. Variantele inoculate au prezentat o eficacitate de îndepărtare a biomasei micromicetei de $93,73 \pm 0,88\%$ și $83,09 \pm 0,62\%$ la 10 și respectiv $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$ (media \pm SD, $n=3$). Capacitățile de biosorbție a Hg^{2+} (mg g^{-1} masă uscată) pentru biomasa micromicetei au fost de $0,288 \pm 0,015$ și $4,75 \pm 0,793$, la 10 și respectiv $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$. Biomasa

a reținut $9,38 \pm 0,72\%$ și $12,77 \pm 3,29\%$, în timp ce $5,18 \pm 0,92\%$ și $14,68 \pm 0,69\%$ a rămas rezidual în mediul de cultură, la 10 și, respectiv, 100 mg L⁻¹ Hg²⁺ (media ± SD, n=3). Biovolatilizarea a fost calculată a fi responsabilă pentru îndepărtarea a $26,45 \pm 0,42\%$ și $5,29 \pm 4,2\%$, la 10 și respectiv 100 mg L⁻¹ Hg²⁺ (media ± SD, n=3).

La concentrația non-inhibitoare de 10 mg L⁻¹ Hg²⁺, răspunsul a fost probabil orientat către un mecanism care promovează reducerea Hg²⁺ și volatilizarea ca Hg⁰, deoarece volatilizarea (26,45%) a reprezentat o proporție mai mare din strategiile de rezistență decât retenția în biomasă (9,38%). Alternativ, celulele expuse la concentrația inhibitoare de 100 mg L⁻¹ Hg²⁺ ar fi putut inițial să-și direcționeze răspunsul către reducerea Hg²⁺, rezultând o biovolatilizare de 5,29%, până când populația de celule a fost progresiv inactivată din cauza efectelor toxice ale Hg. Ulterior, biomasa inactivată ar fi putut funcționa ca un adsorbent pasiv până la saturarea completă, în concordanță cu capacitatea mai mare de biosorbție a biomasei la această concentrație.

Modificarea concentrației de metale (inițial 250 mg L⁻¹ Cu, 10 mg L⁻¹ Hg și 150 mg L⁻¹ Zn) în culturile LB de 50 mL cu aerare activă a fost monitorizată la momentul adăugării metalelor (0 h) și la sfârșitul perioadei de incubare (48 h) (Figura 5A-C). Eficiențele de îndepărtare au fost $6,84 \pm 0,99\%$ pentru Cu, $90,67 \pm 3,88\%$ pentru Hg și $4,67 \pm 2,21\%$ pentru Zn (medie ± SD, n=6) (Figura 5D). Cu toate acestea, eficiența de îndepărtare a izolatului *F. oxysporum* P2.7 a fost semnificativ diferită doar pentru Hg, între tratamentele neinoculate și inoculate ($p < 0,05$), în condiții de aerare activă. Capacitățile de biosorbție (mg metal g⁻¹ masă uscată) ale izolatului *F. oxysporum* P2.7 au fost $13,2 \pm 1,19$, $2,51 \pm 0,09$ și $2,87 \pm 0,65$ în mediu LB contaminat cu (mg L⁻¹) 250 Cu, 10 Hg și respectiv 150 Zn (medie ± SD, n=3).

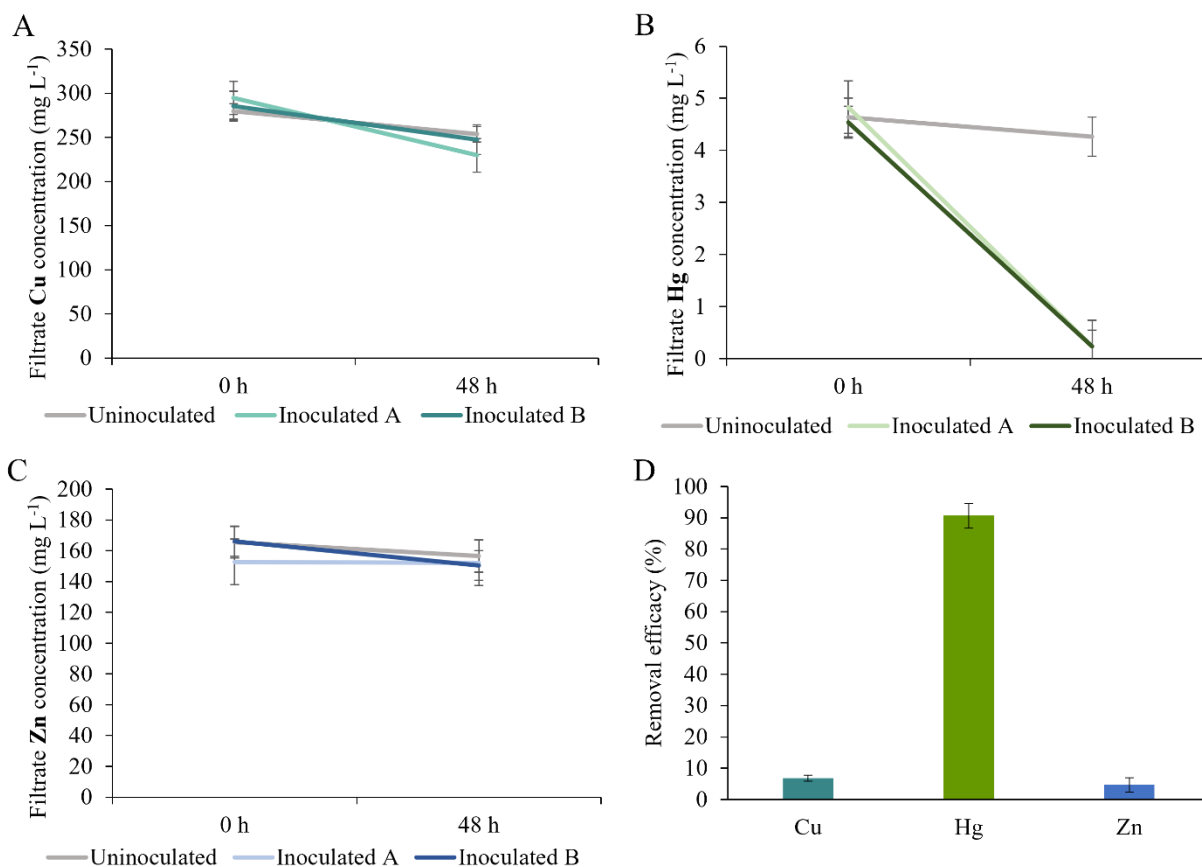


Figura 5. Concentrațiile de Cu (A), Hg (B) și Zn (C) în filtratele culturii izolatului *Fusarium oxysporum* P2.7 au fost măsurate la începutul (0 h) și la sfârșitul (48 h) experimentului, în variantele neinoculate și inoculate A și B. (D) Eficiența de îndepărtare (%) a izolatului *Fusarium oxysporum* P2.7 pentru Cu, Hg și Zn la finalul perioadei de incubare de 48 h; valorile au fost exprimate ca medie ± SD (n=6). Culturile au fost obținute în mediu LB, la 28°C, aerate activ timp de 5 zile, când s-a adăugat 250 mg L⁻¹ Cu, 10 mg L⁻¹ Hg sau 150 mg L⁻¹ Zn, și incubate în continuare timp de 48 h. Barele de eroare reprezintă SD (medie ± SD, n=3).

Principalele strategii de rezistență la Cu, Hg și Zn ale izolatului *F. oxysporum* P2.7 au fost evaluate pe baza concentrațiilor elementelor detectate în biomasele de tip A (biosorbție totală) și tip B (fracția de metal intracelulară) (Figura 6). Cu a fost complet imobilizat la nivelul pereților celulari ai micromicetei, în proporție de 99,99 ± 0,01% (medie ± SD, n=3). Doar 14,55 ± 8,88% din Hg detectat a fost asociat cu fracția extracelulară, în timp ce 48,93 ± 7,07% a fost asociat cu fracția intracelulară, rezultând o imobilizare totală în biomasă de 63,48% (medie ± SD, n=3). O fracțiune importantă de Hg, 36,51 ± 3,11%, a fost asociată cu procesul de volatilizare, capturat de

capcanele pentru Hg (medie \pm SD, n=3). Similar cu Cu, Zn a fost detectat în mare parte în fracția extracelulară, $93,03 \pm 3,02\%$, în timp ce doar $6,97 \pm 3,02\%$ a fost detectat în interiorul celulelor (medie \pm SD, n=3).

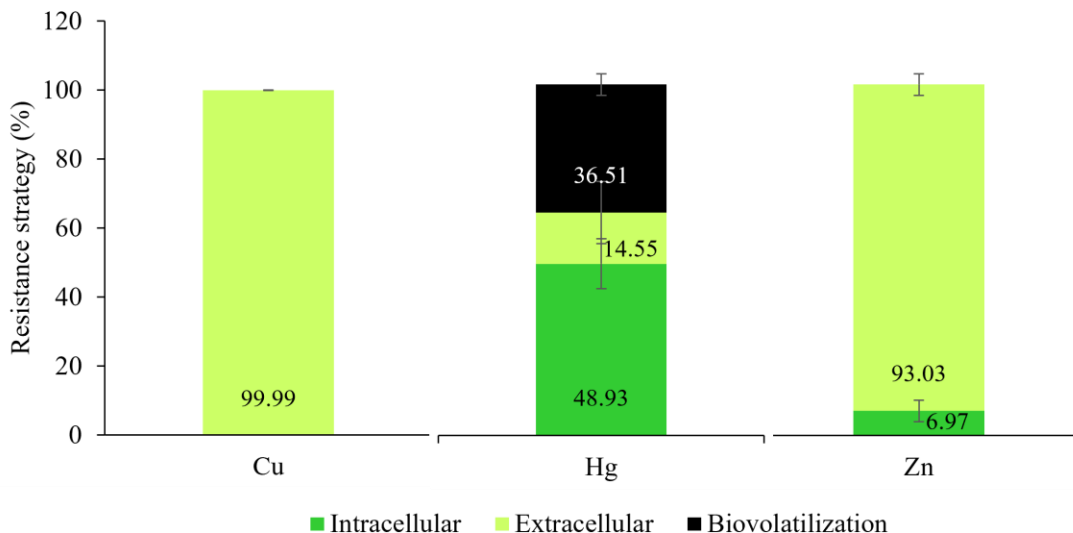


Figura 6. Principalele strategii de rezistență ale izolatului *Fusarium oxysporum* P2.7 după 48 de ore de expunere la 250 mg L^{-1} Cu, 10 mg L^{-1} Hg și 150 mg L^{-1} Zn, în culturi LB aerate activ. Barele de eroare reprezintă SD (medie \pm SD, n=3).

În ansamblu, rezultatele obținute în culturi lichide cu metale au indicat că izolatul *F. oxysporum* P2.7 a adaptat principalele strategii de rezistență la Hg în funcție de condițiile de cultură și concentrația inițială de Hg. Imobilizarea extracelulară a fost folosită ca primă strategie de apărare, sechestrând Hg^{2+} în peretele celular, urmată de acumularea în citosol, unde s-ar fi putut produce reducerea la Hg^0 , având ca rezultat volatilizarea și difuzarea în afara celulei. Rezistența micromicetei împotriva stresului la concentrații ridicate de Cu și Zn a fost atribuită strategiilor de evitare, cu o acumulare intracelulară limitată sau deloc, deoarece cea mai mare parte a interacțiunii acestor elemente cu biomasa a fost asociată cu fracția extracelulară.

Biovolatilizarea Hg^{2+} în izolatul *F. oxysporum* P2.7 a fost un proces dedus care contribuie la fenotipul său puternic rezistent la Hg. Rezistența la Hg prin biovolatilizare a fost raportată anterior la speciile de micromicete. Cu toate acestea, caracterizarea detaliată a mecanismelor fungice responsabile de reducerea Hg^{2+} nu a fost raportată. Secvența cu codul ENH73124.1 din NCBI (secvență de aminoacizi) a fost adnotată ca mercur reductază (MerA) în genomul *F.*

oxysporum, fără caracterizare biochimică sau genetică, și a fost utilizată pentru a efectua un studiu bioinformatic comparativ cu enzima caracterizată de la bacterii.

O analiză filogenetică a MerA în cadrul celor trei Domenii de viață a fost utilizată pentru a dezvălui calea evolutivă a enzimei prezumtive în Fungi, în raport cu Bacteria. A fost indicat un posibil strămoș comun pentru secvențele MerA fungice și cianobacteriene. Majoritatea secvențelor MerA fungice au avut motivul sitului catalitic CLNVGC conservat în comun cu Cyanobacteria, distinct de motivul CVNVGC conservat la Bacteria și Archaea, sugerând o origine comună a mecanismului MerA pentru Fungi și Cyanobacteria. Lipsa perechii de reziduri de cisteină a capătului carboxil-terminal, în structura primară MerA atât la ciuperci, cât și la cianobacterii, esențială pentru activitatea enzimei bacteriene, a susținut ipoteza unui mecanism distinct față de cel din bacterii. Această presupunere a fost consolidată de un studiu care a raportat interacțiuni MerA-glutaredoxină ca alternativă viabilă pentru mecanismul de reducere a Hg^{2+} în cianobacteria *Synechocystis* spp. PCC6803 (Marteyn *et al.*, 2013). S-a presupus că MerA ar putea fi glutatationilată în timpul reducerii Hg^{2+} , apoi deglutatationilată de enzima glutaredoxină Grx1, deoarece atât MerA, cât și Grx1 au fost cruciale pentru supraviețuirea celulelor în prezența Hg. Mai mult, comutarea activității enzimelor prin glutatationilare/deglutatationilare este un proces biologic specific pentru eucariote (Marteyn *et al.*, 2013).

Modelarea secvenței MerA prezumtive la *F. oxysporum* a prezis o configurație homodimerică așteptată (Figura 7). Structura cuaternară a secvenței proteice modelate s-a potrivit în general cu aceea a enzimei cu structură cristalizată de la *Pseudomonas aeruginosa*. În plus, localizarea celor două reziduuri de cisteină ale sitului catalitic, în interiorul enzimei, s-a potrivit între aceste modele. Suprapunerea acestor două modele a susținut potrivirea configurației lor, deși s-au putut observa diferențe ușoare în structura terțiară, ca unghiuri distinctive ale plierilor lanțurilor de peptide.

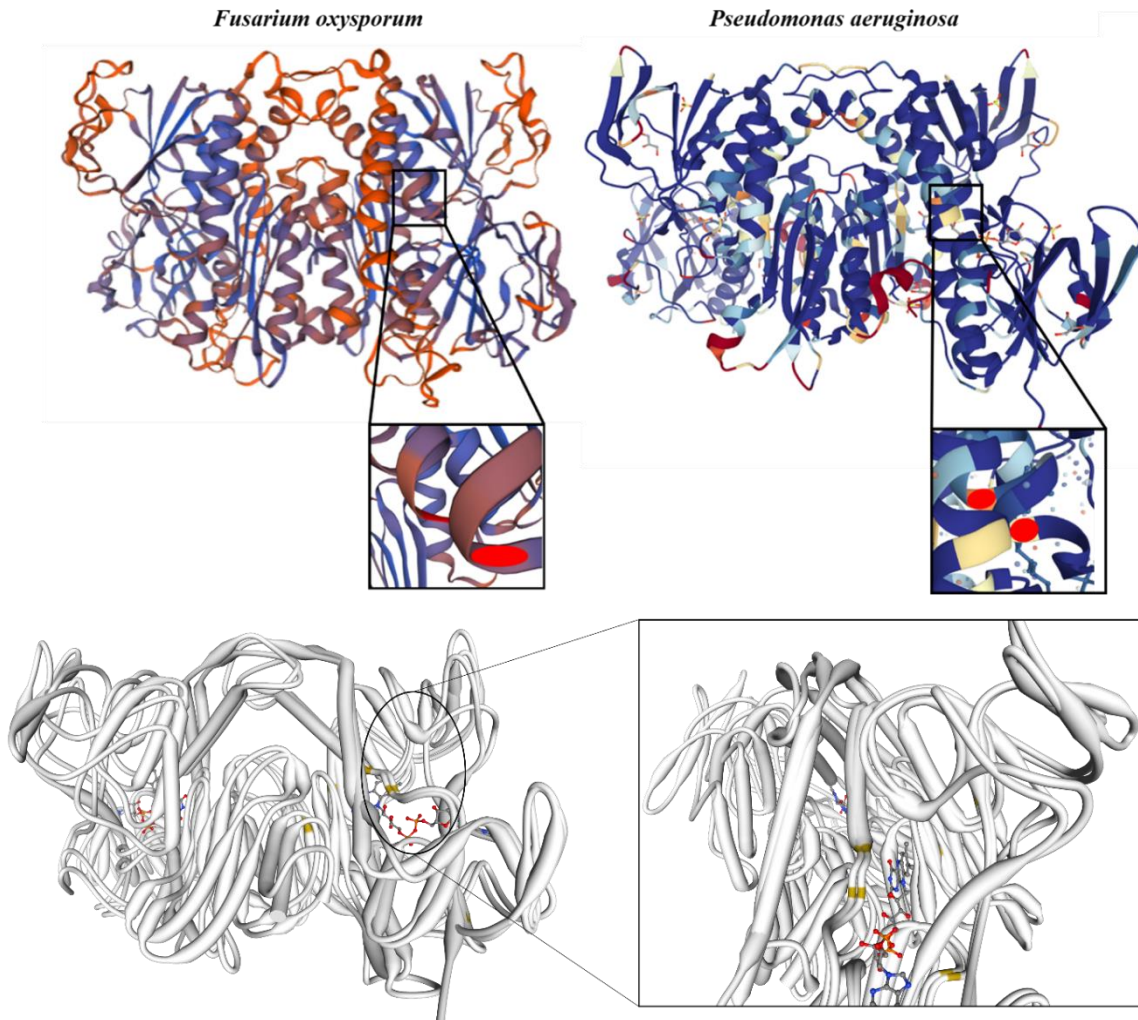


Figura 7. Modelarea secvențelor de proteine cu SWISS-MODEL pentru MerA prezumtivă la *Fusarium oxysporum* și MerA caracterizată la *Pseudomonas aeruginosa* (benzi colorate, partea de sus); suprapunerea celor două secvențe de proteine modelate cu molecula de FAD, reprezentată cu albastru și roșu (model cilindric, partea de jos); inserțiile evidențiază pozițiile reziduurilor de cisteină conservate ale sitului catalitic (zone roșii sus, inele galbene jos).

CAPITOLUL IV

Concluzii

Examinarea fungilor asociați cu picturi pe pânză, datând din secolele XVIII-XIX, a oferit perspective valoroase asupra rolului micomicetelor în procesele de biodeteriorare. Originalitatea acestui studiu a constat în examinarea amplă a proceselor metabolice fungice implicate în biodeteriorare, realizată printr-un screening cuprinzător pentru o serie de enzime și pentru

solubilizarea pigmentilor. Reprezentanții Ascomycota, în principal din genul *Penicillium* urmat de genurile *Aspergillus* și *Alternaria*, au fost izolați cel mai frecvent, iar diversitatea fungilor a fost în general tipică pentru mediile interioare din muzee. Mai multe enzime cheie asociate cu procesele de biodeteriorare au fost detectate, sugerând un risc semnificativ pentru lucrările de artă studiate. Aceste enzime includ caseinazele, amidazele, gelatinazele, fosfatazele acide, N-acetilglucosaminidazele, naphthol-AS-BI-fosfohidrolazele și β -glucosidazele. În plus, majoritatea izolatelor fungice au prezentat capacitatea de a decolora pigmentul albastru, probabil printr-un mecanism de complexare a metalelor din structura pigmentului, facilitat de secreția de acizi organici. Un alt mecanism observat, care ar putea produce modificări estetice ireversibile picturilor pe pânză, a fost secreția de pigment de către fungi. În perspectivă, colecția de izolate fungice ar putea fi utilizată pentru caracterizarea în profunzime a mecanismelor biochimice și a impactului acestora asupra constituenților individuali din compoziția picturilor. În plus, ar putea contribui la studii care evaluează eficacitatea tehnologiilor de inactivare pentru promovarea practicilor de conservare.

Studiul micromicetelor rezistente la metale, native unui sit cu contaminare istorică cu Hg și metale, a avansat potențialul lor semnificativ în scopuri de bioremediere, în special pentru tratarea substraturilor puternic contaminate cu Hg. Treizeci și două de izolate de micromicete rezistente la metale au fost recuperate din probele de sol contaminat, folosind tehnici clasice de cultivare și identificate molecular. Spectrul și gradul de rezistență la Cd, Cu, Hg, Pb și Zn al izolatelor fungice a reflectat indicii de risc ecologic generați pentru probele de sol, indicând faptul că populația fungică s-a adaptat la condițiile toxice. Îndepărtarea Hg^{2+} din soluție apoasă după 48 de ore de tratament a fost demonstrată cu rate de eficacitate de 47-97%, și capacități de biosorbție de 33.8-54.9 mg Hg g⁻¹ masă uscată, pentru un set de cinci micromicete selectate. Aceste constatări subliniază rolul promițător al speciilor fungice identificate ca mijloace eficiente de micoremediere pentru substraturi apoase puternic contaminate cu Hg^{2+} , sugerând potențialul lor de aplicare în eforturile de remediere a mediului înconjurător. Cercetările ulterioare ar trebui să se concentreze pe investigații detaliate ale mecanismelor moleculare și biochimice implicate în rezistența la metale în aceste izolate. Înțelegerea determinantilor specifici ai rezistenței la metale este esențială pentru avansarea tehnologiilor de micoremediere.

Studiul izolatului extrem de rezistent la metale, *Fusarium oxysporum* P2.7, pentru limitele și strategiile de rezistență, eficacitatea de îndepărtare și capacitatea de biosorbție pentru Hg,

combinat cu examinarea bioinformatică a mercur reductazei fungice prezumtive, reprezintă o contribuție valoroasă în înțelegerea interacțiunii micromicetelor cu Hg și în domeniul materialelor adsorbante noi. Utilizarea culturilor lichide aerate activ cu capcane de Hg atașate, reprezintă o abordare inovatoare în studiul procesului de biovolatilizare a Hg. Izolatul a manifestat o rezistență ridicată la Hg, deoarece creșterea sa a fost oprită la $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$ în mediu lichid. Mai mult, biomasa micromicetului s-a dovedit a fi foarte eficientă pentru îndepărtarea Hg^{2+} (81.53-93.73%), în prezența substanțelor nutritive din mediul lichid, indiferent de concentrația inițială de Hg. Strategiile principale de rezistență în izolatul *F. oxysporum* P2.7 împotriva Hg au fost imobilizarea celulară (sechestrarea extracelulară și acumulare intracelulară) și probabil biovolatilizarea. Cu toate acestea, gradul de contribuție a acestor strategii de rezistență a variat în funcție de concentrația inițială de Hg^{2+} și de condițiile de volum și aerare ale culturii. Strategiile de evitare și/sau imobilizare extracelulară au fost folosite de micromicetă împotriva stresului Cu și Zn. Cu toate acestea, capacitățile de biosorbție pentru Cu, relevante pentru dezvoltarea aplicațiilor de remediere, au fost stabilite pentru biomasa izolatului *F. oxysporum* P2.7. O secvență de proteină a mercur reductazei prezumtive, din genomul *F. oxysporum*, este probabil omologul enzimei bacteriene caracterizate, datorită prezenței motivului catalitic conservat, a localizării citosolice precise și a conformației proteinei modelate. Analizele filogenetice și structurale au indicat o posibilă origine comună timpurie a acestei enzime pentru cladele Cyanobacteria și Fungi, implicând un mecanism distinct de reducere a Hg^{2+} comparativ cu cel al bacteriilor. Studiul reducerii și volatilizării a Hg^{2+} la fungi este fundamental pentru înțelegerea acestui mecanism mai puțin explorat în ciuperci. O caracterizare amănunțită a mecanismului de reducere a Hg^{2+} în ciuperci ar facilita progresul tehnicilor de micoremediere și ar ajuta la înțelegerea rolului microorganismelor în ciclul global de specierie a Hg.

Diseminare

*Articole publicate în jurnale cu factor de impact (incluse în teza de doctorat)
ca prim-autor*

***Văcar, C.L.**, Covaci, E., Chakraborty, S., Li, B., Weindorf, D.C., Frențiu, T., Pârvu, M., Podar, D. Heavy Metal-Resistant Filamentous Fungi as Potential Mercury Bioremediators. *Journal of Fungi* 2021, 7, 386. <https://doi.org/10.3390/jof7050386>, **IF** 5.816 (2020).

***Văcar, C.L.**, Mircea, C., Pârvu, M., Podar, D. Diversity and Metabolic Activity of Fungi Causing Biodeterioration of Canvas Paintings. *Journal of Fungi* 2022, 8, 589. <https://doi.org/10.3390/jof8060589>, **IF** 5.724 (2021).

ca prim-autor cu contribuții egale (†)

*Tiodar, E.D.†, **Văcar, C.L.**†, Podar, D. Phytoremediation and Microorganisms-Assisted Phytoremediation of Mercury-Contaminated Soils: Challenges and Perspectives. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2021, 18, 2435. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052435>, **IF** 4.614 (2021).

Articole publicate în jurnale cu factor de impact (neincluse în teza de doctorat)

Văcar, C.L.†, Ciorîță, A.†, Tudoran, C., Podar, D., Carpa, R., Leoștean, C., Kacso, I., Mircea, C. Compact cold atmospheric pressure plasma cleaner suited for inhibiting bacterial biodeteriogens from paper archives. *Journal of Cultural Heritage* 2023, 62, 198-205. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2023.05.027>, **IF** 3.1 (2022).

Article published in ISI indexed journals, as contributor author

Tiodar, E.D., Chiriac, C.M., Pošćić, F., **Văcar, C.L.**, Balázs, Z.R., Coman, C., Weindorf, D.C., Banciu, M., Krämer, U., Podar, D. Plant colonizers of a mercury contaminated site: trace metals and associated rhizosphere bacteria. *Plant and Soil* 2024, <https://doi.org/10.1007/s11104-024-06552-7>, **IF** 4.9 (2022).

Bibliografie selectivă

Barkay, T., Miller, S. M., Summers, A. O., 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 355-384, doi:10.1016/s0168-6445(03)00046-9.

Chang, J., Duan, Y., Dong, J., Shen, S., Si, G., He, F., Yang, Q., Chen, J., 2019. Bioremediation of Hg-contaminated soil by combining a novel Hg-volatilizing *Lecythophora* sp. fungus, DC-F1, with biochar: Performance and the response of soil fungal community. *Science of The Total Environment* 671, 676-684, doi:10.1016/j.scitotenv.2019.03.409.

Chang, J., Shi, Y., Si, G., Yang, Q., Dong, J., Chen, J., 2020. The bioremediation potentials and mercury(II)-resistant mechanisms of a novel fungus *Penicillium* spp. DC-F11 isolated from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 396, 122638, doi:10.1016/j.jhazmat.2020.122638.

Fermo, P., Comite, V., 2022. Indoor air quality in heritage and museum buildings. *Handbook of Cultural Heritage Analysis*. Springer, pp. 1003-1031.

Fomina, M., Gadd, G. M., 2014. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Bioresource Technology* 160, 3-14, doi:10.1016/j.biortech.2013.12.102.

Gadd, G. M., 2009. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84, 13-28, doi:10.1002/jctb.1999.

- Kavkler, K., Humar, M., Kržišnik, D., Turk, M., Tavzes, Č., Gostinčar, C., Džeroski, S., Popov, S., Penko, A., Gunde - Cimerman, N., Zalar, P., 2022. A multidisciplinary study of biodeteriorated Celje Ceiling, a tempera painting on canvas. *International Biodeterioration and Biodegradation* 170, 105389, doi:10.1016/j.ibiod.2022.105389.
- Kumar, V., Dwivedi, S. K., 2021. Mycoremediation of heavy metals: processes, mechanisms, and affecting factors. *Environmental Science and Pollution Research* 28, 10375-10412, doi:10.1007/s11356-020-11491-8.
- Lian, P., Guo, H.-B., Riccardi, D., Dong, A., Parks, J. M., Xu, Q., Pai, E. F., Miller, S. M., Wei, D.-Q., Smith, J. C., 2014. X-ray structure of a Hg²⁺ complex of mercuric reductase (MerA) and quantum mechanical/molecular mechanical study of Hg²⁺ transfer between the C-terminal and buried catalytic site cysteine pairs. *Biochemistry* 53, 7211-7222, doi:10.1021/bi500608u.
- Marteyn, B., Sakr, S., Farci, S., Bedhomme, M., Chardonnet, S., Decottignies, P., Lemaire, S. D., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., 2013. The *Synechocystis* PCC6803 MerA-like enzyme operates in the reduction of both mercury and uranium under the control of the glutaredoxin 1 enzyme. *Journal of Bacteriology* 195, 4138-4145, doi:10.1128/JB.00272-13.
- Panagos, P., Van Liedekerke, M., Yigini, Y., Montanarella, L., 2013. Contaminated Sites in Europe: Review of the Current Situation Based on Data Collected through a European Network. *Journal of Environmental and Public Health* 2013, 158764, doi:10.1155/2013/158764.
- Rajendran, S., Priya, T. A. K., Khoo, K. S., Hoang, T. K. A., Ng, H.-S., Munawaroh, H. S. H., Karaman, C., Orooji, Y., Show, P. L., 2022. A critical review on various remediation approaches for heavy metal contaminants removal from contaminated soils. *Chemosphere* 287, 132369, doi:10.1016/j.chemosphere.2021.132369.
- Skóra, J., Gutarowska, B., Pielech-Przybylska, K., Stępień, Ł., Pietrzak, K., Piotrowska, M., Piotrowski, P., 2015. Assessment of microbiological contamination in the work environments of museums, archives and libraries. *Aerobiologia* 31, 389-401, doi:10.1007/s10453-015-9372-8.
- Sterflinger, K., Piñar, G., 2013. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art—tilting at windmills? *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 9637-9646, doi:10.1007/s00253-013-5283-1.
- Tiodar, E. D., Văcar, C. L., Podar, D., 2021. Phytoremediation and Microorganisms-Assisted Phytoremediation of Mercury-Contaminated Soils: Challenges and Perspectives. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18, 2435, doi:10.3390/ijerph18052435.
- Văcar, C. L., Covaci, E., Chakraborty, S., Li, B., Weindorf, D. C., Frențiu, T., Pârvu, M., Podar, D., 2021. Heavy Metal-Resistant Filamentous Fungi as Potential Mercury Bioremediators. *Journal of Fungi* 7, 386, doi:10.3390/jof7050386.
- Văcar, C. L., Mircea, C., Pârvu, M., Podar, D., 2022. Diversity and Metabolic Activity of Fungi Causing Biodeterioration of Canvas Paintings. *Journal of Fungi* 8, 589, doi:10.3390/jof8060589.
- Wang, L., Hou, D., Cao, Y., Ok, Y. S., Tack, F. M. G., Rinklebe, J., O'Connor, D., 2020. Remediation of mercury contaminated soil, water, and air: A review of emerging materials and innovative technologies. *Environment International* 134, 105281, doi:10.1016/j.envint.2019.105281.