



UNIUNEA EUROPEANĂ



GVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECŢIEI SOCIALE ŞI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Școala doctorală de Inginerie



**Utilizarea fenoloxidazelor sintetizate de
streptomicete selecționate în procese de
bioconversie a compușilor xenobiotici
(Rezumatul tezei de doctorat)**

Doctorand,

biolog Claudia-Veronica POPA (UNGUREANU)

Conducător științific,

prof. dr. ing. Gabriela-Elena BAHRIM

Seria I.1 Nr. 4

GALAȚI

2013



DECIZIA
nr. **2293/18.10.2013**

În conformitate cu prevederile Legii Educației Naționale nr. 1/05.01.2011, ale Codului studiilor universitare de doctorat și ale Regulamentului instituțional privind organizarea și desfășurarea studiilor universitare de doctorat;

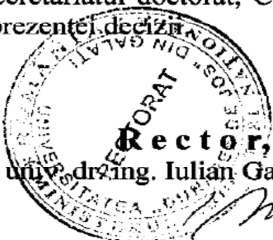
în baza referatului conducătorului științific **Prof.univ.dr.ing. Gabriela-Elena BHRIM**;
conform aprobării Consiliului școlii doctorale din data de **14.10.2013**;
în baza Ordinului Ministrului Educației, Cercetării, Tineretului și Sportului nr. 3288/20.02.2012 privitor la numirea rectorului;

Rectorul universității decide:

Art. 1. Se numește comisia pentru evaluarea și susținerea publică a tezei de doctorat de către doctorandul(a) **ing. POPA D. CLAUDIA-VERONICA (UNGUREANU)**, domeniul **Biotehnologiei**, în următoarea componență :

- | | |
|----------------------------------|---|
| 1. Președinte | Prof.univ.dr.ing. Petru ALEXE
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați |
| 2. Conducător de doctorat | Prof.univ.dr.ing. Gabriela-Elena BHRIM
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați |
| 3. Referent oficial | Prof.univ.dr.biolog Cătălin TĂNASE
Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași |
| 4. Referent oficial | Conf.univ.dr.ing. Lidia FAVIER
Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, France |
| 5. Referent oficial | Conf.univ.dr.ing. Luminița GEORGESCU
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați |

Art. 2. Școala doctorală, Secretariatul doctorat, Compartimentul salarizare și Biroul financiar vor duce la îndeplinire prevederile prezentei decizii.


Rector,
Prof. univ. dr. ing. Iulian Gabriel BÎRSAN
mat



UNIUNEA EUROPEANĂ



GVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OIPOSDRU



Teza de doctorat a fost elaborată cu sprijinul financiar acordat de către proiectul **POSDRU /107/1.5/S/76822, ID proiect: 76822, "Calitatea și continuitatea formării în cadrul ciclului de studii doctorale"-TOP ACADEMIC**, proiect cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007–2013, axa prioritară 1: "Educația și formarea profesională în sprijinul creșterii economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere", domeniul major de intervenție 1.5: "Programe doctorale și postdoctorale în sprijinul cercetării", perioada de implementare: 1 octombrie 2010 – 30 septembrie 2013, Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați.

Cuprins

Introducere	1
I. STUDIUL DOCUMENTAR	
1. Caractere taxonomice, morfologice și fiziologice ale bacteriilor din genul <i>Streptomyces</i>	11
1.1 Actinomicetele, microorganisme potențial producătoare de fenoloxidaze	11
1.2 Taxonomia, morfologia și fiziologia streptomicetelor	11
1.2.1 Răspândirea bacteriilor din genul <i>Streptomyces</i>	11
1.2.2 Taxonomia genului <i>Streptomyces</i>	12
1.2.3 Caractere culturale și microscopice ale streptomicetelor	12
1.2.4 Reproducerea streptomicetelor	17
1.2.5 Caractere fiziologice generale ale streptomicetelor	18
1.3 Metode de izolare și conservare a bacteriilor din genul <i>Streptomyces</i>	18
1.3.1 Tratamentul probelor de sol în vederea izolării streptomicetelor	19
1.3.2 Obținerea și conservarea culturilor pure de <i>Streptomyces</i> spp.	20
1.4 Avantajul utilizării în biotehnologie a streptomicetelor, comparativ cu alte bacterii	21
2. Obținerea și utilizarea în procese de bioconversie a fenoloxidazelor produse de streptomicete	21
2.1 Noțiuni generale privind enzimele din clasa oxidoreductaze	21
2.1.1 Enzimele fenoloxidaze	22
2.1.1.1 Funcțiile biologice ale fenoloxidazelor în natură	23
2.1.1.2 Mecanismul reacțiilor catalizate de fenoloxidaze	24
2.1.1.3 Structura fenoloxidazelor	26
2.2 Condiții biotehnologice pentru producerea și utilizarea enzimelor fenoloxidaze	28
2.2.1 Surse de fenoloxidaze	28
2.2.2 Proprietățile catalitice ale tirozinazei și lacazei sintetizate de bacterii	33
2.2.3 Aplicații biotehnologice ale tirozinazei și lacazei	35
3. Biodegradarea compușilor farmaceutici recalcitranți	
3.1 Contaminarea mediului înconjurător cu compuși xenobiotici recalcitranți	37
3.2 Caracteristicile compușilor farmaceutici recalcitranți poluanți ai mediilor acvatice	39
3.2.1 Carbamazepina	39
3.2.1.1 Structura chimică și proprietățile fizico-chimice	39
3.2.1.2 Contaminarea și efectele poluante ale carbamazepinei asupra mediului înconjurător	40
3.2.1.3 Biodegradarea carbamazepinei	40
3.2.2 Acidul clofibrinic	42
3.2.2.1 Structura chimică	42
3.2.2.2 Contaminarea și efectele poluante ale acidului clofibrinic asupra mediului înconjurător	42

3.2.2.3 Biodegradarea acidului clofibrinic.....	43
3.3 Biostimularea pentru creșterea eficienței tratamentului biologic al compușilor organici recalcitranți.....	44
Referințe bibliografice	45

II. PARTEA EXPERIMENTALĂ

4. Izolarea, selecția și caracterizarea unor streptomicete activ producătoare de fenoloxidaze	55
4.1 Introducere	55
4.2 Materiale și metode de investigare	56
4.2.1 Reactivi și materiale	56
4.2.2 Metode de izolare, întreținere și conservare a culturilor pure de actinomicete aparținând genului <i>Streptomyces</i>	57
4.2.3 Metode de analiză și prelucrare statistică a datelor experimentale	61
4.3 Rezultate și discuții.....	61
4.3.1 Izolarea streptomicetelor din sol	61
4.3.2 Selecția streptomicetelor activ producătoare de fenoloxidaze.....	65
4.3.3 Obținerea fenoloxidazelor cu streptomicete selecționate și caracterizarea proprietăților catalitice	67
4.3.3.1 Proprietățile catalitice ale lacazei	69
4.3.3.2 Proprietățile catalitice ale tirozinazei	73
4.4 Concluzii parțiale	78
Referințe bibliografice.....	79
5. Utilizarea culturilor selecționate de streptomicete pentru biodegradarea carbamazepinei	81
5.1 Introducere	81
5.2 Materiale și metode de investigare, analiză și interpretare a datelor experimentale.....	83
5.2.1 Reactivi și materiale	83
5.2.2 Metode de investigare	83
5.2.2.1 Selecția calitativă a tulpinilor <i>Streptomyces</i> spp. privind rezistența la toxicitatea carbamazepinei	83
5.2.2.2 Testarea capacității tulpinilor selecționate de biotransformare a carbamazepinei în condiții submerse, aerobe, de cultivare.....	84
5.2.2.3 Cuantificarea prin cromatografie HPLC a biotransformării carbamazepinei și a compușilor de biotransformare	84
5.2.3 Metode de analiză statistică și interpretare a datelor experimentale	85
5.3 Rezultate și discuții.....	89
5.3.1 Testarea toxicității carbamazepinei asupra culturilor de streptomicete	89
5.3.2 Testarea capacității tulpinilor de streptomicete selecționate de bioconversie a carbamazepinei	90
5.3.3 Optimizarea condițiilor de biodegradare a carbamazepinei utilizând tulpini selecționate de streptomicete	99

5.3.3.1 Identificarea și selectarea factorilor semnificativi asupra capacității streptomicetelor de biotransformare a carbamazepinei folosind modelul Plackett-Burman	99
5.3.3.2 Modelarea matematică a condițiilor biotehnologice de biotransformare a carbamazepinei (analiza suprafeței de răspuns).....	102
5.4 Concluzii parțiale	110
Referințe bibliografice.....	110
6. Utilizarea culturilor selecționate de streptomicete pentru biodegradarea acidului clofibrice	114
6.1 Introducere	114
6.2 Materiale și metode de investigare, analiză și interpretare a datelor experimentale.....	115
6.2.1 Reactivi și materiale	115
6.2.2 Metode de investigare, analiză și interpretare a datelor experimentale	116
6.2.2.1 Selecția pe criterii calitative a tulpinilor <i>Streptomyces</i> spp., pe baza rezistenței la toxicitatea acidului clofibrice	116
6.2.2.2 Testarea capacității tulpinilor selecționate de biotransformare a acidului clofibrice în condiții submerse, aerobe, de cultivare	116
6.2.2.3 Cuantificarea prin cromatografie HPLC a biotransformării acidului clofibrice și a compușilor de biotransformare	116
6.2.3 Metode de analiză statistică și interpretare a datelor experimentale	117
6.3 Rezultate și discuții.....	118
6.3.1 Testarea toxicității acidului clofibrice asupra culturilor de streptomicete.....	118
6.3.2 Testarea capacității tulpinilor de streptomicete selecționate de bioconversie a acidului clofibrice.....	119
6.3.3 Optimizarea condițiilor de biodegradare a acidului clofibrice utilizând tulpini selecționate de streptomicete	125
6.3.3.1 Identificarea și selecția factorilor semnificativi cu influență asupra capacității streptomicetelor de biotransformare a acidului clofibrice folosind modelul Plackett-Burman	125
6.3.3.2 Modelarea matematică a condițiilor biotehnologice de biotransformare a acidului clofibrice (analiza suprafeței de răspuns)	127
6.4 Concluzii parțiale	135
Referințe bibliografice.....	136
7. Condiții de biodegradare a compușilor farmaceutici recalitranti în culturi multiple, streptomicete-nămol activ	138
7.1 Introducere	138
7.2 Materiale și metode	139
7.2.1 Reactivi și materiale	139
7.2.2 Metode de investigare, analiză și interpretare a datelor experimentale.....	141
7.2.2.1 Testarea capacității biomasei streptomicetelor de biosorbție a compușilor xenobiotici	141
7.2.2.2 Biodegradarea compușilor farmaceutici cu nămol activ.....	142
7.2.2.3 Teste de biostimulare a biodegradării compușilor farmaceutici.....	142

7.2.2.3 Cuantificarea prin cromatografie HPLC a carbamazepinei, acidului clofibrice și a compușilor de biotransformare.....	143
7.2.3 Metode de analiză și de prelucrare statistică a datelor experimentale	143
7.3 Rezultate și discuții.....	144
7.3.1 Evaluarea capacității biomasei de streptomicete de biosorbție a compușilor farmaceutici recalcitranți.....	144
7.3.2 Biodegradarea compușilor farmaceutici (carbamazepină, acid clofibrice) cu nămol activ	144
7.3.3 Evaluarea capacității de biodegradare a carbamazepinei și a acidului clofibrice în culturi multiple <i>Streptomyces</i> MIUG 4.89 și nămol activ	150
7.4 Concluzii parțiale	158
Referințe bibliografice.....	159
8. CONCLUZII GENERALE.....	162
9. CONTRIBUȚII LA DEZVOLTAREA CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU ȘI PERSPECTIVE .	164
10. DISEMINAREA REZULTATELOR CERCETĂRII	165
ANEXĂ	167

Introducere

Prezența micropoluantilor organici solubili în apă și a compușilor farmaceutici în apele reziduale și luarea unor măsuri eficiente de eliminare a acestora este în ultimii ani o permanentă preocupare a cercetătorilor. Unii dintre compușii farmaceutici recalcitranți sunt intens utilizați ca medicamente neprescrise, iar după administrare sunt eliminați în mediul înconjurător, sub formă de substanțe active sau metaboliți, prin urină și materii fecale. Una din principalele surse de dispersie a acestor compuși în mediul înconjurător sunt apele reziduale. Deși aceste substanțe sunt regăsite în concentrații reduse în mediile acvatiche, se consideră că, induc puternice efecte nefaste, la nivel global, sau specifice, la nivel celular sau molecular. Având în vedere resursele limitate de apă la nivel planetar, reducerea și controlul poluării precum și purificarea apelor contaminate în vederea reutilizării sunt soluții pe termen scurt.

Dezvoltarea de noi tehnici pentru eliminarea produșilor chimici xenobiotici din apele reziduale, este intens studiată în prezent, fiind aplicate procedee fizico- chimice și biologice moderne, avansate. Cu toate acestea, este de menționat lipsa studiilor privind eliminarea din mediul înconjurător, prin procedee biologice (aerobe, anaerobe), a unor compuși xenobiotici derivați din produsele de îngrijire personală și produsele farmaceutice. Bioepurarea cu nămol activ este unul dintre cele mai aplicate procedee biotehnologice în tratamentul apelor reziduale. Întrucât nămolul activ este un consorțiu de microorganisme bine adaptat la condițiile fizico-chimice și biologice din apele reziduale, rezultatele privind eficiența epurării sunt în general acceptabile pentru a asigura calitatea apei epurate. Sunt unanim recunoscute eforturile pentru biodegradarea, utilizând microorganismele sălbatice (indigene și zimogene), a compușilor toxici recalcitranți, în categoria cărora intră și o serie de compuși farmaceutici. În aceste cazuri, este recomandată utilizarea în condiții biotehnologice controlate a culturilor de microorganisme selecționate, care prezintă rezistență la acțiunea toxică a substraturilor supuse biodegradării și au totodată potențial de biotransformare prin echipamentul enzimatic pe care îl dețin.

Teza de doctorat intitulată **"Utilizarea fenoloxidazelor sintetizate de streptomicete selecționate în procese de bioconversie a compușilor xenobiotici"** a vizat izolarea de noi tulpini de bacterii filamentoase din genul *Streptomyces* spp., activ producătoare de fenoloxidaze (lacaza și tirozinaza), în vederea selecției unor tulpini capabile să producă biodegradarea cu eficiență sporită a compușilor farmaceutici recalcitranți, carbamazepina și acidul clofibrin. După izolarea și caracterizarea morfologică a culturilor pure de streptomicete s-au selecționat tulpinile activ producătoare de fenoloxidaze (lacaza și tirozinaza) și s-au studiat condițiile biotehnologice pentru producerea acestor enzime. S-au analizat proprietățile catalitice ale fenoloxidazelor produse de streptomicete selecționate. În vederea utilizării tulpinilor selecționate în procese de bioremediere, s-a testat rezistența streptomicetelor la toxicitatea compușilor farmaceutici țintă (carbamazepina și acid clofibrin) și s-a determinat concentrația maximă de compus farmaceutic care să nu afecteze funcționalitatea metabolică a celulelor. Prin tehnici moderne de modelare matematică și analiză statistică (metoda Plackett-Burman, metoda analizei suprafeței de răspuns) s-au identificat și selectat factorii biotehnologici semnificativi cu influență asupra gradului de biotransformare a carbamazepinei și a acidului clofibrin precum și optimizarea condițiilor biotehnologice, în scopul creșterii vitezei și a eficienței de transformare a compușilor xenobiotici studiați. În perspectiva implementării în practică, în stațiile de epurare, și pentru creșterea eficienței economice a bioproceselor studiate, s-a urmărit utilizarea în procesul de bioremediere a culturilor multiple, streptomicete selecționate-nămol activ, și stabilirea condițiilor optime pentru bioconversia compușilor xenobiotici țintă și creșterea randamentului de biotransformare.

În acest context, cercetările derulate pe parcursul studiilor de doctorat au vizat următoarele obiective științifice:

- Izolarea unor noi tulpini de bacterii filamentoase aparținând genului *Streptomyces* spp. și selecția pe criterii calitative și cantitative a producătorilor de fenoloxidaze (tirozinaza și lacaza).
- Studiul condițiilor biotehnologice de producere a fenoloxidazelor cu tulpini selecționate și caracterizarea proprietăților catalitice ale enzimelor sintetizate.
- Evaluarea toxicității compușilor farmaceutici xenobiotici, țintă (carbamazepina și acidul clofibrinic) asupra creșterii și funcționalității metabolice a culturilor de streptomicete selecționate, activ producătoare de fenoloxidaze și studiul capacității acestora de bioconversie a compușilor xenobiotici țintă, corelat cu condițiile fizico-chimice de cultivare.
- Studiul comparativ al biodegradării compușilor farmaceutici (carbamazepina și acidul clofibrinic), în condiții biotehnologice controlate, utilizând nămol activ (stația de epurare a orașului Galați, România și stația de epurare a orașului Rennes, Franța) și culturi de streptomicete selecționate.
- Biostimularea funcționalității culturilor multiple, nămoluri active și tulpini de streptomicete selecționate pentru bioconversia compușilor farmaceutici țintă, în vederea creșterii eficienței proceselor de bioremediere.

Teza de doctorat este structurată în două părți, după cum urmează:

I. STUDIUL DOCUMENTAR, este structurat în 3 capitole și prezintă date actuale din literatura de specialitate privind taxonomia caracterele morfologice și fiziologice ale bacteriilor filamentoase din genul *Streptomyces* și metodele specifice de izolare și conservare a culturilor pure. Se prezintă totodată date privind enzimele din clasa fenoloxidaze (clasificare, structura, proprietățile catalitice), condițiile biotehnologice de producere cu microorganisme selecționate, aplicațiile practice ale acestor enzime, precum și avantajele folosirii acestora în procesele industriale. Sunt prezentate de asemenea microorganismele implicate în biotransformarea compușilor farmaceutici recalcitranti, poluanți ai apelor reziduale și importanța acestora în procesele de bioremediere.

II. PARTEA EXPERIMENTALĂ, cuprinde rezultatele investigațiilor originale realizate pe parcursul stagiului de doctorat și este structurată în patru capitole, după cum urmează:

Capitolul 4, intitulat ***Izolarea, selecția și caracterizarea unor streptomicete activ producătoare de fenoloxidaze*** prezintă strategia și rezultatele obținute privind izolarea din surse naturale a bacteriilor din genul *Streptomyces* spp. și selecția pe criterii calitative și cantitative a unor tulpini active, cu capacitatea de a biosintetiza fenoloxidaze în condiții biotehnologice controlate. Au fost analizate condițiile biotehnologice de producere a fenoloxidazelor (lacaza și tirozinaza) cu tulpini selecționate de streptomicete și s-au stabilit totodată condițiile optime de activitate ale enzimelor sintetizate, evidențiind importanța proprietăților lor catalitice pentru utilizarea în procesele de biodegradare a compușilor farmaceutici recalcitranti, carbamazepina și acidul clofibrinic.

Capitolul 5, intitulat, ***Utilizarea culturilor selecționate de streptomicete pentru biodegradarea carbamazepinei***, a vizat testarea rezistenței tulpinilor de streptomicete față de toxicitatea carbamazepinei, determinarea concentrației maxime de compus farmaceutic care să nu afecteze creșterea și funcționalitatea metabolică a streptomicetelor. De asemenea, utilizând tulpina selecționată *Streptomyces* MIUG 4.89, prin modelare matematică și analiză statistică s-a urmărit identificarea factorilor biotehnologici cu influență în procesul de biodegradare a carbamazepinei și optimizarea condițiilor de biotransformare în scopul creșterii eficienței procesului de bioremediere.

Capitolul 6, intitulat, ***Utilizarea culturilor selecționate de streptomicete pentru biodegradarea acidului clofibrinic***, prezintă rezultatele investigațiilor privind testarea rezistenței tulpinilor de streptomicete față de toxicitatea acidului clofibrinic, determinarea concentrației maxime de compus farmaceutic care să

nu afecteze funcționalitatea streptomicetelor precum și identificarea factorilor biotehnologici cu influență majoră și optimizarea condițiilor biotehnologice de biodegradare a acidului clofibrin cu tulpina selecționată *Streptomyces* MIUG 4.89, în scopul creșterii eficienței biotransformării compusului farmaceutic recalcitrant.

Capitolul 7, intitulat **Condiții de biodegradare a compușilor farmaceutici recalcitranți în culturi multiple, streptomicete-nămol activ**, descrie condițiile de biotransformare a compușilor farmaceutici xenobiotici, carbamazepina și acidul clofibrin, prin activitatea metabolică a streptomicetelor selecționate și a nămolului activ, în monoculturi și în culturi multiple, în condiții controlate de operare, similare cu cele din stațiile de epurare a apelor reziduale.

Fiecare capitol al părții experimentale este structurat într-o succesiune logică a următoarelor subcapitole: *Introducere*, în care se prezintă oportunitatea și obiectivele specifice ale studiilor realizate; *Materiale și metode*, în care sunt descrise materialele, reactivii, culturile de microorganisme și mediile fermentative utilizate în experimentări, precum și metodele de investigare, analiză și de prelucrare a datelor experimentale; *Rezultate și discuții*, în care se prezintă rezultatele originale obținute și compararea acestora cu date similare din literatura de specialitate; *Concluzii parțiale și Referințe bibliografice* specifice.

Capitolul 8, Concluzii generale, prezintă principalele concluzii rezultate din experimentele realizate ce au vizat izolarea și selecția unor bacterii din genul *Streptomyces* spp. activ producătoare de fenoloxidaze (tirozinaza și lacaza), caracterizarea proprietăților catalitice ale fenoloxidazelor sintetizate de streptomicete, evaluarea capacității tulpinilor selecționate de streptomicete de biodegradare a compușilor farmaceutici (carbamazepină și acid clofibrin) precum și biostimularea funcționalității acestora în culturi multiple și nămoluri active pentru utilizare în procese de bioremediere a apelor reziduale poluate cu compuși farmaceutici xenobiotici, în condiții controlate, în stații pilot sau *in situ*.

În final, sunt prezentate **contribuțiile originale** ale tezei de doctorat, cu impact în dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspectivele pentru continuarea cercetărilor, precum și diseminarea rezultatelor obținute în domeniul de cercetare abordat.

Activitățile de cercetare din cadrul tezei de doctorat au fost realizate cu ajutorul infrastructurii moderne de cercetare ale laboratoarelor: *Centrul integrat de cercetare, expertiză și transfer tehnologic (BioAliment-TehnIA)* (www.bioaliment.ugal.ro), din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați; *Laboratorul de Chimia și Ingineria Proceselor*, din cadrul Școlii Naționale Superioare de Chimie, Universitatea din Rennes, Franța.

Studiile doctorale au fost susținute financiar de Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane (POSDRU) – 107/1.5/S/76822 - **Sistem de Management al Burselor Acordate Doctoranzilor-ID 76822**, acronim **Top Academic**.

Pe parcursul studiilor doctorale, doctoranda a fost implicată în echipele de cercetare a 3 proiecte, 1 proiect în cadrul programului IDEI și 2 proiecte de colaborare internațională, cu Franța și China.

Rezultatele cercetărilor desfășurate în cadrul tezei de doctorat au fost prezentate pentru diseminare în **4 articole științifice** publicate sau în curs de publicare în reviste cotate ISI și indexate în baze de date internaționale, **1 capitol publicat într-o carte apărută în editura internațională** (Lambert Academic Publishing, Germania), **9 comunicări** la manifestări științifice reprezentative pentru domeniul biotehnologiei.

Teza de doctorat conține 180 pagini, în care sunt incluse 95 figuri și 18 tabele. Studiul documentar reprezintă 20 % iar partea experimentală 80 %.

II. PARTEA EXPERIMENTALĂ

4. Izolarea, selecția și caracterizarea unor streptomicete activ producătoare de fenoloxidaze

4.1 Introducere

În prima etapă a cercetărilor s-a urmărit izolarea și selecția unor tulpini de streptomicete activ producătoare de fenoloxidaze (tirozinază și lacază), studiul condițiilor biotehnologice de biosinteză a enzimelor și caracterizarea proprietăților catalitice, în vederea stabilirii condițiilor fizico-chimice pentru utilizarea în procese de biotransformare a unor compuși xenobiotici cu structură aromatică.

4.2 Materiale și metode de investigare

▪ Microorganisme

Au fost studiate **40 de tulpini de *Streptomyces* spp.**

Metodele utilizate în cadrul acestui capitol sunt:

- *Metode de izolare a streptomicetelor*
- *Metode de selecție a streptomicetelor producătoare de fenoloxidaze*
- *Cultivarea streptomicetelor pentru biosinteza fenoloxidazelor*
- *Determinarea dinamicii de înmulțire a bacteriei și a concentrația de biomasă acumulată*
- *Metode de obținere a extractului enzimatic brut*
- *Metode de determinare a activității fenoloxidazelor (tirozinază și lacază)*

4.3 Rezultate și discuții

4.3.1 Izolarea streptomicetelor din sol

Tulpinile de streptomicete nou izolate au fost caracterizate din punct de vedere morfologic și diferențiate pe baza caracterelor culturale prin cultivare pe mediul Gauze-agar în concordanță cu caracterele descrise pentru streptomicete în "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (Lechevalier, 1989). Caracteristicile morfologice ale tulpinilor nou izolate au fost comparate și cu cele ale tulpinilor din colecția de microorganisme MIUG.

Coloniile cu caractere morfologice distincte au fost izolate în culturi pure în eprubete cu mediul Gauze înclinat și conservate sub ulei de parafină steril, sau prin păstrare la temperatura de 0...4°C.

4.3.2 Selecția streptomicetelor activ producătoare de fenoloxidaze

Selecția calitativă (preselecția) Tulpinile noi izolate din probele de sol și cele din Colecția de microorganisme (MIUG) au fost testate și verificate pentru capacitatea lor de a produce tirozinază și lacază. Testele preliminare privind producerea de enzime, au fost efectuate în plăci Petri pe mediul Gauze-agar suplimentat cu 1 g L⁻¹ L-tirozină, timp de 7 zile la 25°C.

În funcție de capacitatea tulpinilor de a produce pigmenti melaninici pe reversul coloniei (figura 4.3), au fost selecționate 19 tulpini, totodată realizându-se și o apreciere semicantitativă.

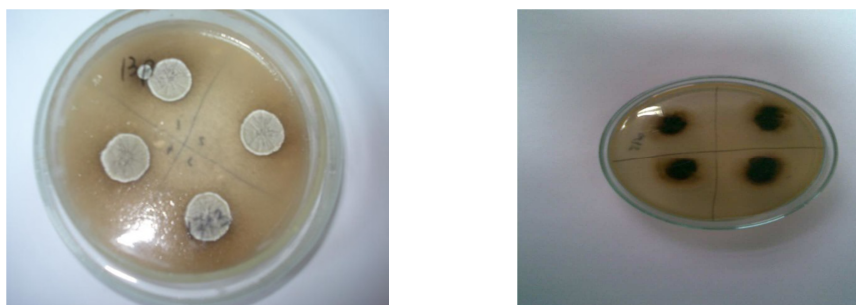


Figura 4.3 Caractere macroscopice ale coloniilor de *Streptomyces* spp. selecționate prin cultivare pe mediul Gauze – agar, suplimentat cu 1 g L^{-1} L-tirozină

S-au considerat bune producătoare de fenoloxidaze tulpinile pentru care raportul dintre diametrul zonei de transformare a substratului a variat între 2 - 3,5.

În funcție de acest raport, tulpinile testate au fost clasificate în mai multe grupe, după cum urmează:

- înalt active: $R_a = 2 - 3,5$; 25 % dintre tulpini;
- slab active: $R_a = 1 - 1,6$; 75 % dintre tulpini.

4.3.3 Obținerea fenoloxidazelor cu streptomicete selecționate și caracterizarea proprietăților catalitice

După cultivarea în condiții submerse pe mediul Gauze lichid, suplimentat cu inductorii L-tirozină sau CuSO_4 , timp de 7 zile, la 150 rpm, s-a separat lichidul cultural care s-a utilizat ca sursă de fenoloxidaze extracelulare (extract brut).

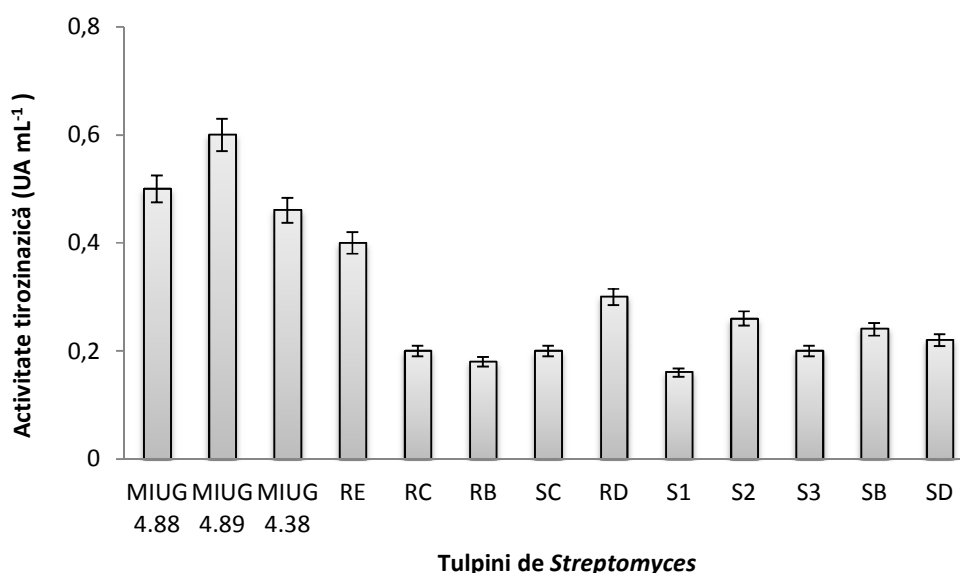


Figura 4.5 Potențialul tulpinilor de streptomicete selecționate de a sintetiza tirozinază extracelulară

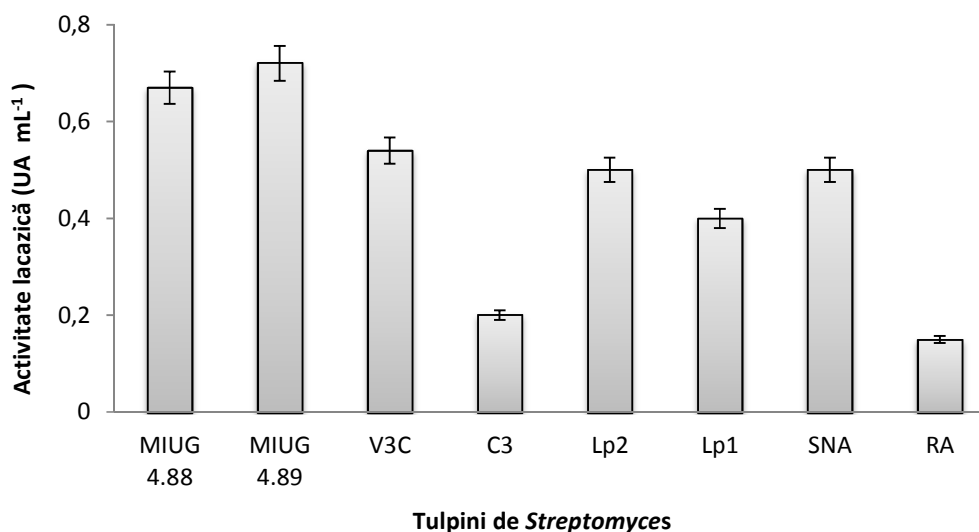


Figura 4.6 Potențialul tulpinilor de streptomicete selecționate de a sintetiza lacază extracelulară

În urma studiilor de evaluare a activității fenoloxidazice a celor 40 de tulpini selecționate luate în studiu s-au evidențiat următoarele tulpini:

- Tulpinile codificate RE, RC, RB, SC, RD, S₁, S₂, S₃, SB, SD, MIUG 4.88, MIUG 4.89 și MIUG 4.38 producătoare de tirozinază (figura 4.5);
- Tulpinile codificate V₃C, C₃, SNA, Lp₁, Lp₂, RA, MIUG 4.88 și MIUG 4.89, producătoare de lacază (figura 4.6).

Se remarcă, tulpinile *Streptomyces* MIUG 4.89 și MIUG 4.88, din colecția MIUG care produc simultan ambele enzime. Tulpinile codificate MIUG 4.88, MIUG 4.89, MIUG 4.38, RE, SNA, V₃C, Lp₂ au prezentat performanțe superioare de biosinteză, și au fost selecționate pentru etapele următoare ale studiului privind obținerea și caracterizarea enzimelor produse.

4.3.3.1 Proprietățile catalitice ale lacazei

▪ Influența concentrației de substrat și a raportului enzimă : substrat

Pentru lacaza produsă de tulpinile *Streptomyces* MIUG 4.89, *Streptomyces* MIUG 4.88 și tulpinile noi izolate codificate V₃C, C₃, Lp₂, Lp₁, SNA și RA s-a variat concentrația de pirogalol în calitate de substrat între 0,005 M și 0,1M și raportul enzimă: substrat, la valori între 0,7:1; 0,8:1; 0,9:1 și 1:1. În figura 4.7 și figura 4.8 se prezintă variația activității lacazice în funcție de raportul enzimă substrat, pentru două dintre extractele enzimatice produse de tulpinile cele mai productive.

Din figura 4.9 se observă că în cazul folosirii drept substrat a pirogalolului la o concentrație de 0,05 M, raportul optim enzimă : substrat este de 1:1. În urma studiului se consideră optime pentru funcționalitatea lacazei produsă de streptomicete următoarele: substratul pirogalol, în concentrație 0,05 M și raportul enzimă:substrat 1:1.

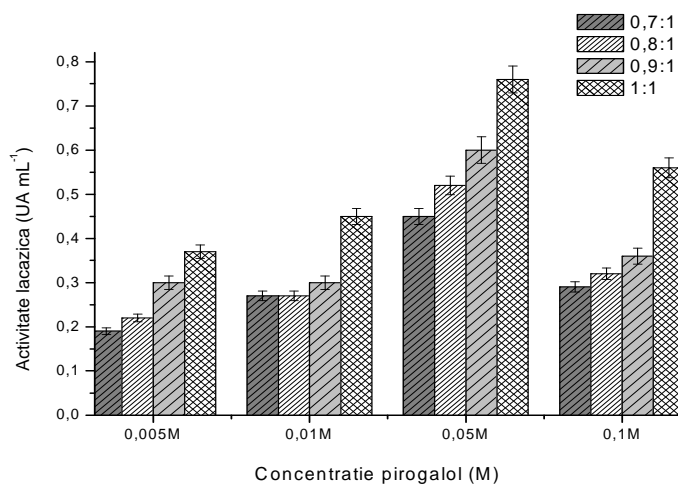


Figura 4.7 Stabilirea concentrației optime de pirogalol pentru funcționalitatea lacazei sintetizată de tulpina *Streptomyces* MIUG 4.88

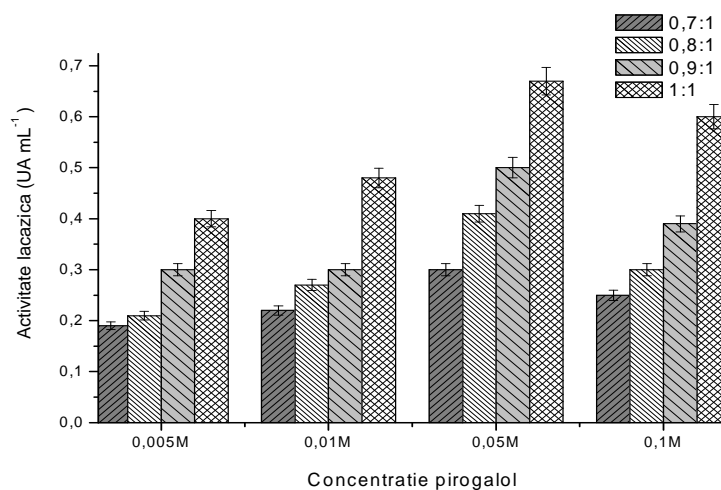


Figura 4.8 Stabilirea concentrației optime de pirogalol pentru funcționalitatea lacazei sintetizată de tulpina *Streptomyces* SNA

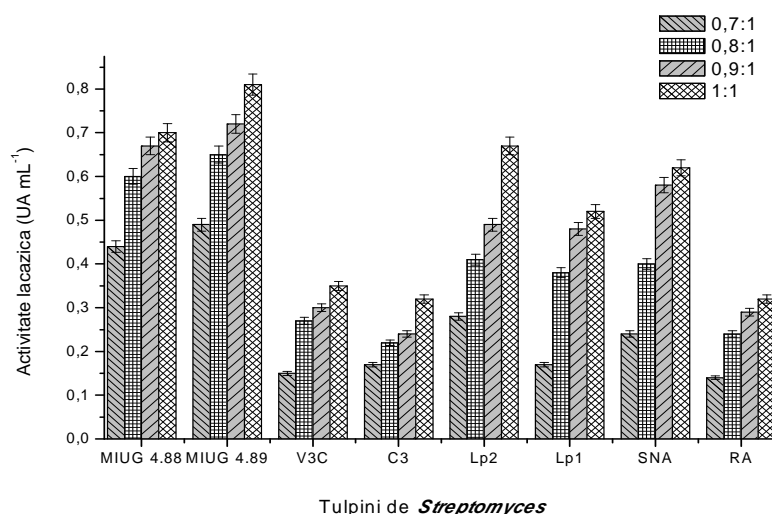


Figura 4.9 Variația activității lacazice în funcție de raportul enzimă: 0,05 M pirogalol

▪ **Stabilirea pH-ului optim de activitate al lacazei**

Efectul pH-ului asupra activității lacazice a fost studiat în soluție de tampon fosfat (0.001mM), la valori de pH cuprinse între 3,0 și 8,0.

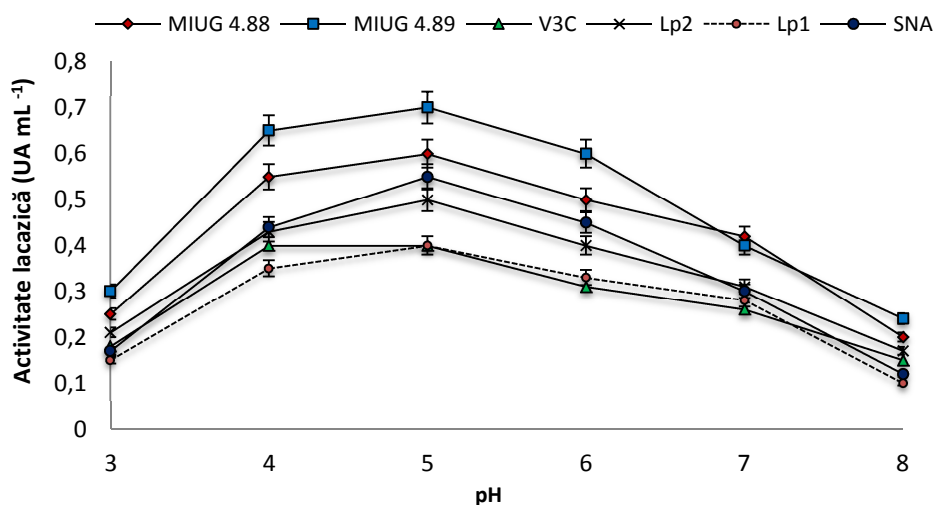


Figura 4.11 Efectul pH-ului asupra lacazei sintetizată de tulpini selecționate de *Streptomyces* spp.

Așa cum se poate observă în figura 4.11, pH-ul optim de acțiune pentru lacaza produsă de streptomicete este 5,0. Variația pH-ului în jurul acestui optim conduce la o scădere a activității enzimei. În literatura de specialitate sunt prezentate puține informații cu privire la efectul pH-ului respectiv al temperaturii asupra funcționalității lacazei sintetizate de tulpini din genul *Streptomyces*.

▪ **Stabilirea temperaturii optime de acțiune a lacazei sintetizate de streptomicete**

Influența temperaturii asupra activității lacazei produsă de tulpinile genului *Streptomyces* spp. a fost studiată prin termostatarea amestecului de reacție la temperaturi diferite, variind de la 10°C la 60°C și pH

5,0, timp de 20 minute. Valorile maxime de activitate pentru lacaza sintetizată de tulpinile selecționate studiate au fost obținute la temperatura de 30°C, așa cum se poate observa în figura 4.12.

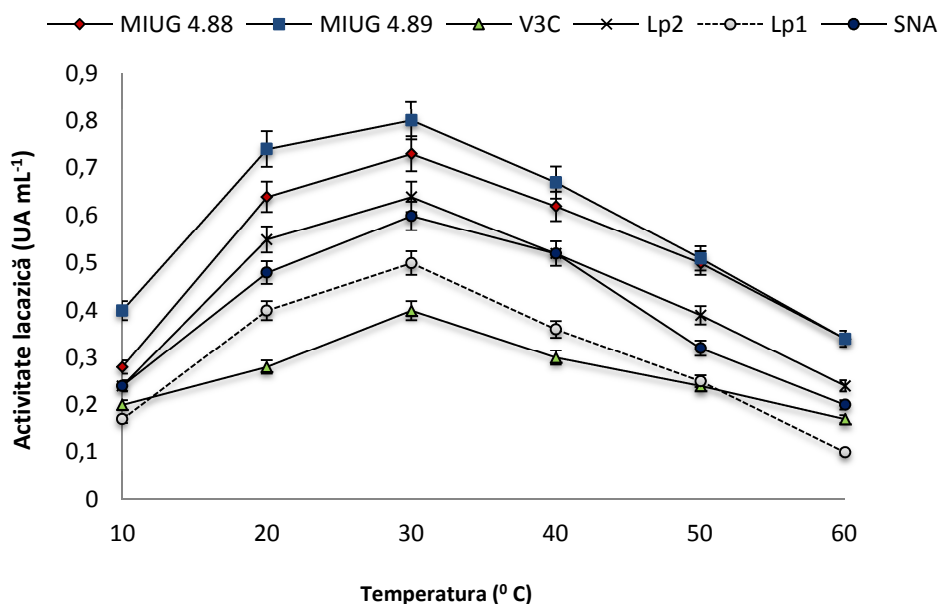


Figura 4.12 Efectul temperaturii asupra activității lacazei sintetizată de tulpinile selecționate de *Streptomyces* spp.

4.3.3.2 Proprietățile catalitice ale tirozinazei

▪ Influența concentrației de substrat și a raportului enzimă : substrat

Pentru tirozinaza produsă de tulpinile *Streptomyces* MIUG 13p, MIUG 4.88, MIUG 4.89 și tulpinile noi izolate, codificate RE, RC, RB, SC, RD, S₁, S₂, S₃, SB și SD, s-a variat concentrația de L-tirozină, în calitate de substrat, între 0,005 M și 0,1M și raportul enzimă:substrat, la valori între 0,7:1; 0,8:1; 0,9:1 și 1:1.

În figura 4.13 și figura 4.14 sunt prezentate rezultatele obținute privind variația activității tirozinazice în funcție de concentrația de substrat și raportul enzimă :substrat, pentru două dintre cele mai productive tulpini selecționate.

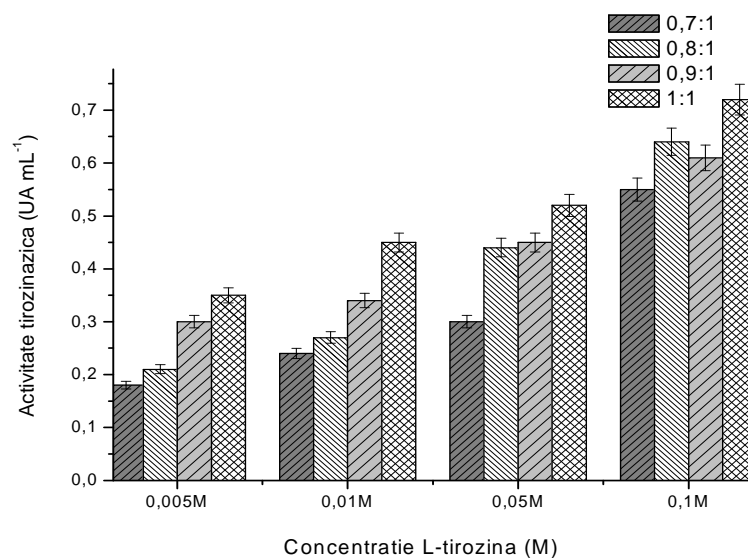


Figura 4.13 Stabilirea concentrației optime de substrat pentru funcționalitatea tirozinazei sintetizată de tulpina *Streptomyces* MIUG 4.88

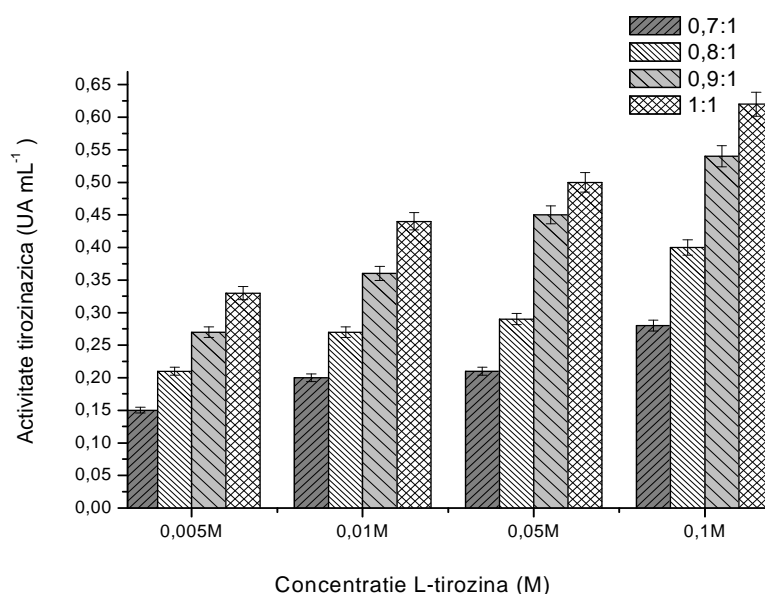


Figura 4.14 Stabilirea concentrației optime de substrat pentru funcționalitatea tirozinazei sintetizată de tulpina *Streptomyces* RE

Din figura 4.15 se observă că în cazul folosirii drept substrat L-tirozină la o concentrație de 0,1 M, raportul optim enzimă : substrat este de 1:1. În urma studiului se consideră optime pentru funcționalitatea tirozinazei produsă de streptomicete următoarele: substrat 0,1 M L-tirozină și raportul enzimă:substrat 1:1.

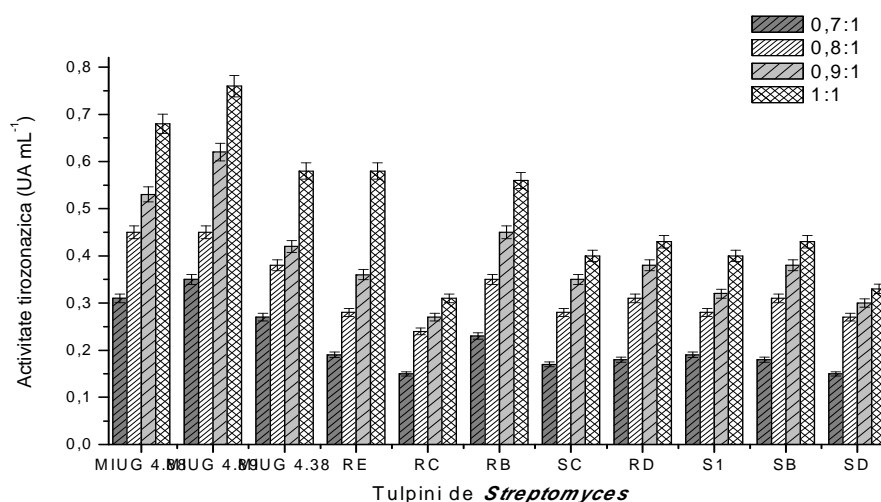


Figura 4.15 Stabilirea raportului optim enzimă: substrat (substrat: 0,1M L-tirozina) pentru funcționalitatea tirozinazei sintetizată de tulpini selecționate de streptomicete

▪ **Stabilirea pH-ului optim al tirozinazei sintetizate de streptomicete selecționate**

Păstrând constante condițiile de reacție optimizate anterior s-a studiat funcționalitatea tirozinazei la valori de pH cuprinse între 3,0 și 8,0.

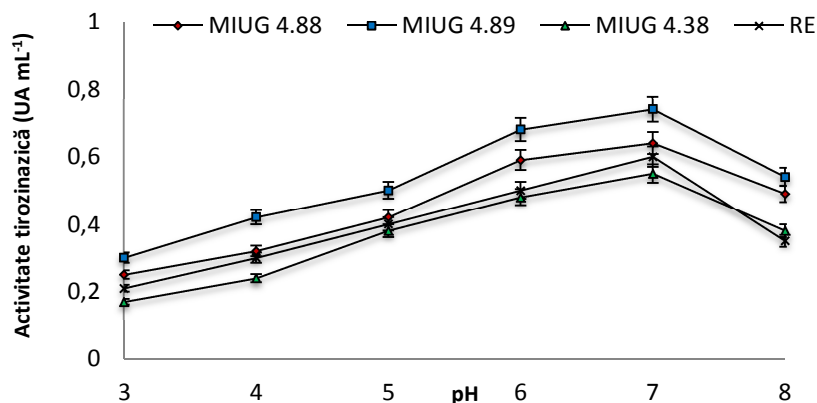


Figura 4.17 Efectul pH-ului asupra tirozinazei sintetizată de tulpinile selecționate de *Streptomyces* spp.

Așa cum se poate observa în figura 4.17, pH-ul optim de acțiune pentru tirozinaza sintetizată de tulpinile selecționate de streptomicete este cuprins între valorile 6,0-7,0.

▪ **Stabilirea temperaturii optime a tirozinazei**

Influența temperaturii asupra activității tirozinazei produsă de tulpinile selecționate de *Streptomyces* spp. a fost studiată prin termostatarea amestecului de reacție la temperaturi diferite, variind de la 10°C la 60°C

și la pH 7,0, timp de 20 minute. Valorile maxime de activitate pentru preparatele brute de tirozinază studiate au fost obținute la temperatura de 30°C (figura 4.18).

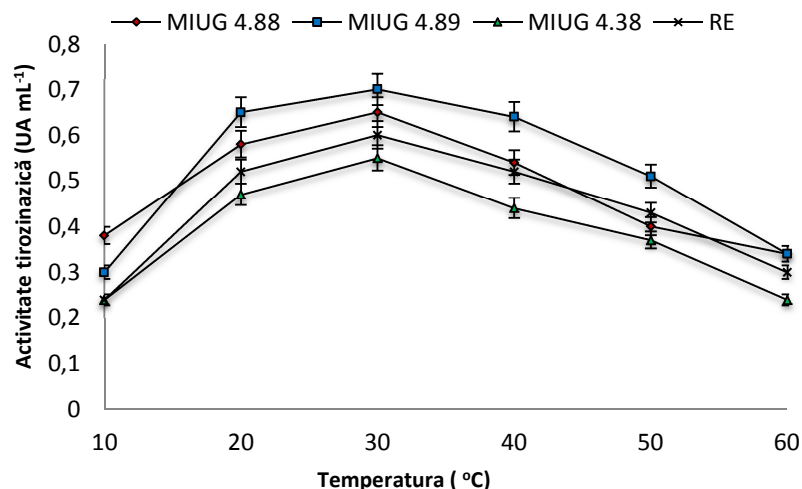


Figura 4.18 Efectul temperaturii asupra tirozinazei sintetizată de tulpini selecționate de *Streptomyces* spp.

4.4 Concluzii parțiale

1. S-au studiat 40 de tulpini de *Streptomyces* spp., dintre care 10 tulpini de streptomicete aparținând colecției de microorganisme a Platformei de cercetare și formare "Bioaliment" a Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor din cadrul Universității "Dunărea de Jos" din Galați (indicativ MIUG), conservate prin păstrare sub ulei de parafină steril și 30 tulpini de streptomicete nou izolate din diferite probe de sol, prelevate din județul Galați.
2. Tulpinile de streptomicete izolate au fost diferențiate pe baza caracterelor culturale prin cultivare pe mediu Gauze-agar în concordanță cu datele prezentate de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (Lechevalier, 1989).
3. Selecția calitativă a tulpinilor de streptomicete producătoare de fenoloxidaze, s-a realizat prin cultivare în plăci Petri pe mediul Gauze suplimentat cu 1 % tirozină în calitate de inductor al biosintezei. Criteriul principal de selecție l-a constituit formarea pigmentului de culoare brună, difuzabil în mediu, în jurul coloniilor tulpinilor active.
4. Prin selecție pe criterii semicantitative, prin evaluarea potențialului de biosinteză a fenoloxidazelor extracelulare pe baza indicelui de transformare a substratului L-tirozină, definit ca raportul dintre diametrul zonei de transformare a substratului, clar evidențiată și diametrul coloniei formate, s-au evidențiat tulpinile cele mai activ producătoare de fenoloxidaze, și anume tulpinile *Streptomyces* MIUG 4.89, MIUG 4.38, MIUG 4.88 dar și tulpinile noi izolate, codificate SNA, Lp₁, Lp₂ și RE.
5. Activitatea tirozinazei și lacazei sintetizate de streptomicete variază în funcție de concentrația de substrat și raportul enzimă: substrat, cele mai bune activități înregistrându-se la concentrația optimă de substrat de 0,05 M pirogalol (pentru lacază) și 0, 1 M L-tirozină (pentru tirozinază) și un raport enzimă substrat de 1 :1. Randamentul maxim de transformare al substratului se obține după 5 minute de reacție, atât în cazul tirozinazei cât și al lacazei.
7. Lacaza și tirozinaza produse de tulpinile de streptomicete selecționate acționează optim la temperatura de 30 °C și la pH 5,0, pentru lacază și pH 7,0, pentru tirozinază.

8. Tulpinile selecționate vor fi studiate ca potențiali agenți pentru biodegradarea compușilor farmaceutici carbamazepina și acid clofibrin, în medii lichide, în condiții submerse, în experimente în sisteme model, în condiții similare cu cele de bioremediere *in situ* din stațiile de epurare.

5. Utilizarea culturilor selecționate de streptomicete pentru biodegradarea carbamazepinei

5.1 Introducere

A vizat testarea rezistenței tulpinilor de streptomicete față de toxicitatea carbamazepinei, determinarea concentrației maxime de compus farmaceutic care să nu afecteze creșterea și funcționalitatea metabolică a streptomicetelor. De asemenea, utilizând tulpina selecționată *Streptomyces* MIUG 4.89, prin modelare matematică și analiză statistică s-a urmărit identificarea factorilor biotehnologici cu influență în procesul de biodegradare a carbamazepinei și optimizarea condițiilor de biotransformare în scopul creșterii eficienței procesului de bioremediere.

5.2 Materiale și metode de investigare, analiză și interpretare a datelor experimentale

▪ Microorganisme

S-au studiat **19 de tulpini de *Streptomyces* spp.** activ producătoare de fenoloxidaze.

Metodele utilizate în cadrul acestui capitol sunt:

- Selecția calitativă a tulpinilor *Streptomyces* spp. privind rezistența la toxicitatea carbamazepinei
- Testarea capacității tulpinilor selecționate de biotransformare a carbamazepinei în condiții submerse, aerobe, de cultivare
- Cuantificarea prin cromatografie HPLC a biotransformării carbamazepinei și a compușilor de biotransformare

Gradul de biotransformare a carbamazepinei a fost calculat după formula:

$$\text{Gradul de biotransformare \%} = \frac{(C_0 - C_f) \cdot 100}{C_0} \quad (5.1)$$

unde: C_0 - concentrația inițială de carbamazepină în mediul de cultură, mg L^{-1} ;
 C_f - concentrația de carbamazepină după biotransformare, mg L^{-1} .

5.2.3 Metode de analiză statistică și interpretare a datelor experimentale

▪ Modelul Plackett-Burman

S-a conceput un model empiric pe baza setului de răspunsuri obținute din cercetările anterioare și a condițiilor optime de funcționare conform datelor din literatura de specialitate. Astfel, pentru generarea modelului Plackett-Burman s-au selectat 10 parametri (variabile independente). Prin variația acestor 10 parametri s-au generat 11 experimente în care s-au variat valorile variabilelor independente (limita superioară, limita inferioară).

Proiectarea experimentelor, descrierea parametrilor și limitele de variație sunt descrise în tabelul 5.1.

Tabelul 5.1 Variabilele independente selectate pentru modelul Plackett-Burmann și limitele de variație

Variabile independente	Unitatea de măsură	Cod	Nivele de variație	
			Inferior	Superior
▪ Concentrația de carbamazepină	mg L ⁻¹	A	0,2	8
▪ Concentrația sursei de azot (extract de drojdie)	g L ⁻¹	B	1	3
▪ Concentrație glucoză	g L ⁻¹	C	3	10
▪ Concentrație inocul	% (v/v)	D	4	10
▪ Vârsta inocul	h	E	24	72
▪ Volumul de mediu	mL	F	50	250
▪ pH	unități pH	G	5	7
▪ Temperatura	°C	H	25	35
▪ Viteza de agitare	rpm	J	100	200
▪ Timpul de cultivare	zile	K	7	14

▪ **Metoda analizei suprafeței de răspuns pentru optimizarea condițiilor biotehnologice de bioconversie a carbamazepinei**

Modelul experimental CCD a impus conceperea a 24 variante experimentale și a inclus 4 puncte de proiectare factorială, 10 puncte pentru studii axiale (2 pentru fiecare variabilă) și 3 studii pentru replicarea punctelor centrale.

Pentru toate variabilele s-a considerat valoarea centrală codificată zero. Intervalele maxime și minime ale variabilelor investigate în planul experimental în formă reală și în formă codificată sunt prezentate în tabelul 5.2.

Tabelul 5.2 Nivelurile și intervalele de variație ale variabilelor independente utilizând CCD pentru procesul de biodegradare a carbamazepinei

Variabile independente	Cod	Nivelul codificat al variabilei				
		-α	-1	0	+1	+α
▪ Concentrația de extract de drojdie, g L ⁻¹	B	0,2	1	2	3	4
▪ Concentrație glucoză, g L ⁻¹	C	0,1	3	6,5	10	13
▪ Concentrație inocul, % (v/v)	D	2	4	7	10	13
▪ Volum de mediu, mL	F	50	125	150	250	350
▪ pH	G	4	5	6	7	8

Pentru estimarea parametrilor statistici s-a aplicat analiza variației ANOVA. Relevanța modelului s-a apreciat și pe baza coeficientului multiplu de determinare R^2 (similar coeficientului de regresie). Pentru analiza modelului experimental s-a utilizat pachetul software statistic „Design-Expert 8.0.7.1”, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA.

5.3 Rezultate și discuții

5.3.1 Testarea toxicității carbamazepinei asupra culturilor de streptomicete

Selecția semi-cantitativă bazată pe testul de rezistență a streptomicetelor la carbamazepină (CBZ), a fost realizat prin cultivarea celor nouăsprezece tulpini de *Streptomyces* spp. pe mediul Gauze suplimentat cu diferite concentrații de CBZ (între 0,05 și 8 mg L⁻¹). Aceste concentrații au fost alese corelat cu gradul de poluare posibil al mediilor acvatiche. Rezultatele obținute au indicat rezistența diferită a streptomicetelor față de toxicitatea carbamazepinei. Tulpinile de *Streptomyces* spp. cu diametrul coloniei mai mare de 6 mm au fost considerate a fi rezistente la carbamazepină (figura 5.2). Dintre cele nouăsprezece tulpini *Streptomyces* spp. testate, numai cinci tulpini, codificate MIUG 4.88, MIUG 4.89, SNA, Lp₁ și Lp₂, au indicat o toleranță ridicată la CBZ, la majoritatea concentrațiile testate (0,05-8 mg L⁻¹). Din figura 5.2, se observă că tulpinile cele mai afectate de toxicitatea CBZ la concentrații de 1 mg L⁻¹, 5 mg L⁻¹ și 8 mg L⁻¹ au fost tulpinile codificate SB, SD, RD, S₂ și S₃.

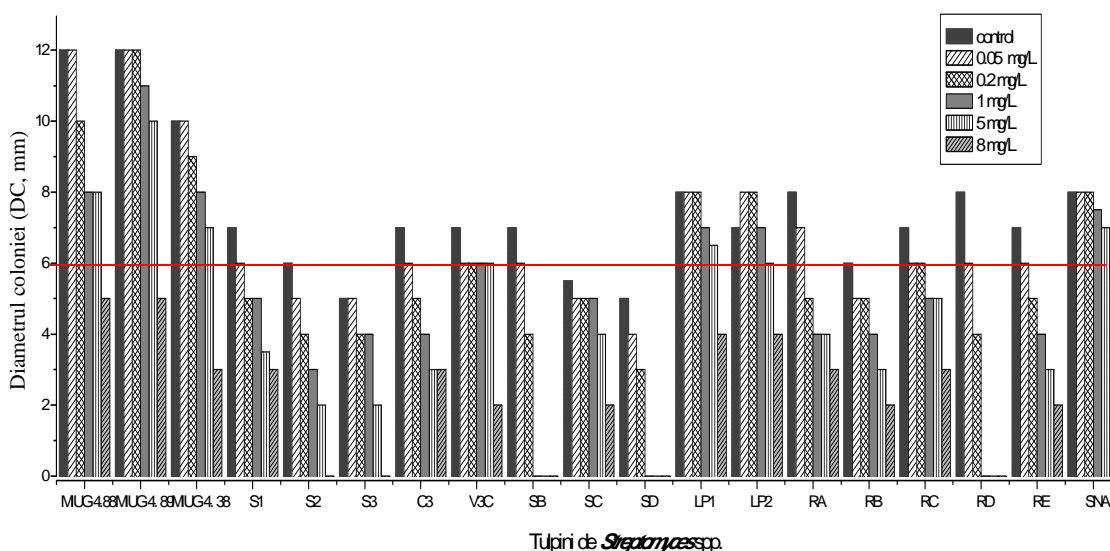


Figura 5.2 Dezvoltarea colonială a tulpinilor de *Streptomyces* spp. în medii cu carbamazepină

Tulpinile codificate MIUG 4.88, MIUG 4.89, Lp₁, Lp₂ și SNA au fost, prin urmare, selecționate pentru următoarele teste de toxicitate la CBZ.

5.3.2 Testarea capacității tulpinilor de streptomicete selecționate de bioconversie a carbamazepinei

Evaluarea creșterii streptomicetelor în prezența carbamazepinei, în condiții aerobe, submerse de cultivare

În acest studiu s-a urmărit capacitatea tulpinilor selecționate de streptomicete de a elimina carbamazepina în concentrație de 0,2 mg L⁻¹, în condiții aerobe, submerse de cultivare.

Rezultatele au indicat că cele cinci tulpini de streptomicete selecționate codificate MIUG 4.88, MIUG 4.89, SNA, Lp₁ și Lp₂, prezintă o bună creștere în mediul lichid minimal, suplimentat cu carbamazepină ca sursă unică de carbon (figura 5.3).

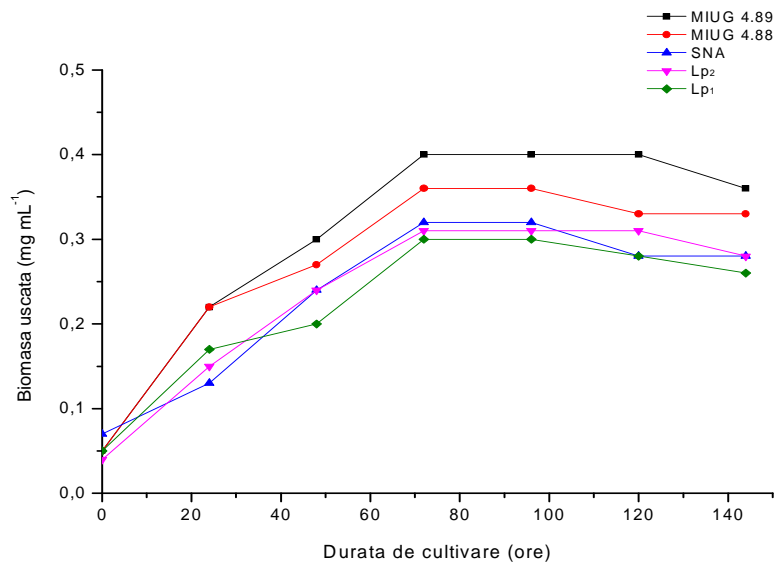


Figura 5.3 Dinamica multiplicării streptomicetelor selecționate cultivate în sistem submers pe mediul minimal suplimentat cu 0,2 mg L⁻¹ carbamazepină (temperatura de 25°C și 150 rpm)

După cum reiese din figura 5.3, tulpinile codificate MIUG 4.89, MIUG 4.88 și SNA prezintă un bun potențial de a crește și de a se multiplica în prezența carbamazepinei ca sursă unică de carbon, după 70 de ore de cultivare pe mediul lichid minimal, în sistem submers, cu aerare.

Deoarece s-a constatat că tulpinile selecționate cresc foarte greu în mediu cu CBZ ca sursă unică de carbon a fost evaluat efectul adăugării glucozei în testele de biodegradare, urmărindu-se dacă adăugarea de glucoză poate îmbunătăți înmulțirea celulelor (acumularea de biomasă) și capacitatea acestora de biodegradare a CBZ. S-au testat două nivele de concentrație: 0,5 g L⁻¹ și 5 g L⁻¹ glucoză.

Dintre tulpinile de *Streptomyces* spp. testate, tulpinile codificate MIUG 4.89 și SNA au prezentat cel mai ridicat potențial de biodegradare, ducând la eliminarea carbamazepinei în procent de 30 % în mediul cu 5 g L⁻¹ glucoză, în calitate de co-substrat.

Efectul concentrației inițiale de carbamazepină asupra funcționalității metabolice a streptomicetelor selecționate

Pentru a evidenția impactul concentrației inițiale de carbamazepină asupra creșterii tulpinilor selecționate (*Streptomyces* MIUG 4.89 și *Streptomyces* SNA), acestea au fost cultivate în condiții submerse, aerobe, în mediul lichid minimal suplimentat cu cinci concentrații inițiale de carbamazepină (0,2, 0,5, 1, 5, 8 mg L⁻¹) și glucoză (5 g L⁻¹).

Criteriile avute în vedere pentru aprecierea potențialului de biodegradare au fost concentrația de carbamazepină reziduală în mediul de cultură, la sfârșitul perioadei de cultivare și randamentul de biomasă uscată. Rezultatele obținute după zece zile de cultivare în condiții submerse, în aerobioză, la

temperatura de 25°C și 150 rpm sunt prezentate în figura 5.14.

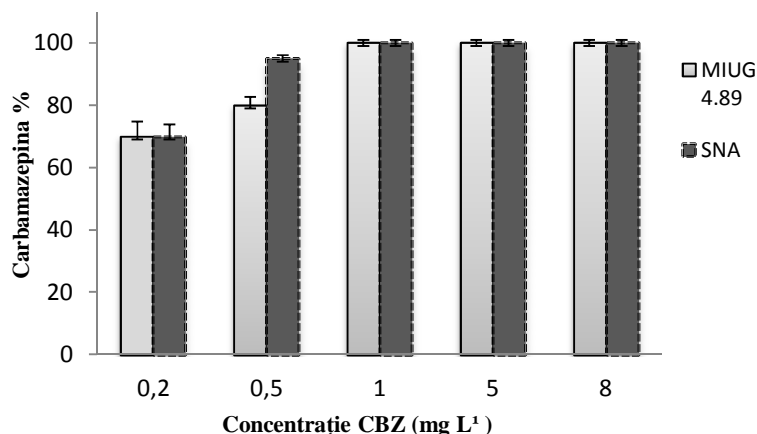


Figura 5.14 Capacitatea de biodegradare a carbamazepinei de către tulpinile de streptomicete selecționate, cultivate în sistem submers, cu aerare, pe mediul minimal suplimentat cu diferite concentrații de carbamazepină și 5 g L⁻¹ glucoză (după 10 zile de cultivare, la temperatura de 25°C și 150 rpm)

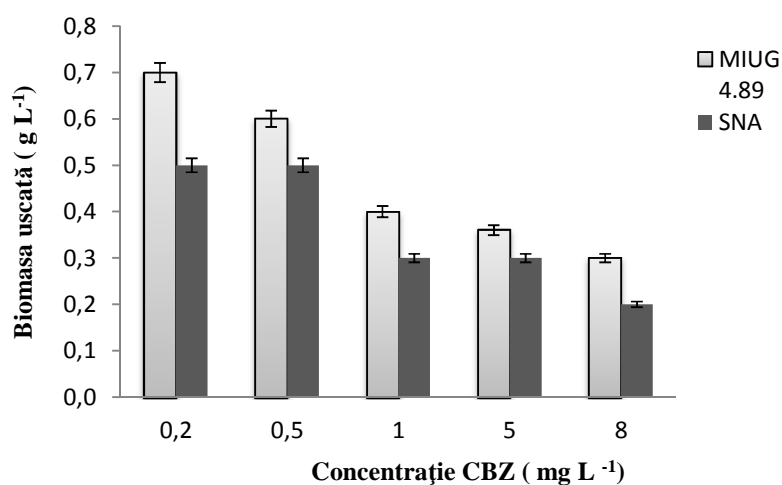


Figura 5.15 Dinamica de acumulare a biomasei tulpinilor *Streptomyces* MIUG 4.89 și *Streptomyces* SNA, cultivate în sistem submers, cu aerare, pe mediul minimal suplimentat cu diferite concentrații de carbamazepină și 5 g L⁻¹ glucoză (după 10 zile de cultivare, la temperatura de 25°C și 150 rpm)

Randamentul de biodegradare a CBZ a fost semnificativ, aproximativ 30 % cu tulpina codificată SNA și respectiv tulpina *Streptomyces* MIUG 4.89, la concentrația inițială de 0,2 mg L⁻¹. Un procent redus de biodegradare a înregistrat pentru concentrații de CBZ mai mari de 1 mg L⁻¹. Aceste rezultate sugerează în mod clar că concentrația inițială de poluant de 0,2 mg L⁻¹ este cea mai favorabilă pentru un proces

eficient de biodegradare de către streptomicete.

Degradare carbamazepinei este corelată evident cu acumularea de biomasă, deoarece o reducere importantă a concentrației de biomasă uscată acumulată a fost observată la concentrații mai mari de carbamazepină (figura 5.15). Cu toate acestea, cele mai mari valori ale randamentului de biomasă ($0,6 - 0,7 \text{ g L}^{-1}$) au fost obținute numai de tulpina *Streptomyces* MIUG 4.89 după zece zile de cultivare submersă, în condiții aerobe (figura 5.15). Conform celor două criterii enumerate anterior tulpina *Streptomyces* MIUG 4.89 a fost selecționată pentru studiile ulterioare de optimizare pentru a stabili condițiile de cultură adecvate pentru biotransformarea carbamazepinei și, de asemenea, pentru a înțelege în mod clar care din acești parametri contribuie la sporirea eficienței procesului de biodegradare.

5.3.3 Optimizarea condițiilor de biodegradare a carbamazepinei utilizând tulpini selecționate de streptomicete

Analiza coeficienților de regresie a celor 10 variabile a indicat că factorii: concentrația de extract de drojdie și de glucoză, concentrație de inocul, volumul de mediu și pH-ul au fost găsiți semnificativi cu influență pozitivă asupra procesului de biodegradare al carbamazepinei și au fost incluși în experimentele de optimizare. În contrast, concentrația de compus xenobiotic, viteza de agitare, timpul de cultivare, vârsta inoculului și temperatura sunt nesemnificativi asupra procesului de biodegradare al carbamazepinei (figura 5.16).

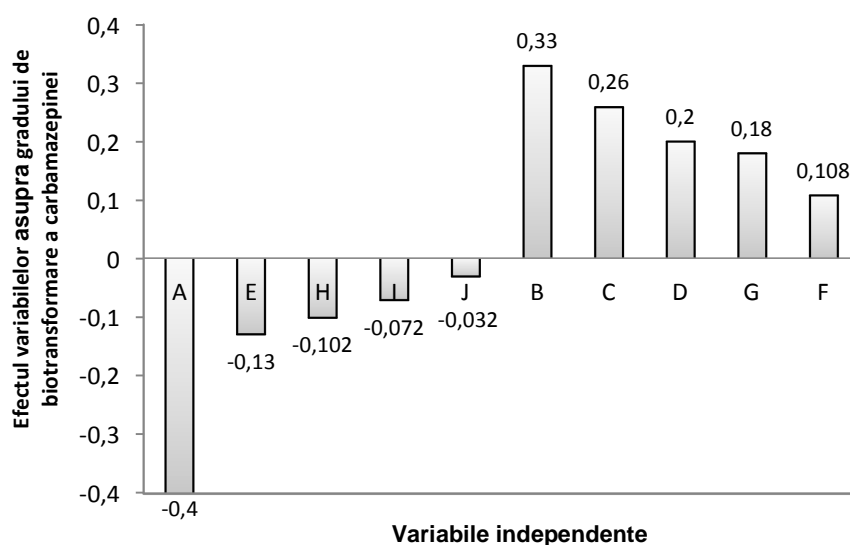
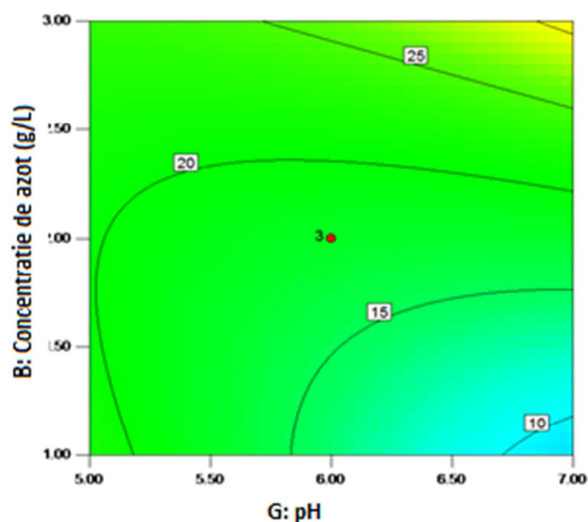


Figura 5.16 Efectul variabilelor independente asupra gradului de biotransformare a carbamazepinei de către tulpina selecționată *Streptomyces* MIUG 4.89

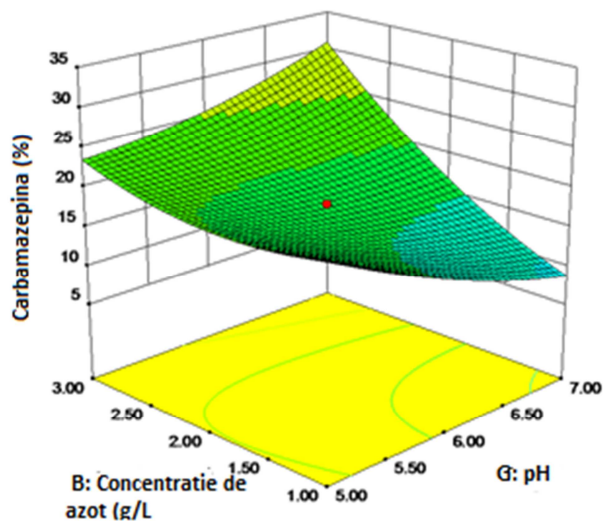
Variabilele independente selectate au fost verificate prin intermediul testului t-student (analiza variației ANOVA), iar cele cu valoarea lui $p < 0,1$ și 95 % nivel de încredere au fost acceptate ca factori semnificativi în procesul de biodegradare.

5.3.3.2 Modelarea matematică a condițiilor biotehnologice de biotransformare a carbamazepinei (analiza suprafeței de răspuns)

În figurile 5.17 și 5.18, se observă efectele corelate ale variabilelor independente, respectiv interacțiunea dintre concentrația sursei de azot și pH, precum și concentrația de glucoză și pH, asupra gradului de biotransformare a carbamazepinei.

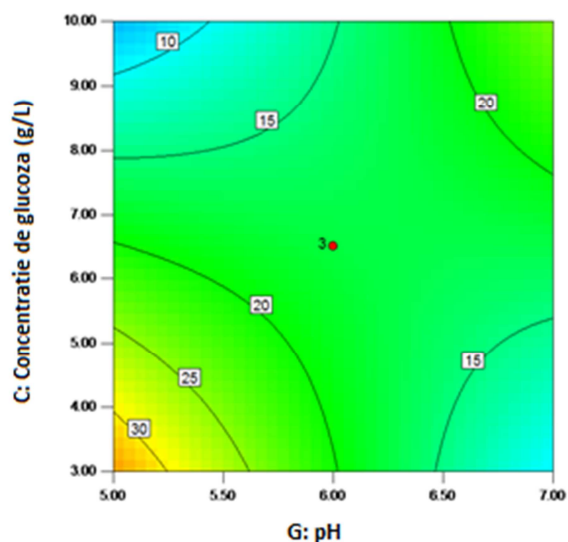


a)

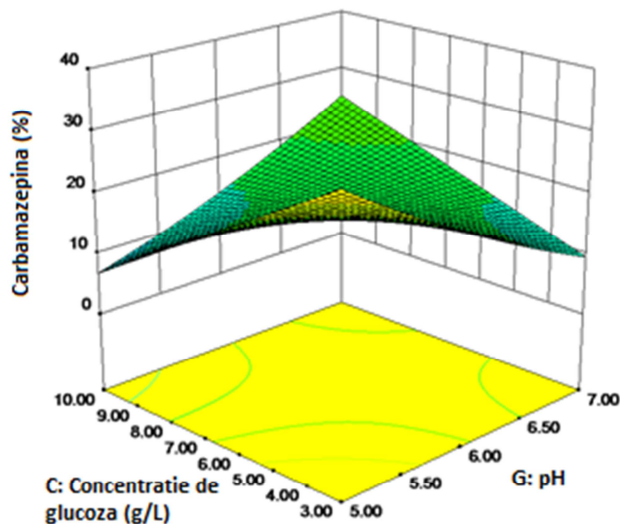


b)

Figura 5.17 Graficul de contur (a) și suprafața de răspuns (b) ce descriu efectele cantitative, corelate ale pH-ului (G) și a concentrației de extract de drojdie (B), asupra randamentului de biotransformare a carbamazepinei cu tulpina *Streptomyces* MIUG 4.89



a)



b)

Figura 5.18 Graficul de contur (a) și suprafața de răspuns (b) ce descriu efectele cantitative, corelate ale pH-ului (G) și a concentrației de glucoză (C) asupra randamentului de biotransformare a carbamazepinei cu tulpina *Streptomyces* MIUG 4.89

Menținând concentrația de azot la valoare minimă 2 g L^{-1} și pH-ul mediului la valoarea 6,0, se obține un randament de biotransformare a carbamazepinei de 18 %. În condițiile în care se mărește cantitatea de extract de drojdie (3 g L^{-1}), se observă că gradul de eliminare a carbamazepinei ajunge la 30 %. Acest lucru sugerează că mărirea cantității de azot în mediul de cultivare conduce la creșterea eficienței de eliminare a carbamazepinei.

Efectele interacțiunii corelate dintre concentrația de inocul și pH sunt redate în figura 5.19. Din optimizare rezultă că între concentrația de inocul și pH-ul mediului există o corelație negativă, în raport cu viteza de eliminare a compusului țintă. Pentru creșterea vitezei de eliminare a carbamazepinei, concentrația de inocul și pH-ul mediului au fost păstrate la valori minime și anume 7 % și respectiv 6,0.

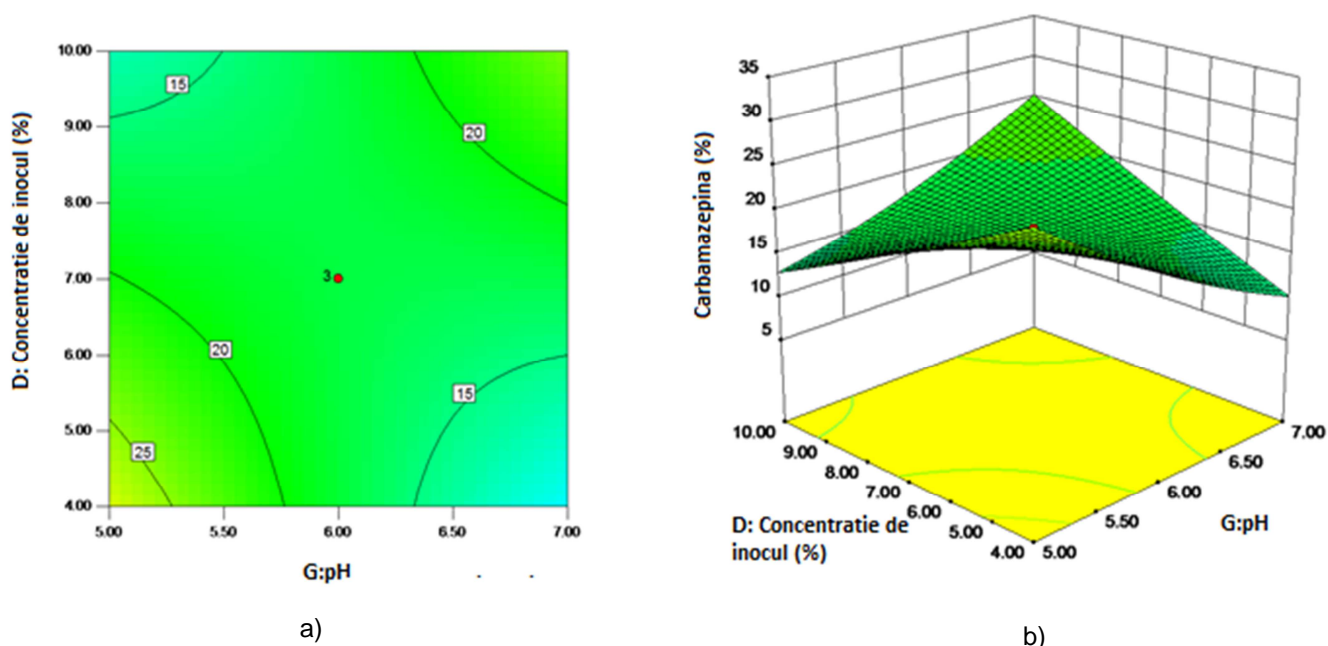


Figura 5.19 Graficul de contur (a) și suprafața de răspuns (b) ce descriu efectele cantitative, corelate ale pH-ului (G) și a concentrației de inocul (D) asupra randamentului de biotransformare a carbamazepinei cu tulpina *Streptomyces* MIUG 4.89

Analizând evoluția răspunsului în funcție de concentrația de extract de drojdie și concentrația de inocul (figura 5.20) se observă că eliminarea carbamazepinei este în procent de 18 % în următoarele condiții: glucoză $6,50 \text{ g L}^{-1}$, sursa de azot 2 g L^{-1} și 7 % concentrație de inocul. Menținerea valori constante a concentrației de inocul și mărirea cantității de azot la 3 g L^{-1} , conduc la un randament superior de eliminare a carbamazepinei (25 %).

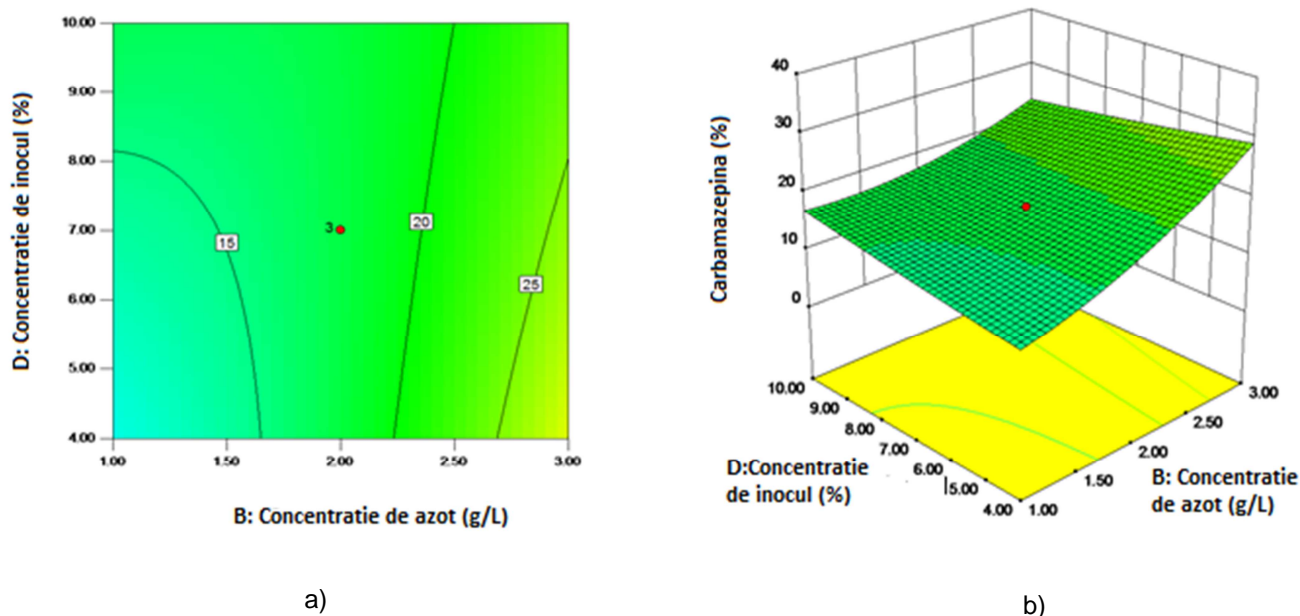


Figura 5.20 Graficul de contur (a) și suprafața de răspuns (b) ce descriu efectele cantitative, corelate ale concentrației de extract de drojdie (B) și a concentrației de inocul (D) asupra randamentului de biotransformare a carbamazepinei cu tulpina *Streptomyces* MIUG 4.89

Rezultatele studiului de modelare statistică al procesului de biodegradare a CBZ cu tulpina selecționată *Streptomyces* MIUG 4.89 au permis identificarea valorilor optime a celor cinci componente cu influență esențială asupra randamentului de eliminare a carbamazepinei și anume: 2 g L^{-1} extract de drojdie, $6,5 \text{ g L}^{-1}$ concentrație de glucoză, 7 % concentrație de inocul și 250 mL volum de mediu (raport volum mediu: volum vas de cultivare de 1:2), pH=6,0.

Validarea modelului

Modelul a fost validat, prin repetarea experimentelor în condiții optime : 2 g L^{-1} extract de drojdie, $6,5 \text{ g L}^{-1}$ concentrație de glucoză, 7 % concentrație de inocul, 250 mL volum de mediu și pH 6.0, obținând un randament de biotransformare a carbamazepinei de 30 %.

5.4 Concluzii parțiale

1. S-a testat rezistența față de toxicitatea indusă de carbamazepină pentru 19 tulpini de *Streptomyces* spp. activ producătoare de fenoloxidaze. S-a remarcat faptul că la concentrații scăzute de CBZ în mediu, de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ și $0,2 \text{ mg L}^{-1}$, nu este influențată funcționalitatea metabolică a streptomicetelor, inhibarea acestora producându-se la concentrații mai mari de 1 mg L^{-1} .
2. S-a demonstrat prin selecție calitativă și cantitativă capacitatea unor tulpini de *Streptomyces* spp. de a transforma carbamazepina în concentrație de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$, prin cultivare în condiții submerse aerobe, în mediu minimal suplimentat cu 5 g L^{-1} glucoză.
3. Tulpinile codificate MIUG 4.89, MIUG 4.88, Lp₁, Lp₂ și SNA au demonstrat performanțe superioare în biodegradarea carbamazepinei, în faza staționară de creștere în sistem submers discontinuu, cu aerare, corelat și cu producerea de lacază extracelulară.
4. S-a studiat efectul unor factori (variabile independente) cu influență în procesele de biodegradare a carbamazepinei (concentrația de compus toxic, vârsta inoculului, viteza de agitare, temperatura,

pH-ul, concentrația surselor de carbon și azot, concentrația de inocul, volumul de mediu și timpul de cultivare) cu tulpina selecționată *Streptomyces* MIUG 4.89, prin cultivare în condiții de laborator, în sistem submers, cu aerare și agitare.

5. Prin modelare matematică s-a demonstrat că concentrația de glucoză și a sursei de azot, concentrația de inocul, pH-ul și volumul de mediu, sunt factori semnificativi în biotransformarea carbamazepinei.
6. În condițiile biotehnologice testate, randamente sporite de biotransformare a carbamazepinei (la o concentrație inițială în mediu de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$) se obțin cu tulpina selecționată *Streptomyces* MIUG 4.89, prin cultivare în mediul minimal suplimentat cu 2 g L^{-1} extract de drojdie, pH 6,0, 7 % concentrație de inocul, $6,50 \text{ g L}^{-1}$ glucoză și 250 mL mediu de cultură.
7. Prin cultivarea tulpinii selecționate *Streptomyces* MIUG 4.89 pe mediul optimizat ce conține 2 g L^{-1} extract de drojdie, pH 6, 7 % concentrație de inocul și $6,50 \text{ g L}^{-1}$ concentrație de glucoză, asigură obținerea unui randament de biotransformare a carbamazepinei de 30 %.

6. Utilizarea culturilor selecționate de streptomicete pentru biodegradarea acidului clofibrice

6.1 Introducere

Având în vedere omniprezența și persistența acidului clofibrice, în special în mediile acvatice, în prezentul studiu s-a urmărit, testarea rezistenței tulpinilor de streptomicete selecționate la acid clofibrice, determinarea concentrației de compus farmaceutic care să nu afecteze funcționalitatea streptomicetelor, identificarea și selectarea factorilor semnificativi în procesul de biotransformare a acidului clofibrice precum și optimizare condițiilor biotehnologice în scopul creșterii eficienței și a vitezei de biotransformare a compusului farmaceutic țintă, în condiții similare, asemănătoare cu cele din stațiile de epurare a apelor reziduale.

6.2.1 Materiale și metode de investigare, analiză și interpretare a datelor experimentale

▪ Microorganisme

Au fost studiate **19 de tulpini de *Streptomyces* spp.** activ producătoare de fenoloxidaze.

Metodele utilizate în cadrul acestui capitol sunt:

- Selecția pe criterii calitative a tulpinilor *Streptomyces* spp., pe baza rezistenței la toxicitatea acidului clofibrice
- Testarea capacității tulpinilor selecționate de biotransformare a acidului clofibrice
- Cuantificarea prin cromatografie HPLC a biotransformării acidului clofibrice și a compușilor de biotransformare

6.2.3 Metode de analiză statistică și interpretare a datelor experimentale

- **Modelul experimental Plackett-Burman** s-a realizat în conformitate cu protocolul de lucru descris în subcapitolul 5.2.3.
- **Metoda analizei suprafeței de răspuns** pentru optimizarea condițiilor biotehnologice de bioconversie a acidului clofibrice.

Intervalele maxime și minime ale variabilelor investigate în planul experimental în formă actuală și în formă codificată sunt prezentate în tabelul 6.1.

Tabelul 6.1 Nivelurile și intervalele de variație ale variabilelor independente utilizând CCD pentru procesul de biodegradare a acidului clofibric cu streptomicete selecționate

Variabila independentă	Cod	Nivelul codificat al variabilei				
		- α	-1	0	+1	+ α
▪ Concentrația glucoză, g L ⁻¹	C	0,1	3	6,50	10	13
▪ Concentrația inocul, %	D	2	4	7	10	13
▪ Temperatura, °C	H	20	25	30	35	40
▪ Timpul de cultivare, zile	J	5	7	10,50	14	20

6.3 Rezultate și discuții

6.3.1 Testarea toxicității acidului clofibric asupra culturilor de streptomicete

Dintre cele nouăsprezece tulpini de *Streptomyces* spp. testate, numai cinci tulpini și anume cele codificate MUG 4.88, MIUG 4.89, SNA, Lp₁ și Lp₂, au indicat o toleranță ridicată la toxicitatea acidului clofibric, la majoritatea concentrațiilor (0,05-8 mg L⁻¹) (figura 6.2).

Din figura 6.2, se observă că tulpinile codificate S₂, S_c și RD sunt afectate prin efect microbicid prin cultivare pe mediul Gauze agar suplimentat cu 8 mg L⁻¹ acid clofibric, iar pentru tulpinile codificate S₃, SB și SD efectul toxic este evident la concentrații de acid clofibric mai mari de 1 mg L⁻¹.

Prin urmare tulpinile codificate MIUG 4.88, MIUG 4.89, Lp₁, Lp₂ și SNA reprezintă potențiali agenți pentru biodegradarea acidului clofibric.

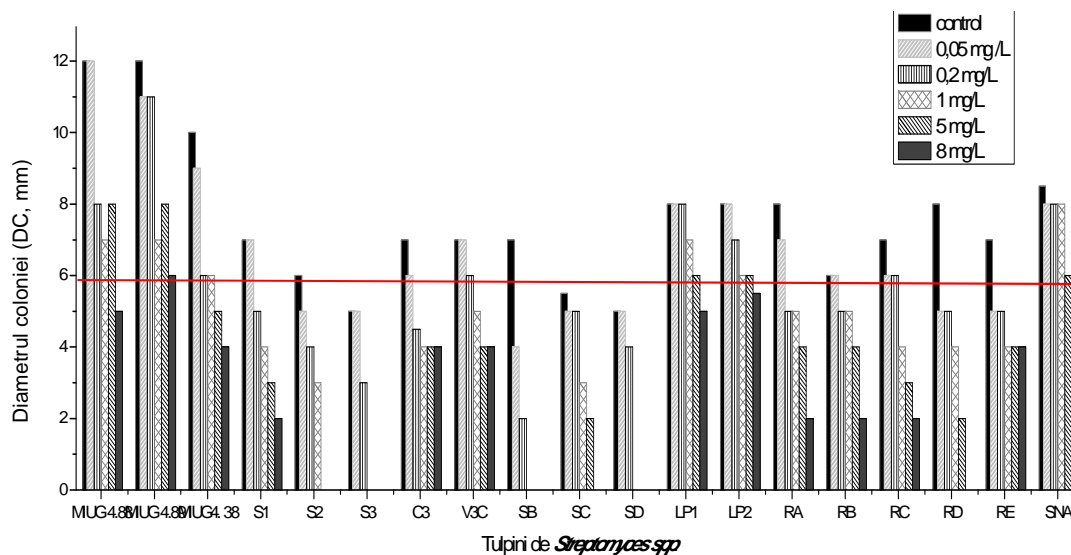


Figura 6.2 Dezvoltarea colonială a tulpinilor de *Streptomyces* spp. în medii cu acid clofibric

6.3.2 Testarea capacității tulpinilor de streptomicete selecționate de bioconversie a acidului clofibrice

Evaluarea creșterii streptomicetelor în prezența acidului clofibrice, în condiții aerobe, submerse de cultivare

După cum reiese din figura 6.3, tulpinile *Streptomyces* MIUG 4.89, *Streptomyces* 4.88 și *Streptomyces* Lp₁ prezintă un bun potențial de a crește, în condiții aerobe, în mediul de cultură lichid cu compoziție minimală, care conține acid clofibrice ca sursă unică de carbon, dinamica de acumulare a biomasei prezentând o evoluție ascendentă în primele 72 de ore de cultivare, după care intră în stare staționară.

Deoarece tulpinile selecționate cresc foarte greu în mediul de cultură cu acid clofibrice ca sursa unică de carbon a fost evaluat și în acest caz efectul adăugării glucozei în testele de biodegradare, urmărindu-se dacă adăugarea de glucoză poate îmbunătăți creșterea randamentului de biomasă și eliminarea compusului țintă. Și în acest caz mediul lichid minimal a fost suplimentat cu 0,5 g L⁻¹ glucoză și respectiv 5 g L⁻¹ glucoză, în calitate de sursă preferată de carbon și energie.

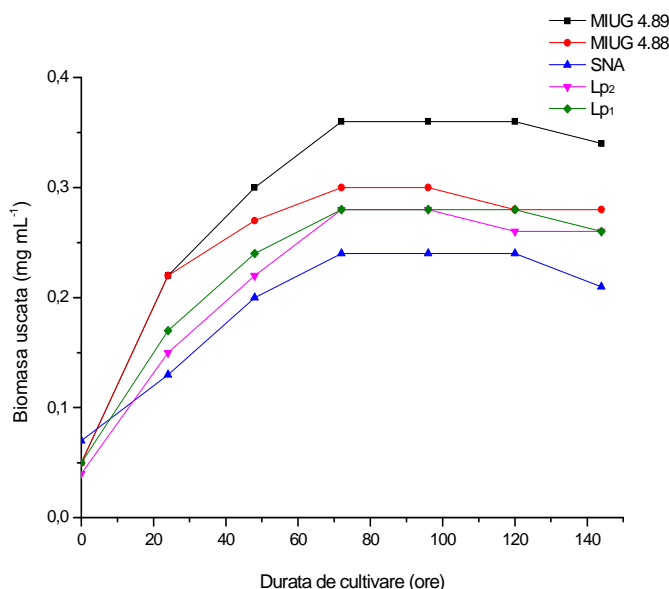


Figura 6.3 Dinamica de acumulare a biomasei la cultivarea streptomicetelor selecționate, în condiții submerse, cu aerare, în mediul minimal suplimentat cu 0,2 mg L⁻¹ acid clofibrice (temperatura de 25°C, 150 rpm)

Pe baza acestor rezultate, tulpinile *Streptomyces* MIUG 4.89 și *Streptomyces* MIUG 4.88 au fost considerate potențiali agenți pentru utilizare în procesele de biodegradare a acidului clofibrice și au fost selectate pentru investigații viitoare.

Efectul concentrației inițiale de acid clofibrice asupra creșterii tulpinilor selecționate

Pe baza unor studii anterioare, derulate în cazul carbamazepinei, au fost luate în considerare două criterii pentru selectarea celei mai eficiente tulpini: concentrația de acid clofibrice reziduală în mediu la sfârșitul cultivării și randamentul de substanță uscată. În figura 6.10, sunt prezentate rezultatele obținute, după 10 zile de cultivare, la temperatura de 25°C și 150 rpm. Astfel, randamentul de degradare a acidului clofibrice

a fost mai semnificativ la o concentrație inițială de 0,2 mg L⁻¹ fiind eliminat în procent de 10 %, în timp ce o biodegradare neglijabilă a fost observată pentru concentrații mai mari de 1 mg L⁻¹ acid clofibrice. Prin urmare, ca și în cazul carbamazepinei aceste rezultate sugerează în mod clar că concentrația inițială de poluant de 0,2 mg L⁻¹ a fost cea mai favorabilă pentru eficiența procesului de biodegradare.

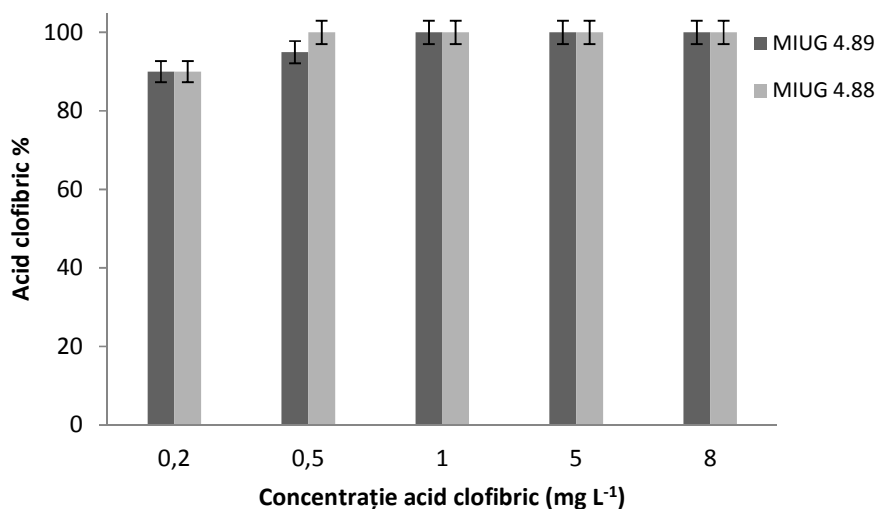


Figura 6.10 Capacitatea tulpinilor selecționate de streptomicete de biodegradare a acidului clofibrice, în sistem submers de cultivare, cu aerare, pe mediul minimal suplimentat cu diferite concentrații de compus țintă și 5 g L⁻¹ glucoză (după 10 zile de cultivare, la temperatura de 25°C și 150 rpm)

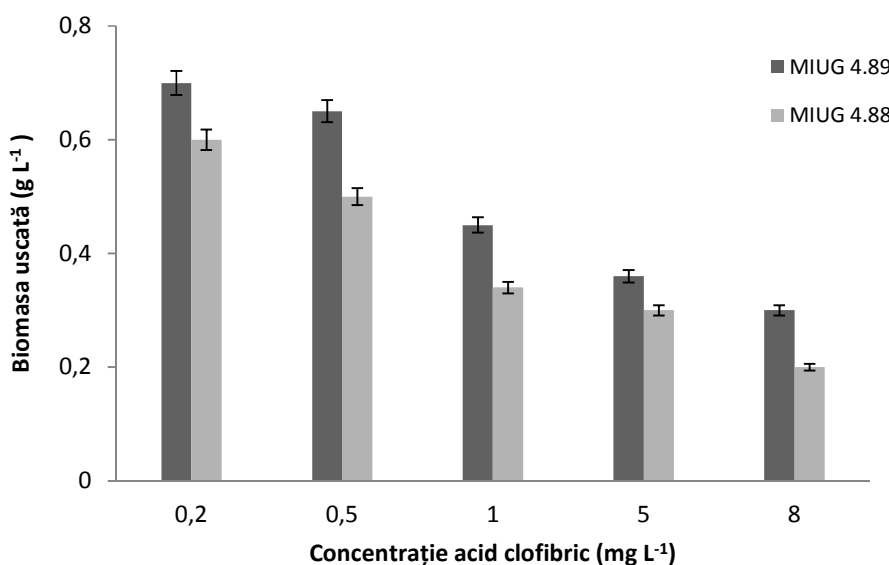


Figura 6.11 Dinamica de acumulare a biomasei tulpinilor *Streptomyces* MIUG 4.88 și *Streptomyces* MIUG 4.89 cultivate în sistem submers, cu aerare, pe mediul minimal suplimentat cu diferite concentrații de acid clofibrice și 5 g L⁻¹ glucoză (după 10 zile de cultivare, la temperatura de 25°C și 150 rpm)

De asemenea, degradarea acidului clofibrinic a fost corelată în mod evident și de înmulțirea celulelor, deoarece o scădere importantă a concentrației biomasei a fost observată la concentrații mai mari de 0,5 mg L⁻¹ acid clofibrinic (figura 6.11). Cu toate acestea, cele mai mari valori ale randamentului de biomasă (de 0,6 și 0,7 g L⁻¹ biomasă uscată) au fost obținute, după 10 zile de la cultivare, numai cu tulpina *Streptomyces* MIUG 4.89, aceasta fiind considerată cea mai performantă tulpină și pentru biodegradarea acidului clofibrinic și pe aceste considerente a fost utilizată în studiile ulterioare.

6.3.3 Optimizarea condițiilor de biodegradare a acidului clofibrinic utilizând tulpini selecționate de streptomicete

6.3.3.1 Identificarea și selecția factorilor semnificativi cu influență asupra capacității streptomicetelor de biotransformare a acidului clofibrinic folosind modelul Plackett-Burman

Analiza coeficienților de regresie a celor 10 factori a indicat că concentrația de glucoză, concentrația de inocul, temperatura și timpul de cultivare sunt parametrii semnificativi cu influență pozitivă asupra procesului de biodegradare a acidului clofibrinic și au fost incluși în experimentele de optimizare. Concentrația de compus xenobiotic, concentrația de extract de drojdie, agitarea, vârsta inoculului, volumul de mediu și pH-ul sunt parametrii nesemnificativi în procesului de biodegradare a acidului clofibrinic (figura 6.12).

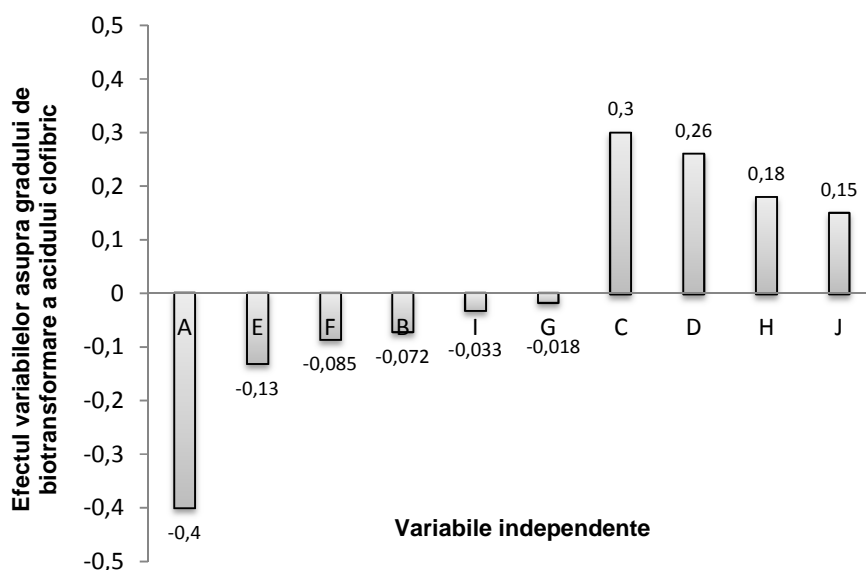


Figura 6.12 Efectul variabilelor independente asupra gradului de biotransformare a acidului clofibrinic de către tulpina selecționată *Streptomyces* MIUG 4.89

Variabilele selectate au fost verificate prin intermediul testului t-student (din analiza variației ANOVA), iar cele cu valoarea lui $p < 0,1$ și 95 % nivel de încredere au fost acceptate ca factori semnificativi în procesul de biodegradare.

6.3.3.2 Modelarea matematică a condițiilor biotehnologice de biotransformare a acidului clofibrinic (analiza suprafeței de răspuns)

În figura 6.13, se observă că prin creșterea simultană a temperaturii și a concentrației de glucoză se induce o creștere a eficienței de biotransformare a acidului clofibrinic de către tulpina selecționată *Streptomyces* MIUG 4.89, de până la 33 %.

Analizând evoluția nivelului răspunsului, se observă că mărirea concentrației de inocul și a temperaturii conduc la scăderea vitezei de eliminarea a compusului țintă. Prin urmare, menținerea concentrației de inocul la 7 % și a temperaturii la valoarea de 30°C, se obține un randament de biotransformare de 30 % (figura 6.14).

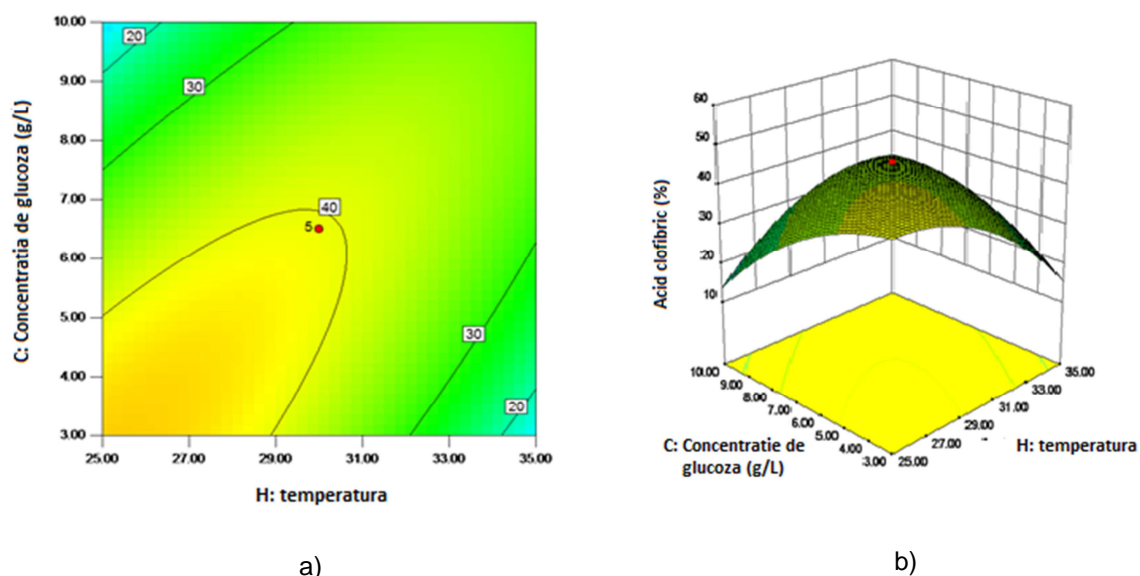
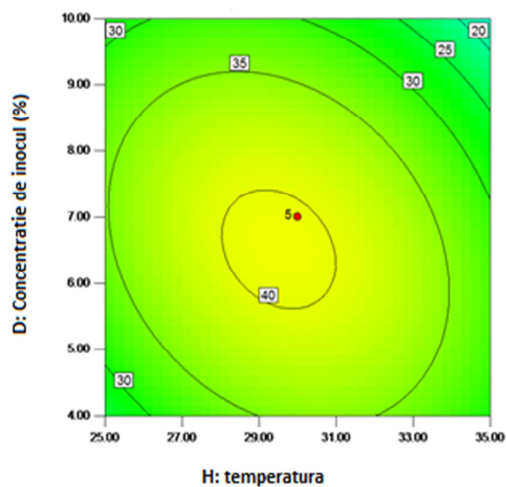


Figura 6.13 Graficul de contur (a) și suprafața de răspuns (b) ce descriu efectele cantitative, corelate ale concentrației de glucoză (C) și a temperaturii (H) asupra randamentului de biotransformare a acidului clofibrinic cu tulpina *Streptomyces* MIUG 4.89

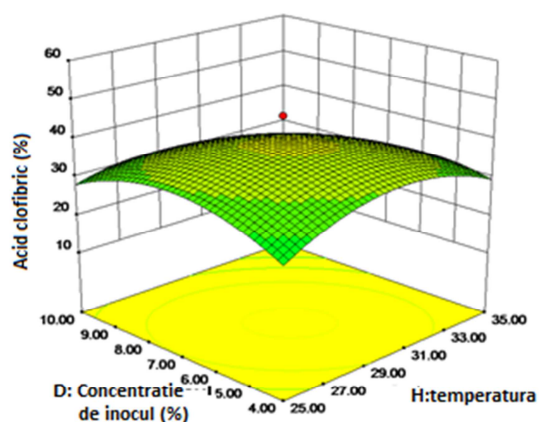
Generalizând evoluția nivelului răspunsului în funcție de concentrația de inocul și concentrația de glucoză se poate observa că gradul de biotransformare a acidului clofibrinic este de 30 % în condițiile: 6,50 g L⁻¹ glucoză și 7 % concentrație de inocul (figura 6.15). În condițiile în care cantitatea de glucoză se reduce la 3 g L⁻¹, se constată că viteza de eliminare a acidului clofibrinic se îmbunătățește cu 6 %.

În figurile 6.17 și figura 6.18, se observă efectele interacțiunii corelate dintre durata de cultivare și temperatură respectiv durata de cultivare și concentrația de glucoză, asupra gradului de biotransformare a acidului clofibrinic. În condițiile menținerii concentrației de glucoză la 6,5 g L⁻¹, a temperaturii la valoarea de 30°C, după 11 zile de cultivare se obține un randament de biotransformare a acidului clofibrinic de 35 %.

Prelungind timpul de cultivare până la 14 zile și păstrând valorile constante ale temperaturii și ale concentrației de glucoză se remarcă că viteza de eliminare a acidului clofibrinic crește până la 50 %.

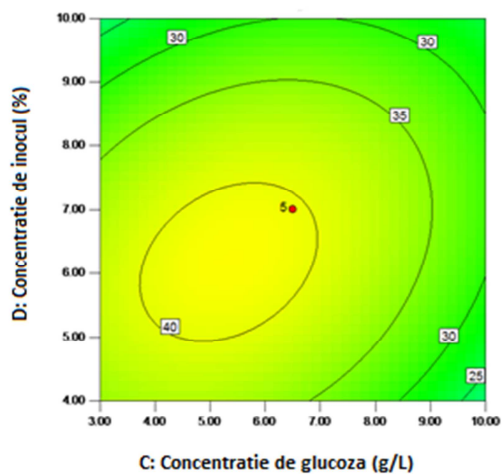


a)

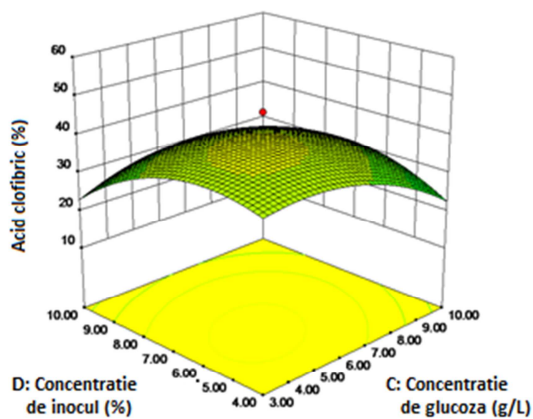


b)

Figura 6.14 Graficul de contur (a) și suprafața de răspuns (b) ce descriu efectele cantitative, corelate ale concentrației de inocul (D) și a temperaturii (H) asupra randamentului de biotransformare a acidului clofibric cu tulpina *Streptomyces* MIUG 4.89



a)



b)

Figura 6.15 Graficul de contur (a) și suprafața de răspuns (b) ce descriu efectele cantitative, corelate ale concentrației de inocul (D) și a concentrației de glucoză (C) asupra randamentului de biotransformare a acidului clofibric cu tulpina *Streptomyces* MIUG 4.89

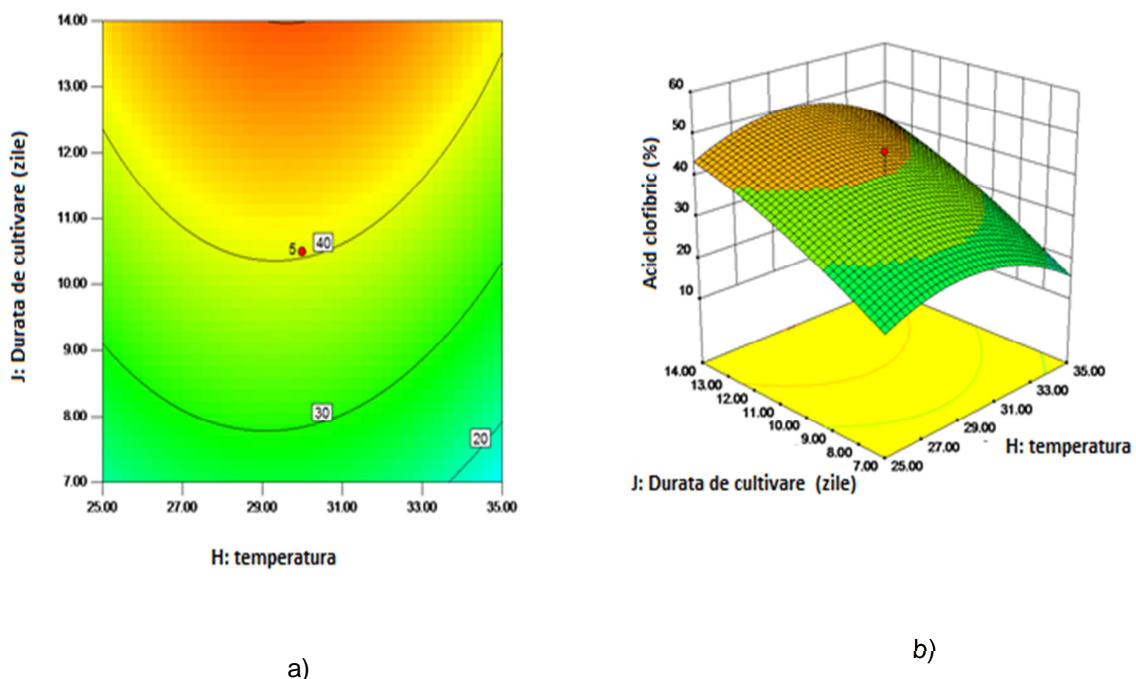


Figura 6.17 Graficul de contur (a) și suprafața de răspuns (b) ce descriu efectele cantitative, corelate ale timpului de cultivare (J) și a temperaturii (H) asupra randamentului de biotransformare a acidului clofibric cu tulpina *Streptomyces* MIUG 4.89

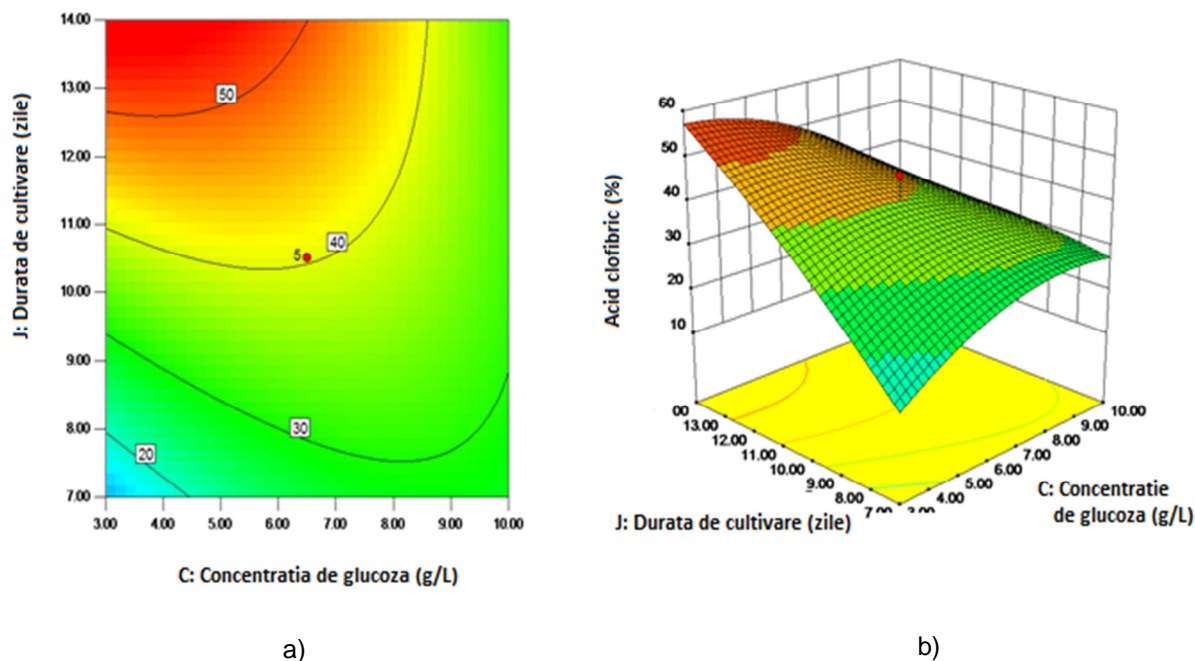


Figura 6.18 Graficul de contur (a) și suprafața de răspuns (b) ce descriu efectele cantitative, corelate ale timpului de cultivare (J) și a concentrației de glucoză (C) asupra randamentului de biotransformare a acidului clofibric cu tulpina *Streptomyces* MIUG 4.89

Rezultatele studiului de modelare statistica ale proceselor de biodegradare cu tulpina selecționată *Streptomyces* MIUG 4.89 au permis identificarea valorilor optime ale celor patru parametri biotehnologici cu influență esențială asupra randamentului de eliminare a acidului clofibrinic și anume: 6,50 g L⁻¹ glucoză, 7 % concentrație de inocul, la temperatura de 30 °C și după 11 zile de termostatare.

Validarea modelului

Modelul a fost validat prin repetarea experimentelor în condiții optime: 6,50 g L⁻¹ glucoză, 7 % concentrație de inocul, 30 °C temperatura și 11 zile de termostatare, obținând un randament de biotransformare a acidului clofibrinic de 35 %.

6.4 Concluzii parțiale

1. În urma analizei potențialului a 19 tulpini de streptomicete selecționate privind rezistența la toxicitatea acidului clofibrinic, s-a remarcat faptul că la concentrații scăzute (0,05 mg L⁻¹ și 0,2 mg L⁻¹), tulpinile studiate sunt rezistente în timp ce la concentrații de 1 mg L⁻¹, 5 mg L⁻¹ și 8 mg L⁻¹ acidul clofibrinic are efect bacteriostatic sau chiar bactericid.
2. Pentru estimarea comportamentului biotehnologic în prezență de 0,2 mg L⁻¹ acid clofibrinic s-a studiat dinamica de multiplicare în sistem submers, în condiții aerobe, pentru 5 tulpini selecționate de *Streptomyces* MIUG 4.89 , MIUG 4.88, Lp₁, Lp₂ și SNA și s-a evaluat randamentul de biomasă uscată.
3. Prin cultivare în sistem submers în condiții aerobe, pe mediul minimal cu 0,2 mg L⁻¹ acid clofibrinic, suplimentat cu 5 g L⁻¹ glucoză, s-a observat că după 10 zile de la cultivare, acidul clofibrinic a fost eliminat în procent de 10 %.
4. S-a studiat efectul unor factori (variabile independente) cu influență în procesul de biodegradare a acidului clofibrinic, concentrația de compus toxic, vârsta inoculului, viteza de agitare, temperatura, pH-ul, concentrația surselor de carbon și azot, concentrația de inocul, volumul de mediu și timpul de cultivare, cu tulpina selecționată *Streptomyces* MIUG 4.89.
5. S-a demonstrat că sursa de carbon, concentrația de inocul, temperatura și timpul de cultivare influențează semnificativ gradul de biotransformare a acidului clofibrinic.
6. Aplicarea modelului compoziției centrale și a metodei analizei suprafeței de răspuns a condus la optimizarea condițiilor de biodegradare. În condiții optime de procesare, gradul de biotransformare a acidului clofibrinic este de 35 %, la cultivarea în sistem submers, cu aerare, în prezență de 6,50 g L⁻¹ glucoză, 7% concentrație de inocul, temperatura de 30 °C, după 11 zile de cultivare.

7. Condiții de biodegradare a compușilor farmaceutici recalcitranți în culturi multiple, streptomicete-nămol activ

7.1 Introducere

Studiile realizate în această etapă a tezei de doctorat au vizat certificarea capacității streptomicetelor selecționate de biodegradare a carbamazepinei și acidului clofibrinic și adaptabilitatea acestora în culturi multiple, cu nămol activ. Totodată s-a urmărit și posibilitatea de biostimulare a activității microorganismelor din consorțiu prin optimizarea funcționalității lor în procesul de biodegradare a compușilor farmaceutici, în sisteme model.

7.2 Materiale și metode

- Culturi de microorganisme
- Biomasă de streptomicete aparținând tulpinii selecționate *Streptomyces* MIUG 4.89
- Nămol activ de la stația municipală de epurare a apelor reziduale Galați.
- Nămolul activ colectat din bazinul de aerare a stației de epurare a apelor uzate din zona Beaurade, Rennes (Franța).

7.2.2 Metodele utilizate în acest capitol au fost :

- Testarea capacității biomasei streptomicetelor de biosorbție a compușilor xenobiotici
- Testul abiotic pentru a stabili fotosensibilitatea chimică a compușilor farmaceutici
- Testul de biosorbție cu biomasa activă
- Inactivarea termică a biomasei
- Inactivarea chimică a biomasei
- Biodegradarea compușilor farmaceutici cu nămol activ
- Teste de biostimulare a biodegradării compușilor farmaceutici

7.3 Rezultate și discuții

7.3.1 Evaluarea capacității biomasei de streptomicete de biosorbție a compușilor farmaceutici recalcitranți

Evaluarea stabilității față de fotodegradare a carbamazepinei și a acidului clofibric

În urma studiului s-a remarcat faptul că atât carbamazepina cât și acidul clofibric nu se fotodegradează, rămânând până la sfârșitul perioadei de cultivare la concentrația inițială de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. Rezultate similare au obținut și Andreozzi *et al.* (2003) iar Doll și Frimmel (2003), care au remarcat o ușoară fotodegradare a carbamazepinei când se află în concentrație ridicată în apele reziduale.

Capacitatea biomasei active de streptomicete și nămol activ de biosorbție a carbamazepinei și a acidului clofibric

Acest experiment s-a realizat timp de patru ore, timp în care s-au prelevat din mediul de reacție probe (10-12 probe) și s-a urmărit gradul de biosorbție a compușilor farmaceutici țintă, de către biomasa activă a tulpinii *Streptomyces* MIUG 4.89 și de către nămolul activ. În urma studiului nu s-a observat o scădere de concentrație în carbamazepină respectiv acid clofibric în mediu de reacție.

Capacitatea biomasei inactivate de streptomicete și nămol activ de biosorbție a carbamazepinei și a acidului clofibric

S-au realizat experimente de biosorbție pe principii similare, cu diferența că biomasa a fost inactivată termic sau chimic.

Timp de o oră s-au analizat câte 6 probe (o probă la fiecare 10 minute), apoi timp de 7 ore sau luat la analizat la fiecare 60 de minute, după care s-a prelevat câte o probă în fiecare zi, timp de 5 zile. Studiile au demonstrat că atât carbamazepina cât și acidul clofibric nu se absorb în biomasa inactivată termic sau chimic.

7.3.2 Biodegradarea compușilor farmaceutici (carbamazepină, acid clofibric) cu nămol activ

În acest studiu s-a urmărit capacitatea nămolului activ provenit de la cele două stații de epurare de a elimina compuși farmaceutici studiați, în concentrație de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$, prin cultivare în sistem submers. În cazul nămolului activ de la stația de epurare Galați, se observă că la sfârșitul perioadei de cultivare,

carbamazepina a fost eliminată în procent de 6 %, indiferent de concentrația de biomasă folosită (figura 7.2) iar acidul clofibrinic a fost eliminat în procent de 20 % în condițiile în care concentrația de biomasă uscată a fost de 20 % (figura 7.3).

Din figurile 7.4 și 7.5 se observă că după 5 zile de la cultivare, compuși țintă au început să fie eliminați din mediul de cultură. La sfârșitul perioadei de cultivare (după 240 de ore), carbamazepina a fost biotransformată în procent de 10 % indiferent de concentrația de biomasă folosită în timpul experimentelor, iar acidul clofibrinic a fost eliminat în procent de 60 %, în condițiile în care concentrația inițială de biomasă uscată inoculată în mediu a fost de 24 %.

Kosjel et al., 2009 au obținut un procent de eliminare a carbamazepinei de numai 16 % atât în condiții aerobe cât și anaerobe, iar Zorita et al., 2009, au raportat o îndepărtare de 55 % a acidului clofibrinic, folosind drept cultură starter nămolul activ.

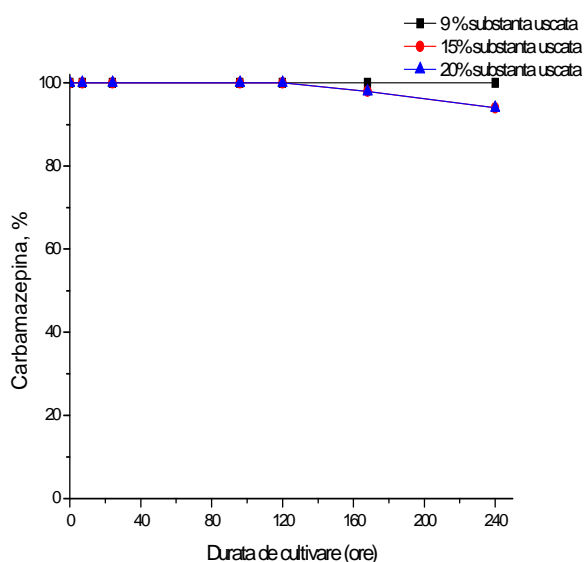


Figura 7.2 Dinamica de biotransformare a carbamazepinei cu diferite concentrații de nămol activ de la stația de epurare Galați, prin cultivare submersă (agitator orbital la temperatura de 25⁰C și 150 rpm), în mediu minimal suplimentat cu 0,2 mg L⁻¹ carbamazepină

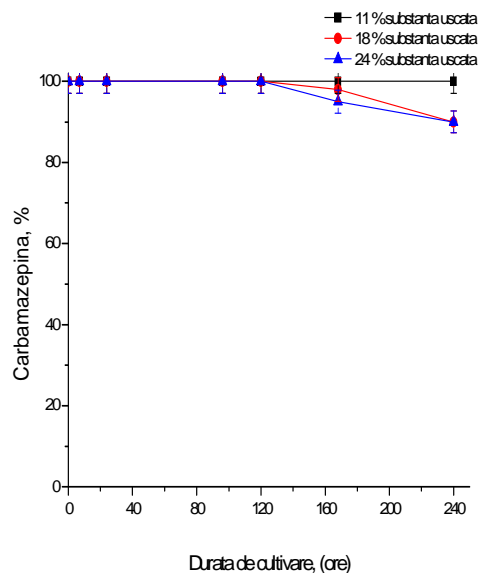


Figura 7.4 Dinamica de biotransformare a carbamazepinei cu diferite concentrații de nămol activ de la stația de epurare Rennes, prin cultivare submersă (agitator orbital la temperatura de 25⁰C și 150 rpm), în mediu minimal suplimentat cu 0,2 mg L⁻¹ carbamazepină

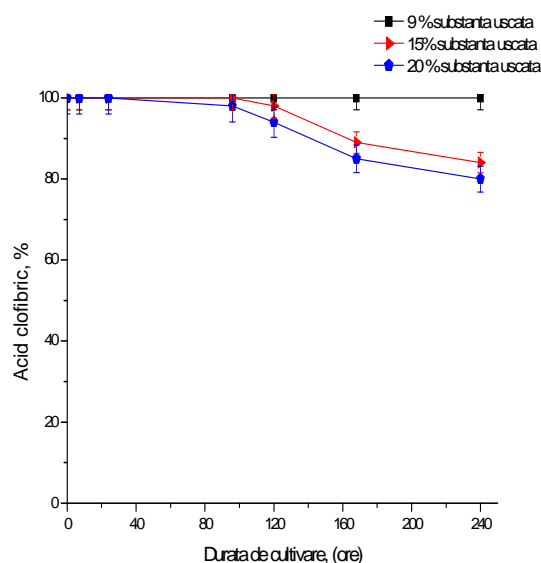


Figura 7.3 Dinamica de biotransformare a acidului clofibrinic cu diferite concentrații de nămol activ de la stația de epurare Galați, prin cultivare submersă (agitator orbital la temperatura de 25°C și 150 rpm), în mediu minimal suplimentat cu 0,2 mg L⁻¹ acid clofibrinic

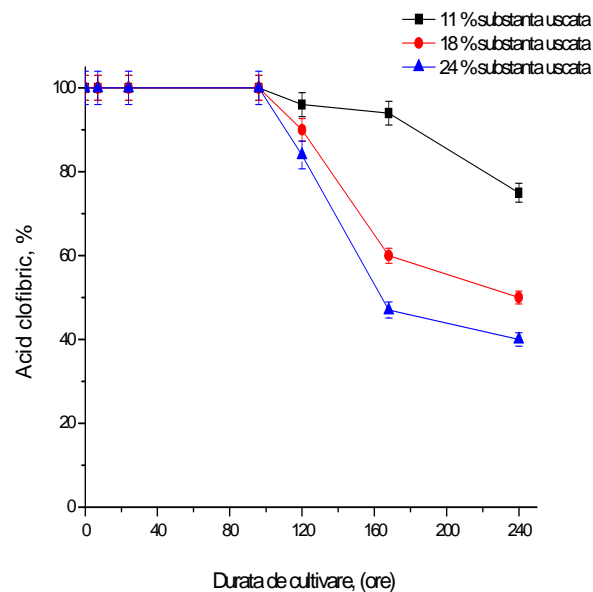


Figura 7.5 Dinamica de biotransformare a acidului clofibrinic cu diferite concentrații de nămol activ de la stația de epurare Rennes, prin cultivare submersă (agitator orbital la temperatura de 25°C și 150 rpm), în mediu minimal suplimentat cu 0,2 mg L⁻¹ acid clofibrinic

7.3.3 Evaluarea capacității de biodegradare a carbamazepinei și a acidului clofibrinic în culturi multiple *Streptomyces* MIUG 4.89 și nămol activ

Testul 1

În acest studiu inoculul format din nămol activ și tulpina selecționată de *Streptomyces* MIUG 4.89 au fost inoculate simultan la începutul cultivării, și s-a variat dimensiunea inoculului prin variația raportul biomasă umedă *Streptomyces* MIUG 4.89: nămol activ la valori de 1:1 și 1:2 (în funcție de substanța uscată a biomasei).

După cum se poate observa în figura 7.16 carbamazepina a fost eliminată din mediu de cultură în procent de 20 % în condițiile în care raportul de substanță uscată *Streptomyces* MIUG 4.89: nămol activ de la stația de epurare Galați a fost de 1:1. În condițiile în care nămolul activ de la stația de epurare Rennes și tulpina selecționată au fost cultivate în mediul de cultură în raport de 1:1, carbamazepina a fost eliminată în procent de 50 % (figura 7.17).

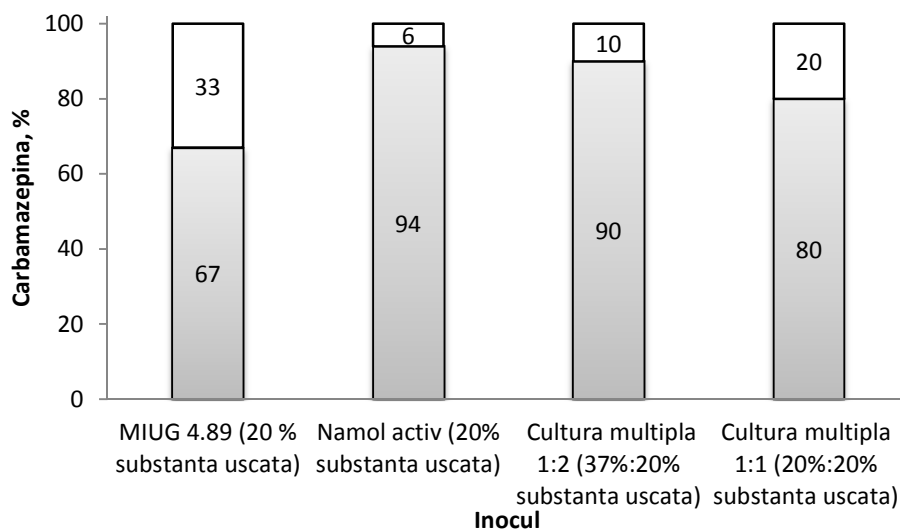


Figura 7.16 Capacitatea de biodegradare a carbamazepinei în culturi multiple *Streptomyces* MIUG 4.89: nămol activ de la stația de epurare Galați, prin variația raportului între culturi; cultivare în sistem submers pe mediul minimal suplimentat cu $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ carbamazepină, după 10 zile de cultivare, la temperatura de 25°C și 150 rpm (□ procentul de substanță eliminată, ■ procentul de substanță nedegradată)

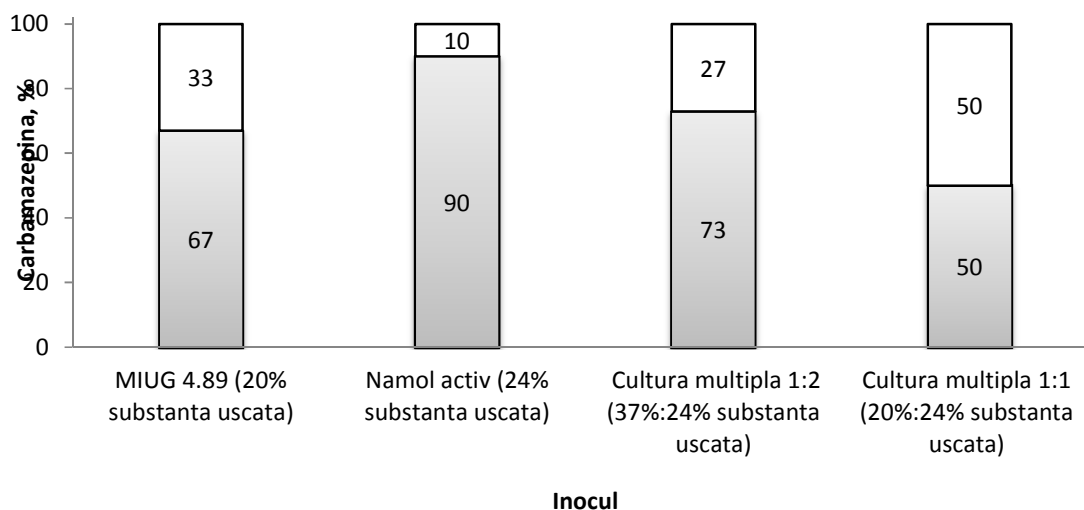


Figura 7.17 Capacitatea de biodegradare a carbamazepinei în culturi multiple *Streptomyces* MIUG 4.89: nămol activ de la stația de epurare Rennes, prin variația raportului între culturi; cultivare în sistem submers pe mediul minimal suplimentat cu $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ carbamazepină, după 10 zile de cultivare, la temperatura de 25°C și 150 rpm (□ procentul de substanță eliminată, ■ procentul de substanță nedegradată)

Gradul de biotransformare a acidul clofibric a fost de 30 % când raportul biomasă uscată *Streptomyces* MIUG 4.89: nămol activ de la stația de epurare Galați a fost de 1:1 (figura 7.18) și respectiv 53 % când raportul biomasă uscată *Streptomyces* MIUG 4.89 : nămol activ de la stația de epurare Rennes a fost de asemenea de 1 :1 (figura 7.19).

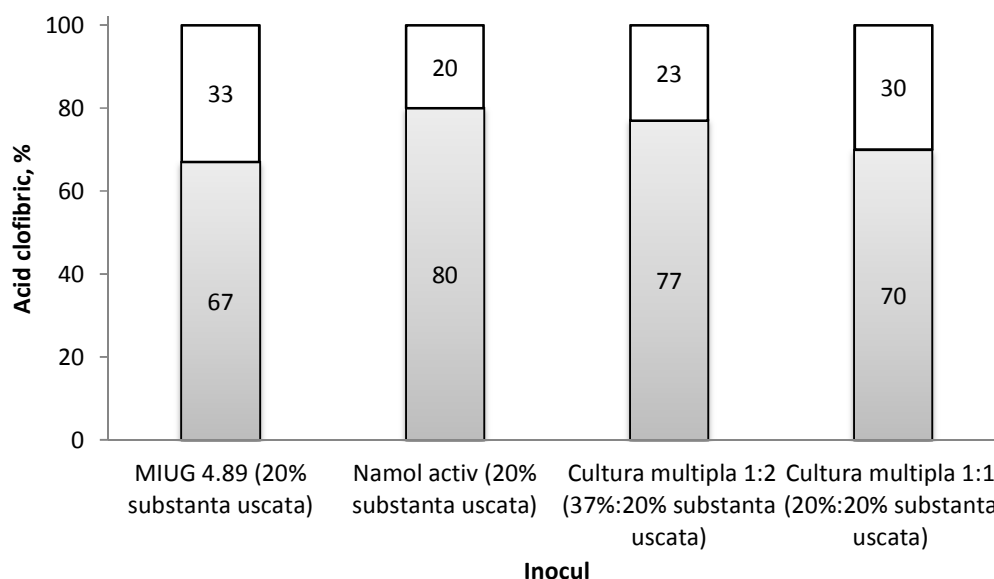


Figura 7.18 Capacitatea de biodegradare a acidului clofibric în culturi multiple *Streptomyces* MIUG 4.89: nămol activ de la stația de epurare Galați, prin variația raportului între culturi; cultivare în sistem submers pe mediul minimal suplimentat cu $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ acid clofibric, după 10 zile de cultivare, la temperatura de 25°C și 150 rpm (□ procentul de substanță eliminată, ■ procentul de substanță ne degradată)

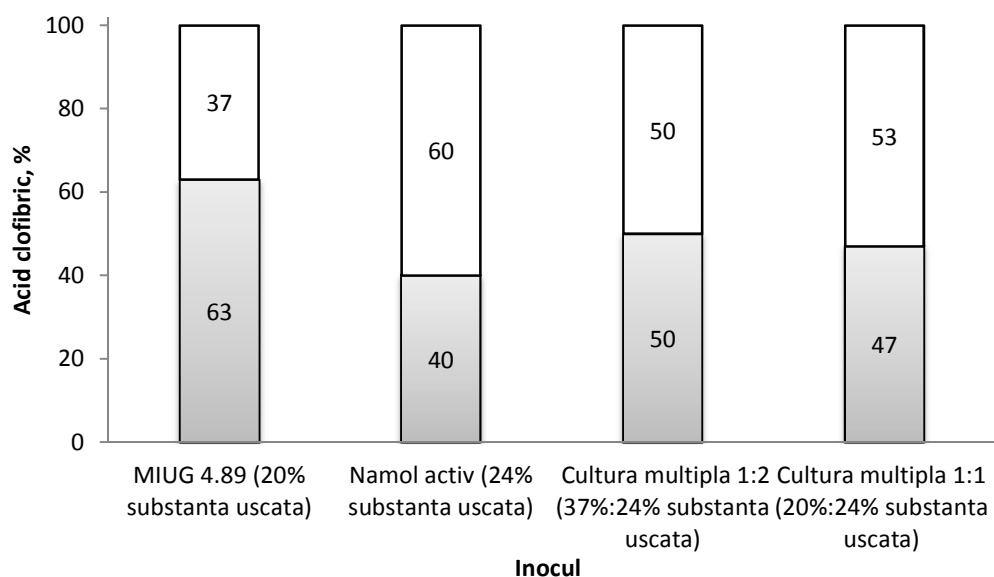


Figura 7.19 Capacitatea de biodegradare a acidului clofibric în culturi multiple *Streptomyces* MIUG 4.89: nămol activ de la stația de epurare Rennes, prin variația raportului între culturi; cultivare în sistem submers pe mediul minimal suplimentat cu $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ acid clofibric, după 10 zile de cultivare, la temperatura de 25°C și 150 rpm (□ procentul de substanță eliminată, ■ procentul de substanță ne degradată)

Testul 2

În acest studiu s-a urmărit, efectul adăugării decalate a culturilor starter asupra eficienței biodegradării carbamazepinei și acidului clofibric. Astfel, cultura starter *Streptomyces* MIUG 4.89 a fost inoculată după cinci zile de la startul procesului cu nămol activ și totodată s-a variat și raportul între cele două culturi.

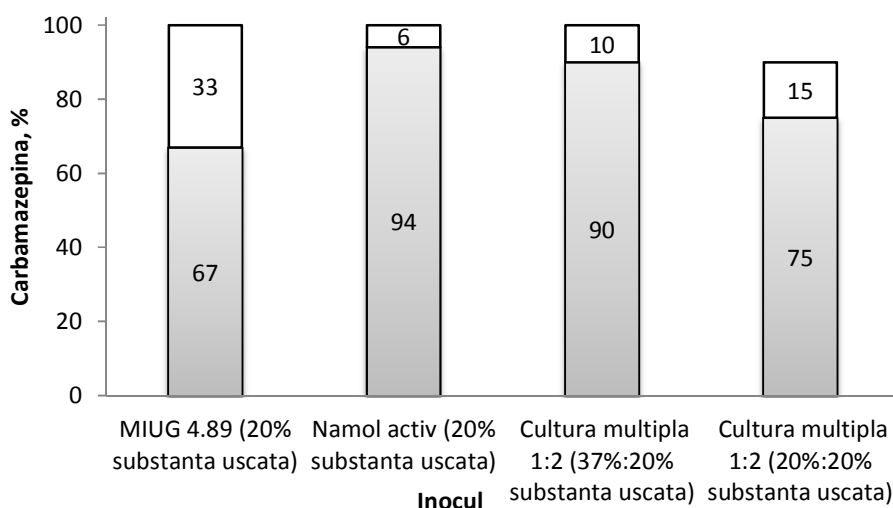


Figura 7.22 Capacitatea culturilor starter multiple de a degrada carbamazepina, prin inocularea decalată la interval de 5 zile; cultivare în sistem submers pe mediul minimal suplimentat cu $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ compus țintă, la temperatura de 25°C și 150 rpm (□ procentul de substanță eliminată, ■ procentul de substanță nedegradată)

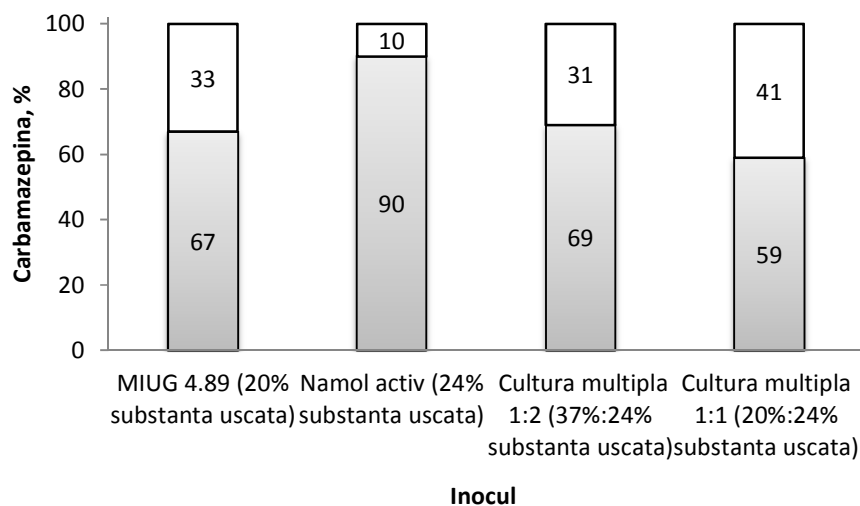


Figura 7.23 Capacitatea culturilor starter multiple de a degrada carbamazepina, prin inocularea decalată la interval de 5 zile; cultivare în sistem submers pe mediul minimal suplimentat cu $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ compus țintă, la temperatura de 25°C și 150 rpm (□ procentul de substanță eliminată, ■ procentul de substanță nedegradată)

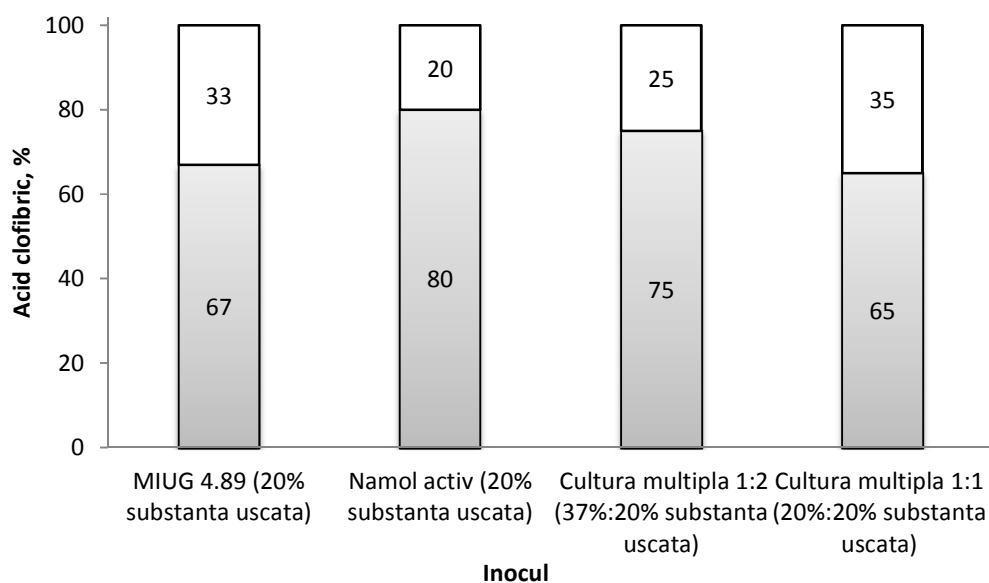


Figura 7.24 Capacitatea culturilor starter multiple de a degrada acidul clofibric, prin inocularea decalată la interval de 5 zile; cultivare în sistem submers pe mediul minimal suplimentat cu $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ compus țintă, la temperatura de 25°C și 150 rpm (□ procentul de substanță eliminată, ■ procentul de substanță nedegradată)

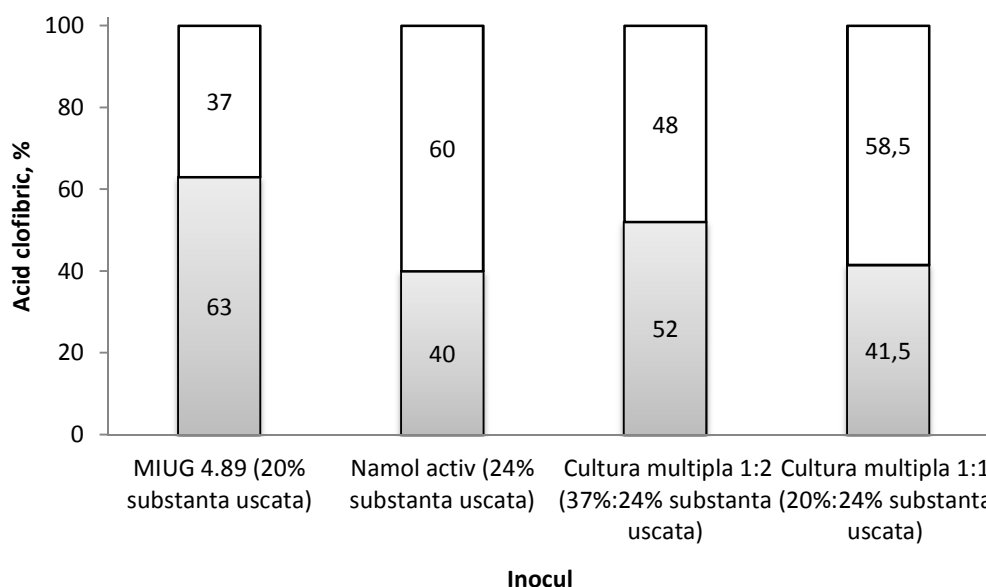


Figura 7.25 Capacitatea culturilor starter multiple de a degrada acidul clofibric, prin inocularea decalată la interval de 5 zile; cultivare în sistem submers pe mediul minimal suplimentat cu $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ compus țintă, la temperatura de 25°C și 150 rpm (□ procentul de substanță eliminată, ■ procentul de substanță nedegradată)

După cum se poate observa în figura 7.22, carbamazepina a fost eliminată din mediul de cultură în procent de 15 % în condițiile în care raportul biomasă umedă *Streptomyces* MIUG 4.89: namol activ de la stația de epurare Galați a fost de 1:1 și respectiv 41 % în cazul raportului biomasă uscată *Streptomyces*

MIUG 4.89 : nămol activ de la stația de epurare Rennes (figura 7.23), iar acidul clofibrinic a fost îndepărtat din mediul de reacție în procent de 35 % (figura 7.24) respectiv 58,5 % (figura 7.25), când raportul biomasă umedă *Streptomyces* MIUG 4.89: nămol activ a fost de asemenea 1:1.

7.4 Concluzii parțiale

1. S-a studiat capacitatea biomasei de streptomicete și nămol activ, în stare activă și inactivate termic și chimic, de biosorbție a carbamazepinei și a acidului clofibrinic și s-a demonstrat că în suspensie, în condiții aerobe de menținere, biomasă nu leagă cei doi compuși, solubili în mediu lichid în concentrație de 0, 2 mg L⁻¹.
2. S-a demonstrat capacitatea nămolului activ de la stația de epurare din Galați de biodegradare a carbamazepinei și acidului clofibrinic, în concentrații de 0, 2 g L⁻¹, în condiții aerobe, submerse cu agitare și aerare, când mediul a fost suplimentat cu 5 g L⁻¹ glucoză, obținându-se după 10 zile, randamente de biodegradare de 6 %, în cazul carbamazepinei și respectiv de 20 %, în cazul acidului clofibrinic.
3. De asemenea, s-a demonstrat capacitatea nămolului activ de la stația de epurare din Rennes de biotransformare a carbamazepinei și acidului clofibrinic, în concentrații de 0,2 g L⁻¹, în aceleași condiții experimentale, obținându-se după 10 zile, randamente de biodegradare de 10 %, în cazul carbamazepinei și respectiv de 60 %, în cazul acidului clofibrinic.
4. Eficiența biotransformării carbamazepinei și a acidului clofibrinic crește când se utilizează culturi multiple streptomicete: nămol activ, în raport de 1:1.
5. Gradul de biotransformare a carbamazepinei este avansat la 20 % și respectiv 50 %, în condițiile în care nămolul activ și tulpina *Streptomyces* MIUG 4.89 sunt inoculate simultan în raport de biomasă uscată *Streptomyces* MIUG 4.89: nămol activ de 1:1, după o perioadă de cultivare submersă, cu agitare și aerare, timp de 10 zile.
6. Randamente superioare de biotransformare a acidului clofibrinic de 30 % și respectiv 58,5 %, s-au obținut cu culturi multiple *Streptomyces* MIUG 4.89: nămol activ, în condițiile în care tulpina selecționată *Streptomyces* MIUG 4.89 a fost inoculată decalat, în concentrație de 20 % substanță uscată, după cinci zile de la startul procesului cu nămol activ în concentrație similară.

Referințe bibliografice selective

- Ahmadi M., Vahabzadeh F., Bonakdarpour B., Mofarrah E., Mehranian M., (2005), Application of the central composite design and response surface methodology to the advanced treatment of olive oil processing wastewater using Fenton's peroxidation, *Journal of Hazardous Materials*, **123**, 187–195.
- Buser H.R., Müller M.D., Theobald N., (1998), Occurrence of the pharmaceutical drug clofibrinic acid and the herbicide mecoprop in various Swiss lakes and in the North Sea, *Environmental Science & Technology*, **32**, 188–192.
- Das S., Chandra A.L., (1990), Chromate reduction in *Streptomyces*, *Experientia*, **46**, 731-733.
- De Schrijver A., De Mot, R., (1999), Degradation of pesticides by actinomycetes, *Critical Reviews in Microbiology*, **25**, 85-119.
- Lechevalier H., (1989), A practical guide to generic identification of actinomycetes, pp. 2344-2347. In: S.T. Williams (eds.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Lerch K., Ettliger L., (1972), Purification of a tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*, *European Journal of Biochemistry*, **31**, 427–437.
- Golan-Rozen N., Chefetz B., Ben-Ari J., Geva J., Hadar Y., (2011), Transformation of the recalcitrant pharmaceutical compound carbamazepine by *Pleurotus ostreatus*: role of cytochrome P450 Monooxygenase and manganese peroxidase, *Environmental Science & Technology*, **45**, 6800-6805.

- Gracia-Lor E., Sancho J.V., Serrano R., Hernandez F., (2012), Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia, *Chemosphere*, **87**, 453–462.
- Gros M., Petrovic M., Ginebreda A., Barcelo D., (2010), Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes, *Environment International*, **36**, 15-26.
- Machczynski M.C., Vijgenboom E., Samyn B., Canters G.W., (2004), Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity, *Protein Science*, **13**, 2388–2397.
- Zhou J., Yu X., Ding C., Wang Z., Zhou Q., Pao H., Cai W., (2011), Optimization of phenol degradation by *Candida tropicalis* Z-04 using Plackett-Burman design and response surface methodology, *Journal of Environmental Sciences*, **231**, 22-30.

8. Concluzii generale

Studiile realizate în acord cu obiectivele științifice ale tezei de doctorat au vizat analiza potențialului bacteriilor din genul *Streptomyces* de a biosintetiza fenoloxidaze, cu aplicații industriale și în bioremediere. Pe baza concluziilor parțiale prezentate la finalul fiecărui capitol din cadrul studiului experimental, este reliefată sumativ o serie de concluzii generale, după cum urmează:

- S-au studiat 40 de tulpini de *Streptomyces* spp., dintre care 30 de tulpini de streptomicete nou izolate din probe de sol și vegetație din județul Galați și 10 tulpini de streptomicete aparținând Colecției de microorganisme MIUG afiliată Platformei de cercetare și formare "Bioaliment", din cadrul Universității „Dunărea de Jos” din Galați.
- Un număr de 19 tulpini selecționate, ca activi producători de tirozinază și lacază au fost testate privind rezistența la compuși farmaceutici recalcitranti (carbamazepină și acid clofibrin). S-a remarcat faptul că, la concentrații de 0,05 mg L⁻¹ și 0,2 mg L⁻¹ de carbamazepină și acid clofibrin, tulpinile sunt active, în timp ce la concentrații ridicate (1 mg L⁻¹, 5 mg L⁻¹ și 8 mg L⁻¹) tulpinile prezintă o creștere lentă sau sunt inactivate.
- Tulpina *Streptomyces* MIUG 4.89 s-a remarcat print-un potențial superior de a biotransforma carbamazepina și acidul clofibrin, în concentrații de 0,2 mg L⁻¹, în condiții submerse de cultivare, cu agitare și aerare, obținându-se după 10 zile, randamente de biodegradare de 30 %, în cazul carbamazepinei și respectiv 34 %, în cazul acidului clofibrin.
- Utilizând modelul Plackett-Burman, modelul compoziției centrale (CCD) și metoda analizei suprafeței de răspuns, s-a studiat efectul unor factori biotehnologici semnificativi asupra gradului de biotransformare a compușilor xenobiotici și s-au optimizat parametrii procesului de biodegradare în scopul creșterii vitezei de transformare a compușilor farmaceutici țintă, cu ajutorul tulpinii selecționate *Streptomyces* MIUG 4.89.
- Studiile de optimizare demonstrează posibilitatea coordonării mecanismului de biodegradare în sensul intensificării vitezei de transformare a compușilor xenobiotici țintă prin modificarea compoziției mediului fermentativ și a duratei de cultivare. Acest aspect are importanță practică deosebită în procesele de bioremediere.
- S-a demonstrat capacitatea nămolului activ de la stația de epurare din Galați și a nămolului activ de la stația de epurare din Rennes de biodegradare a carbamazepinei și acidului clofibrin, în concentrații de 0, 2 g L⁻¹, în condiții aerobe, obținându-se după 10 zile, randamente de biodegradare de 6 %, în cazul carbamazepinei și respectiv de 20 %, în cazul acidului clofibrin.
- De asemenea, s-a demonstrat capacitatea biomasei de streptomicete și a nămolului activ de la stația de epurare din Galați respectiv Rennes de a funcționa în culturi multiple și a produce biotransformarea carbamazepinei și acidului clofibrin, în concentrații de 0,2 g L⁻¹, în condiții aerobe, submerse cu agitare și aerare, obținându-se după 10 zile, randamente superioare de

biotransformare a celor doi compuși, ceea ce explică adaptabilitatea streptomicetelor în consorții complexe de microorganisme și îmbunătățirea substanțială a eficienței procesului de biodegradare.

- Studiile realizate au valoare de cercetare fundamentală și aplicativă întrucât promovează concepte noi privind utilizarea microorganismelor în special bacterii din genul *Streptomyces*, prin aplicarea unei metode simple și eficiente din punct de vedere economic, cu aplicații în procesele de bioremediere a compușilor farmaceutici toxici, carbamazepina și acidul clofibrinic.

9. Contribuții la dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspective

Originalitatea cercetărilor efectuate, în concordanță cu obiectivele științifice ale tezei de doctorat, se concretizează printr-o serie de elemente de noutate, care sporesc valoarea științifică a studiilor realizate.

Contribuțiile originale ale tezei de doctorat pot fi sintetizate după cum urmează:

- S-a demonstrat posibilitatea utilizării streptomicetelor ca surse importante de enzime comerciale pentru bioconversia compușilor farmaceutici xenobiotici, carbamazepina și acidul clofibrinic. Aceste studii sunt o premieră pentru cercetările în domeniul abordat de teză și oferă numeroase perspective viitoare pentru noi inovații și potențiale dezvoltări și aplicații.
- S-a studiat capacitatea tulpinii *Streptomyces* MIUG 4.89 aparținând Colecției de microorganisme MIUG a Platformei de cercetare și formare "Bioaliment" a Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor din cadrul Universității "Dunărea de Jos" din Galați de biotransformare a compușilor farmaceutici recalcitranti în concentrații de 0,2 mg L⁻¹, prin cultivarea în condiții aerobe, submerse cu agitare și aerare controlate.
- S-a demonstrat potențialul de bioepurare a compușilor farmaceutici xenobiotici, carbamazepina și acidul clofibrinic, prin acțiunea streptomicetelor selecționate și a nămolului activ, individual sau în culture multiple, în condiții de operare similare cu cele din stațiile de epurare a apelor reziduale. Aceste date au valoare de cercetare fundamentală și aplicativă întrucât sunt de asemenea în premieră abordate.

Studiile privind bioremedierea apelor reziduale prin metode neconvenționale ieftine sunt necesare pentru menținerea echilibrului între viața social-economică și ecosistemele acvatice naturale. Rezultatele obținute încurajează continuarea cercetărilor de biotratament în condiții eficiente, controlate, a apelor reziduale privind optimizarea procesului industrial în scopul de a optimiza procesele din stațiile de epurare pentru o mai bună gestionare a resurselor de apă, protecția mediului înconjurător și creșterea calității vieții.

Diseminarea rezultatelor cercetării

Diseminarea rezultatelor cercetărilor s-a materializat prin publicarea sau comunicarea unor lucrări științifice după cum urmează:

A. Articole publicate în reviste cotate ISI

1. **Claudia Popa**, Lidia Favier, Gabriela Bahrim, Abdeltif Amrane, Study of *Streptomyces* as agents for clofibrinic acid biotransformation, *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 24, Supplement 1, Pages S1-S144 (July 2013). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166913003169>

2. **Claudia Popa Ungureanu**, Lidia Favier, Gabriela Bahrim, Abdeltif Amrane, 2013, Response surface optimization of experimental conditions for carbamazepine biodegradation by *Streptomyces* MIUG 4.89. *New Biotechnology*, **IF 1.7** (în recenzie).
3. **Claudia Popa**, Lidia Favier, Rodica Dinica, Samer Semrany, Hayet Djelal, Gabriela Bahrim, Abdeltif Amrane, 2013, Carbamazepine biodegradation potential of wild strains of *Streptomyces*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **IF 1.2** (în recenzie).

B. Articole publicate în reviste indexate în baza de date internaționale

1. **Claudia Popa (Ungureanu)**, Lidia Favier, Gabriela Bahrim, 2013, Testing of the new streptomyces strains for production of phenoloxidases, *Annals of "DUNAREA DE JOS" University of Galati, Food Technology*, Fascicle VI, vol 37 (2).
2. **Claudia Popa**, Gabriela Bahrim, 2011, *Streptomyces* tyrosinase: Production and practical applications. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, vol 8, 1-7.

C. Cărți și capitole în cărți

1. Bahrim Gabriela, Coman Gigi, Cotarlet Mihaela, **Popa Claudia**, 2011, Enzy-Streptomyces As Valuable Bioingredients And Biopreservatives, in: *Microbial Technology "The Emerging Era"*, Lambert Academic Publishing, Germany, 52-89.

D. Lucrări comunicate la manifestări științifice internaționale

1. **Claudia Popa**, Lidia Favier, Hayet Djelal, Ben Mansour, Gabriela Bahrim, Isolation and characterisation of indigenous carbamazepine resistant strains. 1st International Conference: Microbial Diversity Challenges and Applications. 1-3 Noiembrie 2013, Hammamet, Tunisia 2013.
2. **Claudia Popa Ungureanu**, Lidia Favier, Gabriela Bahrim, Abdeltif Amrane, Response surface optimization of experimental conditions for carbamazepine biodegradation by *Streptomyces* MIUG 4.89, 7th International conference environmental engineering and management, 18-21 Septembrie, Vienna, Austria 2013.
3. **Claudia Popa (Ungureanu)**, Lidia Favier, Gabriela Bahrim, Testing of the new *Streptomyces* strains for production of phenoloxidases, The 6th International Symposium Euroalimint, 3-5 Octombrie, Galați, 2013.
4. **Claudia Popa**, Lidia Favier, Gabriela Bahrim, Abdeltif Amrane, Study of *Streptomyces* as Agents for Clofibric Acid Biotransformation, European Biotechnology Congress, 16-18 Mai, Bratislava, Slovacia 2013.
5. Samer Semrany, **Claudia Popa**, Lidia Favier, Samir Taha, Abdeltif Amrane, Degradation of carbamazepine by *Trametes versicolor* strain grown on various organic supplements, Centenary of Education in Chemical Engineering, 28-30 Noiembrie, Iași, 2012.
6. **Claudia Popa**, Samer Semrany, Lidia Favier, Gabriela Bahrim, Abdeltif Amrane, Isolation and Screening of *Streptomyces* Strains Resistant to Anticonvulsant Drug Carbamazepine, Centenary of Education in Chemical Engineering, 28-30 Noiembrie, Iași, 2012.
7. Samer Semrany, **Claudia Popa**, Lidia Favier, Hayet Djelal, Abdeltif Amrane, Investigating possibilities and Limitations of Conventional Activated Sludge Process in Carbamazepine Biodegradation: Testing the Influence of Several Carbon Sources, *Polluants emergents*, Ecole des Mines de Nantes, 1 et 2 Februarie 2012, Nantes, Franța.

E. Lucrări comunicate la manifestări științifice naționale

1. **Claudia Popa (Ungureanu)**, Gabriela BHRIM, Isolation and screening of *Streptomyces* strains from soil as tyrosinase producers, The Second PhD Student Symposium, POSDRU/107/1.5/S/76822 "Dunărea de Jos" University of Galați, 13-14 Decembrie 2012.
2. **Claudia Popa (Ungureanu)**, Gabriela Bahrim, Isolation and Screening of *Streptomyces* Strains as Producers of Phenoloxidases (Tyrosinase and Laccase), Conferința Științifică a Școlilor Doctorale, 16-17 Mai, Galați 2013.

Membru în echipele proiectelor de cercetare

1. 2013-2014 Proiect bilateral Franța-Romania, BRANCUȘI Nr. 29510YD "Dezvoltarea și implementarea unor procedee eficiente de bioremediere a compușilor farmaceutici".
2. 2013-2014 Proiect bilateral România - China "Utilizarea de tulpini fungice selectate pentru a obține antimicrobieni cu impact mare în asigurarea siguranței alimentare".
3. 2011-2014 Proiect PN-II-ID-PCE-2011-3-0255 nr 39/25.10.2011 "Realizarea unui sistem electronic pe baza de senzori electrochimici și biosenzori pentru controlul aminelor biogene.

PREMII

Best Award, *International Conference on Analytical Chemistry RO - ICAC*, 18-21 Septembrie, Targoviste, 2012.

Locul I, Conferința Științifică a Școlilor Doctorale, 16-17 Mai, Galați cu lucrarea: Isolation and Screening of *Streptomyces* Strains as Producers of Phenoloxidases (Tyrosinase and Laccase).

Locul al II-lea, Conferința Științifică a Școlilor Doctorale, 16-17 Mai, Galați cu lucrarea: Disposable Biosensors Based on Carbonaceous Screen-Printed Electrodes and Diamine Oxidase.

Locul al II-lea -secțiunea publicații acordat în cadrul proiectului POS DRU 76822 - TOP ACADEMIC