

MICROORGANISME ȘI HABITATE: BIODIVERSITATE ȘI BIORESURSĂ

TEZĂ DE ABILITARE

- rezumat -

Dr. Cristian Coman

Cluj-Napoca
2020

Prezentarea candidatului și schița tezei

Autorul este cercetător științific gr. I la Institutul de Cercetări Biologice Cluj-Napoca (ICB Cluj), filială a Institutului Național de Cercetare și Dezvoltare pentru Științe Biologice (INCDSB) București. La ICB Cluj, autorul este liderul grupului de microbiologie ambientală și membru în Consiliul de conducere, iar la INCDSB este membru al Consiliului științific. Per ansamblu, autorul are o experiență de peste 12 ani în domeniul cercetării și dezvoltării, cu accent pe studii asupra biodiversității microbiene în medii acvatice și extreme, rezistență antimicrobiană în mediul înconjurător, microbiologie moleculară, metagenomică.

Candidatul este licențiat în biologie la Facultatea de Biologie și Geologie, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca în 2007. După obținerea diplomei de Master în Biologie celulară și biotehnologie moleculară de la aceeași universitate în 2008, a început stagiul de doctorat în Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, primind diploma de Doctor în Biologie în noiembrie 2011.

De la obținerea titlului de Doctor, autorul a publicat 31 de lucrări în reviste internaționale și naționale peer-review, din care 22 sunt indexate în baza de date Clarivate Analytics (lucrări ISI) și nouă sunt indexate în baze de date internaționale. De asemenea, autorul este editorul unei cărți și i-a fost acordat un brevet național. În martie 2020, indicele H al autorului este 8, conform Web of Science (cu 264 de citări) și Scopus (cu 295 de citări) sau 10, potrivit Google Scholar (cu 405 de citări). În ceea ce privește experiența în managementul proiectelor, autorul este/a fost director de proiect sau responsabil partener în șase proiecte de cercetare, două internaționale și patru naționale.

Realizările științifice și profesionale prezentate în această teză se întind pe o perioadă de opt ani, între sfârșitul anului 2011 (titlul de Doctor acordat) și prezent. Tema principală a tezei de abilitare este microbiologia ambientală din România, cu rezultate ce prezintă: biodiversitatea comunităților microbiene termofile din Câmpia de Vest a României, conceptul One Health și răspândirea rezistenței la antibiotice în mediul înconjurător și potențialul biotehnologic al microorganismelor izolate din mediul înconjurător. În capitolul final, autorul prezintă planul de dezvoltare profesională și academică, colaborările sale naționale și internaționale și planurile de viitor.

I. Biodiversitatea comunităților microbiene din medii extreme, termale, din România

În ceea ce privește mediile subterane, investigațiile au vizat prima caracterizare a biodiversității microbiene în acviferele hipertermale Panonian și Triasic din Câmpia de Vest a României, cu temperaturi ale apei cuprinse între 47 - 84 °C și, respectiv, 72 - 104 °C. Abundențele celulelor procariote au variat atât cu tipul acviferului, cât și cu temperatura apei, numărul copiilor genei pentru ARNr fiind între 10⁵ - 10⁶/mL în acviferul Panonian, valorile mai mari fiind observate la temperatura cea mai scăzută (47 °C). În acviferul Triasic, aceste valori au fost cuprinse între 10² - 10⁴/mL, cele mai scăzute valori fiind detectate la 92 - 104 °C. Astfel, abundențele celulelor bacteriene tind să scadă treptat, odată cu adâncimea și cu creșterea temperaturii apei. Deși se află în proximitate geografică, acviferul Panonian este un sistem hidrologic foarte stabil, probabil independent de orice rezerve de apă de la suprafață, în timp ce zăcămintul Triasic este inclus în ciclul hidrologic datorită reumplirii naturale. În acest context, a fost observat că în acviferul Panonian, 95 - 99% din bibliotecile de secvențe au fost compuse din taxoni termofili și hipertermofili, fapt ce validează acest acvifer ca fiind unul închis. Pe de altă parte, acviferul Triasic a conținut 28 - 98% taxoni indigeni, alături de o contaminare cu taxoni mezofili. Comunitățile procariote din acviferele investigate au fost formate din 24 de filumuri diferite, 13 dintre ele cu o abundență de peste 1%. Cel mai abundent filum din acviferul Panonian a fost Proteobacteria, în timp ce în Triasic cele mai răspândite au fost atât Proteobacteria, cât și Firmicutes. Aceste filumuri sunt observate ca dominante în mediile subterane continentale, Alpha-, Beta- și Gammaproteobacteria fiind frecvent întâlnite în acvifere de joasă adâncime, în timp ce taxonii aparținând Firmicutes sunt de obicei dominanți la o adâncime mai mare, așa cum e cazul acviferul Triasic. Din cele 224 OTU întâlnite în cele 11 probe, doar cinci dintre cele dominante au fost observate în toate probele, subliniind că aceste acvifere conțin comunități microbiene distincte. Deși alfa-diversitatea pare să fie influențată de aportul de mesofile de la suprafață în cazul acviferului Triasic, lucrurile sunt diferite în cazul beta-diversității. Alți parametri, care sunt specifici pentru fiecare acvifer, precum temperatura, adâncimea, Na⁺, Ca²⁺, SO₄²⁻, pH-ul și conductivitatea au fost corelate în mod semnificativ cu biodiversitatea microbială. Astfel, parametrii fizico-chimici specifici și reumplerea cu apă de la suprafață, condiții particulare fiecărui tip de acvifer, au cel mai probabil un efect cumulativ în conturarea structurii comunităților de microorganisme.

Când urcăm la suprafață, în comunitățile microbiene nemineralizate, putem observa că abundența celulelor crește, variind între 10^6 - 10^8 , fără însă o tendință constantă în raport cu variația temperaturii. Domeniul Bacteria a fost mult mai divers decât Archaea, filumurile dominante fiind Proteobacteria, Cianobacteria, Cloroflexi și Nitrospirae. Pe măsură ce temperatura crește, cianobacteriile (fotosinteza oxigenică) sunt înlocuite treptat de fototrofi anoxigenici precum *Chloroflexus* și *Ectothiorhodospira*. S-a constatat că temperatura exercită o influență semnificativă asupra alfa-diversității, diversitatea taxonilor scăzând proporțional cu creșterea temperaturii. Beta-diversitatea s-a dovedit a fi influențată într-o măsură mai mare de caracteristicile fizico-chimice ale fiecărui izvor geotermal, în special de concentrațiile de ioni dominanți (Na^+ , K^+ , HCO_3^- și PO_4^{3-}), de temperatură și de conductivitate. În comunitățile microbiene mineralizate, la temperaturi mai scăzute (32°C), filumul dominant în bibliotecile de secvențe a fost Cianobacteria, urmat de Proteobacteria și Firmicutes. La temperaturi mai ridicate (49°C și 65°C) Proteobacteria și Firmicutes au fost dominante, în unele cazuri aproape complet (de exemplu, o abundență a Proteobacteriilor de 91% la 49°C). Abundența celulelor de Archaea au fost scăzute la 32°C și 49°C , însă au crescut substanțial la 65°C , reprezentând 36% din biblioteca de secvențe, fiind compuse aproape în întregime de Euryarchaeota. Formarea depozitelor de carbonat este destul de frecventă în jurul izvoarelor termale continentale, însă o întrebare importantă rămâne cea dacă acel proces este abiogen, bazat exclusiv pe starea de saturație a apei, sau biogen, unde depunerile minerale sunt influențate de consorțiul microbial prin metabolismul lor. La suprafață, în punctul în care iese apa geotermală din subteran, în principal datorită „efectului de presiune scăzută” are loc o precipitare a carbonatului de calciu, care încastrează și celulele microbiene. Pe măsură ce ne îndepărtăm de acest punct, atât temperatura, cât și debitul de apă scad, iar comunitățile microbiene încep să prospere. Astfel, mineralizarea ar putea fi influențată atât de apă, cât și de comunitatea de microorganisme (la 49°C) sau în principal de comunitatea microbială (la 32°C), hidratarea aici fiind sporadică.

În concluzie, investigarea acestor tipuri de habitate oferă informații valoroase asupra diversității și ecologiei microbiene în aceste medii extreme, furnizând informații importante despre comunitățile microbiene din ape subterane continentale de mare adâncime sau cele de la suprafață, importante pentru studiile de biologie evolutivă și aplicații biotehnologice.

II. Rezistența la antibiotice și conceptul One Health

Aceste investigații au avut rolul de a oferi noi date în contextul informațiilor limitate existente despre prezența și abundența antibioticelor și a rezistenței la antibiotice atât în sursele de poluare (ape uzate din spital), cât și în mediul înconjurător (ape subterane). În apele uzate din spitale au fost detectate concentrații substanțiale de antibiotice din clasele β -lactamice, glicopeptide și trimetoprim. Nivelul de contaminare cu gene de rezistență la antibiotice a fost variat, însă cu o abundență relativă ridicată în toate probele de apă uzată investigate, cea mai mare abundență relativă fiind observată în cazul genelor *suII* și *qacE Δ 1*. Contaminanții microbieni dominanți în probele de apă uzată din spital au aparținut grupurilor Bacteroidetes, Firmicutes și Actinobacteria. Analiza comparativă a eșantioanelor de apă uzată colectate înainte și după etapa de tratare a arătat o eficiență moderată de îndepărtare a acestor poluanți (reziduuri de antibiotice, bacterii și gene de rezistență). Astfel, putem concluziona că apele uzate din spitale (brute și tratate) pot contribui la răspândirea acestor poluanți emergenți în mediile non-clinice. Totodată, în ceea ce privește apele subterane, rezultatele obținute în investigațiile efectuate și prezentate în teză, se poate observa că antibioticele, genele de rezistență la antibiotice și elementele genetice mobile sunt larg răspândite în aceste habitate, nu doar în jurul aglomerațiilor urbane, ci și în zone mai îndepărtate, la distanță considerabilă de orașe. Au fost observate concentrații crescute de cefepime, tazobactam, eritromicină, sulfametoxazol și trimetoprim, acesta din urmă fiind întâlnit în toate probele de apă subterană investigate. Secvențe de ADN afiliate grupurilor Betaproteobacteria și Bacteroidetes au fost detectate în apele subterane cu impact antropic scăzut, în timp ce probele prelevate din zone cu un impact antropic prezumtiv mai ridicat au fost dominate de taxoni aparținând filumului Firmicutes și alți agenți patogeni bacterieni cunoscuți, aparținând familiilor Enterobacteriaceae, Enterococcaceae, Clostridiceae, Campylobacteraceae și Aeromonadaceae. A fost identificată o co-selecție a genelor *int1*, *qacE Δ 1* și *suII* (un grup indicator cunoscut pentru poluarea antropică) cu genele de rezistență *tetC*, *tetO*, *tetW*, ca posibil indicator al influenței antropice în răspândirea acestor poluanți emergenți în ape subterane, o resursă importantă de apă potabilă în comunitățile locale.

III. Microorganismele izolate din mediul înconjurător ca resursă pentru aplicații biotehnologice

Pe baza informațiilor prezentate în acest capitol, putem concluziona că microorganismele sunt o resursă importantă în domeniul cercetărilor biotehnologice, pentru diverse aplicații. Izolatul ROICE este un candidat promițător pentru dezvoltarea de noi compuși antimicrobieni sau pentru reducerea răspândirii bacteriilor multirezistente la antibiotice în mediul înconjurător. Astfel, poate contribui la eforturile de combatere a fenomenului de rezistență antimicrobiană printr-o abordare de tip One Health, care vizează sănătatea umană, animală și a mediului. Extractul bacterian crud a fost testat pe bacterii multirezistente la antibiotice izolate din România, prezentând un efect bactericid evident împotriva a 40% dintre tulpinile testate, un efect bacteriostatic în cazul a 12% dintre tulpini și niciun efect împotriva a 48% dintre patogenii testați. A fost observat un efect inhibitor foarte bun atât în cazul izolatelor de mediu, cât și a celor clinice, precum MRSA și MSSA, Enterococci și Enterobacteriaceae. Un efect diferit (bacteriostatic vs. bactericid) a fost observat în cazul tulpinilor de Enterobacteriaceae izolate din apele uzate brute vs. tratate, ceea ce sugerează că procesul de tratare a apelor uzate poate influența susceptibilitatea bacteriilor rezistente la antibiotice la diferite extracte bacteriene, o premisă importantă pentru aplicații viitoare.

O resursă extraordinară pentru aplicații biotehnologice o reprezintă și Colecția de Alge și Cianobacterii a Institutului de Cercetări Biologice Cluj-Napoca. Aceasta, cu peste 1000 de izolate de microalge și cianobacterii, a fost și este utilizată în diferite cercetări fundamentale și aplicative de tipul celor taxonomice, de energie regenerabilă, suplimente alimentare și diferiți alți compuși secundari.

IV. Plan de dezvoltare profesională și academică

Pe termen mediu și lung, autorul își propune să continue direcția de cercetare-dezvoltare în domeniul microbiologiei ambientale, cu accent pe biodiversitatea și ecologia microbiană și pe biotehnologiile microbiene. Pe termen scurt, autorul se va axa pe conceptul One Health, în principal datorită proiectului Antiversa - *Biodiversity as an ecological barrier for the spread of clinically relevant antibiotic resistance in the environment*, un proiect european finanțat prin programul ERA-Net al H2020 și implementat în perioada 2020-2023. Aici, printr-un efort comun al unor grupuri din șapte țări din UE, investigațiile efectuate vor încerca să răspundă în ce

măsură diversitatea biologică din diferite habitate este o componentă importantă în mecanismul de selecție și acumulare a rezistenței la antibiotice în mediul înconjurător.

Referitor la abordarea One Health pe termen mediu și lung, autorul își propune să continue investigarea rolului apelor uzate urbane în răspândirea rezistenței la antibiotice în mediul înconjurător. Pe lângă aceasta, autorul își propune și dezvoltarea de biotehnologii specifice menite să reducă încărcătura bacteriilor și a genelor de rezistență la antibiotice din apele uzate înainte ca acestea să ajungă în apele de suprafață. Totodată, o temă importantă de cercetare a autorului este legătura dintre rezistența la antibiotice clinică și de mediu, care va fi abordată prin microbiologie clasică și moleculară, inclusiv analiză genomică comparativă.

Biotehnologiile microbiene reprezintă un alt domeniu important pentru autor, pe care dorește să-l continue în viitor. În ultimii ani, grupul de microbiologie ambientală condus de autor a fost implicat în studii de biodiversitate microbială în Delta Dunării, în principal datorită implicării directe a autorului în proiectul DANUBIUS. A fost implementat un plan de eșantionare spațio-temporală ce a permis prelevarea a numeroase probe de apă și sedimente din Delta Dunării. Aceste probe au fost și vor fi utilizate în studii de taxonomie (microalge, bacterii, cianobacterii) și pentru izolarea de microorganisme țintă. Până acum, pe lângă numeroase izolate microalgale din genul *Desmodesmus*, a fost dezvoltată și o colecție de peste 300 de izolate bacteriene. Acestea reprezintă o resursă foarte bună pentru identificarea și testarea de compuși antimicrobieni noi/îmbunătățiți, testele efectuate până în prezent având rezultate promițătoare în acest sens.

Autorul își propune să continue îmbunătățirea infrastructurii în laboratorul pe care îl conduce prin achiziționarea de echipamente specifice pentru creșterea capacității analitice. Totodată, un obiectiv major al autorului este să continue sprijinirea membrilor echipei în dezvoltarea de aptitudini tehnice și de cercetare prin participarea la diverse stagii de perfecționare pe termen scurt și lung. Un alt obiectiv important setat de autor este menținerea și/sau dezvoltarea de noi colaborări, pe lângă cele existente în prezent cu: Universitatea Babeș-Bolyai Cluj-Napoca, Facultatea de Biologie și Geologie; Institutul Corean pentru Cercetări Polare Coreea de Sud; Universitatea Norvegiană pentru Științele Vieții; Universitatea Antofagasta Chile; Compania de Apă Someș S.A. Cluj-Napoca; Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Tehnologii Izotopice și Moleculare Cluj-Napoca; Spitalul de boli infecțioase și tropicale Victor Babeș București; Spitalul de boli infecțioase Cluj-Napoca etc.