

“Babeș-Bolyai” University of Cluj-Napoca, România

Florin MUȘAT, Ph.D.

# TEZA DE ABILITARE

Cluj-Napoca

2021



“Babeș-Bolyai” University of Cluj-Napoca, România

Florin MUȘAT, Ph.D.

Anaerobic oxidation of gaseous and cyclic alkanes

Oxidarea anaerobă a alcanilor gazoși și ciclici

Rezumat

**TEZA DE ABILITARE**

Cluj-Napoca

2021



## Florin MUȘAT – Teza de Abilitare

### Oxidarea anaerobă a alcanilor gazoși și ciclici

#### Rezumat

Lucrarea de față rezumă contribuțiile științifice majore ale aplicantului în domeniul microbiologiei oxidării anaerobe a hidrocarburilor. Investigațiile au fost efectuate la Max Planck Institute for Marine Microbiology, Bremen, Germania, și la Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Leipzig, Germania, după finalizarea studiilor doctorale în 2005. Rezultatele incluse în această teză de abilitare au fost publicate în articole științifice în jurnale cu factor de impact semnificativ.

Teza este axată pe explorarea oxidării alcanilor gazoși și a alcanilor ciclici de către microorganisme anaerobe. Alcanii în stare gazoasă și alcanii ciclici sunt constituenți majori ai gazelor naturale și, respectiv, ai petrolului. În consecință, astfel de hidrocarburi sunt prezente în cantități semnificative în biosferă ca urmare a infiltrărilor naturale din rezervoarele corespunzătoare de gaz sau petrol, sau ca urmare a activităților antropogene legate de explorarea și exploatarea rezervelor de combustibili fosili. În mediu, aceste hidrocarburi au efecte variate, afectând funcțiile ecosistemelor, ciclurile elementelor, procese geomicrobiologice și chiar chimia troposferei, ultima cu consecințe pentru integritatea stratului de ozon și cu influențe asupra efectului de seră la nivel global. Un exemplu ilustrativ este cel al alcanilor gazoși precum etanul, propanul și butanul. Estimări recente sugerează că cel puțin 10 milioane de tone din fiecare dintre aceste hidrocarburi sunt emise anual în atmosferă. Totuși, atât emisiile, cât și soarta acestor hidrocarburi în biosferă sunt controlate de activitatea biodegradativă a microorganismelor. Cantitativ, cea mai mare parte a biodegradării are loc în bazine acvatice sau în sedimente anoxice, ultimele reprezentând volumetric cea mai mare parte a bazinelor sedimentare. Așadar, studiul oxidării anaerobe a hidrocarburilor are atât implicații practice (de exemplu în stabilirea strategiilor de bioremediere, în sprijinul acțiunilor privind combaterea efectelor schimbărilor climatice, sau pentru introducerea de biotehnologii de nouă generație), cât și pentru cunoașterea fundamentală prin definirea de noi principii de fiziologie microbiană, de noi mecanisme biochimice, sau în elucidarea abundenței în mediu și, prin urmare, a impactului pe care astfel de microorganisme îl pot avea asupra ciclurilor elementelor chimice la nivel global.

Teza de față este organizată în două părți. **Prima parte** este structurată în 7 capitole dedicate descrierii rezultatelor privind oxidarea anaerobă a alcanilor în stare gazoasă, de la prima indentificare de bacterii sulfat reducătoare care oxidează propan și butan, și până la identificarea și caracterizarea de

arhee care consumă alcani gazeși în absența oxigenului. **A doua parte** cuprinde două capitole centrate pe prezentarea rezultatelor privind oxidarea anaerobă a ciclohexanului cu nitrat sau sulfat ca acceptori terminali de electroni. Toate capitolele sunt bazate pe publicații științifice ale aplicantului în calitate de autor principal sau co-autor. Gradul de noutate și impactul rezultatelor obținute sunt detaliate în cadrul fiecărui capitol. Rezumatul de față prezintă doar realizările majore ale candidatului.

O primă realizare a fost descoperirea că alcanii gazeși pot servi ca substraturi de creștere pentru microorganisme anaerobe. Noi grupuri filogenetice de bacterii sulfat-reducătoare (SRB) capabile să oxideze propanul și butanul au fost cultivate și identificate. Am identificat mecanismele biochimice utilizate de către aceste microorganisme pentru funcționalizarea alcanilor și pentru direcționarea acestora în căile catabolice centrale, și am elucidat căile complete de oxidare ale acestor alcani. Tulpinile capabile să oxideze alcani au fost identificate în culturi îmbogățite folosind o combinație inovatoare de analize de biologie moleculară, marcarea cu izotopi stabili și imagistică chimică la nivel de celule individuale, bazată pe spectrometrie de masă a ionilor secundari la scară nano (NanoSIMS). Alte analize au fost dedicate fiziologiei, compoziției lipidice și factorilor de fracționare a izotopilor stabili asociați cu oxidarea alcanilor. Aceștia din urmă au aplicabilitate largă în studiile de teren dedicate identificării materialului de origine, tipului de proces (bio)geochimic care a generat hidrocarburile, și/sau a gradului de alterare microbiană a hidrocarburilor din rezervoare de gaze naturale sau petrol. Impactul descoperirilor noastre inițiale este detaliat în capitolul 1. Eforturi ulterioare de cultivare, analize de fiziologie și de filogenie au extins diversitatea cunoscută a SRB capabile să oxideze alcani gazeși, și au oferit o bază de cunoaștere suficient de amplă pentru a face următorul pas logic: evaluarea abundenței și activității acestor tulpini de SRB, sau a altor tulpini similare, direct în mediu (capitolele 2 și 3).

Am arătat că tulpini de SRB similare cu cele identificate de noi în culturi sunt abundente în sedimente marine din jurul infiltrațiilor de hidrocarburi, de la vulcani noroioși submarini din Marea Mediterană, până la emisii de fluide hidrotermale din Golful Californiei. Dezvoltarea de noi tehnici și concepte avansate de analiză a fracționării izotopilor stabili, bazate pe experimente cu microorganisme anaerobe care oxidează propanul, ne-au permis să detectăm și să cuantificăm procese microbiene anaerobe, să elucidăm soarta hidrocarburilor din surse de gaz natural, și să înțelegem procese biogeochimice care guvernează reciclarea de gaze cu efect de seră, toate direct în rezervoare de gaze naturale (capitolele 4 și 5).

Analiza unor culturi termofile capabile să oxideze butanul în condiții anaerobe, culturi caracterizate de comunități microbiene și proprietăți fiziologice distincte, ne-au condus la descoperirea de arhee capabile de oxidarea alcanilor gazeși. Acestea au fost îmbogățite din sedimente hidrotermale marine,

formează consortii cu parteneri SRB, și inițiază oxidarea butanului prin formarea de butil-coenzima M ca intermediar central. Reacția de activare este catalizată de enzime similare cu metil-coenzima M reductaza (MCR). Aceste descoperiri fără precedent au contestat paradigma conform căreia MCR sunt implicate exclusiv în metanogeneză sau în oxidarea anaerobă a metanului, și coenzima M este un transportor exclusiv de grupări metil (capitolul 6).

Cu toate că date biogeochimice indicau oxidarea etanului în sedimente marine anoxice, identitatea eventualelor microorganisme capabile să oxideze etanul în absența oxigenului a rămas, până recent, necunoscută. Folosind sedimente marine de la infiltrații naturale de gaz, am cultivat și identificat arhee capabile să oxideze etanul și am arătat că oxidarea etanului este inițiată prin formarea de etil-coenzima M. Genele și enzimele esențiale activării etanului, precum și genele și enzimele căii complete de oxidare a etanului, au fost identificate folosind analize de metagenomică și metaproteomică. Cu această ocazie, am definit o nouă clasă de enzime, alchil-coenzima M reductazele (ACR), care cuprinde enzimele MCR deja cunoscute, și enzimele nou descrise, implicate în oxidarea alcanilor gazoși. Studii de modelare structurală au indicat că ACR au suferit modificări subtile în centrul lor catalitic activ, modificări ce le permit să lege substrat mai voluminoase decât metanul. În final, am folosit analize comparative a căilor metabolice pentru a propune un model evolutiv pentru dezvoltarea capacității de oxidare a alcanilor gazoși la arhee, model care presupune o combinație de adaptări funcționale și achiziție evolutivă de unități metabolice prin transfer genic lateral (capitolul 7).

Pentru a investiga oxidarea anaerobă a cicloalcanilor, am ales drept compus model ciclohexanul, cel mai stabil alcan din punct de vedere structural și cel mai abundent alcan ciclic fără substituenți. Bacterii sulfat- și nitrat-reducătoare, capabile să folosească ciclohexanul ca unică sursă de carbon și energie au fost obținute în culturi îmbogațite, și identificate prin metode de biologie moleculară. Mecanismul activării ciclohexanului a fost identificat, și am arătat că același mecanism este utilizat cu ambii acceptori de electroni. O observație interesantă în acest caz a fost evidențierea de bacterii nitrat-reducătoare capabile să oxideze ciclohexan în co-cultură cu bacterii anammox, între care s-a stabilit o codependență nutrițională bazată pe un ciclu intern al azotului. Bazat pe aceste rezultate, am propus faptul că interacțiuni similare apar des în mediu atunci când microorganisme cu metabolism lent, precum anammox, coexistă în același spațiu cu anaerobe care oxidează hidrocarburi (capitolele 8 și 9).