

**ACADEMIA ROMÂNĂ**  
**INSTITUTUL DE BIOLOGIE BUCUREȘTI**

**REZUMAT**

**TEZĂ DE DOCTORAT**

*„DINAMICA MICROBIOTEI PLANCTONICE*

*ÎN SISTEMEMICROCOSMOS*

*SUPLIMENTATE CU:*

*HIDROCARBURI, DISPERSANT ȘI NUTRIENȚI-*

*ASPECTE FUNDAMENTALE SI APLICATIVE,,*

**Coordonator științific,**

**Prof. univ. dr. Ioan ARDELEAN**

**Doctorand,**

**Manea MIHAELA**

**București, 2016**

## CUPRINSUL TEZEI

MULȚUMIRI.....	4
PARTEA I – STADIUL CUNOAȘTERII .....	5
I. 1. POLUAREA MEDIULUI ȘI SOLUȚII DE BIOREMEDIERE .....	5
I. 2. POLUAREA CU HIDROCARBURI .....	6
I.2.1. Generalități. scurt istoric .....	6
I.2.2. Efectele poluării cu hidrocarburi asupra mediului .....	9
I.2.3. Bioremediere .....	12
I.2.4. Influența factorilor de mediu în biodegradarea hidrocarburilor petroliere .....	20
I.2.5. Rezistența microorganismelor hidrocarbon-tolerante la antibiotice și compuși toxici .....	25
I.2.6. Importanța subiectului .....	28
SCOPUL TEZEI .....	29
OBIECTIVELE CERCETĂRILOR PERSONALE .....	30
PARTEA II – CONTRIBUȚII PERSONALE .....	31
INTRODUCERE .....	31
CAPITOLUL I - DINAMICA DENSITĂȚII CELULELOR MICROBIENE ÎN MICROCOSMOSURI MARINE SUPLIMENTATE CU MOTORINĂ ȘI DISPERSANT- NACOL C .....	42
I.1. Materiale și metode .....	42
I.2. Rezultate și discuții .....	46
I.3. Concluzii .....	52
CAPITOLUL II - SELECTAREA CONCENTRAȚIILOR OPTIME DE NUTRIENȚI, DISPERSANȚI ȘI MOTORINĂ PENTRU MAXIMALIZAREA METABOLISMULUI ENERGETIC AL POPULAȚIILOR BACTERIENE MARINE CUANTIFICAT PRIN REDUCEREA RESAZURINEI ÎN EXPERIMENTE TIP MICROPLĂCI.....	53
II.1. Materiale și metode .....	53
II.2. Rezultate și discuții .....	59
II.3. Concluzii .....	61

CAPITOLUL III - SELECTAREA CONCENTRAȚIILOR OPTIME DE NUTRIENȚI PENTRU MAXIMALIZAREA METABOLISMULUI ENERGETIC AL POPULAȚIILOR BACTERIENE MARINE CUANTIFICAT PRIN REDUCEREA RESAZURINEI ÎN EXPERIMENTE TIP MICROCOSMOSURI LA 15 ° C .....	63
III.1. Materiale și metode .....	63
III.2. Rezultate și discuții .....	66
III.3. Concluzii .....	70
CAPITOLUL IV- CONSUMUL DE MOTORINĂ ÎN EXPERIMENTE TIP MICROCOSMOSURI PE TERMEN LUNG (15 LUNI) CU ADIȚIE CONTINUĂ DE NUTRIENȚI ANORGANICI .....	71
IV.1. Materiale și metode .....	71
IV.2. Rezultate și discuții .....	78
IV.3. Concluzii .....	86
CAPITOLUL V - IZOLAREA, SELECTAREA ȘI IDENTIFICAREA UNOR BACTERII HIDRCARBON OXIDANTE.....	88
V.1. Materiale și metode .....	88
V.2. Rezultate și discuții .....	89
V.3. Concluzii .....	93
CAPITOLUL VI - TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE SPECIFICE A BACTERIILOR HIDRCARBON OXIDANTE IZOLATE .....	94
VI.1. Materiale și metode .....	94
VI.2. Rezultate și discuții .....	96
VI.3. Concluzii .....	98
CAPITOLUL VII – CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE.....	100
BIBLIOGRAFIE .....	103

## **MULTUMIRI**

*În primul rând doresc să aduc nenumărate mulțumiri conducătorului științific, Domnul Profesor Universitar dr. IOAN ARDELEAN, pentru îndrumarea și sprijinirea pașilor mei pe un drum al cunoașterii științifice de calitate, atât pe parcursul celor 5 ani cât și înainte (în anii facultății).*

*Sincere mulțumiri doamnei asistent MARILENA RADE care m-a sprijinit și ajutat în elaborarea și completarea experimentelor efectuate.*

*Mulțumiri doamnei dr. ANCA MANOLE secretar științific al Institutului de Biologie București al Academiei Romane pentru ajutorul neprețuit acordat.*

*Mulțumesc doamnelor dr. SPIRIDON (GHIȚĂ) SIMONA și dr. SARCHIZZIAN IRIS pentru buna colaborare în calitate de colege, arătându-mi un bun exemplu de urmat.*

*Sincere mulțumiri doresc să adresez colectivului profesoral al Universității „Ovidius,, care mi-a deschis acest drum.*

*Doresc să mulțumesc colectivului întâlnit la Institutul de Biologie București –la centrul de microbiologie al Institutului de biologie București.*

*Mulțumesc familiei mele, managerilor și colegilor mei care m-au sprijinit tot timpul, neconditionat.*

## **SCOPUL TEZEI**

*Studierea dinamicii procariotelor planctonice marine endogene capabile să degradeze/tolereze hidrocarburile (motorina), în sisteme de tip microcosmos în absența bacteriovorilor (apă de mare filtrată prin filtru cu pori 0.45μm) sau în prezența bacteriovorilor (apă de mare nefiltrată).*

### **OBIECTIVELE EXPERIMENTELOR PERSONALE:**

- 1. Selectarea concentrațiilor optime de nutrienți utilizați pentru stimularea creșterii, multiplicării și activității metabolice a procariotelor marine endogene în sisteme microcosmos de laborator în absența bacteriovorilor sau în prezența bacteriovorilor.*
- 2. Selectarea concentrațiilor optime de dispersanți utilizați pentru stimularea creșterii, multiplicării și activității metabolice a procariotelor marine endogene în sisteme microcosmos de laborator în absența bacteriovorilor sau în prezența bacteriovorilor.*
- 3. Selectarea concentrațiilor optime de motorină pentru stimularea creșterii, multiplicării și activității metabolice a procariotelor marine endogene în sisteme microcosmos de laborator în absența bacteriovorilor sau în prezența bacteriovorilor.*
- 4. Cuantificarea consumului de poluant (motorină) în sisteme microcosmos de laborator de către procariote marine endogene, în absența bacteriovorilor sau în prezența bacteriovorilor, în condiții optime de dispersant și nutrienți.*
- 5. Dinamica densității procariotelor marine endogene (vii, moarte precum și hidrocarbon oxidante) în sisteme microcosmos de laborator în condițiile adăugării de nutrienți, dispersant și poluant.*
- 6. Izolarea, purificarea și identificarea de bacterii hidrocarbon oxidante din microbiota endogenă, pentru experimente ulterioare de bioaugmentare.*
- 7. Testarea rezistenței microorganismelor hidrocarbon oxidante la antibiotice.*

### **STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT**

Teza de doctorat este structurată în două părți diferite: prima parte cuprinde alte 2 părți și a doua parte cuprinde șapte capitole aparținând; însumând un **număr de 124 pagini, 45 de figuri, 9 de tabele și 162 de referințe bibliografice.**

**Conținutul tezei este organizat după cum urmează:**

**Partea I** - este structurată în două părți în care au fost prezentate informații referitoare la: stadiul cunoașterii în poluarea mediului și soluții de bioremediere și poluarea cu hidrocarburi - scurt istoric asupra poluării mediului cu hidrocarburi, efectele poluării cu hidrocarburi asupra mediului, bioremediere, influența factorilor de mediu în biodegradarea hidrocarburilor

petroliere , rezistența microorganismelor hidrocarbon-tolerante la antibiotice și compuși toxici, importanța subiectului .

**Partea II** – conține „ **CONTRIBUȚII PERSONALE**” și este structurată în șapte capitole, primele patru capitole sunt dedicate fiecare celor patru experimente derulate pe parcusul celor cinci ani de studiu astfel.:

CAPITOLUL I - Dinamica densității celulelor microbiene în microcosmosuri marine suplimentate cu motorină și dispersant-Nacol C .

CAPITOLUL II - Selectarea concentrațiilor optime de nutrienți, dispersanți și motorină pentru maximalizarea metabolismului energetic al populațiilor bacteriene marine cuantificat prin reducerea resazurinei în experimente tip microplăci.

CAPITOLUL III - Selectarea concentrațiilor optime de nutrienți pentru maximalizarea metabolismului energetic al populațiilor bacteriene marine cuantificat prin reducerea resazurinei în experimente tip microcosmosuri la 15 ° C .

CAPITOLUL IV- Consumul de motorină în experimente tip microcosmosuri pe termen lung (15 luni) cu adăugare continuă de nutrienți anorganici .

Capitolele 1-6 fiind structurate în subcapitole: MATERIALE ȘI METODE, REZULTATE ȘI DISCUȚII, CONCLUZII,

CAPITOLUL V - Izolarea, selectarea și identificarea unor bacterii hidrocarbon oxidante.

CAPITOLUL VI - Testarea sensibilității la antibiotice specifice a bacteriilor hidrocarbon oxidante izolate.

Teza de doctorat se finalizează cu CAPITOLUL VII – Concluzii generale și perspective.

În care sunt prezentate principalele concluzii generale ale cercetărilor realizate, cu prezentarea contribuțiilor originale și propunerea câtorva direcții viitoare de cercetare, perspective.

## **I.2.6.IMPORTANȚA SUBIECTULUI.**

Curățarea mediului de hidrocarburi petroliere este o problemă reală. O mai bună înțelegere a mecanismului de biodegradare are o mare importanță ecologică, care depinde de microorganismele indigene pentru a transforma sau mineraliza contaminanții organici. Procesul

de biodegradare microbiană ajută la eliminarea țiteiului scurs în mediu după deversarea unor cantități mari, după ce au fost eliminate cantități critice prin diverse metode fizico-chimice.

Acest lucru este posibil, deoarece microorganismele au sisteme enzimatică ce le conferă posibilitatea de a degrada și utiliza diferite hidrocarburi folosite ca sursă de carbon și energie.

Este unanim însușită ideea (Bull., 1992, Crook., 1996) că bioremedierea, comparativ cu alte metode de tratare fizico-chimice, constituie o metodă eficientă și economică ce nu perturbă echilibrul ecologic al mediului, prezervând biodiversitatea ecosistemului. Metodele fizice de remediere (adsorbție, filtrare, extracție), în unele cazuri sunt mai eficiente comparativ cu bioremedierea, dar prezintă dezavantajul că nu convertesc deșeurile în constituenți mai puțin toxici. Tratamentele chimice, la rândul lor, pot conduce la produși finali cu un oarecare risc pentru mediu, prin faptul că pot constitui noi surse de poluare, fiind mai refractari decât produșii inițiali.

În general, în zonele poluate se constată o creștere numerică a populațiilor de microorganisme care metabolizează substratul poluat și o reducere a diversității taxonomice. Pornind de la acest aspect, se impune utilizarea în aplicațiile de bioremediere a unor tulpini bacteriene ce provin din situl poluat, care posedă o flexibilitate metabolică și un echipament enzimatic adecvat, care să permită integrarea în arealul poluat fără a afecta echilibrul ecologic al zonei. Cele mai eficiente comunități microbiene utilizate în remedierea mediilor contaminate sunt cele care acționează simergic asupra poluanților organici.

Toate aceste argumente aduse în sprijinul aplicării biotehnologiilor de remediere, justifică interesul acordat abordării problematice de protejare a mediului și de decontaminare a unor suprafețe afectate prin prezența unor agenți poluanți. Totodată, aprofundarea studiilor de biologie moleculară, fie prin aplicarea unor tehnici de identificare taxonomică, fie pentru realizarea unor modificări genetice cu scopul majorării eficienței de metabolizare a contaminanților, fie pentru caracterizarea unor produși de metabolism (enzime, biosurfactanți), situează cercetările microbiologice de bioremediere la granița cu domeniul extrem de actual al nanotehnologiilor.

Procesul de bioremediere are un randament superior atunci când sunt îndeplinite anumite condiții, legate de: tipul de poluant și mediile poluate, microorganismele implicate în tehnologia de remediere și parametrii fizico-chimici.

Tematica abordată prezintă o importanță teoretică prin varietatea metodologică abordată cât și prin cea practică, care vor putea sta la baza unor studii viitoare privitoare la implicarea microorganismelor din apa de mare în procesele de bioremediere. Numărul lor, activitatea lor metabolică, capacitatea lor de a folosi ca sursă de carbon hidrocarburile și astfel degradarea acestora, ajutate fiind de anumite concentrații de nutrienți organici/anorganici și dispersanți, reprezintă tematici considerate de noi importante în cunoașterea rolului lor în bioremediere și prin urmare luate în calcul în studiile realizate în teza.

## **PARTEA II-CONTRIBUȚII PERSONALE.**

Studierea procariotelor planctonice marine capabile să degradeze/tolereze hidrocarburile (motorina) în condițiile stabilite pe parcusul experimentelor s-a realizat cu ajutorul următoarelor tehnici de lucru:

### **MATERIALE SI METODE UTILIZATE:**

**Montarea experimentelor de tip microcosmosuri** (din apă de mare filtrată și nefiltrată) poluate cu motorină, suplimentate cu compuși organici și/sau anorganici, în prezența dispersanților, substanțele au fost adăugate în diferite concentrații (în cele 4 serii de microcosmosuri dezvoltate în această teză pentru stabilirea concentrațiilor și a caracteristicilor optime ale sistemelor pentru maximalizarea creșterii și multiplicării celulare și a intensității metabolismului energetic al populațiilor naturale /al microbiotei marine.

**Microscopie de fluorescență.** este utilizată pe scară largă în ecologia microbiană. Există mai multe avantaje în utilizarea acestuia. Este rapidă și destul de ușor de utilizat, permite vizualizarea distribuției spațiale a celulelor din eșantion și cu o combinație adecvată de colorații fluorescente, este posibilă diferențierea între celulele viabile și cele moarte. Cu toate acestea, identificarea directă a microorganismelor nu este posibilă prin colorații fluorescente convenționale. Prin urmare, distingerea celulelor pe baza de morfologie este importantă, deoarece colorațiile fluorescente nu sunt specifice pentru speciile de bacterii sau genuri (Kepner, 1994).



Sistemele de analiză a imaginilor permite cuantificarea rapidă a mai multor parametri, de exemplu: intensitatea fluorescenței, dimensiunile diferitelor microorganisme și procentul suprafeței acoperite de biofilm. ( Johanna, 2003. , Bloem, 1995., Keevil, 1992. , Møller, 1995.)

Acestea sunt, de asemenea, utilizate pe scară largă în ecologia microbiană și extrem de importante în cercetarea ecologică. Există mai multe avantaje în utilizarea acestora. Sunt rapide și destul de ușor de utilizat, permit vizualizarea distribuției spațiale a celulelor din eșantion și, cu o combinație adecvată de colorații fluorescente, este posibilă o diferențiere între celulele viabile și moarte. (Lecoeur, 2002). Numărul de bacterii prezente în proba originală este calculat din media celulelor numerate/aria grilei folosite, volumul probei filtrate și aria efectivă de filtrare după formulă lui Jones.. (Jones, 1979).

### **Dimensionarea și cuantificarea numărului de celule bacteriene prin metoda manuală, semiautomată și prin metoda automată.**

Metoda manuala (clasica) de numarare a bacteriilor de pe filtru. Metodele fotografice sunt adesea utilizate pentru masurarea mărimii și numărului bacteriilor din medii naturale (Fry.,1990). Măsurarea se poate face cu orice aparat automat atasat la microscop capabil să realizeze imagini la un nivel de luminozitate scăzută. Se numără pe imagine bacteriile direct cu ajutorul unui micrometru sau a unei rigle, sau indirect prin evidențierea cu ajutorul unui marker a celulei bacteriene pe poză.

Metoda automată de numărare a bacteriilor de pe filtru. Pentru dimensionarea și cuantificarea automată a celulelor bacteriene am folosit două programe: Image J și CellC. Pentru cea semiautomată s-a folosit DotCount.

Image J a fost software-ul principal pentru a măsura lungimea de celule și software-ul CellC este al doilea software utilizat în analiza automată a imaginilor noastre de microscopie ca enumerarea de celule și măsurători de proprietăți de celule (de dimensiune, formă, intensitate) (Selinummi., 2008. ) așa cum se arată anterior (Ardelean ., 2009 , Ghiță., 2010b).

Cu ajutorul soft-ului **CellC** se enumeră celulele luminoase pe un fundal întunecat (epifluorescenta). Opțiunea implicită în CellC este de a prezenta parametrii mășurați în pixeli. Bifând această casetă vom defini câți micrometrii corespund unui pixel și de a primi toate rezultatele de măsurare în micrometri. Valoarea corectă a acestui cadru, evident, depinde de

configurare imagistica, de asemenea de aparatul de fotografiat și obiectiv și trebuie să fie folosit în afara de CellC și ImageJ pentru a calibra scara.

Metoda semi-automată de numărare a bacteriilor de pe filtru. Cuantificarea celulelor a fost, de asemenea, realizată printr-o metodă semi automatizată folosind software-ul **DotCount**. DotCount este un program pentru contorizarea numărului de puncte într-o imagine. Punctele sunt considerate a fi regiuni conectate cu aproximativ aceeași intensitate. Scopul său inițial a fost de a număra pete pigmentare pe fotografiile de piele pentru cercetare în domeniul cancerului (Dr. Martin Reuter, <http://reuter.mit.edu/software/>.) Astfel am marcat, asemeni metodei clasice, bacteriile din imagini cu ajutorul unui marker digital și apoi prelucrate în Dot Count.

**Punerea în evidență a activității metabolice bacteriene cu ajutorul resazurinei în experimente de tip microplăci. Determinarea cantitativă a reducerii resazurinei.** Resazurina (10-oxid 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-onă) este un colorant albastru, nonfluorescent, aceasta este redusă până la resorufină (roz și foarte fluorescentă), care este în continuare redusă la hydroresorufină (incoloră și nonfluorescentă), cu ajutorul unor oxidoreductaze prezente în celulele viabile. Resazurina este folosită în principal ca un indicator de oxido-reducere, în teste de viabilitate celulară. (Fig.1) (O'Brien et al, 2000; [www.promege.ro](http://www.promege.ro);) )

Testul reducerii resazurinei este folosit de aproximativ 50 de ani pentru a monitoriza contaminarea bacteriană și cu drojii a laptelui, de asemenea, pentru evaluarea calității materialului seminal. Nu este încă cunoscut modul în care această reducere se produce sau activitatea intracelulară a enzimei ca un mediu de reacție chimică. O formă redusă fluorescentă a resazurinei a fost găsită în citoplasmă și nucleul viu din celulele moarte. Recent, resazurina a devenit foarte populară ca o modalitate foarte simplă și versatilă de măsurare a proliferării celulare și citotoxicității. (O'Brien et al, 2000)

Conversia resazurinei la resorufină fluorescentă este proporțională cu numărul de celule metabolice active, viabile prezente într-o populație

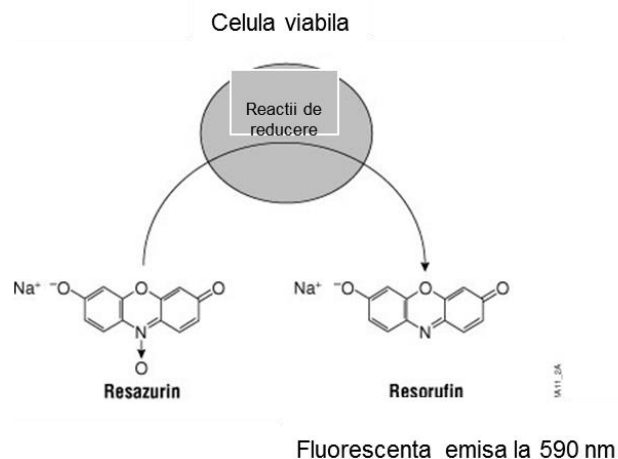


Fig.1.8. Schema reducerii rezazurinei. (O'Brien et al, 2000; /www.promega.ro)

**Utilizarea dispersanților în experimentele de tip microcosmosuri.** Din cauza distribuției inegale a populațiilor bacteriene și a structurii nemiscibile a hidrocarburii folosite în experimente s-au utilizat dispersanți (NACOL C) pentru a facilita distribuirea lor în câmpul microscopic astfel încât să se poată realiza numărători la microscop mult mai facil și eliminând astfel apariția unor erori cum ar fi neluarea în calcul a grupării unor populații bacteriene. (Buesing , 2002, Lunau și colab. 2005.) și pentru facilitarea accesului bacteriilor la hidrocarbură.

**Identificarea bacteriilor hidrocarbon oxidante** se poate realiza prin studierea: caracterelor de cultura, modul de creștere a bacteriilor supuse identificării, forma coloniilor, creșterea lor pe medii selective și caracterele morfotintoriale prin colorația Gram și în funcție de rezultatul obținut se realizează identificările biochimice ce conduc spre identificarea speciei izolate.

**Testarea sensibilității la antibiotice specifice a bacteriilor hidrocarbon oxidante.** Se poate realiza prin metoda difuzimetrică Kirby-Bauer sau/și prin metoda microdiluțiilor (MIC). (CLSI 2017).

## **CAPITOLUL 1. Dinamica densității celulelor microbiene în microcosmosuri marine suplimentate cu motorină și dispersant-Nacol C-EXPERIMENT 1.**

Având în vedere datele din literatura de specialitate, cu privire la dinamica bacterienă în microcosmosurile poluate cu benzină protist-free (Ardelean et al., 2009a; Ghita, 2010; Va'zquez et al., 2005; Sherr., 2002, Shata., 2011), scopul unui prim experiment a fost de măsurarea în timp a evoluției numărului de celule bacteriene în microcosmosurile lipsite de protiste-inclusiv bacteriovore-obținute prin filtrarea apei de mare filtru cu pori de 0,45  $\mu\text{m}$ , suplimentate cu motorină și agent de dispersie (NacolC), în comparație cu microcosmosurile control nesuplimentate.

**Probele de apă** au fost colectate în sticle sterile din Marea Neagră (portul maritim Tomis la o adâncime de 0,5 m; 44° 10 '42" N, 28° 39' 36" E), care a fost folosite pentru configurarea microcosmosurilor în flacoane de polietilenă transparente. Microcosmosurile au fost menținute la temperatura camerei în întuneric.

Pentru a monitoriza schimbările în densitatea celulară bacterienă din microcosmosurile libere de bacteriovori, comunitățile bacteriene au fost obținute prin filtrarea apei de mare printr-un filtru steril de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore) cu ajutorul dispozitivului de filtrare vidat, pentru a evita includerea nanoflagelatelor / heterotrofelor protiste în filtrat. (Jürgens et al., 2000; Sherr et al., 1999, 2002; Vasques- Domniqués et al., 2005, Sherr., 2002,)

Excluderea nanoflagelatelor heterotrofe (precum și a bacteriovorilor sau eucariotelor) din aceste microcosmosuri permite măsurarea numărului total de celule, atunci când celulele procariote nu sunt consumate de microorganisme ca bacteriovorii. Acest lucru este neobișnuit pentru populațiile din bacterioplancton în mediul natural, dar permite simplificarea obiectului de studiu, pentru a înțelege mai bine interacțiunea dintre un număr mai mic de factori. Cu toate acestea, trebuie menționat faptul că filtrarea cu 0.45mm determină excluderea din comunitatea microbială a bacteriilor mai mari, care sunt, în general, în stare metabolică bună. (Vasques- Domniqués et al., 2005).

## Montarea microcosmosurilor

Pentru montarea microcosmosurilor s-a folosit dispersant NACOL C, un amestec de solvenți organici și anorganici, agenți tensioactivi neionici etc, a fost diluat de 10.000 de ori în filtrat - apă de mare.

Variantele experimentale au fost: M1- apă de mare filtrată - control, fără nici o adăugare și M2-control suplimentat cu dispersant (1/10.000) și motorină (1% g / v) (veche de 15 ani).

Avantajele folosirii microcosmosurilor ca modele experimentale în laborator, permite controlul parametrilor experimentali, cum ar fi: temperatura, absența sau prezența bacteriovorilor, concentrația poluantului și / sau a nutrienților. Acest control permite o interpretare mai ușoară a rezultatelor obținute în microcosmosuri, comparativ cu cele din mediul natural și oferă o bază mai ușoară în înțelegerea interacțiunii diferiților factori din mediul natural. Pe de altă parte, există unele dezavantaje: în comparație cu mediul natural, microcosmosul este un sistem simplificat, iar rezultatele astfel obținute nu pot fi extrapolate per se. În plus microcosmosul nu rămâne același pe tot parcursul experimentului și evoluția în timp a microbiotei este, de asemenea, diferită de cea care apare în mediul natural.

În figura 1.1. sunt prezentate imagini reprezentive din cele 20 de capuri inspectate ale microbiotei marine de la probele prelevate în momente diferite pe parcursul experimentului, de la M1 (de control) și M2, la T0, T1 (3 zile), T2 (7 zile), T3 (17 zile), T4 (23 zile) , T5 (38 zile) și T6 (52 zile).

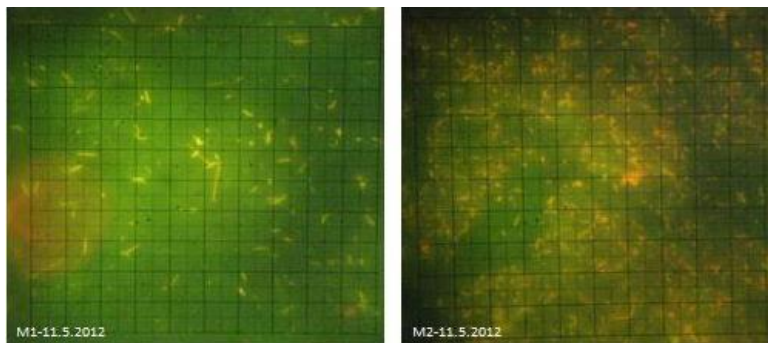


Fig.1.1. Microbiota marină din probele prelevate la: T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6 de la M1 (de control) și M2 (microcosmos suplimentat cu motorină 1% și agent de dispersie Nacol.(Se poate observa că în prezența dispersantului și motorinei (M2), densitățile celulare sunt mai mari decât în control (M1), iar celulele de control sunt mai mari decât cele cultivate în prezența dispersant și motorină (M2).

Au fost calculate pe baza enumerării manuale a bacteriilor de la fiecare timp de prelevare (a se vedea materiale și metode) densitățile celulare. În figura 1.2 și 1.3 se poate vedea dinamica densității celulelor din M1 și M2. Enumerarea celulelor a fost efectuată manual sau cu ajutorul unei analize de imagine automată (software CellC), iar software-ul de semi analiza a imaginii automatizate (DotCount).

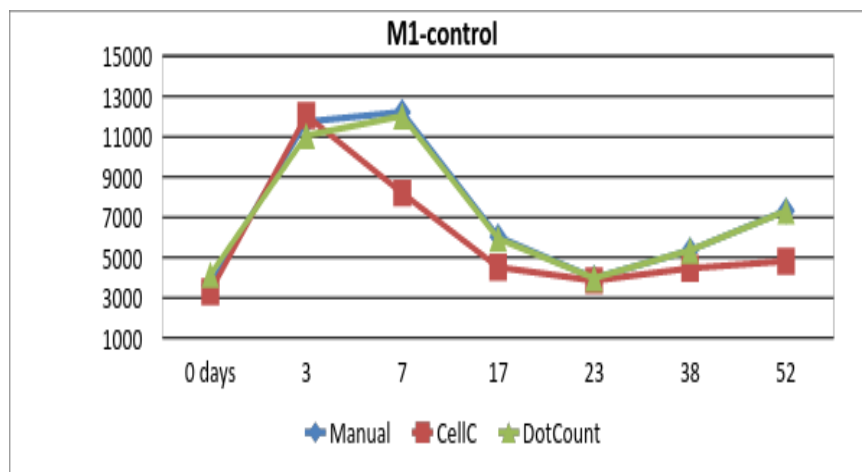


Fig. 1.2. Dinamica densității celulelor microbiene din M1 enumerate manual și cu ajutorul analizei de imagine automate, respectiv semi automată (CellC și DotCount)-valorile înscrise pe ordonata reprezintă număr de celule bacteriene cuantificate.

În legătură cu evoluția în timp a microbiotei în microcosmosul control (M1) se poate observa (figura 1.2), că există o foarte bună corespondență între numărul de celule numărate manual și a numărului de celule numărate semi automat (software DotCount), același lucru este valabil și pentru calcularea realizată prin analiza de imagine automată (software CellC), cu excepția celei de-a treia probe și într-o măsură mai mică la ultima probă. Aceste diferențe se datorează calității inferioare a imaginilor și a densităților celulare foarte mari.

În legătură cu evoluția în timp a microbiotei din microcosmosul suplimentat cu dispersant și motorină (M2) se poate observa (figura 1.3) că există o foarte bună corespondență între numărul de celule numărate manual și numărul de celule numărate semi automat (DotCount), ca și în cazul controlului (figura 1.2). Cu toate acestea, cu excepția timpului zero, există diferențe mari între numărul de celule numărate manual sau semi-automat (DotCount) și rezultatele obținute folosind analiza automată de imagine. Aceste diferențe ar putea

fi determinate / cauzate de densitățile celulare mai mari găsite în M2, așa cum se vede în figura 1.1, făcând dificilă diferențierea între organismele bacteriene și fundal.

Luând în considerare aceste rezultate, se presupune că numărarea manuală și semi-automată oferă o mai bună cuantificare a densității celulare decât analiza automată de imagine, în aceste experimente.

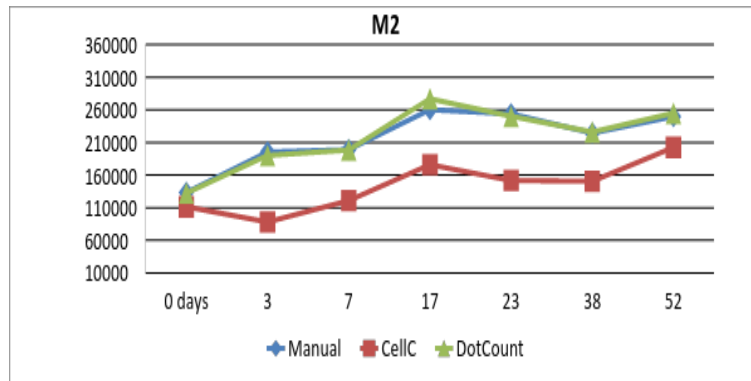


Fig. 1.3 Dinamica densității celulelor în M2 enumerate manual și cu ajutorul analizei automate, respectiv semi-automată de imagine (CellC și DotCount)- valorile înscrise pe ordonata reprezintă număr de celule bacteriene cuantificate.

Pentru a avea o vedere mai bună asupra dinamicii microorganismelor în ambele microcosmosuri, în figura 1.6 sunt prezentate rezultatele privind lungimea celulelor împreună cu valorile de deviație standard (tabelul 1.2).

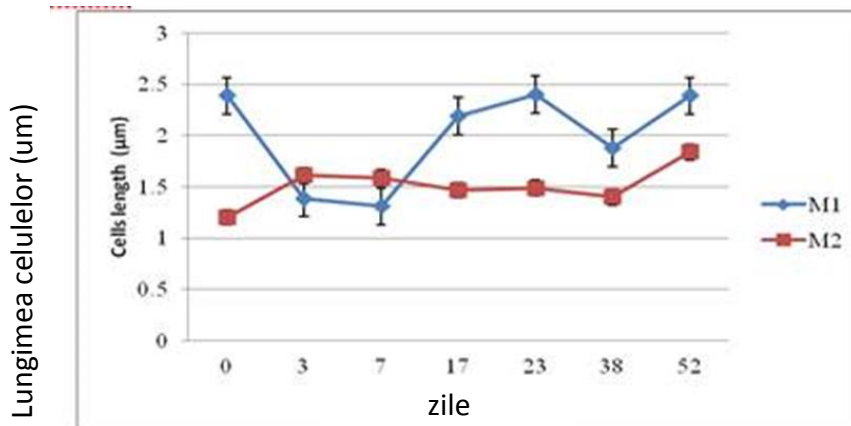


Fig. 1.6 . Evoluția lungimilor celulelor în control (M1) și în prezența atât a motorinei cât și a dispersantului (M2) După cum se poate vedea lungimea celulelor este mai mare în control decât în M2.

Aceste diferențe de mărime ale celulelor ar putea fi legate de prezența dispersantului (Nacol C, un produs biodegradabil) și a motorinei, care ar putea fi folosite ca sursă de carbon de către microflora endogenă susținând astfel creșterea celulară și multiplicare.

## **CONCLUZIE CAPITOL I.**

*Rezultatele arată că în prezența dispersantului și motorinei densitățile celulare sunt mai mari decât la martor , ale carui celule au dimensiuni mai mari decât cele cultivate în prezența dispersantului și a motorinei .*

## **CAPITOLUL II -Selectarea concentrațiilor optime de nutrienți, dispersanti si motorina pentru maximalizarea metabolismului energetic al populațiilor bacteriene marine cuantificat prin reducerea resazurine in experimente tip microplăci-EXPERIMENT 2.**

Ulterior s-a realizat un al doilea screening prin utilizarea microplăcilor. S-au folosit mai multe variabile: concentrația de dispersant, cantitatea de motorină și nutrient organic / anorganic. Pentru urmărirea multiplicării celulare și a intensității metabolismului energetic al microbiotei marine, s-a urmărit rata de **reducere a resazurinei**.

**Punerea în evidență a activității metabolice bacteriene cu ajutorul resazurinei. Determinarea cantitativă a reducerii resazurinei.** Datele obținute pentru fiecare godeu (ng resazurină redusă/ godeu) sunt reprezentate în figura 2.3.



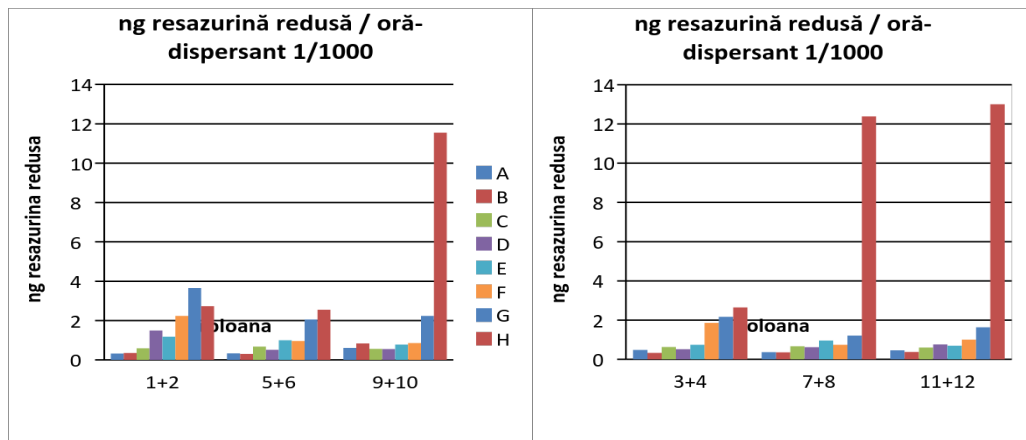


Fig.2.3. Cantitatea de resazurină redusă per ora în godeurile 1-12.

**Creșterea și multiplicarea microorganismelor în microplacă.** Creșterea și multiplicarea celulară a fost mult mai lentă pentru experimentele din screening-ul 2.

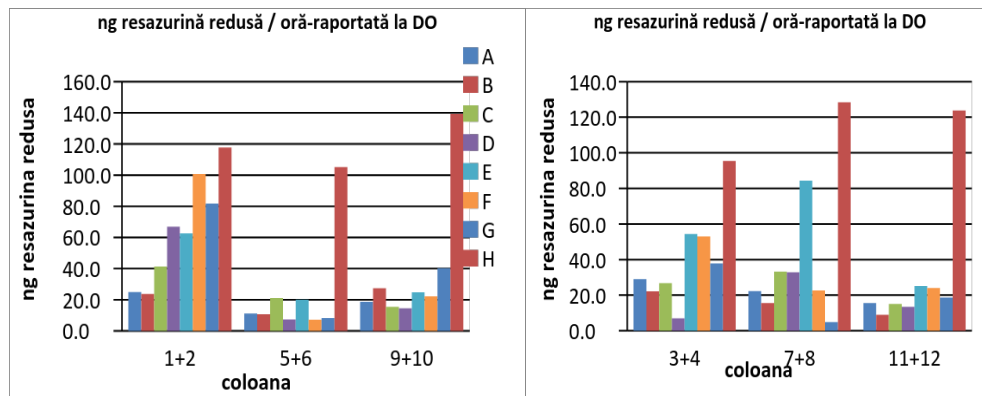


Fig.2.4. Intensitatea reducerii resazurinei ng resazurină redusă / oră//DO

Se poate observa o cantitate mai mare de resazurină redusă în coloanele cu o cantitate de 20μL de motorină. (1-2, 3-4), mai mică. Activitate intensă în șirul martor H -1-12 care nu conține motorină, are dispersant și fosfat de amoniu + acetat de amoniu+ mediul yeast peptonă.

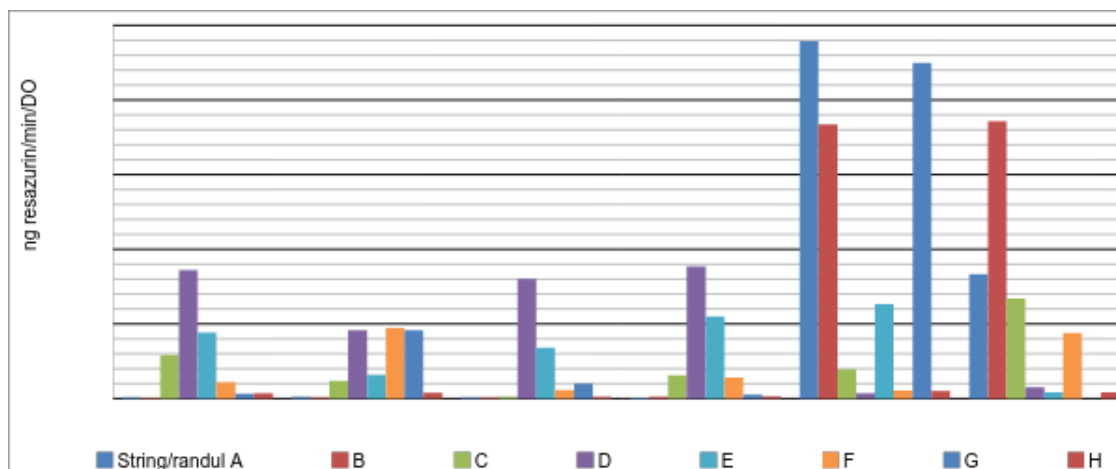


Fig.2.5. Intensitatea reducerii rezazurinei ng rezazurină redusă / oră//DO.

## CONCLUZII CAPITOL II.

*Rezultatele acestui capitol sugerează următoarele variante optime din punct de vedere al celor trei variabile:*

*Variabila motorină:*

- *cantitate optimă este de 20 $\mu$ L (10%) de motorină.*

*Variabila dispersant:*

- *cantitate optimă de dispersant (1/1000).*

## CAPITOLUL 3- Selectarea concentrațiilor optime de nutrienți pentru maximalizarea metabolismului energetic al populațiilor bacteriene marine cuantificat prin reducerea rezazurinei în experimente tip microcosmosuri la 15 ° C-EXPERIMENT 3.

Acest screening a fost realizat în scopul selectării variantelor optime pentru: concentrația optimă de nutrienți, agent de dispersie și motorină pentru stimularea creșterii microbiene și activitatea metabolică (prin reducerea rezazurinei). (Ardelean et al, 2009;. Ghita, 2010, 2011, 2012; Popoviciu, 2011; Manea și Ardelean, 2013; Manea et al., 2013) și relația dintre rata activității metabolice și consumul de motorină al microbiotei marine

endogene incubate la 15°C în comunitățile bacteriene- lipsite de protiste (apă de mare filtrată prin filtru cu pori de 0,45 μm).

Au fost montate 5 microcosmosuri în flacoane din sticlă transparentă cu: 200 ml de apă de mare filtrată cu diferite cantități de nutrienți organici (1/10 yeast- mediu peptonă) și substanțe nutritive anorganice ( acetat de amoniu și fosfat de amoniu 0,5%), motorină (10%) și s-a adăugat dispersant (Nacol C-1 / 1000), așa cum este prezentat în figura 1 A și B.

Cele cinci microcosmosuri au fost apoi incubate la 15 ° C în întuneric. Au fost colectate eșantioane în mod periodic din fiecare microcosmos pentru a determina: activitatea metabolică (reducerea resazurinei) și a consumului de motorină.

Tabelul 3.1. Protocol de lucru experiment 3-conținutul fiecărui microcosmos.

Microcosmos	200 μl apă de mare filtrată prin pori 0,45 μm	Motorină filtrată	Dispersant 1/1000	Acetat de amoniu și Fosfat de amoniu 0,5%	Yeast petone 150 μl
M1	X				
M2	X	X			
M3	X	X	X		
M4	X	X	X	X	
M5	X	X	X	X	X

### III.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

În tabelul 3.1 sunt prezentate rezultatele în ceea ce privește rata de reducere a resazurinei, (exprimat în ng resazurina / oră / godeu) din timpul experimentului de către microbiota nativă din cele 5 tipuri de microcosmosuri.

După cum se poate vedea, rata este mai mică în control (M1), în comparație cu microcosmul cu nutrienți anorganici adăugați (M3-M5), sugerând că nutrienți anorganici susțin creșterea activității metabolice a microbiotei endogene marine. Această creștere este în concordanță cu datele din literatura de specialitate (Fuhrman , 1980, Atlas, 1981, Lewis, 2001, Cohen, 2002; Van Hamme et al, 2003;. Molina-Barahona et al, 2004, Munn, 2004 Cap et al, 2006;. Ducklow, 2008; Gasol 2008; Kirchman 2008, Kempf, 2010; Shata 2011; Enon și

colab, 2011;. și Popoviciu , 2011; Uzoigwe și colab, 2012 .; Ardelean și colab., 2009, Ghiță , 2010, 2011, 2012, Manea, 2013;. Manea et al, 2013).

Când vine vorba de adăugarea de motorină, situația merită o atenție suplimentară.

În M2, în care a fost adăugată doar motorină cu apa de mare, rata de reducere a rezazurinei, este mai mică în comparație cu controlul (M1), aceasta sugerează ca poluantul (motorina) determină o scădere a intensității activității metabolice a microbiotei marine endogene, datele rezultate sunt în acord cu rezultatele anterioare raportate (Atlas, 1981; Venkateswaran et al., 1995; Habe , 2003; Zhang et al., 2010; Manea , 2013; Manea et al., 2013).

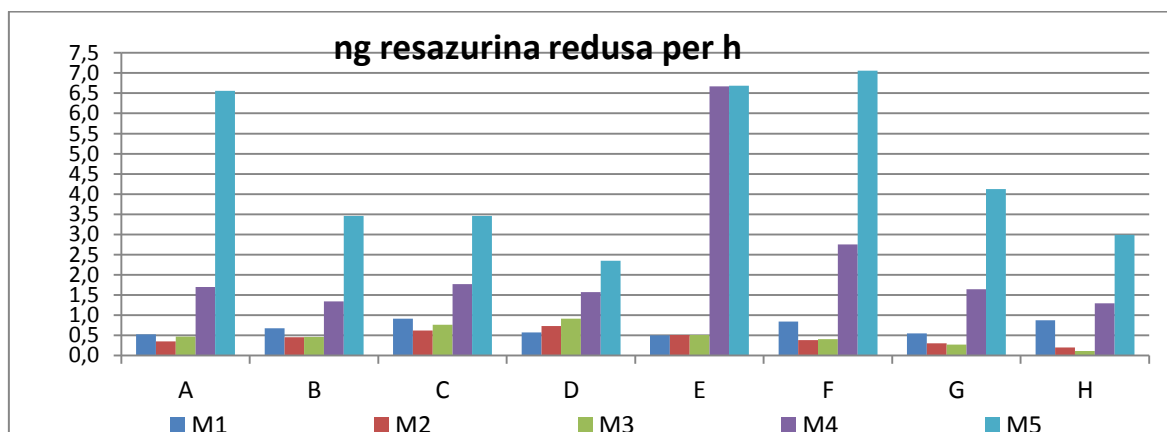


Fig. 3.3. Evoluția activității metabolice în timp (măsurate în ng/resazurina/ ora/godeu) a microbiotei endogene din microcosmosurile cu apă filtrată suplimentate cu dispersant (Nacol C), motorină, nutrienți anorganici și organici.

Rezultate similare au fost obținute în prezența atât a motorinei și a dispersantului (M3), în acord cu rezultatele noastre anterioare în ceea ce privește absența toxicității acestui agent de dispersie la această concentrație scăzută (Manea et al, 2013.). adăugarea de substanță nutritivă anorganică (atât acetat de amoniu și fosfat de amoniu 0,5%) pentru a M4 crește foarte mult viteza de reducere a rezazurinei comparativ cu rata măsurată în absența lor (M1-M3); în plus adăugarea de substanță nutritivă organică în M5 susține o rată de reducere rezazurinei de 2-3 ori mai mare în M5 comparativ cu ratele măsurate fără supliment organic (M4). Toate aceste rezultate sunt în acord cu rapoartele din literatura de specialitate (Atlas, 1981;. Zhang et al,

2010), ceea ce sugerează faptul că concentrațiile de nutrienți anorganici și organici, în mediile marine nepoluate sunt în concentrații limitate (Karl, 2005; Costello și colab, 2010).

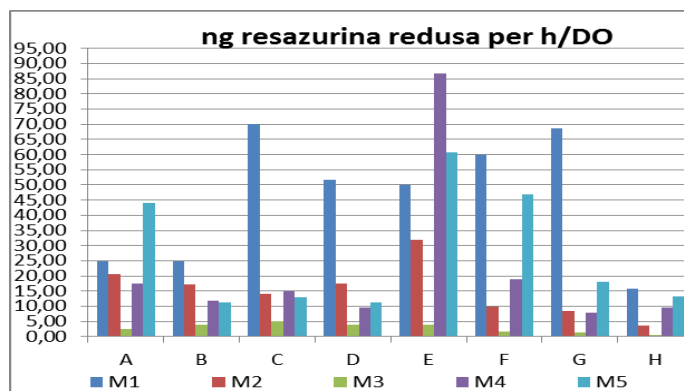


Fig. 3.4. Estimarea consumului de motorina in timp de catre microbiota endogena din microcosmosurile cu apa filtrata suplimentate cu dispersant (Nacol C), motorina, nutrienti anorganici si organici prin reducerea resazurinei.

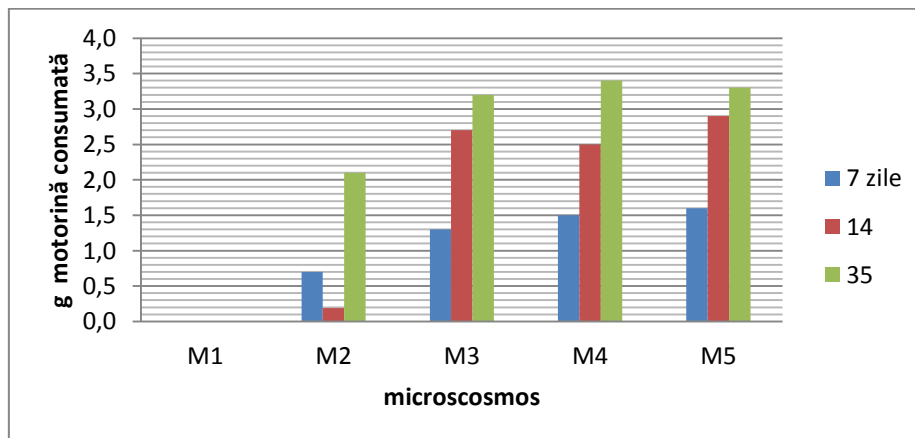


Fig. 3.5. Evoluția în timp a consumului de motorină –se poate observa cantitatea de motorină consumată din cea inițială de 10 g (10%).

Adăugarea dispersantului (M3), crește consumul de motorină de 1,5 ori mai mult, în comparație cu M1, în cazul în care numai motorina a fost adăugată în apă de mare filtrată. Aceste rezultate sunt în acord cu utilizarea diferitelor tipuri de dispersanți (non toxic la concentrația de lucru) pentru a spori interacțiunile complexe dintre celulele microbiene și hidrocarburile din petrol, susținând astfel o rată crescută a consumului de poluant (Atlas, 1981; Lewis, 2001; Cohen, 2002; Van Hamme et al, 2003, Molina-Barahona et al, 2004; Cap

et al, 2006;. Kempf, 2010; Shata 2011; Uzoigwe și colab, 2012;. Manea , 2013; Manea et al., 2013).

Așa cum se arată în figura 3.6., în absența motorinei (M1), se pot observa procariotele izolate, colorate cu acridin orange (Ghita și Ardelean, 2010), în timp ce în prezența motorinei, celulele încep să se agrege (M2) în plus, în prezența dispersantului (M3-M5) se poate vedea micro-vezicule cu diferite dimensiuni, cu bacterii la suprafață și, cele mai mari, adevărate micro bioreactoare, care conțin în interiorul lor populații dense de bacterii ; Această dispunere spațială a bacteriilor la nivelul micro-vezicule îmbunătățește contactul fizic dintre celule și motorină, și consumul bacterian (Lewis, 2001; Cohen, 2002; Van Hamme et al, 2003;. Molina-Barahona et al, 2004; Cap et al, 2006;. Kempf, 2010; Shata 2011;. Uzoigwe et al, 2012).

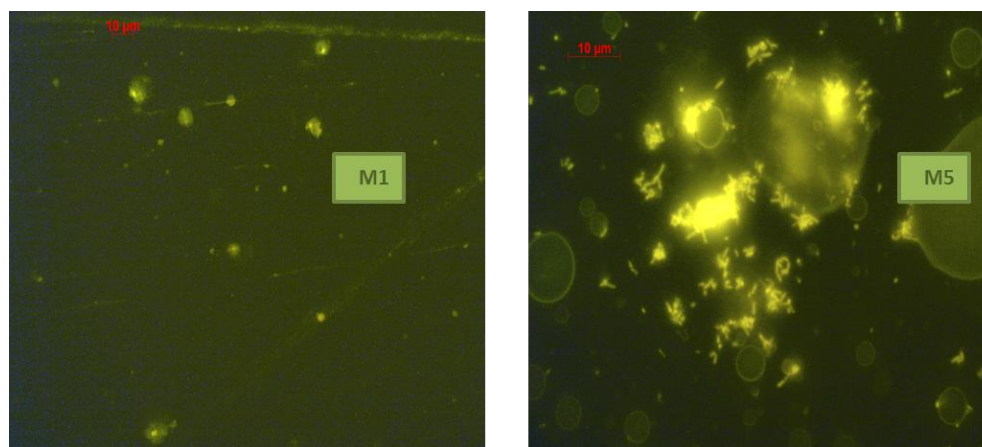


Fig 3.6. Distribuția spațială a celulelor bacteriene în prezența motorinei și în absența dispersantului și a nutrienților (M1) și în prezența dispersantului, a motorinei și a nutrienților (M5). –se poate observa distribuția bacteriilor care aderă la picăturile de motorină, densitatea bacteriană fiind mai mare în prezența dispersantului (M5) apărând și picăturile de motorină dispersate în masa de apă în prezența dispersantului- colorație Acridine Orange (AO).

După cum se arată, consumul de motorină este ușor îmbunătățit (de 1,5 ori) prin adăugarea dispersantului (M3, M4, M5) comparativ cu M2 și M1, dar nutrienți organici și / sau anorganici adăugați nu au un efect asupra consumului de motorină, valorile obținute fiind în nivelul de deviație standard. Cu toate acestea, creșterea consumului de motorină (de 1,5 ori), este cu mult mai mică în comparație cu creșterea ratelor de reducere a resazurinei (de 10

ori sau mai mult), ceea ce sugerează că, în experimentele noastre, adaosurile de nutrienți anorganici și organici au un efect pozitiv limitat privind consumul de motorină.

### **CONCLUZII CAPITOL III.**

*Rata de reducere a rezazurinei este mai mică în godeurile fără nutrienți în comparație cu microcosmosurile cu nutrienți anorganici adăugați.*

*În microcosmosul în care a fost adăugată doar motorină, rata de reducere a rezazurinei este mai mică în comparație cu controlul.*

*Adăugarea de substanță nutritivă anorganică crește foarte mult viteza de reducere a rezazurinei, în plus adăugarea de substanță nutritivă organică susține o rată de reducere rezazurinei de 2-3 ori mai mare comparativ cu ratele măsurate fără supliment organic.*

*Consumul de motorină este îmbunătățit (de 1,5 ori) prin adăugarea dispersantului. Adăugarea de nutrienți organici și / sau anorganici nu au un efect asupra consumului de motorină.*

### **CAPITOLUL IV- Consumul de motorină în experimente tip microcosmosuri pe termen lung (15 luni) cu adiție continuă de nutrienți anorganici- EXPERIMENT 4.**

În continuarea experimentelor prezentate în capitolele anterioare, experimentele din acest capitol aduc ca elemente de noutate: monitorizarea pe termen lung a consumului de motorină și a activității metabolice a microbiotei marine edogene, în condițiile suplimentării periodice cu nutrienți anorganici pe bază de azot și fosfor, în mod discontinuu și în cantități mici, pentru a preveni inhibarea metabolismului microbiotei endogene oligotrofe. (Atlas, 1981, Floodgate, 1984., Choi, 2002., Kim, 2005., Brusseau, 1998., Atlas, 1981, Chaillan, 2006).

Au fost montate 10 microcosmosuri în 5 flacoane din sticlă transparentă cu dop VERDE (180 ml de apă de mare filtrată) și 5 cu dop NEGRU (180 ml de apă de mare nefiltrată) : cu diferite cantități de nutrienți organici (uree) și substanțe nutritive anorganice ( fosfat monopotasic), motorină (1/10) și s-a adăugat dispersant (Nacol C-1 / 1000) .

#### APA NEFILTRATA (grup I):

1. s-au adăugat câte 200 ml apă de mare nefiltrată în toate cele 5 sticle.
2. s-au scos câte 20 ml apă de mare din M1-----M3.
3. s-au adăugat câte 10 ml de motorină filtrată în M1-----M3.
4. s-a adăugat câte 10 ml dispersant din soluția stoc de 1/50 dispersant în M3 a,b,c.
5. s-a adăugat 20ml formol tamponat sol stoc 10X în -180 ml microcosmos M2.

#### APA FILTRATA (grup II):

1. s-au adăugat câte 200 ml apă de mare filtrată în toate cele 5 sticle.
2. s-au scos câte 20 ml apă de mare din M1-----M3.
3. s-au adăugat câte 10 ml de motorină filtrată în M1-----M3.
4. s-a adăugat câte 10 ml dispersant din soluția stoc de 1/50 dispersant în M3 a,b,c.
5. s-a adăugat 20ml formol tamponat sol stoc 10X în -180 ml microcosmos M2.

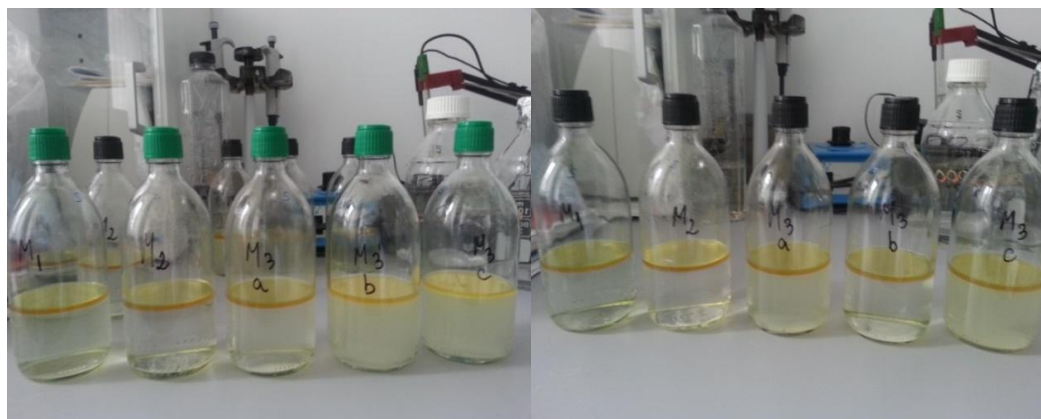


Figura 4.1. Microcosmosurile din GRUPUL I (stânga) și GRUPUL II (dreapta)–  
experiment montat în 5 .5. 2015.

Cele zece microcosmosuri au fost incubate la 15 ° C în întuneric. Au fost colectate eșantioane în mod periodic din fiecare microcosmos pentru a determina: activitatea metabolică (reducerea resazurinei) și a consumului de motorină.



## IV.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

În urma centralizării datelor obținute în decursul celor 7 luni în care s-au efectuat determinări ale activității de reducere a rezazurinei ca marker al activității metabolice a microorganismelor din microcosmosuri. (figurile 4.5 și 4.4), s-a putut observa o rata de reducere a rezazurinei mai mică în control (M1 și M2), în comparație cu microcosmul cu nutrienți organici in diferite proporții adăugați (M3 a, b și c), sugerând că nutrienții susțin creșterea activității metabolice a microbiotei endogene marine. Această creștere este în concordanță cu datele din literatura de specialitate (Fuhrman , 1980, Atlas, 1981, Lewis, 2001, Cohen, 2002; Van Hamme et al, 2003; Molina-Barahona et al, 2004, Munn, 2004 Cap et al, 2006; Ducklow, 2008; Gasol 2008; Kirchman 2008, Kempf, 2010; Shata 2011; Enon și colab, 2011; și Popoviciu Ardelean, 2011; Uzoigwe și colab, 2012 .; Ardelean și colab., 2009, Ghiță, 2010, 2011, 2012, Manea, 2013; Manea și colab, 2013).

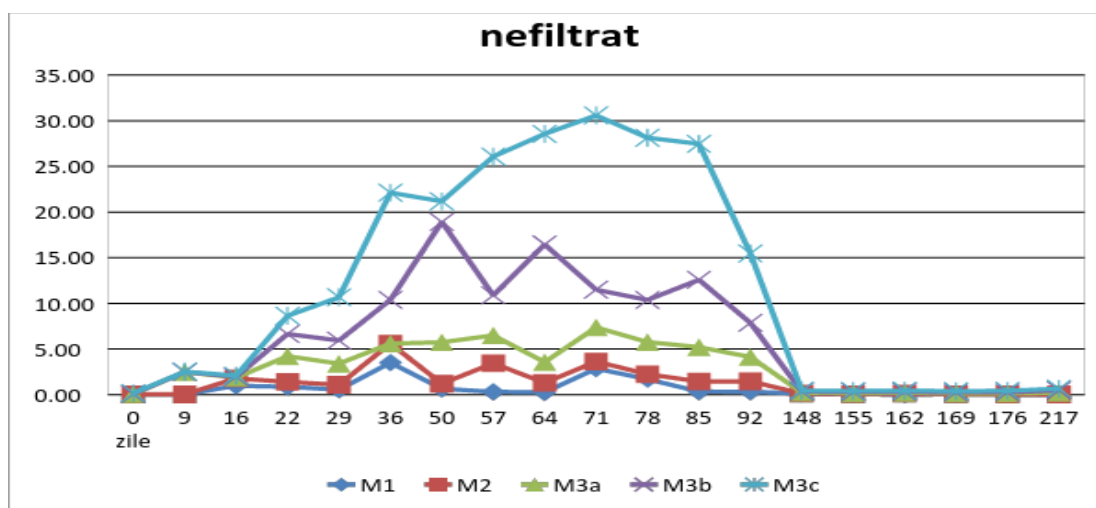


Figura 4.4. Evoluția activității metabolice timp de 7 luni a microbiotei endogene din microcosmosurile cu apă nefiltrată, suplimentate cu dispersant (Nacol C), motorină, nutrienți anorganici și organici.

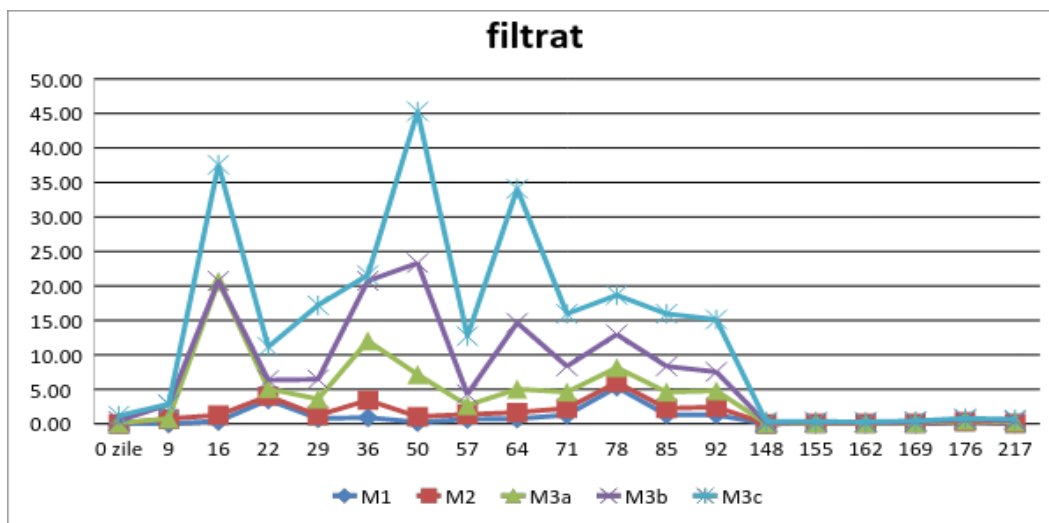


Figura 4.5. Evoluția activității metabolice în timp de 7 luni a microbiotei endogene din microcosmosurile cu apă filtrată suplimentate cu dispersant (Nacol C), motorină, nutrienți anorganici și organici .

Dar se poate observa și o inhibare a ratei de reducere a rezazurinei în microcosmosurile cu o cantitate mai mare de nutrienți organici (M 3a, M3b) spre deosebire de cel în care cantitatea este mai mică (M3c). Această creștere este în concordanță cu datele din literatura de specialitate ( Atlas, 1985.) care confirmă faptul că nutrienții sunt necesari procesului de biodegradare, dar pot devenii în anumite concentrații factori limitanți.

Se poate observa o creșterea activității metabolice a microbiotei endogene marine în microcosmosul M3c cu o cantitate mai mica de nutrient organic 1,08g/200ml, față de 2,17g/200ml in M3a și 3,25g/200ml in M3b. Toate aceste rezultate sunt în acord cu literatura de specialitate (Atlas, 1985; Venkateswaran și colab, 1995;. Habe, 2003;. Zhang și colab, 2010), ceea ce confirmă faptul că nutrienții sunt necesari procesului de biodegradare, dar pot devenii în anumite concentrații factori limitanți.

Însă concentrațiile de nutrienți anorganici și organici, în mediile marine nepoluate sunt în concentrații limitate (De Lungi 2005; Costello și colab, 2010;.. Liu și colab, 2010) ceea ce sugerează că augmentarea cu nutrienți poate ajuta procesul de bioremediere accelerându-l.

**Consumul de motorină în cele 10 microcosmosuri este ilustrat in figura 4.6 următor ca diferență între concentrația inițială și cea de la finalul experimentului (metoda gravimetrică) .**

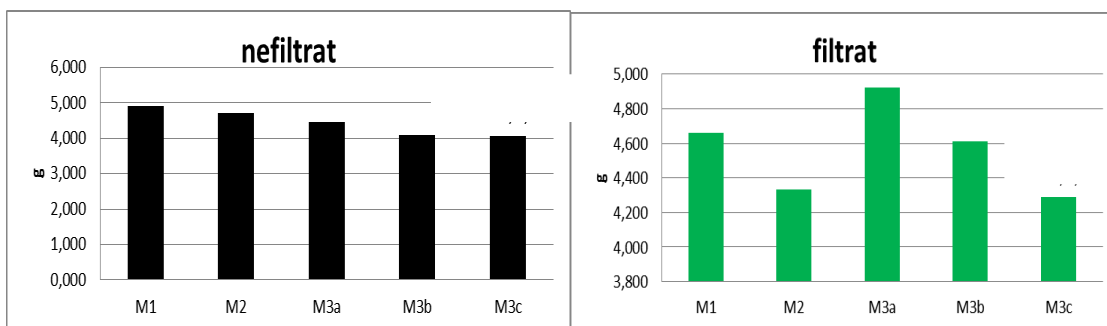


Fig 4.6. Cantitățile de motorină rămase în microcosmosuri la finalul experimentului-ca diferență între concentrația inițială și ce finală (iulie 2016). Se poate observa consum mai mare în microcosmosul M3c, cu o cantitatea de nutrienți mai mică față de cei cu concentrații mai mari (M 3a, M3b).

În urma efectuării dozării consumului de motorină prin metoda gravimetrică s-a putut pune în evidență o scădere a cantității de hidrocarbură în microcosmosul suplimentat cu cantități de nutrienți în cantități moderate (M3c) față de cei cu concentrații mai mari (M 3a, M3b).

**Cuantificarea bacteriilor hidro-carbon oxidante in microcosmosurile suplimentate cu nutrienți.** Numărul de colonii numărate pe plăcile însămânțate în data de 30.9.2016 la 148 zile de la demararea experimentului sunt prezentate în tabelul 4.6.

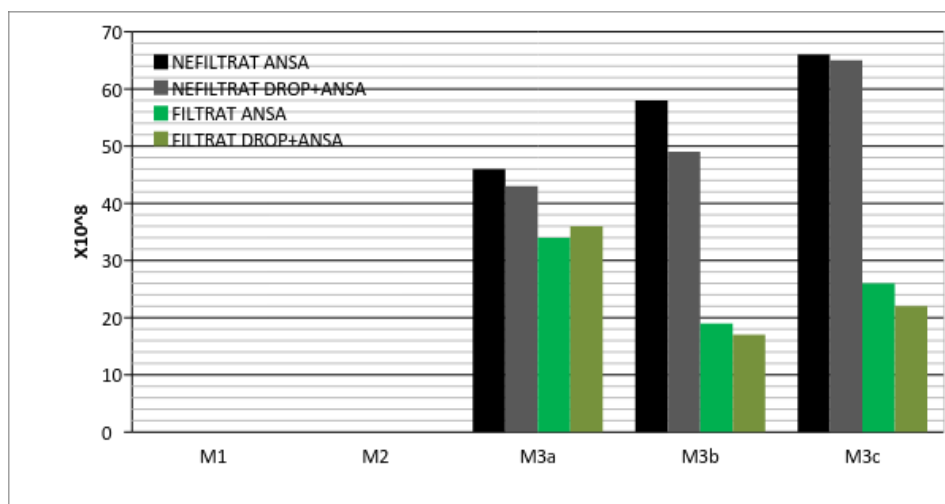


Figura 4.7. Număr de UFC hidrocarbon oxidante numărate la 148 de zile de la demararea experimentului..



Figura 4.8. Colonii izolate din microcosmosurile M3b filtrat (jos) si nefiltrat (sus).

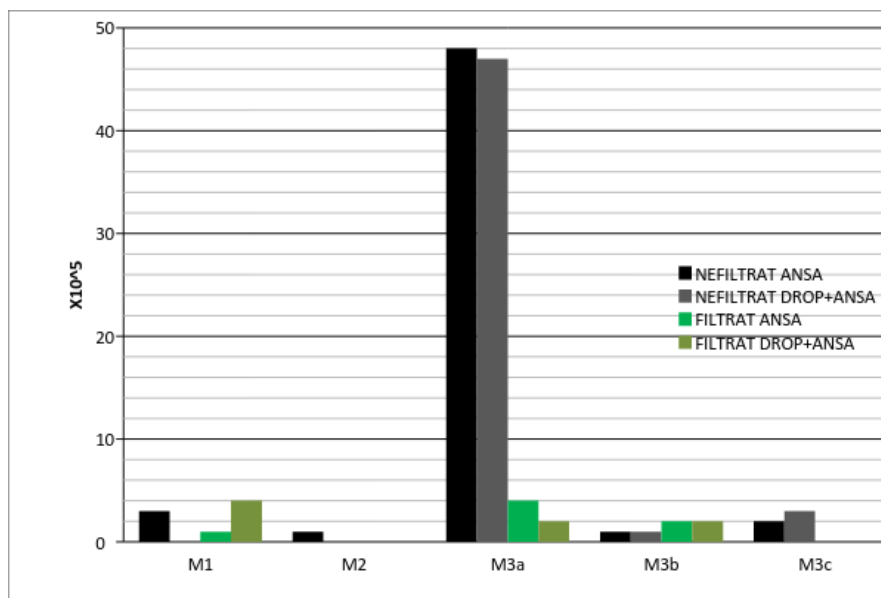


Figura 4.10. Număr de UFC hidrocarbon oxidante numărate la 305 de zile de la demararea experimentului..

În urma selectării bacteriilor hidrocarbon-oxidante în microcosmosurile suplimentate cu nutrienți. S-a putut observa o scădere previzibilă a densității coloniilor viabile în faza a II-a. În urma efectuării numărărilor de colonii s-a putut observa o diversitate a coloniilor pentru microcosmosurile nefiltrate mai mare decât la cel filtrat.

## CONCLUZII CAPITOL IV.

*În experimente tip microcosmos de durată lungă ( 15 luni), adaugarea discontinuă de nutrienți azot și fosfor a condus la consumarea unei cantități mai mari de motorină, comparativ cu microcosmurile martor atât la microcosmosurile cu apă de mare filtrată cât și la cele cu apă de mare nefiltrată;*

*Densitatea celulelor hidro-carbon oxidante este mai mare din microcosmosuri cu adădire de nutrienți anorganici , comparativ cu microcosmosul martor atât la microcosmosurile cu apă de mare filtrată cât și la cele cu apă de mare nefiltrată;*

## CAPITOLUL V - IZOLAREA, SELECTAREA ȘI IDENTIFICAREA UNOR BACTERII HIDRCARBON OXIDANTE.

În urma analizării caracterelor de cultură, a frotiurilor GRAM au putut fi identificate două tipuri morfologice:

**tipul 1-** Pe mediul Columbia agar cu 5 % sange de berbec -colonii circulare, convexe de tip S, cu margini întregi.

Diametrul coloniilor 1-1,5 mm la 24 h la 37°C.și 3,0-3,5 mm la 48h la 28°C.

Fără hemoliza. Fără motilitate. ( fig.5.1)

Pe mediul MacConkey –creștere bună la 24h la 37°C.și 3,0-3,5 mm la 48h la 28°C. colonii lactozo-negative. ( fig.5.1)

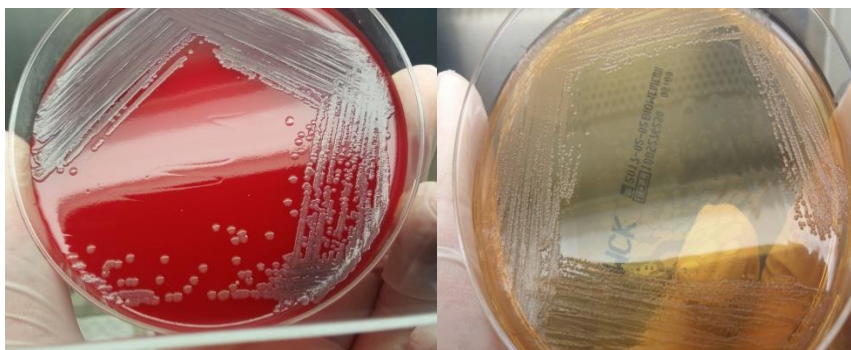


Figura 5.1. coloniile tipului morfologic 1 izolat din microcosmosuri.

(stânga-COS, dreapta MC)

**Identificare –Galerii REMEL.** Conform identificării efectuate cu ajutorul trusei REMEL în proporție de 99% , specia tipului 1 identificată aparține genului Acinetobacter.

**Identificare –MEDII POLITROPE.** Conform identificării efectuate cu ajutorul testelor biochimice individuale și interpretate cu softul ABIS online în proporție de aprox. 92% , specia identificată este Acinetobacter lwoffii.

Genul Acinetobacter, izolat in experimentele noastre reprezintă un grup de bacterii Gram-negative, imobile, nefermentative și oxidază negativ aparținând familiei Moraxellaceae. Speciile de Acinetobacter sunt capabile să supraviețuiască pe diverse suprafețe (atât umede și uscate). Aceste bacterii au rezistență intrinsecă la multe clase de antibiotice. Conform Gerischer Acinetobacter este o bacterie potrivită exploatarei în scopuri biotehnologice. (Gerischer. , 2008).

Genul Acinetobacter face parte alături de genul Pseudomonas din Ordinul **Pseudomonadales** . ambele genuri cuprind specii nefermentative, implicate în bioremediere, ubiquitare. Pseudomonas aeruginosa reprezintă o bacterie care poate tolera solvenții organici datorită mecanismelor metabolice ce le permit dezvoltarea lor în diverse ecosisteme, inclusiv cele puternic poluate. (Lăzăroaie, 2010, . 2009,Stancu. MM, 2011).

## CONCLUZII CAPITOL V.

**S-au izolat, purificat și identificat din experimentul IV la nivel de gen o tulpină de Acinetobacter sp. și o tulpină Bacillus sp.**

**Tulpina identificată la nivel de gen a putut fi indentificată în proporție de aprox. 92% la nivel de specie ca Acinetobacter lwoffii.**

## **CAPITOLUL VI – TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE SPECIFICE A BACTERIILOR HIDRCARBON OXIDANTE IZOLATE.**

După incubare, plăcile au fost examinate vizual pentru prezența sau absența unei creșterii bacteriene, astfel lipsa de creștere a fost înregistrată ca rezistență, în timp ce creșterea bacteriană înregistrată ca fiind susceptibilitate..

S-a putut pune în evidență rezistența tulpinii izolate la clasa de cefalosporine, carbapeneme și beta-lactamaze. (tabel 6.1). datele obținute fiind conform literaturii de specialitate, astfel conform Gupta. testele de verificare a susceptibilității la antibiotice a izolatelor de *Acinetobacter* sp. au arătat rezistență față de piperacilin (55%), ceftriaxone (46%), ceftazidime (46%), cefepime (44%), cefotaxime (43%), amikacin (42%) și imipenem (22%). (Gupta , 2015).

În același timp s-a putut observa lipsa de rezistență la clasa: Aminoglycosides: Trimethoprim + sulfamethoxazole, Quinolones și Tetracyclines. Datele obținute sunt în concordanță cu datele din literatură, conform Sharma, 2016. izolatele bacteriene din deversările petroliere sunt rezistente în număr destul de mare la ampiciline 12/28, peniciline 10/28 și doar 1/28 rezistente la tetraciclina, ceea ce sugerează că acest agent antimicrobian ar fi destul de eficient. (Sharma, 2016 ).

Din cauza rezistenței la cefalosporine și carbapeneme, tulpina a fost testată pentru producția de ESBL și Carbapenemază. Testele fiind negative. (fig. 6.1), ceea ce ar putea explica existența altor mecanisme ce pot produce rezistența tulpinii la anumite clase de antibiotice și susceptibilitatea sa la altele; mecanismele acestea ar putea fi conform literaturii de specialitate: activarea sau/și inactivarea unor pompe de eflux de la nivelul peretelui celular. ( Stancu. MM, Grifoll. M, 2011., Lăzăroaie, 2010, .2009.,Poole, 2001, 2005 ).

De asemenea speciile de *Acinetobacter spp.* Izolate din probe medicale conform Abbott 2013. Prezintă în număr destul de mare rezistență, astfel 39.63% din izolate au fost multidrug rezistente ( la cel puțin 2 sau 3 clase : penicillins, cephalosporins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and carbapenems). (Abbott .I, 2013., Gupta .N, 2015).

Tabel 6.1. Antibiograma tulpinii hidrocarbon oxidanteizolate *Acinetobacter lwoffii*.  
(se poate observa rezistența tulpinii ca cefalosporine și carbapeneme, rezistența intrinsecă confirmată la amoxicilină-clavulanat)

<i>Antibiotic</i>	<i>Coținut antibiotic per disc</i>	<i>Clasa antibiotic</i>	<i>Diametrul citit:</i>	<i>Incaдрare Conform CLSI</i>	<i>Diametrul citit în prezența hidrocarburii:</i>	<i>Incaдрare Conform CLSI</i>
Tobramycin	(10 µg),	Aminoglycosides	27 mm	SENSIBIL	26 mm	SENSIBIL
<b>Trimethoprim + sulfamethoxazole</b>	<b>(1.25+23.75 µg)</b>	<b>Inhibitor al căii folatului</b>	<b>26 mm</b>	<b>SENSIBIL</b>	<b>34 mm</b>	<b>SENSIBIL</b>
Levofloxacin	(5 µg)	Quinolones	24 mm	SENSIBIL	25 mm	SENSIBIL
Ciprofloxacin	(5 µg)	Quinolones	26 mm	SENSIBIL	25 mm	SENSIBIL
<b>Doxycycline</b>	<b>(30 µg)</b>	<b>Tetracyclines</b>	<b>20 mm</b>	<b>SENSIBIL</b>	<b>25 mm</b>	<b>SENSIBIL</b>
<b>Tetracycline</b>	<b>(30 µg)</b>	<b>Tetracyclines</b>	<b>16 mm</b>	<b>SENSIBIL</b>	<b>26 mm</b>	<b>SENSIBIL</b>
Gentamicin	(10 µg)	Aminoglycosides	15 mm	SENSIBIL	15 mm	SENSIBIL
Amikacin	(30 µg)	Aminoglycosides	12 mm	REZISTENT	15 mm	REZISTENT
<b>Piperacillin + Tazobactam</b>	<b>(100+10 µg)</b>	<b>beta-Lactams</b>	<b>16 mm</b>	<b>REZISTENT</b>	<b>24 mm</b>	<b>SENSIBIL</b>
Ampicillin + Sulbactam	(10+10 µg)	beta-Lactams	0 mm	REZISTENT	0 mm	REZISTENT
Ceftazidime	(30 µg)	Cefalosporine	0 mm	REZISTENT	0 mm	REZISTENT
Cefepime	(30 µg)	Cefalosporine	0 mm	REZISTENT	0 mm	REZISTENT
Ceftriaxone	(30 µg)	Cefalosporine	0 mm	REZISTENT	0 mm	REZISTENT
Imipenem	(10 µg)	Carbapenems	0 mm	REZISTENT	0 mm	REZISTENT
Meropenem	(10 µg)	Carbapenems	0 mm	REZISTENT	0 mm	REZISTENT
Piperacillin	(100 µg)	Penicillins	0 mm	REZISTENT	0 mm	REZISTENT

## CONCLUZII CAPITOL VI.

*Tulpina de Acinetobacter lwoffii. izolată prezintă rezistența la cefalosporine, beta-lactame, carbapeneme, peniciline și sensibilitate la tetracicline, quinolone, aminoglicozide, falși metaboliți . în prezența motorinei și în absența ei.*

*Excepții în prezența motorinei : tulpina ea devenit sensibilă pentru piperacillin-tazobactam, iar pentru Doxycycline, Tetracycline, Trimethoprim + sulfamethoxazole tulpina a căpătat o susceptibilitate mai mare exprimată prin mărirea diametrul citit.*



## CAPITOLUL VII- CONCLUZII GENERALE

1. Rezultatele arată că în prezența dispersantului și motorinei densitățile celulare sunt mai mari decât la martor , ale carui celule au dimensiuni mai mari decât cele cultivate în prezența dispersantului și a motorinei
2. Din punct de vedere al rtei reducerii rezazurinei, concentrația optimă de motorina este de 10% iar cea de dispersant de 1/1000
3. Consumul de motorină este stimulat de 1,5 ori prin adăugarea dispersantului dar adaugarea de nutrienți organici și / sau anorganici nu are efect asupra consumului de motorină
4. În experimente tip microcosmos de durată lungă ( 15 luni), adaugarea discontinuă de nutrienți azot și fosfor a condus la consumarea unei cantități mai mari de motorină, comparativ cu microcosmurile martor atât la microcosmosurile cu apă de mare filtrată cât și la cele cu apă de mare nefiltrată;
5. Densitatea celulelor hidro-carbon oxidante este mai mare din microcosmosuri cu adăugare de nutrienți anorganici , comparativ cu microcosmosul martor atât la microcosmosurile cu apă de mare filtrată cât și la cele cu apă de mare nefiltrată
6. S-au izolat, purificat și identificat din experimentul IV la nivel de gen o tulpină de Acinetobacter sp. și o tulpină Bacillus sp.
7. Tulpina identificată la nivel de gen a putut fi indentificată în proporție de aprox. 92% la nivel de specie ca Acinetobacter lwoffii
8. Tulpina de Acinetobacter lwoffii, izolată prezintă rezistența la cefalosporine, beta-lactame, carbapeneme, peniciline și sensibilitate la tetracicline, qinolone, aminoglicozide, falși metaboliți . în prezența motorinei și în absența ei.
9. Excepții în prezența motorinei : tulpina ea devenit sensibilă pentru piperacillin-tazobactam, iar pentru Doxycycline, Tetracycline, Trimethoprim + sulfamethoxazole tulpina a căpătat o susceptibilitate mai mare exprimată prin mărirea diametrului de inhibiție determinat experimental.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Anthony .I. O, 2006. *Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants*. Biotechnology and Molecular Biology Review Vol. 1 (2),. pp. 38-50.
2. Atlas R.M., 1981. *Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective*, Microbiological reviews, Vol. 45, No. 1, . p. 180-209.
3. Alexandra Ibáñez E , Alfredo Meneses Marcel II; Yanetsy Machado Tugores II; Juan José Nogal Ruiz I; Vicente J Arán Redó III; José Antonio Escario García-Trevijano I; Alicia Gómez Barrio I., 2012, *Validation of a modified fluorimetric assay for the screening of trichomonacidal drugs* , Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.107 no.5 . pp 637–643.
4. Ardelean I.I., Ghita S., Sarchizian I., 2009, *Epifluorescent method for quantification of planktonic marine prokaryotes*, Proceedings of the 2nd International Symposium “New Research in Biotechnology”, serie F, pp. 288-296.
5. Atlas R.M., 1981, *Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective*, Microbiol. Rev., Vol. 45 , pp.180-209.
6. Autio K, Mattila-Sandholm T ,1992, *Detection of active yeast cells (Saccharomyces cerevisiae) in frozen dough sections*, .Appl Environ Microbiol Vol.58:2153–2157.
7. Atlas R. M. ,1985. *Effects of hydrocarbons on micro-organisms and biodegradation in Arctic ecosystems*, Petroleum Effects in the Arctic Environment, F. R. Engelhardt, Ed., pp. 63–99.
8. Abbott I; Cerqueira G. M; Bhuiyan S ; Peleg A.Y, 2013. „Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* Laboratory Challenges, Mechanistic Insights and Therapeutic Strategies, Expert Rev Anti Infect Ther. ;11(4):395-409.
9. Bull A.T., Goodfellow M., Slater J.H., 1992 – *Biodiversity as a source of innovation in biotechnology*, Ann. Rev., Microbiol., Vol.46, 219-252.
10. Cohen Y., *Bioremediation of oil by marine microbial mats*, Int Microbiol., Vol. 5, 2002, pp. 189–193.
11. Costello M. J., Coll M., Danovaro R., Halpin P., Ojaveer H., Miloslavich P., 2010, *A Census of Marine Biodiversity Knowledge, Resources, and Future Challenges*, PLoS ONE, Vol. 5, pp. 1-15.

12. Crook B., 1996, *Methods of monitoring for process microorganisms in biotechnology*. Ann. Occup. Hyg., 40, 245-260.
13. Fry J.C., 1990. *Direct methods and biomass estimation*, Methods in Microbiology, Vol. 22, , pp. 41-85.
14. Fuhrman J.A., Azam F., 1980. *Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica and California*, Applied and Environmental Microbiology, vol. 39 , pp. 1085–1095.
15. Floodgate .G., 1984. “*The fate of petroleum in marine ecosystems* ” ,Petroleum Microbiology, R. M. Atlas, Ed., pp. 355–398.
16. Gasol J.M., Pinhassi J., Alonso-Sáez .L., Ducklow H., Herndl G.J., Koblížek M., Labrenz M., Luo Y., Morán XAG., Reinthaler T., Simon M., 2008. *Towards a better understanding of microbial carbon flux in the sea*, Aquat Microb Ecol, Vol. 53, pp. 21–38.
17. Ghiță S., Ardelean I.I., *Dynamics of marine bacterioplankton density in filtered (0.45 μm) microcosms supplemented with gasoline*, 3th International Conference on Environmental and Geological Science and Engineering (EG’10), Published by WSEAS Press, 2010a, pp. 93-98.
18. Ghiță S., Sarchizian I., Ardelean I.I., *Utilization of epifluorescence microscopy and digital image analysis to study some morphological and functional aspects of prokaryotes*, Ovidius University Annals - Biology-Ecology Series, Vol. 14, 2010b, pp. 127-137.
19. Ghiță S., Ardelean I.I., *Total cell count, single cell biomass and growth rate in marine microcosms supplemented with gasoline and gasoline-enriched marine populations*, Journal of Marine Technology and Environment, Vol. 1, 2011, pp. 39-46.
20. Jürgens K., Pernthaler J., Schalla S., Amann R., 1999. *Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing*, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 65, pp. 1241–1250..
21. Jones JG, Simon BM. , 1975 . *An investigation of errors in direct counts of aquatic bacteria by epifluorescence microscopy, with reference to a new method for dyeing membrane filters*. J Appl Bacteriol.; 39(3):317–329.
22. Joux.F., 2000. *Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level*. Microbes & Infection . 2, 1523–1535..

23. Keevil CW, Walker JT, 1992. *Normaski DIC microscopy and image analysis of biofilms*. Binary 4:92–95.
24. Kim S.-J., Choi D. H., Sim D. S., Oh Y.-S., 2005. “*Evaluation of bioremediation effectiveness on crude oil-contaminated sand*,” Chemosphere, vol. 59, no. 6, pp. 845–852.
25. Liu J., Weinbauer M. G., Maier C., Dai M., Gattuso J.P., 2010. *Effect of ocean acidification on microbial diversity and on microbe-driven biogeochemistry and ecosystem functioning*, Aquatic Microbial Ecology, Vol. 61 , pp. 291–305.
26. Luna G.M., Manini E., Danovaro R., 2002. *Large fraction of dead and inactive bacteria in coastal marine sediments: comparison of protocols for determination and ecological significance*, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 68 , pp. 3509-3513.
27. Lunau M., Lemke A., Walther K., Martens-Habbena W., Simon M., 2005. *An improved method for counting bacteria from sediments and turbid environments by epifluorescence microscopy*, Environ. Microbiol., Vol. 7 , pp. 961-968.
28. Lăzăroaie. MM, 2010, *Multiple responses of gram-positive and gram-negative bacteria to mixture of hydrocarbons*, Brazilian Journal of Microbiology 41 (3), 649-667.
29. Lăzăroaie. MM, 2009, *Mechanisms Involved In Organic Solvent Resistance in Gram-Negative Bacteria*, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering Vol:3, No:6. 309-319 .
30. Lazar. I, Dobrota. S, Voicu. A, Stefanescu .M, Sandulescu. L, Petrisor. IG, 1999. *Microbial degradation of waste hydrocarbons in oily sludge from some Romanian oil fields*, Journal of Petroleum Science and Engineering 22 (1), 151-160.
31. Lazar. I, Voicu. A, Nicolescu. C, Mucenica. D, Dobrota. S, Petrisor. IG, 1999. *The use of naturally occurring selectively isolated bacteria for inhibiting paraffin deposition*, Journal of Petroleum Science and Engineering 22 (1), 161-169.
32. Lazar. I, Dobrota. S, Stefanescu. M, L Sandulescu, Constantinescu. P , 1991. *Ch. F-2 Preliminary Results of Some Recent MEOR Field Trials in Romania*, .Developments in Petroleum Science 31, 365-385.
33. Lazar. I, Dobrota. S, Stefanescu. M, L Sandulescu, Paduraru. R, .1993. *.MEOR, recent field trials in Romania: reservoir selection, type of inoculum, protocol for well treatment and line monitoring*, Developments in Petroleum Science 39, 265-287.

34. McGenity et al. (2012): *Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions*. Aquatic Biosystems, 2012 8:10.
35. Manini E., Danovaro R., 2006. *Synoptic determination of living/dead and active/dormant bacterial fractions in marine sediments*, FEMS Microbiol. Ecol., Vol. 55, pp. 416-423.
36. Manea. M, Cîrnu. M , Ardelean. I, 2014. “*Selecting the optimal concentration of nutrients, dispersant and diesel oil to enhance metabolic activity and diesel oil consumption by marine endogenous microbiota at 15 °C*”, AgroLife Scientific Journal – Vol. 3, No. 1, Pag 94-99.
37. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Source AstraZeneca, Alderley Park., 2000. *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity*. Eur J Biochem. ;267(17):5421-6.
38. Odu C. T. 1972.. *Microbiology of soils contaminated with petroleum hydrocarbons*. Inst. Petrol., 158, 201 -8.
39. Sherr B., Sherr E., del Giorgio P., 2001. *Enumeration of total and highly active bacteria*, Methods in Microbiology, Vol. 30, pp. 1-9.
40. Sherr E., Sherr B., 2002. *Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs*, Ant van Leeuwen, Vol. 81, pp. 293–308.
41. Singer. M. M., George. S., Jacobson. S., Lee L., Weetman L. L., Tjeerdema R. S., Sowby .M. L., 1995. “*Acute toxicity of oil dispersant corexit 9554 to marine organisms*,” Ecotoxicology and Environmental safety, vol. 32, 81.
42. Singer M. M., George S., Jacobson S., Lee L., Weetman L. L., Tjeerdema R. S., Sowby M. L., 1996., “*Comparison of acute aquatic effects of the oil dispersant Corexit 9500 with those of other Corexit series dispersants*,” Ecotoxicology and Environmental safety, vol. 35, 183.
43. Stewart P.S, Griebe T, Srinivasan R, Chen C-I, Yu FP, Beer D de, McFeters GA , 1994. *Comparison of respiratory activity and culturability during monochloramine disinfection of binary population biofilms*. Appl Environ Microbiol 60:1690–1692.
44. Stancu. MM, Grifoll. M, 2011, *Multidrug resistance in hydrocarbon-tolerant Gram-positive and Gram-negative bacteria*. The Journal of general and applied microbiology, 57 (1), 1-18.
45. Stancu. MM, 2011, *Effect of organic solvents on solvent-tolerant Aeromonas hydrophila IBBPo8 and Pseudomonas aeruginosa IBBPo10*, Indian J Biotechnol 10, 352-361.

46. Sharma R., 2016. *Response of Bacterial Isolates to Various Antibiotics Isolated from Petroleum Spilled Soil*. International Journal of Advance research , Ideas and Innovations in Technology. Volume-2, 1-5.
47. Taylor DL, Salmon ED, 1989. *Basic fluorescence microscopy*. In: Wang Y-L, Taylor DL (eds) *Fluorescence microscopy of living cells in culture. Part A: fluorescent analogs, labeling cells and basic microscopy*. Methods in cell biology, vol 29, Academic Press, San Diego, Calif., pp 207–237..
48. Toti M., M. Dumitru, Anca Rovena Voiculescu, Gabriela Mihalache, Carolina Constantin, M. Mihalache, "*Metodologia de remediere a solurilor poluate cu titei cu ajutorul microorganismelor specifice selectionate din microflora autohtona*", Editura GNP MINISCHOOL, Bucuresti, 2003.
49. Toti M., M. Dumitru, Carolina Constantin, – *Poluarea cu petrol si apa sarata a solurilor din România*. Ed. RisoPrint Cluj Napoca, 227 pag., 1999.
50. Toti M., Rauta, C., Dumitru M., Capitanu, Gament Eugenia, Damian Maria, - *Distributia principalelor tipuri de poluare cu reziduuri petroliere si apa sarata din România*. Analele ICPA nr. 52, Bucuresti, 1992.
51. Uzoigwe C. I., 2012. *Biodegradation of oil spill dispersants in natural aquatic ecosystem*, International Journal of Physical Sciences, Vol. 7, , pp. 5477-5484.
52. Venosa AD, Holder EL, 2007 . *Biodegradability of dispersed crude oil at two different temperatures*, Mar. Poll. Bull. 54(5):545-553.
53. Vazquez-Dominguez E., Casamayor E.O., Catala` P., Lebaron P., 2005. *Different Marine Heterotrophic Nanoflagellates Affect Differentially the Composition of Enriched Bacterial Communities*, Microbial Ecology, Vol. 49 , pp. 474–485.
54. Venkateswaran .K., Hoaki .T., Kato .M., Maruyama. T., 1995. *Microbial degradation of resins fractionated from Arabian light crude oil*, Canadian Journal Microbiology, Vol. 41, pp. 418– 424.
55. Venosa A.D., Xueqing Z., 2003. *Bioremediation of crude oil contaminating marine shorelines and fresh water wetlands*, Spill Sci. Technol. Bull., Vol. 8 , pp.163-178.

56. Vazquez-Dominguez E., Casamayor E.O., Catala` P., Lebaron P., 2005. *Different Marine Heterotrophic Nanoflagellates Affect Differentially the Composition of Enriched Bacterial Communities*, Microbial Ecology, Vol. 49 , pp. 474–485.
57. Venosa. D., Zhu. X., 2003., “*Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands,*” Spill Science and Technology Bulletin, vol. 8, no. 2, pp. 163–178.
58. Walberg M, Gaustad P, Steen HB, 1999. *Uptake kinetics of nucleic acid targeting dyes in S. aureus, E. faecalis and B. cereus: a flow cytometric study.* J Microbiol Methods 35:167–176.
59. Yu FP, McFeters GA, 1994. *Rapid in situ assessment of physiological activities in bacterial biofilms using fluorescent probes.* J Microbiol Methods 20:1–10.
60. <http://www.promega.ro/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cell-viability/>
61. DOTCOUNT-----Dr. Martin Reuter, Massachusetts General Hospital Martinos Center for Biomedical Imaging 49 Thirteenth Street, Suite 2301 Charlestown, MA 02129 <http://reuter.mit.edu/software/>.
62. CLSI-Clinical and laboratory standards institute- Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, a 27-a editie, ianuarie .2017. M100-S27E.

**Rezultatele obținute în urma demersului științific din cadrul prezentei teze de doctorat au fost valorificate prin 3 publicații pe subiectul tezei :**

1. MANEA, M.,<sup>1</sup> GHIȚĂ, S.<sup>2</sup>, ARDELEAN, I.<sup>1,3</sup>, „*Microbial cell density dynamics in sea water microcosms supplemented with diesel and the dispersant-Nacol C,*” Proceedings of the 11th International Conference on Environment, Ecosystems and Development (EED '13) Proceedings of the 2nd International Conference on Sustainable Tourism and Cultural Heritage (STACH '13) Brasov, Romania June 1-3, 2013. Publicat de WSEAS Press , (pg.117- 124), Editori: Vladimir Marascu-Klei, Fanel-Viorel Panaitescu, Mariana Panaitescu. [www.wseas.us/e-library/conferences/2013/Brasov](http://www.wseas.us/e-library/conferences/2013/Brasov).  
ISSN: 2227-4359  
ISBN: 978-1-61804-195-1

2. MANEA, M.,<sup>1</sup> ARDELEAN, I.<sup>2</sup>. „*Screening of optimal concentrations of dispersant (nacol c) and diesel to enhance growth, multiplication and metabolic activity of marine endogenous microbiota* „,

PROCEEDINGS of ISB-INMA TEH' 2013 SYMPOSIUM INTERNATIONAL SYMPOSIUM ISB-INMA-TEH-AGRICULTURAL AND MECHANICAL ENGINEERING.

Publicat de INMA București (pg. 353-358) .

<http://www.inma.ro/symposia/ISB-INMATEH-2014/Documents/ISB-INMA%20TEH%202013.pdf>

ISSN 2344 – 4118

3. MANEA, M., CIRNU, M., ARDELEAN, I . „ *Selecting the optimal concentration of nutrients, dispersant and diesel oil to enhance metabolic activity and diesel oil consumption by marine endogenous microbiota at 15<sup>0</sup> C.*„

Publicat de AGROLIFE JOURNAL, Vol.3, Nr.1, 2014 (pg. 94-99)

<http://agrolifejournal.usamv.ro/pdf/Vol3/art16.pdf>

ISSN 2285-5718;

ISSN CD-ROM 2285-5726; ISSN ONLINE 2286-0126; ISSN-L 2285-5718

4. BADEA, V., MANEA, M., BALABAN, D.P., GRIGORIAN, M. AND NUCA, C., „*Bacteria screening of black sea beaches by conventional and alternative pollution indicators*„,

PROCEEDINGS of 40<sup>th</sup> CIESM CONGRES PROCEEDINGS.

Publicat de CIESM Congress 2013, Marseille, Franța, Vol.40, articol 0403, (pg. 403)

[http://www.ciesm.org/online/archives/abstracts/pdf/40/Pg\\_0403.pdf](http://www.ciesm.org/online/archives/abstracts/pdf/40/Pg_0403.pdf)