

**MINISTERUL EDUCAȚIEI, CERCETĂRII, TINERETULUI ȘI SPORTULUI
UNIVERSITATEA "OVIDIUS" CONSTANȚA
FACULTATEA DE ȘTIINȚE ALE NATURII ȘI ȘTIINȚE AGRICOLE
ȘCOALA DOCTORALĂ – DOMENIUL BIOLOGIE**

TEZĂ DE DOCTORAT

ASPECTE CANTITATIVE ȘI CALITATIVE ALE MICROBIOTEI SEDIMENTELOR NISIPOASE DE LA LITORALUL ROMÂNESC AL MĂRII NEGRE: SEMNIFICAȚII TEORETICE ȘI APLICATIVE

REZUMAT

**Conducător științific:
Prof. Univ. Dr. Ioan Ardelean**

**Doctorand:
Popoviciu Dan Răzvan**

**Constanța
- 2012 -**

CUPRINS

	Pagina
INTRODUCERE	4
PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	5
Capitolul 1. Sedimentele nisipoase marine – generalități	5
Capitolul 2. Bacteriobentosul marin	5
2.1. Aspecte cantitative privind microbiota bentică marină.....	5
2.2. Grupe fiziologice de procariote și activitatea lor metabolică în sedimentele marine.....	6
2.3. Caracteristici morfo-structurale și taxonomice ale microbiotei sedimentelor marine litorale	8
Capitolul 3. Potențialul de bioremediere al sedimentelor marine în cazul poluării cu uleiuri minerale sau vegetale	9
PARTEA A II-A. CONTRIBUȚII PERSONALE LA STUDIUL CANTITATIV ȘI CALITATIV AL MICROBIOTEI BENTICE LITORALE	11
Scopul și obiectivele lucrării	11
Capitolul 4. Materiale și Metode	11
4.1. Prelevarea și fixarea probelor	11
4.1.1. Determinarea caracteristicilor microbiotei din sedimente nisipoase de diferite granulații de pe litoralul românesc al Mării Negre	11
4.1.2. Evoluția microbiotei bentice în microcosmosuri cu sedimente marine de diferite granulații	12
4.1.3. Determinarea variațiilor sezoniere ale caracteristicilor microbiotei bentice litorale.....	13
4.1.4. Determinarea variației sezoniere a concentrației pigmentilor clorofilieni din sediment.....	13
4.1.5. Estimarea densității unor grupe fiziologice microbiene din sedimentele litorale	14
4.2. Analiza granulometrică a sedimentelor	14
4.3. Analiza microscopică.....	14
4.3.1. Dislocarea celulelor aderente pe granulele de sediment	14
4.3.2. Cuantificarea directă a celulelor microbiene	14
4.3.3. Cuantificarea biomasei microbiene	15
4.3.4. Diferențierea bacteriilor Gram pozitive și Gram negative prin microscopie de epifluorescență	15
4.3.5. Diferențierea celulelor bacteriene în funcție de integritatea plasmalemei	15
4.4. Cuantificarea pigmentilor clorofilieni din sedimente	16
4.5. Determinarea corelațiilor între diferiți parametri	16
4.6. Estimarea densității unor grupe fiziologice microbiene din sedimentele litorale	16
4.7. Evaluarea potențialului de bioremediere al microbiotei bentice litorale.....	17
4.7.1. Efectul poluării cu hidrocarburi asupra microbiotei bentice litorale.....	17
4.7.2. Estimarea densității microorganismelor capabile să degradeze hidrocarburi și uleiuri vegetale	17
4.7.3. Influența nutrienților asupra bioremedierii sedimentelor poluate cu hidrocarburi – experimente de tip microcosmos.....	18
Capitolul 5. Rezultate și discuții	19
5.1. Caracteristicile microbiotei din sedimente nisipoase de diferite granulații de pe litoralul românesc al Mării Negre	19
5.1.1. Granulometria sedimentelor	19
5.1.2. Densitatea și biomasa populațiilor microbiene	19
5.1.3. Distribuția principalelor grupuri morfologice microbiene.....	20
5.1.4. Integritatea membranelor a celulelor microbiene.....	21
5.2. Evoluția microbiotei bentice în microcosmosuri cu sedimente marine de diferite granulații.....	22
5.3. Variații sezoniere ale caracteristicilor microbiotei bentice litorale.....	23
5.3.1. Densitate celulară și biomasă	23
5.3.2. Distribuția principalelor grupuri morfo-structurale bacteriene	24
5.3.3. Evoluția sezonieră a concentrației pigmentilor clorofilieni în sedimentele litorale	25
5.3.4. Corelații între caracteristicile microbiotei și condițiile de mediu	26
5.4. Estimarea densității unor grupe fiziologice microbiene din sedimentele litorale	27
5.5. Potențialul de bioremediere al microbiotei bentice litorale	29
5.5.1. Efectul poluării cu hidrocarburi asupra microbiotei bentice litorale.....	29
5.5.2. Densitatea microorganismelor capabile să degradeze hidrocarburi și uleiuri vegetale.....	31
5.5.3. Influența nutrienților asupra bioremedierii sedimentelor poluate cu hidrocarburi.....	32
CONCLUZII	34
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	36

INTRODUCERE

Organismele procariote sunt răspândite în toate mediile de viață. Desigur, sedimentele marine nu fac excepție. De altfel, bacteriobentosul este mult mai bogat, ca densitate a microbiotei, decât bacterioplanctonul.

Atât bacteriile de la suprafața sedimentelor cât și cele din profunzimea acestora joacă roluri foarte importante în cadrul ecosistemelor marine. Ele participă la ciclurile biogeochimice, asigurând recircularea diferitelor bioelemente. Prin descompunerea substanțelor organice și eliberarea nutrienților, sporesc productivitatea bazinelor marine. De asemenea, bacteriile participă la transformări fizico-chimice esențiale în geneza diferitelor tipuri de sedimente marine.

Din păcate, deși au fost realizate numeroase studii asupra bacteriobentosului, puține lucrări au atins problema bacteriilor psamicele și încă și mai puține au încercat realizarea unor corelații între densitatea, biomasa și structura comunităților bacteriene, pe de o parte, și diverși factori de mediu (granulația sedimentelor, temperatura etc.), pe de altă parte.

Cuvinte-cheie: bacterii, sedimente nisipoase, densitate, biomasă, diversitate morfo-structurală, variații sezoniere, grupe fiziologice, bioremediere.

PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Capitolul 1. Sedimentele nisipoase marine – generalități

Sedimentele de marine se pot clasifica în două mari categorii: sedimente de mică adâncime și sedimente de mare adâncime. Sedimentele de mică adâncime se împart în mai multe subcategorii, importante pentru prezenta lucrare fiind sedimentele litorale. Acestea sunt constituite preponderent din nisipuri de diferite granulații, coborând până la 15-40 m adâncime (Bondar et al., 1973, p. 103).

Nisipurile pot fi definite drept sedimente mobile, cu granule distincte, aspre la pipăit și cu puține particule fine coloidale. Clasificarea nisipurilor se realizează, în principal, după granulometria lor: nisipuri foarte fine (cu un diametru mediu al particulelor de 0,016-0,12 mm), fine (0,1-0,25 mm), medii (până la 0,5 mm) și grosiere (0,5-2 mm). Peste 2 mm se poate vorbi deja de pietrișuri (Gomoiu, 1969).

Sedimentele nisipoase nu sunt uniforme pe toată lungimea litoralului românesc, granulația crescând progresiv, de la nisipuri cu granulație mică de origine aluvionară, în nord, până la nisipuri medii și chiar grosiere rezultate din fărâmițarea cochiliilor de moluște și a rocilor calcaroase, la sud de Constanța. Există și o variație pe verticală a granulației, ea scăzând pe măsura îndepărtării față de țărm. Granulometria nisipurilor variază și în timp, fiind influențată, de exemplu, de speciile de moluște prezente în regiune.

Și compoziția chimică a sedimentelor variază. Cele din sectorul nordic al litoralului românesc preponderent silicioase, iar în sud, predomină carbonatul de calciu.

Cantitatea de materie organică din sediment, poate varia între 0,4% și 14,2%, fiind mai abundentă în zona de spargere a valurilor (Gomoiu, 1969).

Cantitatea de oxigen dizolvat în apa interstițială și adâncimea de pătrundere a luminii sunt doi factori de mare importanță pentru microorganisme, ele depinzând de granulația nisipului, de adâncimea apei și, în cazul oxigenului, de temperatura apei (Gomoiu, 1969).

Capitolul 2. Bacteriobentosul marin

2.1. Aspecte cantitative privind microbiota bentică marină

Distribuția bacteriilor bentale este determinată de mai mulți factori. Adâncimea la care se găsesc în coloana de sediment influențează accesul la nutrienți și oxigen. Densitatea maximă este atinsă la interfața dintre sediment și apă (Pora & Oros, 1974).

Localizarea geografică a sedimentelor este și ea importantă. În regiunile mai apropiate de țărm, densitatea bacteriobentosului crește datorită cantității mai mari de compuși organici

rezultați prin depunerea resturilor vegetale și animale. Se adaugă, ca factori favorizanți, gradul ridicat de oxigenare și temperaturile mai ridicate. Ca factori nefavorabili, apar variații de salinitate și temperatură și hidrodinamismul (Novitsky & MacSween, 1989, Pusceddu et al., 2005, Mudryk & Podgórska, 2006b, Podgórska et al., 2008)

De asemenea, tipul de sediment influențează abundența bacteriilor. Mălurile, mălurile cu argile, sedimentele detritice sunt foarte bogate în nutrient organici, deci și în microorganisme, spre deosebire de nisipuri.

Prin metode de numărare directă, densitățile microbiotei bentice litorale determinate de diverși autori în diferite zone ale lumii se încadrează în limitele de circa 10^6 - 10^9 celule per cm^3 (Montagna, 1982, Novitsky & MacSween, 1989, Danovaro et al., 1994, Epstein et al., 1997, Hymel & Plante, 1998, Kuwae & Hosokawa, 1999, Dietrich & Arndt, 2000, Proctor & Souza, 2001, Luna et al., 2002, Lunau et al., 2005, Pusceddu et al., 2005, Šestanović et al., 2005, Ferrara-Guerrero et al., 2007, Røberg et al., 2007, Podgórska et al., 2008, Šestanović et al., 2009), cu variații circadiene și sezoniere (Šestanović et al., 2005, Ferrara-Guerrero et al., 2007, Šestanović et al., 2009).

Trebuie menționat faptul că dintre celulele bacteriene vizualizate prin metode de numărare directă rareori mai mult de 60% sunt vii (Luna et al., 2002), iar cele cultivabile pot reprezenta sub 1‰ (Khiyama & Makemson, 1973).

Bacteriile colonizează doar o mică parte din suprafața sedimentelor (sub 1%), preferând spații adăpostite (fisuri, crăpături) față de abraziune, mișcările apei și consumatori. Depunerile de detritus favorizează, evident, colonizarea microbiană (Weise & Rheinheimer, 1977, DeFlaun & Mayer, 1983, Novitsky & MacSween, 1989, Mudryk & Podgórska, 2006b).

2.2. Grupe fiziologice de procariote și activitatea lor metabolică în sedimentele marine

În ceea ce privește ecologia microbiotei sedimentelor, trebuie precizat că parametrii diverșilor factori de mediu (lumină, oxigen, diferite substraturi organice și anorganice) suferă variații puternice pe verticală, putând apărea diferențe foarte mari la distanțe de ordinul milimetrilor. O deosebită importanță o reprezintă gradientii oxigenului. Astfel, în cadrul sedimentelor se poate distinge o zonă superioară, aerobă, o zonă de tranziție oxic-anoxică bine definită și zona anaerobă. Grosimea acestor zone variază în funcție de granulometria sedimentului, cantitatea de materie organică prezentă, prezența sau absența cianobacteriilor sau microalgelor, de turbiditatea apei, sau microtopografia suprafeței sedimentelor (care

poate fi modificată de dinamismul apei sau de animale; Brune et al., 2000, Kogure & Wada, 2005).

La interfața dintre apă și sedimente se întâlnesc cele mai mari densități bacteriene din întregul domeniu bental, datorită acumulării unor cantități mari de substanțe organice și gradului ridicat de oxigenare. Aici este sediul principal al activității degradative. Polizaharidele complexe (celuloza, lignina, chitina), oligozaharidele, lipidele și, mai ales, aminoacizii sunt resurse trofice pentru microbiota heterotrofă (Pora & Oros, 1974, Mudryk et al., 2005, Mudryk & Podgórska, 2006a). Majoritatea bacteriilor bentice au o versatilitate trofică redusă, fiind specializate pe un număr restrâns de substraturi organice (Khiyama & Makemson, 1973).

Zona anaerobă a sedimentelor se poate subdivide și ea în straturile superioare, cu potențial redox pozitiv și cele inferioare, cu potențial redox negativ. În straturile superioare, nitrații, ionul manganic (Mn^{4+}) și cel feric (Fe^{3+}) reprezintă principalii acceptori finali de electroni utilizați de către bacteriile anaerobe în procesele respiratorii. Compușii reduși ai acestor acceptori ajung apoi la interfața oxic-anoxică, unde alte bacterii îi reoxidează.

În straturile inferioare, reduse, sulfații și dioxidul de carbon reprezintă principalii acceptori finali de electroni utilizați în respirația anaerobă. Acidul sulfhidric și metanul produse de către bacteriile sulfat-reducătoare și metanogene sunt oxidate în straturile cu potențial redox pozitiv (Hansen & Blackburn, 1991, Brune et al., 2000).

Microbiota sedimentelor prezintă o mare importanță din punct de vedere ecologic. În primul rând, majoritatea acestor bacterii sunt implicate în descompunerea substanței organice rezultate prin depunerea de resturi vegetale și animale. Ele eliberează nutrienți care vor sta la baza lanțurilor trofice bentale și pelagice, jucând un rol important în productivitatea bazinelor marine și oceanice (Pora & Oros, 1974).

Microorganismele bentice produc modificări chimice esențiale pentru formarea și evoluția diferitelor tipuri de sedimente marine, mai ales prin precipitarea carbonatului de calciu și prin formarea humusului. Unele sunt implicate în geneza zăcămintelor de hidrocarburi și a depozitelor feromanganoase

În ansamblu, se poate spune că microbiota bentală menține echilibrul dinamic al chimismului sedimentelor marine și al maselor de apă învecinate (Pora & Oros, 1974).

2.3. Caracteristici morfo-structurale și taxonomice ale microbiotei sedimentelor marine litorale

Din punct de vedere al morfologiei, în sedimentele litorale se întâlnesc diferite tipuri de celule procariote: coci, cocobacili, bacili, vibrioni, celule filamentoase, discoidale etc. Există atât forme solitare cât și coloniale.

Există diverși factori care influențează distribuția grupelor morfologice bacteriene: hidrodinamismul, variațiile sezoniere, granulometria sedimentului, cantitatea de nutrienți, acțiunea selectivă a consumatorilor (Novitsky & MacSween, 1989, Šestanović et al., 2005, Šestanović et al., 2009). Formele coloniale (agregate sau filamentoase) sunt de regulă rare, întâlnite mai ales la cianobacterii sau la unele bacterii sulfat-reducătoare. În sedimentele apărate de hidrodinamism, pot apărea și biofilme (DeFlaun & Mayer, 1983, Novitsky & MacSween, 1989, Mudryk & Podgórska, 2006b).

Privind dimensiunile, predomină în nisipurile litorale procariotele de talie mică, cu un biovolum celular mediu în jurul a $0,1 \mu\text{m}^3$ (Kuwaie & Hosokawa, 1999, Mudryk & Podgórska, 2006b, Podgórska et al., 2008).

Marea majoritate a bacteriilor benthice sunt atașate de granulele de sediment, doar o mică parte trăind în apa interstițială (Khiyama & Makemson, 1973, Mudryk & Podgórska, 2006b). De aceea, ele prezintă structuri specifice pentru adeziunea la substrat – glicocalix, filamente polizaharidice sau alte mecanisme, încă puțin cunoscute (Weise & Rheinheimer, 1977, Moriarty & Hayward, 1982, Novitsky & MacSween, 1989, Mudryk & Podgórska, 2006b).

Referitor la repartiția bacteriilor marine în funcție de structura peretelui celular, s-a demonstrat că predomină net bacteriile Gram negative (70-90%; Khiyama & Makemson, 1973, Moriarty & Hayward, 1982).

Metodele genetice de investigare a populațiilor microbiene naturale au permis determinarea diversității taxonomice a microbiotei sedimentelor marine, și chiar identificarea unor taxoni noi pentru știință.

Referitor la distribuția diferitelor grupe taxonomice în sedimentele costiere, diverși autori au obținut date variate, în general predominând grupele de proteobacterii (*Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, *Deltaproteobacteria*), grupul taxonomic *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*, frecvente fiind și planctomicetele și bacteriile Gram pozitive (Llobet-Brossa et al., 1998, Gillan et al., 2005, Mușat et al., 2006, Tănase, 2009, Kunihiro et al., 2012). Arhebacteriile sunt relativ puțin numeroase (Tănase, 2009).

Capitolul 3. Potențialul de bioremediere al sedimentelor marine în cazul poluării cu uleiuri minerale sau vegetale

Bioremedierea reprezintă procesul de reconstrucție ecologică prin care microbiota naturală este utilizată pentru a reduce concentrația, într-un anumit mediu, sau toxicitatea unor poluanți, prin biodegradarea lor (Korda et al., 1997). Deși prezintă anumite limitări, bioremedierea rămâne o modalitate extrem de atractivă de reconstrucție ecologică, datorită costurilor sale scăzute (Doboș & Puia, 2010).

Una dintre cele mai frecvente și mai periculoase forme de poluare a ecosistemelor marine o constituie deversarea de produse petroliere. Petrolul și produsele derivate sunt amestecuri complexe conținând diferite tipuri de hidrocarburi: alcani, cicloalcani, alchene, hidrocarburi aromatice și poliaromatice, asfaltene, hidrocarburi sulfurate. Unele microorganisme posedă căi metabolice prin care astfel de compuși pot fi oxidați (de obicei aerob), de regulă cu formarea de acizi grași. În general, fiecare dintre speciile sau tulpinile de microorganisme hidrocarbon-oxidante este specializată strict pe un număr restrâns de hidrocarburi (Atlas, 1981, Korda et al., 1997, Harayama et al., 1999, Okoh, 2006, Das & Chandran, 2011).

Diverși factori de mediu pot influența modul în care decurge procesul de bioremediere: starea fizică a poluantului, solubilitatea acestuia, suprafața disponibilă pentru interacțiunea între acesta și microorganisme, concentrația sa, eventualele poluări anterioare (care favorizează microbiota hidrocarbon-degradativă), temperatura, nutrienții (azot, fosfor), oxigenul, salinitatea și presiunea hidrostatică (Atlas, 1981, Leahy & Colwell, 1990, Van Hamme et al., 2003, Okoh, 2006, Doboș & Puia, 2010, Hazen, 2010, Das & Chandran, 2011).

Pornind de la cunoașterea principiilor procesului și a factorilor favorizanți sau inhibitori, bioremedierea naturală poate fi dirijată de către om în sensul unei eficiențe superioare, prin biostimulare (adaosul de nutrienți în mediu) sau bioaugmentare (adaosul de organisme degradative). S-a demonstrat că biostimularea poate da rezultate foarte bune în diverse medii. Tehnicile de stimulare includ suplimentarea surselor de azot și fosfor, oxigenarea artificială (unde este cazul) și adăugarea de surfactanți (Atlas, 1981, Korda et al., 1997, Van Hamme et al., 2003, Doboș & Puia, 2010, Hazen, 2010).

Sedimentele marine litorale sunt unul dintre mediile cele mai des afectate de poluarea cu hidrocarburi, efectele acestora diferă în funcție de tipul de sediment (IPIECA, 2000)

Similare ca efecte cu acest tip de poluare sunt și contaminările cu mixturi lipidice de origine biologică (în special vegetală), din ce în ce mai frecvente odată cu utilizarea pe scară tot mai extinsă a acestor uleiuri în producția de biocombustibili și în alte ramuri industriale.

Uleiurile vegetale (mai ales cele de floarea-soarelui, rapiță, in, palmier) reprezintă una dintre cele mai frecvente surse de poluare în multe state ale lumii (Al-Darbi et al., 2005, Aluyor et al., 2009).

Uleiurile vegetale diferă mult în ceea ce privește compoziția lor și mai ales raportul între acizii grași saturați și nesaturați și lungimea catenelor acestora. Compoziția, alături de diverși factori de mediu, determină rata de biodegradare a acestora (Aluyor et al., 2009).

PARTEA A II-A. CONTRIBUȚII PERSONALE LA STUDIUL CANTITATIV ȘI CALITATIV AL MICROBIOTEI BENTICE LITORALE

Scopul și obiectivele lucrării

Prezenta lucrare are ca scop studierea, în termeni cantitativi și calitativi, a microbiotei sedimentelor nisipoase de pe litoralul românesc al Mării Negre pentru atingerea următoarelor obiective:

1. Determinarea caracteristicilor microbiotei bentice (densitate, biomasă, diversitate morfo-structurală) din sedimente nisipoase din diferite stații de-a lungul litoralului românesc.
2. Determinarea relației dintre granulația sedimentelor și caracteristicile microbiotei pe care o găzduiesc.
3. Studierea variațiilor sezoniere ale abundenței, biomasei și diversității morfo-structurale a bacteriilor bentice, în relație cu anumiți factori de mediu (concentrația pigmentilor clorofilieni – expresie a densității producătorilor primari, temperatura apei).
4. Determinarea densității estimative a unor grupe funcționale microbiene implicate în unele cicluri biogeochimice importante de la nivelul sedimentelor marine.
5. Studiul impactului poluării cu hidrocarburi asupra caracteristicilor cantitative și a diversității morfo-structurale a microbiotei bentice, prin experimente de tip microcosmos.
6. Evaluarea potențialului de bioremediere al microbiotei bentice în cazul contaminării cu amestecuri de hidrocarburi sau uleiuri lipidice, prin estimarea densității potențialilor degradatori.
7. Determinarea influenței adaosului de nutrienți azotați și fosfați asupra eficienței procesului de bioremediere prin experimente pe microcosmosuri de laborator.

Capitolul 4. Materiale și metode

4.1. Prelevarea și fixarea probelor

4.1.1. Determinarea caracteristicilor microbiotei din sedimente nisipoase de diferite granulații de pe litoralul românesc al Mării Negre

Probele, constând în carote de sediment, au fost prelevate din opt stații de-a lungul litoralului românesc, pe 24 septembrie 2010, de la circa 0,5 m adâncime. Stația I este localizată în Vama Veche, stația II în Mangalia, stația III în Neptun, stația IV în Costinești,

stația V în Eforie-Nord, stația VI în Constanța, stația VII în Mamaia și stația VIII pe plaja Vadu (fig. 1). De asemenea, au fost colectate mostre de nisip pentru studiile granulometrice.

Probele au fost prelevate utilizând carotiere improvizate, din fiecare carotă, cei 5 cm³ superficiali (corespunzând unei adâncimi de 17,5 mm) fiind preluați pentru analiză, suspendați în formalină tamponată (4% concentrație finală) și păstrați prin refrigerare la +4°C (Fry, 1990, Epstein et al., 1997, Luna et al., 2002).

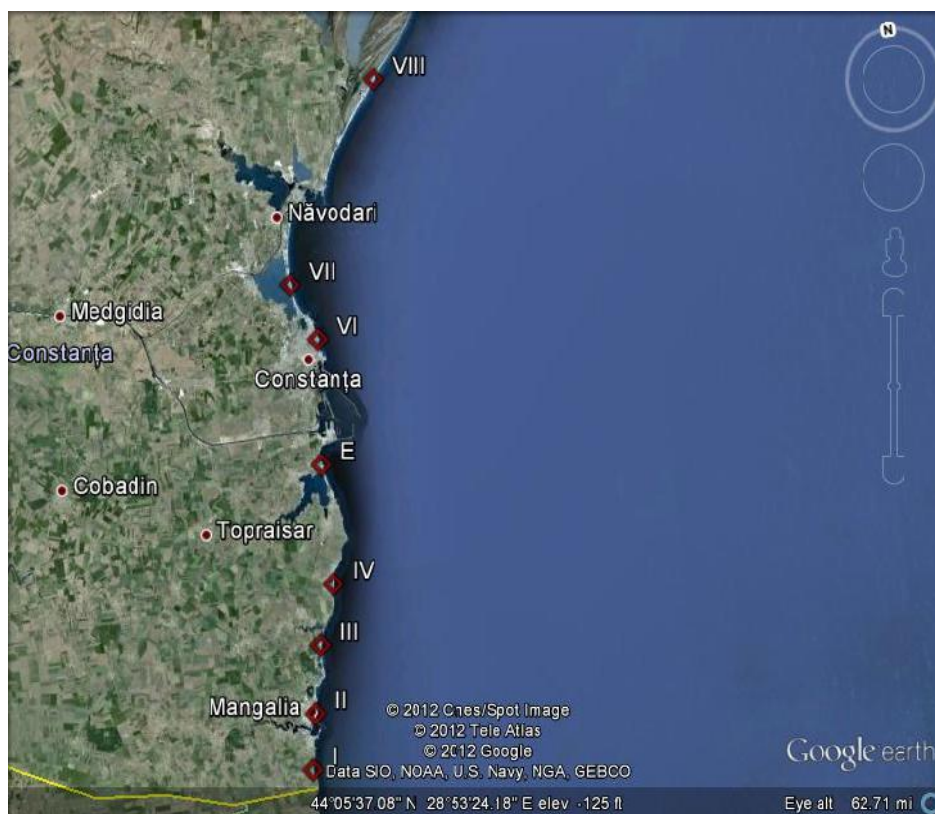


Fig.1. Localizarea stațiilor de prelevare a probelor (septembrie 2010; imagine Google Earth - <http://www.google.com/earth/index.html>).

4.1.2. Evoluția microbiotei bentice în microcosmosuri cu sedimente marine de diferite granulații

Nisipul marin pentru microcosmosuri a fost colectat de pe câteva plaje din Constanța, spălat cu Tween 80 (1 mg/L final), sterilizat la 105°C, sortat în funcție de dimensiunea granulelor, utilizând un dispozitiv granulometric Endecotts Minor și distribuit în patru recipiente de plastic de 1 L, astfel: microcosmosul A – granule cu diametrul de 0-200 μm, microcosmosul B – 200-400 μm, C – 400-800 μm, iar D – 800-1 000 μm. S-a adăugat apă de

mare, până la un volum total de circa 700 cm³, iar microcosmosurile au fost acoperite cu folie transparentă și păstrate la temperatura camerei, la iluminare naturală.

Probele au fost prelevate din două în două săptămâni (până la zece săptămâni), prelevarea, fixarea și stocarea lor efectuându-se la fel ca și la punctul anterior.

4.1.3. Determinarea variațiilor sezoniere ale caracteristicilor microbiotei benthice litorale

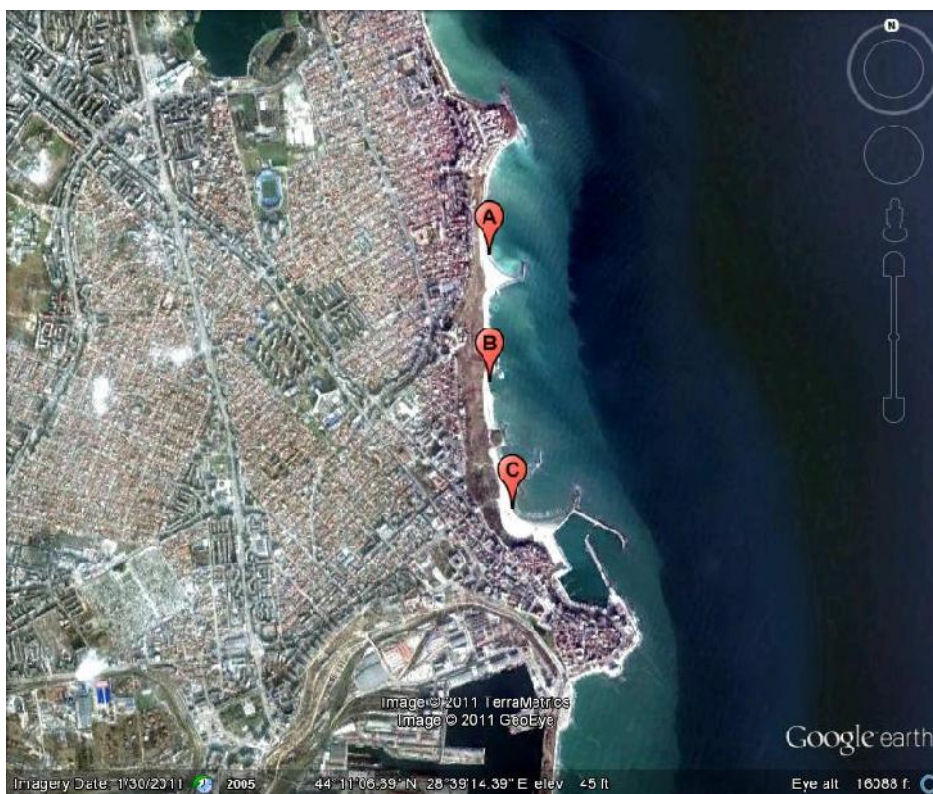


Fig. 2. Localizarea stațiilor de prelevare a probelor sezoniere (imagine Google Earth).

Probe constând în carote de sediment au fost prelevate lunar de pe trei plaje (din etajul mediolitoral) din orașul Constanța (notate drept Stațiile A, B și C; fig. 2), începând din aprilie 2011. Stațiile A și B, prezintă ambele sedimente grosiere, dar expuneri ușor diferite, iar stația C este într-un golf adăpostit și cu pantă lină, cu un sediment fin. Prelevarea, fixarea și stocarea probelor s-au efectuat la fel ca și la punctul anterior.

4.1.4. Determinarea variației sezoniere a concentrației pigmentilor clorofilieni din sediment

Lunar, odată cu prelevarea carotelor pentru analiza microbiologică, din stațiile A și C (vezi punctul 4.1.3) au fost prelevate carote separate pentru determinarea concentrației pigmentilor clorofilieni (începând din august 2011). Pentru analiză s-au utilizat cei 3 cm³ superficiali din fiecare carotă, stocați la -20°C (Roelfsema, 1999).

4.1.5. Estimarea densității unor grupe fiziologice microbiene din sedimentele litorale

Pentru experimentele vizând cultivarea și estimarea numărului microorganismelor din anumite grupe fiziologice specifice, inclusiv a celor capabile de degradarea hidrocarburilor sau a unor mixturi lipidice (vezi punctele 4.6 și 4.7.2), au fost utilizate ca inocul carote de sediment mediolitoral superficial, de câte 5 cm³ fiecare, prelevate la fel ca și cele de la punctul 4.1.1, dar nefixate, inocularea efectuându-se imediat după recoltare. Carotele au fost prelevate din stațiile A și C de la punctul 4.1.3.

4.2. Analiza granulometrică a sedimentelor

Probele de sediment au fost uscate și, ulterior, analizate utilizând un dispozitiv granulometric Endecotts Minor, cu site de 1 000, 800, 400, 200, 180, 125, 90 și 53 μm. A fost determinată masa fiecărei fracții, după care a fost calculată proporția procentuală.

4.3. Analiza microscopică

4.3.1. Dislocarea celulelor aderente pe granulele de sediment

Pentru dislocarea microorganismelor atașate de substrat, în vederea analizei microscopice suspensiile de sediment au fost diluate, incubate cu Tween 80 (1 mg/L final) timp de 15 minute și vortexate la 2 400 r.p.m. timp de 5 minute (protocol adaptat după Epstein & Rossel, 1995, Kuwae & Hosokawa, 1999, Bennett et al., 2006).

4.3.2. Cuantificarea directă a celulelor microbiene

Microorganismele au fost vizualizate prin microscopie de epifluorescență, utilizând SYBR Green I, un fluorocrom care dă o fluorescență verde puternică în urma legării de acizii nucleici, colorând atât celulele moarte, cât și pe cele vii (Noble & Fuhrman 1998).

Protocolul utilizat a fost adaptat după Noble & Fuhrman (1998). Suspensiile de sediment au fost diluate până la o densitate celulară optimă, incubate 15 minute cu SYBR Green I

(1:10 000 final), filtrate prin sucțiune pe membrane filtrante Millipore de 0,2 μm și examinate microscopic (la o mărire de 1 000 $\times$), utilizând și un micrometru ocular tip grilă.

Au fost numărate manual celulele fluorescente, excluzând particulele fluorescente anorganice și structurile evident eucariote (prin dimensiuni și morfologie) și a fost calculată densitatea celulară medie pentru fiecare probă.

4.3.3. Cuantificarea biomasei microbiene

Dimensiunile microorganismelor observate au fost măsurate cu ajutorul micrometrului și s-a calculat biovolumul fiecărei celule, forma unei celule fiind aproximată cu cea a unui cilindru cu capete emisferice (Fry, 1990).

Pentru a determina biomasa uscată pe baza biovolumului a fost utilizată formula de conversie a lui Loferer-Krößbacher et al. (1998).

4.3.4. Diferențierea bacteriilor Gram pozitive și Gram negative prin microscopie de epifluorescență

Iodura de hexidiu este un fluorocrom cu fluorescență roșu-oranj, care nu poate străbate pereții bacteriilor Gram-negative. Utilizând simultan SYBR Green I și iodură de hexidiu (10 mg/L, 15 minute incubare), celulele bacteriene apar colorate diferențiat (Mason et al., 1998, Forster et al., 2002).

Celulele au fost împărțite pe categorii morfo-structurale, în funcție de atât de caracterul Gram, cât și de morfologie (coci – celule sferice, bacili și forme filamentose – cele cu o lungime de peste cinci ori mai mare decât lățimea; Šestanović et al., 2005).

4.3.5. Diferențierea celulelor bacteriene în funcție de integritatea plasmalemei

Iodura de propidiu este un fluorocrom cu o fluorescență roșu-portocalie puternică, care pătrunde numai în celulele cu integritate membranară compromisă (celule moarte la data recoltării). Se poate utiliza împreună cu SYBR Green, pentru a distinge celulele cu plasmalema integră (cel mai probabil, celule viabile) de cele moarte (20 mg/L, incubare 15 minute; Grégori et al., 2001, Falcioni et al., 2006).

4.4. Cuantificarea pigmentilor clorofilieni din sedimente

Protocolul utilizat a fost preluat după Roelfsema (1999). Extracția pigmentilor s-a efectuat cu soluție de acetonă 90% și amestecul a fost centrifugat la 3 000 r.p.m. timp de 25 de minute.

Supernatantul a fost analizat prin spectrofotometrie, iar concentrația principalilor pigmenți clorofilieni (A, B, C) a fost determinată conform ecuațiilor tricromatice ale lui Jeffrey & Humphrey (1975, cit. de Namsaraev, 2009).

4.5. Determinarea corelațiilor între diferiți parametri

Pentru a determina existența unor corelații între diferitele caracteristici ale microbiotei analizate, precum și între acestea și factori de mediu, a fost calculat **coeficientul de corelație Pearson** (Dale, 1974, Paulson, 2008, Šestanović et al., 2009). Valorile apropiate de 1 sau -1 indică existența unei corelații semnificative, pozitive sau, respectiv, negative. Valorile apropiate de 0 indică o slabă corelare a celor două mărimi.

Pentru a verifica corelațiile între o caracteristică a microbiotei (densitate, biomasă) și un set de variabile independente a fost utilizată regresia multiplă (Dale, 1974, Paulson, 2008, Šestanović et al., 2009).

4.6. Estimarea densității unor grupe fiziologice microbiene din sedimentele litorale

Pentru a determina densitatea și distribuția unora dintre principalele grupe fiziologice microbiene au fost prelevate și utilizate ca surse de inoculare carote de sediment provenite de pe două plaje din Constanța, una cu nisip grosier și una cu sedimente fine (stațiile A și C de la punctul 4.1.3; prelevarea s-a realizat în aprilie-mai 2012).

Au fost avute în vedere microorganisme fixatoare de azot, amonificatoare, nitrificatoare și denitrificatoare, pentru ciclul azotului, precum și cele sulfat-reducătoare.

În cazul diazotrofelor aerobe s-a utilizat un mediu lichid de cultură lipsit de compuși cu azot, cu sucroză (Hanson & Gundersen, 1976, Zuberer & Silver, 1978, Tejera et al., 2005, Torpee, 2009) și clorură de trifeniltetrazoliu (TTC; 0,01%), ca indicator al activității metabolice microbiene (Kutty, 2009). Incubarea s-a realizat aerob, la temperatura camerei și lumină naturală.

Amonificatorii au fost cultivați pe mediu cu peptonă (incubare aerobă), utilizând reactivul Nessler ca indicator al prezenței amoniului (Gołaś et al., 2008).

Pentru microorganismele nitrificatoare (mai precis, pentru nitritbacterii, care oxidează aerob compușii amoniului) s-a utilizat un mediu de cultură cu sulfat de amoniu (incubare aerobă), înregistrându-se reacțiile negative cu reactivul Nessler (Burton & Prosser, 2001, Gołaś et al., 2008).

Pentru denitrificatori, s-a utilizat un mediu cu extract de vită, peptonă și KNO_3 (incubare anaerobă; Britton & Greeson, 1987). Ca indicator a fost utilizat albastrul de bromtimol (10 g/L; Saitoh et al., 2003)..

La sulfat-reducătoare, inocularea s-a făcut pe un mediu cu tioglicolat de sodiu (incubare anaerobă), observându-se depunerea sulfurilor (Hines & Buck, 1982, Chandrika et al., 1990).

În toate cazurile estimarea numărului acestor microorganisme s-a realizat printr-o metodă de tip Most Probable Number (MPN), utilizând software-ul gratuit MPN Calculator (<http://www.i2workout.com/mcuriale/mpn/index.html>).

4.7. Evaluarea potențialului de bioremediere al microbiotei bentice litorale

4.7.1. Efectul poluării cu hidrocarburi asupra microbiotei bentice litorale

Pentru a evalua impactul poluării cu hidrocarburi asupra microbiotei sedimentelor nisipoase marine, au fost efectuate experimente pe microcosmosuri similare celor de la punctul 4.1.2 (circa 500 cm³ de sediment în fiecare și acoperit un strat subțire de apă marină sterilă). Primul a servit drept martor, iar în celălalt s-a adăugat motorină (20 g/L), amestecându-se cu sedimentul. Microcosmosurile au fost păstrate la temperatura camerei, la lumină naturală.

Carote de sediment fost prelevate și fixate conform metodei prezentate la punctul 4.1.1, astfel: în microcosmosul martor – la data montării, la 8 și respectiv 14 zile, iar în microcosmosul contaminat – imediat înaintea deversării și din două în două zile, timp de două săptămâni.

Microorganismele au fost vizualizate prin microscopie de epifluorescență, utilizând SYBR Green și iodura de hexidiu, cuantificate și repartizate în clase morfo-structurale.

4.7.2. Estimarea densității microorganismelor capabile să degradeze hidrocarburi și uleiuri vegetale

În prezentul studiu au fost cuantificate microorganismele bentice care pot utiliza drept unică sursă de carbon hidrocarburile prezente în următoarele mixturi: eter de petrol

(conținând în principal compuși cu cinci sau șase atomi de carbon), benzină (hidrocarburi din gama C₄-C₁₂), motorină (C₁₀-C₁₅) și ceară de parafină (C₂₀-C₄₀).

În ceea ce privește uleiurile vegetale, au fost utilizate ca substraturi uleiul de floarea-soarelui, cel de măsline și cel de in.

Estimarea densității s-a realizat printr-o metoda MPN, utilizând mediul de cultură Bushnell-Haas (Horowitz & Atlas, 1977, Wrenn & Venosa, 1996, Ramsay et al., 2000, Kutty, 2009), suplimentat cu TTC (Kutty, 2009) și mixturile de hidrocarburi (0,5%, Walker & Colwell, 1976, Horowitz & Atlas, 1977, Adoki, 2007), respectiv uleiurile vegetale (1%, Al-Darbi et al., 2005). În cazul hidrocarburilor volatile (eter de petrol) sau a celor solide (ceară de parafină), s-a utilizat forma solidă a mediului Bushnell-Haas (cu agaroză 2%).

Ca sursă de inoculare au fost utilizate carote de sediment prelevate, în luna septembrie 2011, din stațiile A și C de la punctul 4.1.3.

4.7.3. Influența nutrienților asupra bioremedierii sedimentelor poluate cu hidrocarburi – experimente de tip microcosmos

Un factor important care favorizează remedierea naturală a ecosistemelor contaminate cu hidrocarburi îl reprezintă cantitatea de nutrienți. De aceea, aditia de azotați și fosfați este o metodă frecvent utilizată pentru stimularea procesului.

În acest studiu, au fost utilizate microcosmosuri concepute în mod similar celor de la punctul 4.7.1. (500 cm³ nisip, acoperit cu un strat de 100 cm³ apă de mare sterilă). În fiecare microcosmos s-a amestecat în sediment motorină (20 g/L). Microcosmosurile au fost păstrate la temperatura camerei, la iluminare naturală.

Microcosmosul numărul 1 a servit drept martor, celorlalte fiindu-le adăugate concentrații diferite de nutrienți anorganici (menținându-se un raport constant între azotat și fosfat; Heitkamp & Cerniglia, 1989, Röling et al., 2002), după cum urmează: microcosmosul 2 – 5 mg/L NH₄NO₃ și 0,5 mg/L KH₂PO₄; microcosmosul 3 – 25 mg/L NH₄NO₃ și 2,5 mg/L KH₂PO₄; microcosmosul 4: 50 mg/L NH₄NO₃ și 5 mg/L KH₂PO₄; microcosmosul 5 – 100 mg/L NH₄NO₃ și 10 mg/L KH₂PO₄; microcosmosul 6 – 200 mg/L NH₄NO₃ și 20 mg/L KH₂PO₄.

Evoluția procesului de bioremediere a fost urmărită prin prelevarea, la fiecare șapte zile, de sediment superficial (carote de 3 cm³) și determinarea concentrației de hidrocarburi totale (TPH), prin metoda lui Nwaogu et al., 2008 (uscarea la 50°C, extracție, evaporarea solventului la 50°C în vase precântărite, cântărirea reziduului), folosind, însă, drept solvent, cloroformul

(Kalédienè et al., 2003, Ezekiel et al., 2011). S-a calculat cantitatea de hidrocarburi per gram de sediment uscat, exprimată în părți per milion (ppm).

De asemenea, au fost cuantificate microorgansimele hidrocarbon-oxidante din fiecare microcosmos (după 35 de zile de la începerea experimentului), conform metodei prezentate la punctul 4.7.2. Microorganismele izolate astfel au fost cercetate și prin microscopie de epifluorescență (cu SYBR Green și iodură de hexidiu).

Capitolul 5. Rezultate și discuții

5.1. Caracteristicile microbiotei din sedimente nisipoase de diferite granulații de pe litoralul românesc al Mării Negre

5.1.1. Granulometria sedimentelor

Sedimentul prelevat din stațiile I, III și IV este cel mai grosier, la polul opus aflându-se stațiile VIII și, mai ales, II (fig. 3).

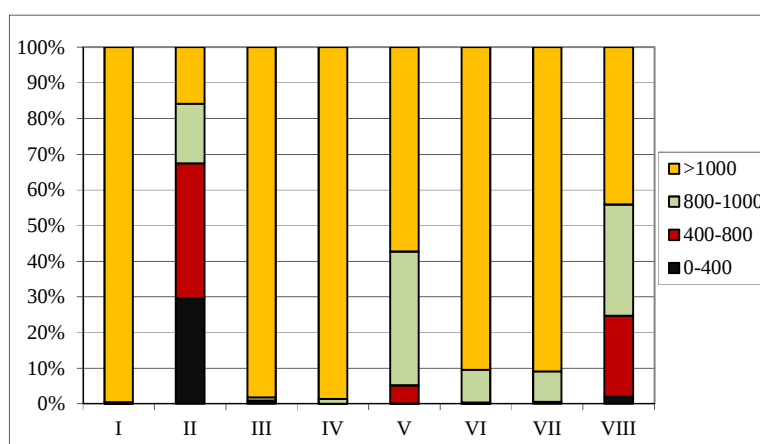


Fig. 3. Proporția diferitelor fracții ale sedimentelor prelevate de-a lungul litoralului românesc (μm).

5.1.2. Densitatea și biomasa populațiilor microbiene

Între cele opt stații densitatea microbiană a variat între $4,62-9,64 \times 10^7$ celule/ cm^3 sediment, cu o medie de $7,15 \times 10^7$ celule/ cm^3 (fig. 4).

Aceste valori se încadrează în limitele de variație ale densității microbiotei sedimentelor litorale (circa 10^6-10^9 celule per cm^3), comparabile celor obținute de diverși autori în sedimente litorale din diverse părți ale lumii (Montagna, 1982, Novitsky & MacSween, 1989, Danovaro et al., 1994, Epstein et al., 1997, Torrèton et al., 1997, Hymel & Plante, 1998, Kuwae & Hosokawa, 1999, Dietrich & Arndt, 2000, Proctor & Souza, 2001, Lucas et al., 2003, Lunau et al., 2005, Pusceddu et al., 2005, Šestanović et al., 2005, Ferrara-Guerrero et

al., 2007, Hewson et al., 2007, Røberg et al., 2007, Podgórska et al., 2008, Šestanović et al., 2009).

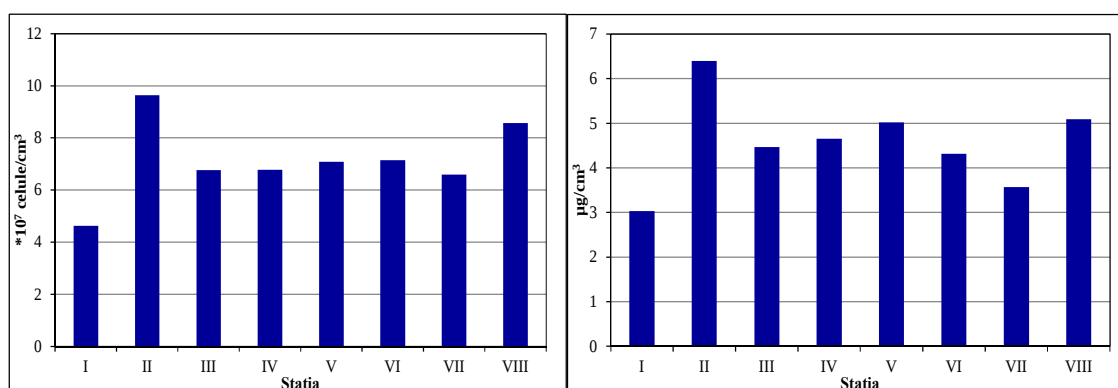


Fig. 4. Abundența și biomasa microbiană uscată per cm³ sediment în fiecare stație.

Se observă o tendință de corelare a negativă a densității bacteriene cu granulația sedimentului, fapt semnalat de numeroși autori (Novitsky & MacSween, 1989, Kuwae & Hosokawa, 1999). Acest lucru se datorează suprafeței mai mari disponibile și cantității mai ridicate de materie organică din sedimentele fine. Totuși, corelația nu este absolută și nici proporțională, ceea ce sugerează existența și a altor factori de mediu care determină distribuția microorganismelor.

Biomasa a prezentat variații semnificative de la o stație la alta (fig. 4), între 3,03 și 6,39 µg/cm³ sediment, urmând, în general, variațiile abundenței. Raportat la densitatea celulară, aceste rezultate sunt similare celor obținute de Danovaro et al. (1994), Luna et al. (2002), Pusceddu et al. (2005), Šestanović et al. (2005) sau Ferrara-Guerrero et al. (2007).

Biovolumul celular mediu a fost de 0,12 µm³ (0,10-0,13 µm³), valori similare celor determinate de Kuwae & Hosokawa (1999) sau Mudryk & Podgórska (2006b).

5.1.3. Distribuția principalelor grupuri morfologice microbiene

Bacilii (incluzând cocobacilii și puținii vibrioni) au constituit majoritatea celulelor bacteriene observate (58-65%; fig. 5). Proporția a fost diferită în cele opt stații, tendința fiind aceea de sporire a numărului lor odată cu scăderea granulației. Formele filamentoase au fost rare, la fel și cele coloniale (în concordanță cu observațiile făcute de Novitsky & MacSween, 1989). Trebuie menționat că studii de microscopie electronică efectuate pe sedimente litorale au demonstrat existența unor bacterii discoidale, a căror formă nu poate fi înregistrată corect prin microscopia de epifluorescență (Mudryk & Podgórska, 2006b).

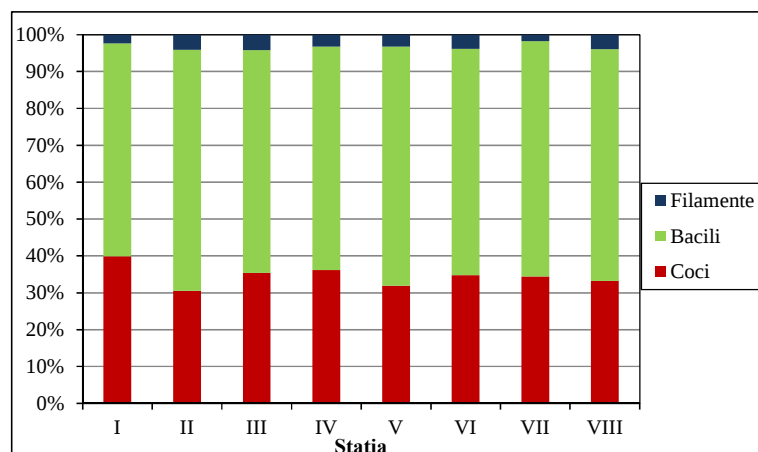


Fig. 5. Proporția procentuală a principalelor grupe morfologice bacteriene.

5.1.4. Integritatea membranară a celulelor microbiene

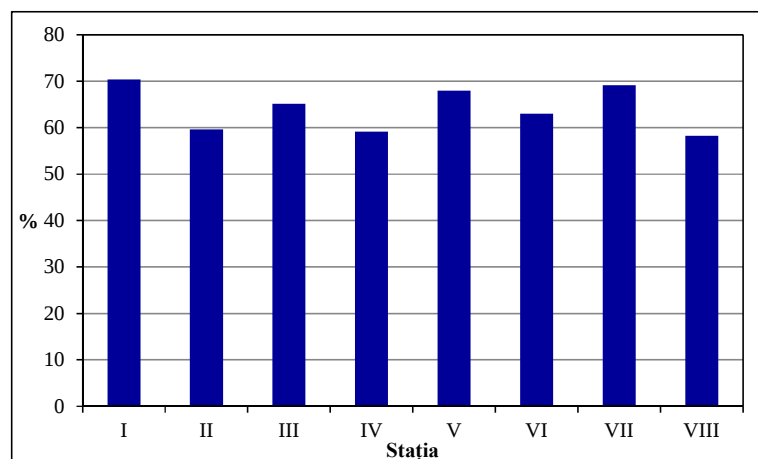


Fig. 6. Proporția procentuală a bacteriilor cu plasmalemă integă (IP-negative).

58-70% dintre microorganismele cuantificate au dat o reacție negativă cu iodura de propidiu (IP), având, deci, membrane celulare intacte. În general, sedimentele mai fine au prezentat un procent mai mic de celule viabile, în timp ce valorile cele mai ridicate au fost determinate în stația I (cu cea mai mare granulație; fig. 6).

Aceste procentaje sunt mult mai ridicate decât cele determinate, de exemplu, de Luna et al. (2002), în sedimente măloase și nisipuri fine, ceea ce susține ideea că există o corelație negativă între granulometria sedimentului și proporția bacteriilor viabile.

5.2. Evoluția microbiotei bentice în microcosmosuri cu sedimente marine de diferite granulații

După primele două săptămâni densitatea celulelor bacteriene a atins valori de $7,7-22,5 \times 10^7$ celule/cm³ sediment (fig. 7). Aceste valori sunt similare celor determinate în probe naturale de sediment (vezi punctele 5.1.2., 5.2.1.). Așadar, colonizarea sedimentelor sterile de către microorganisme poate fi foarte rapidă (în condițiile lipsei hidrodinamismului și a variațiilor termice). Creșterea încetinește ulterior, apărând o tendință de stabilizare a densității microbiotei.

Biovolumul celular mediu s-a situat între $0,069-0,1 \mu\text{m}^3$. Majoritatea celulelor observate au fost bacili și cocobacili, cocii reprezentând cel mult o treime din total în toate probele analizate, iar formele filamentoase fiind în număr foarte redus.

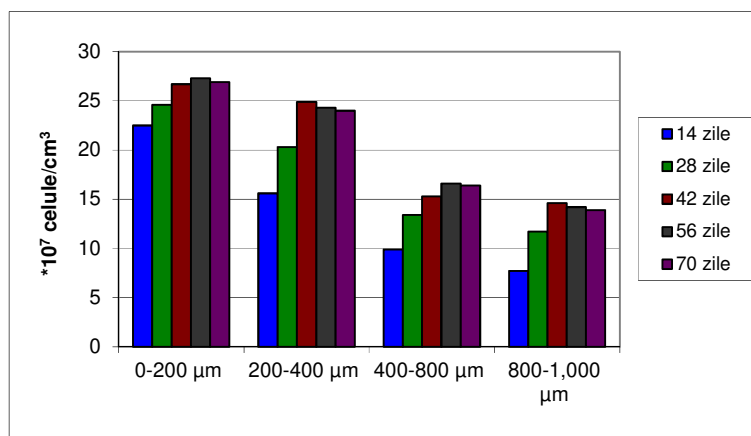


Fig. 7. Evoluția în timp a densității microbiene în fiecare microcosmos.

Se observă existența unei corelații între densitatea microbiană și caracteristicile granulometrice ale sedimentului. Existența acestei corelații și modul în care se manifestă ea constituie subiectul unor opinii divergente în literatura de specialitate, mergând de la o relație aproape invers proporțională între abundența bacteriană și diametrul sau suprafața granulelor de sediment (Dale, 1974, DeFlaun & Mayer, 1983) și până la absența oricărei relații predictibile, alți factori (temperatură, bacteriovori) fiind determinanți (Cammen, 1982).

În cazul prezentului experiment, în condiții de mediu controlate (temperaturi constante, absența hidrodinamismului), se observă o corelație negativă evidentă (coeficientul de corelație Pearson mediu este de -0,97), dar neproporțională (un motiv posibil ar fi forma granulelor de nisip; în realitate aceasta este variabilă, iar suprafața nu poate fi calculată în funcție de diametru). Cea mai apropiată ecuație de regresie (cu un coeficient de determinare de numai 76%) ar fi următoarea:

$$A = 26,75 - 0,017 \times \phi$$

unde A = abundența microbiană ($\times 10^7$ celule/cm³), iar ϕ = diametrul mediu al particulelor de sediment (μm)

În ceea ce privește dimensiunile medii ale celulelor, ele variază independent de granulometrie (coeficient Pearson de -0,18).

5.3. Variații sezoniere ale caracteristicilor microbiotei bentice litorale

5.3.1. Densitate celulară și biomasă

Densitatea microbiană înregistrată a variat între $4,32$ - $12,64 \times 10^7$ celule/cm³ sediment (fig. 8), densități de asemenea comparabile celor din literatura de specialitate.

Densitățile cele mai ridicate au fost constatate în lunile calde ale anului (mai-octombrie), iar cele minime iarna, mai ales în luna februarie 2012 (cu o perioadă de îngheț).

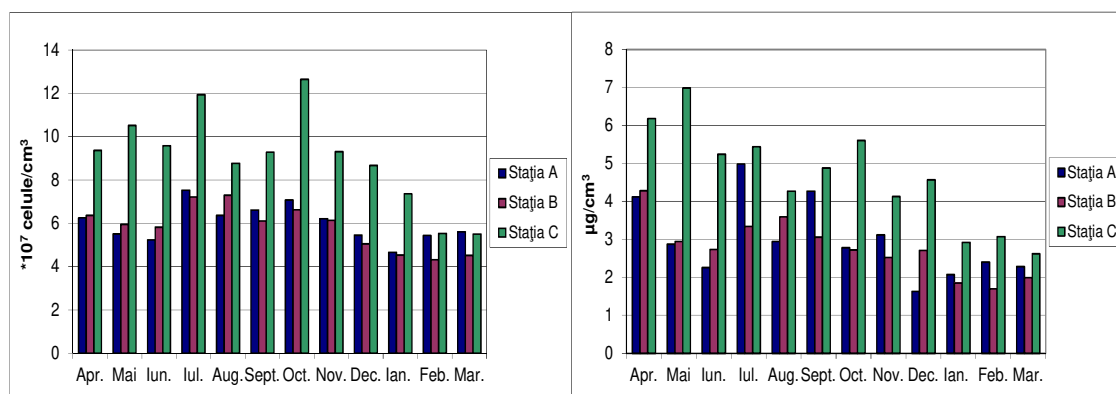


Fig. 8. Evoluția densității și biomasei uscate microbiene în fiecare stație (perioada aprilie 2011-martie 2012).

Dacă stațiile A și B sunt similare din acest punct de vedere, stația C prezintă densități microbiene mult mai ridicate (datorită diferențelor de granulometrie și hidrodinamism; Novitsky & MacSween, 1989).

Biomasa a prezentat variații semnificative de la o stație la alta și de la o lună la alta (fig. 8), între $1,63$ și $6,99 \mu\text{g/cm}^3$ sediment.

Biovolumul celular mediu a fost de $0,096 \mu\text{m}^3$, limitele de variație fiind de $0,07$ - $0,14 \mu\text{m}^3$, pentru fiecare probă. Variațiile sale nu urmează un model și nu se corelează cu alte mărimi determinate în prezentul studiu.

În general, există doi factori care reglează biovolumul mediu al bacteriilor: cantitatea de nutrienți organici disponibilă (care favorizează creșterea în dimensiuni a microorganismelor)

și activitatea protistelor bacteriovore (care fie bacteriile de talie foarte redusă, fie pe cele de talie mare, mai puțin accesibile bacteriovorilor). Efectele acestor factori variază în funcție de tipul de mediu. Dacă în mediul planctonic, unii autori au observat o ciclicitate sezonieră a biovolumului mediu, cu valorile maxime în lunile calde, Šestanović et al. (2005, 2009) au semnalat, în nisipuri fine infralitorale, o ciclicitate inversă, cu biovolumele maxime iarna.

5.3.2. Distribuția principalelor grupuri morfo-structurale bacteriene

Bacteriile observate au fost clasificate în funcție de caracterul Gram (caracter cu valoare taxonomică dat de structura peretelui celular) și morfologie (fig. 9).

Majoritatea celulelor cuantificate au fost Gram negative (70-86%), ceea ce concordă cu datele din literatura de specialitate (Khiyama & Makemson, 1973, Moriarty & Hayward, 1982). Proporția bacteriilor Gram pozitive a fost semnificativ mai mare în sedimentele mai grosiere (stațiile A și B) față de cele fine și în lunile reci ale anului față de cele calde.

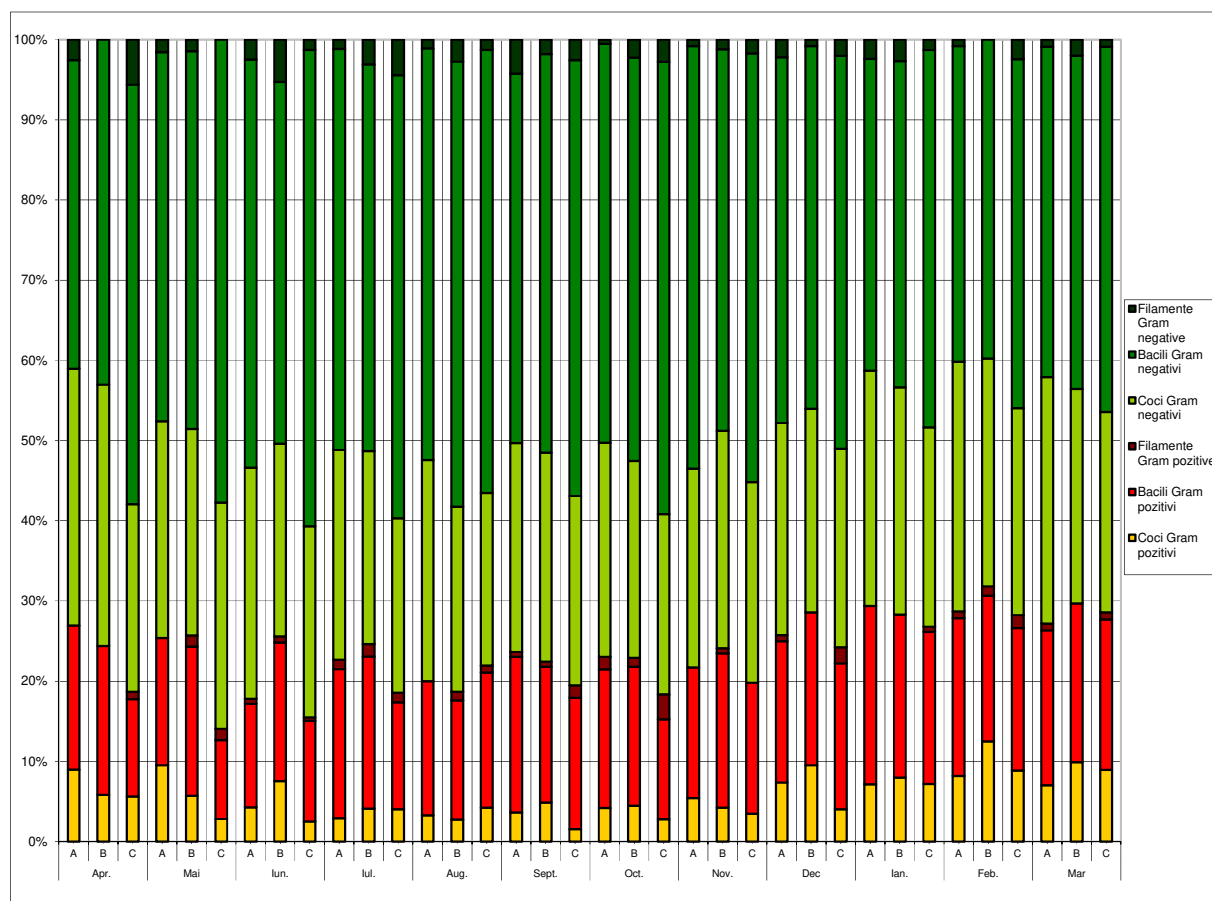


Fig. 9. Proporția procentuală a principalelor grupe morfo-structurale bacteriene în fiecare stație (aprilie 2011-martie 2012).

Din punct de vedere al morfologiei, predominanți au fost bacili (56-72%). Proportia cocilor este mai ridicată în sedimentele mai groasere și în perioadele reci, contrar observațiilor efectuate de alți autori (Novitsky & MacSween, 1989, Šestanović et al., 2005, Šestanović et al., 2009). Formele filamentoză au fost relativ rare în toate probele studiate.

5.3.3. Evoluția sezonieră a concentrației pigmentilor clorofilieni în sedimentele litorale

Între stațiile A și C au existat diferențe foarte mari în ceea ce privește concentrația clorofilelor. În perioada studiului (august 2011-iulie 2012) cantitatea totală de clorofile a variat între 0,11-0,41 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ sediment, în stația A, și 0,15-2,64 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, în stația C, cu valorile maxime în lunile de toamnă, iar minimele ulterior perioadei de îngheț (februarie-martie 2012).

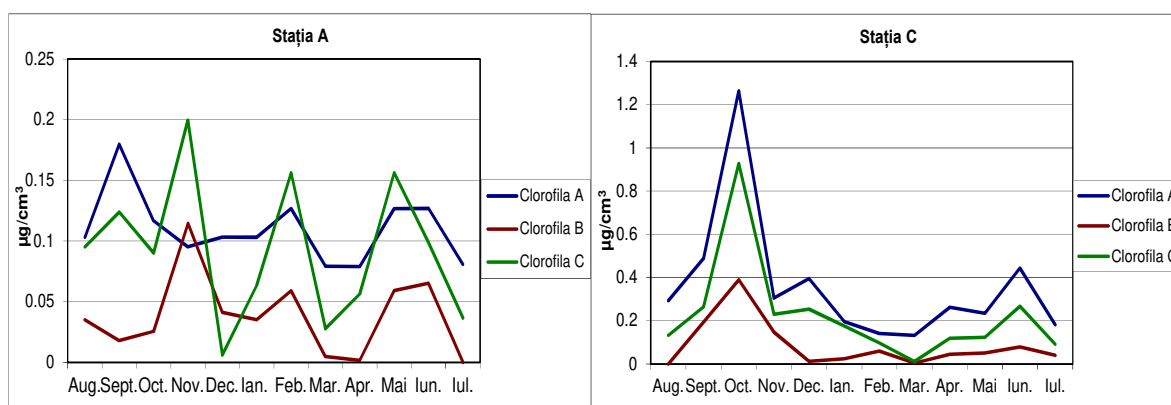


Fig. 10. Concentrația pigmentilor clorofilieni (stațiile A și C, august 2011-iulie 2012).

Distribuția diferitelor tipuri de clorofilă este prezentată în fig. 10. Clorofila A este comună tuturor organismelor fotosintetizante oxigenice, clorofila B este specifică algelor verzi și plantelor superioare, iar clorofila C mai multor grupuri de alge, dintre care cele mai importante în acest context sunt diatomeele. Cantitatea de pigmenți asimilatori este un indiciu al productivității primare din sedimente și al cantității de materie organică disponibilă; ea provine atât de la microfitobentos, cât și din depunerea planctonului sau descompunerea macroalgelor. În cazul prezentului studiu, clorofilele A și C sunt predominante, iar concentrațiile lor sunt relativ corelate, confirmând rolul principal al diatomeelor în producția primară din sedimentele litorale (García-Robledo et al., 2010).

5.3.4. Corelații între caracteristicile microbiotei și condițiile de mediu

Tabelul 1 prezintă valorile coeficientului Pearson pentru diferite perechi de mărimi determinate.

Abundența și biomasa microorganismelor au prezentat corelații pozitive semnificative cu temperatura apei și cu concentrația clorofilelor. Așadar, dezvoltarea microorganismelor este favorizată în perioadele mai calde ale anului și în cele cu o dezvoltare accentuată a microfitobentosului și, în principal, a diatomeelor. Dimensiunile medii ale celulelor se corelează, însă, foarte slab cu temperatura și practic deloc cu alte caracteristici ale microbiotei și ale mediului studiate.

Tabel 1. Matricea de corelație Pearson pentru mărimile studiate: A = abundența microbiană, V cel. = biovolumul celular mediu, B = biomasa microbiană, % coci = procentul bacteriilor sferice, % Gram+ = procentul bacteriilor Gram pozitive, Chl A/B/C = concentrația clorofilei A/B/C, Total Chl = concentrația totală a clorofilelor, Temp. = temperatura apei la recoltare (cf. <http://www.meteoconstanta.ro>).

	A	V cel.	B	% coci	% Gram+	Chl A	Chl B	Chl C	Total Chl	Temp.
A	1,00	0,25	0,79	-0,74	-0,70	0,64	0,39	0,61	0,61	0,71
V cel.		1,00	0,76	0,06	-0,22	0,29	-0,09	0,09	0,15	0,35
B			1,00	-0,42	-0,61	0,77	0,38	0,69	0,70	0,76
% coci				1,00	0,73	-0,50	-0,37	-0,44	-0,49	-0,86
% Gram+					1,00	-0,40	-0,49	-0,50	-0,52	-0,84
Chl A						1,00	0,54	0,72	0,80	0,27
Chl B							1,00	0,83	0,88	0,05
Chl C								1,00	0,98	0,13
Total Chl									1,00	0,16
Temp.										1,00

Condițiile de mediu nefavorabile (temperaturi scăzute, producție primară scăzută) par să favorizeze bacteriile Gram pozitive pe cele cu forme sferice (atât sezonier cât și între stații cu granulometrie diferită). În ceea ce privește bacteriile Gram pozitive, explicația este legată, probabil, de capacitatea de a genera forme de rezistență de tipul endosporilor. În cazul

cocilor, este vorba, cel mai probabil, de dimensiuni. Cea mai mare parte a cocilor observați au avut diametre de circa 0,25 micrometri. Aparent, în condițiile lipsei de nutrienți, bacteriile pot lua forme criptobiotice, cu dimensiuni foarte reduse (Velimirov, 2001).

Relațiile strânse între microbiota sedimentelor și microfitobentos, în termeni cantitativi și ai diversității, au fost constatate și de alți autori, precum Šestanović et al. (2009) sau Kunihiro et al. (2012), între cele două existând schimburi permanente de compuși nutritivi organici și anorganici. Gonzalez-Acosta et al. (2006) au constatat o corelație pozitivă ($R = 0,6$) între temperatura apei și densitatea bacteriilor heterotrofe cultivabile în sedimente tropicale.

Evoluția concentrației clorofilelor, în perioada studiată, nu se corelează cu temperaturile apei, urmând un ciclu sezonier propriu, cu valori maxime în lunile de toamnă.

Rezultatele arată că variațiile abundenței și biomasei microbiotei bentice pot fi puse în mare parte pe seama variațiilor temperaturii și densității producătorilor primari, cei doi factori având ponderi apropiate.

5.4. Estimarea densității unor grupe fiziologice microbiene din sedimentele litorale

Tabelul 2 prezintă numărul estimativ al microorganismelor din fiecare grupă studiată per cm^3 de sediment.

Tabel 2. Numărul estimativ de microorganisme cultivabile ($\times 10^3$) per cm^3 de sediment din fiecare grup fiziologic studiat, în cele două stații.

Grup fiziologic	Stația A	Stația C
Fixatoare de azot	3,7	11
Amonificatoare	5,3	16
Nitrificatoare	3,7	8
Denitrificatoare	4,4	8,8
Sulfat-reducătoare	3,5	170

În cazul fixatoarelor de azot, metoda utilizată permite cuantificarea exclusiv a microorganismelor aerobe sau care tolerează oxigenul. Cele mai comune sunt speciile genurilor *Azotobacter* și *Azospirillum*, și uneori *Campylobacter*, *Beggiatoa*, unele cianobacterii etc. (Capone, 1988, Herbert, 1999), toate fiind Gram negative și, de regulă, baciliforme, grup morfo-structural net predominant în probele analizate (cu o medie de peste 67% pentru cele două stații).

În diverse tipuri de sedimente marine, diferiți autori au quantificat densități variate ale bacteriilor fixatoare de azot (aerobe și anaerobe), de la sub 10^2 până la peste 10^4 bacterii/g (Hanson & Gundersen, 1976, Zuberer & Silver, 1978, Kannan, 2004).

Microorganismele amonificatoare cultivabile au reprezentat sub 0,02% din totalul bacteriilor quantificabile direct. În general, abundența acestor bacterii variază de la un tip de sediment la altul, în funcție de cantitatea de azot organic disponibilă (Herbert, 1999): de la sub 10^3 la peste 10^6 bacterii/g (Podgórska & Mudryk, 2007, Kannan, 2004, Brambilla, 2006).

Microorganismele amonificatoare joacă un rol important în circuitul azotului în ecosistemele marine, convertind compușii organici azotați în săruri de amoniu, mai ușor accesibile producătorilor primari. Printre cele mai comuni taxoni microbieni implicați se regăsesc specii ale genurilor *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Serratia* (Gram-negative), *Bacillus*, *Clostridium*, numeroase actinomicete (Gram-pozitive), precum și unii fungi (Herbert, 1999). Analiza microscopică a bacteriilor dezvoltate pe mediul pentru amonificatoare a arătat o predominanță netă a bacteriilor Gram pozitive (baciliforme și filamentose).

Bacteriile nitrificatoare (capabile de oxidarea amoniului – nitritbacterii) au prezentat densități de ordinul a $10^3/\text{cm}^3$ și o proporție relativ similară în cadrul microbiotei totale în ambele stații studiate. În funcție de condițiile locale, abundența acestor bacterii poate varia între 10^1 și 10^6 bacterii/g (Henriksen & Kemp, 1988, Isnansetyo et al., 2011).

Oxidarea amoniului funcționează în principal drept cale de eliminare a azotului din mediu. Nitrații produși sunt utilizați de bacteriile denitrificatoare, care îi convertesc în produși volatili. Printre principalii factori care influențează nitrificarea se află gradul de oxigenare al sedimentelor, cantitatea de hidrogen sulfurat și competiția cu alte organisme pentru cantitatea de amoniu disponibilă (Herbert, 1999).

Marea majoritate a microorganismelor nitrificatoare cunoscute sunt bacterii Gram-negative, la fel ca și peste 64% dintre cele cultivate și observate în prezentul studiu. Cele mai comune genuri sunt *Nitrosomonas*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosococcus* etc. (Henriksen & Kemp, 1988, Herbert, 1999). De multe ori, bacteriile nitrificatoare formează consorții cu heterotrofe Gram pozitive (Achuthan et al., 2006), ceea ce explică numărul relativ ridicat al acestui tip de bacterii, observat în imaginile microscopice.

Microorganismele denitrificatoare au prezentat densități similare și o proporție similară în cele două stații. Pentru comparație, diverși autori au determinat 10^1 - 10^6 denitrificatori/g, în diverse tipuri de sedimente marine (Heitzer & Ottow, 1976, Sugahara et al., 1988, Shieh & Yang, 1997, Kannan, 2004).

Cele mai răspândite bacterii denitrificatoare aparțin genului *Pseudomonas*, dar există și specii denitrificatoare de *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Hyphomicrobium* (Gram-negative), *Bacillus*, *Streptomyces* (Gram-pozitive; Takeuchi, 2005, Rezaee et al., 2010). Majoritatea bacteriilor observate în acest experiment au fost Gram pozitive, baciliforme sau filamentoase.

Concluzionând, microorgansimele implicate în toate fazele ciclului biochimic al azotului sunt prezente în sedimentele litorale. Pe primul loc ca densitate sunt cele amonificatoare, mai ales în nisipurile fine. Totuși, de regulă, raportul între bacteriile amonificatoare și alte grupe implicate în acest ciclu este mult mai mare (de exemplu, la Kannan, 2004, sau Podgórska & Mudryk, 2007). Acest fapt pare a indica fie o posibilă dependență a microbiotei sedimentelor studiate de activitatea amonificatoare din coloana de apă, în ceea ce privește sursa de amoniu, fie circulația preferențială a azotului sub forma altor compuși ușor metabolizabili, cum ar fi ureea și acidul uric (Herbert, 1999, Podgórska & Mudryk, 2007).

Privind numărul estimativ al bacteriilor sulfat-reducătoare cultivabile, au existat diferențe mari între cele două stații. Dacă în stația A, raportate la densitatea totală, ele ar reprezenta sub 0,006%, în stația C, proporția lor atinge 0,17%. În general, aceste bacterii ating densități de 10^2 - 10^6 bacterii/cm³ în sedimentele litorale (Hines & Buck, 1982, Chandrika et al., 1990, Bussmann & Reichardt, 1991, Phuong et al., 2006).

Majoritatea sulfat-reducătorilor cunoscuți aparțin grupului taxonomic Deltaproteobacteria (Gram-negative), cele mai frecvente în sedimentele marine fiind genurile *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, (baciliforme sau vibrioide) și *Desulfococcus* (în general sferice). *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus* și alte câteva genuri înrudite cuprind sulfat-reducătoare Gram-pozitive, baciliforme, și ele frecvente în sedimentele marine (Bussmann & Reichardt, 1991, Castro et al., 2000, Phuong et al., 2006). În cadrul prezentului experiment, majoritatea bacteriilor observate (59%) au fost Gram negative și baciliforme, urmate de bacilii Gram pozitivi și cocii Gram negativi.

5.5. Potențialul de bioremediere al microbiotei benthice litorale

5.5.1. Efectul poluării cu hidrocarburi asupra microbiotei benthice litorale

Dacă în microcosmosul martor densitatea și structura microbiotei benthice au rămas relativ constante pe parcursul experimentului, adăția de motorină a avut efecte semnificative asupra microorganismelor din celălalt microcosmos. În primul rând, se observă o scădere majoră a abundenței bacteriene în primele patru zile de la contaminare (cu circa 28%; fig. 11).

Microbiota și-a revenit treptat, la sfârșitul celor două săptămâni înregistrându-se densități apropiate de cele inițiale. Structura microbiotei din microcosmosul poluat a suferit și ea modificări, în principal prin sporirea semnificativă numărului bacteriilor Gram pozitive baciliforme (fig. 12; a se vedea și punctul 5.5.3).

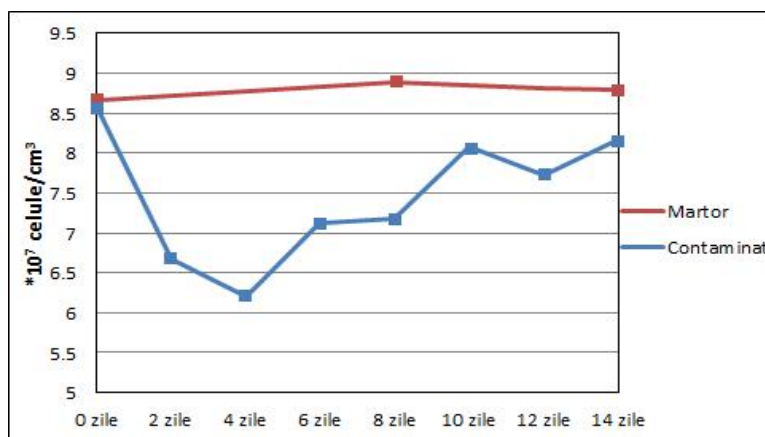


Fig. 11. Evoluția densității populației microbiene în cele două microcosmosuri.

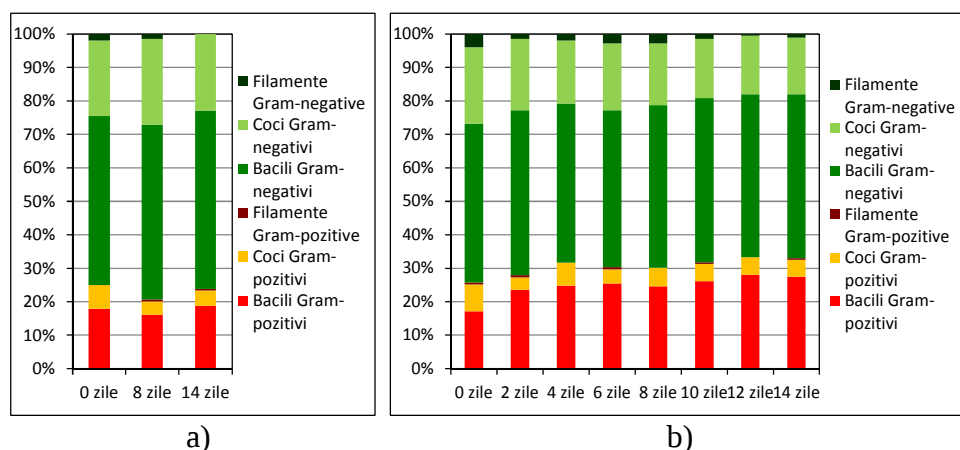


Fig. 12. Evoluția proporției procentuale a diferitelor grupe morfo-structurale bacteriene: a) microcosmos martor; b) microcosmos contaminat.

Diverși autori, studiind impactul pe termen scurt al poluării cu hidrocarburi asupra microbiotei din diverse medii, au observat scăderi masive ale densității celulare în primele zile, ca urmare a acțiunii toxice a contaminanților, urmate de reveniri la valorile normale, în urma selectării microorganismelor hidrocarbon-tolerante, de regulă după intervale de 2-3 săptămâni (Delille & Vaillant, 1990, Delille & Delille, 2000, Akpoveta et al., 2011). Contaminarea cu produse petroliere afectează, evident, și compoziția taxonomică a microbiotei (Røberg et al., 2011). Amplora acestor modificări poate varia, de la variații

ne semnificative până la unele majore, în principal în funcție de concentrația poluantului (Alexander & Schwarz, 1980, Carman et al., 1996, Akpoveta et al., 2011).

5.5.2. Densitatea microorganismelor capabile să degradeze hidrocarburi și uleiuri vegetale

Până la 0,01% din totalul microorganismelor din sedimentele studiate pot utiliza hidrocarburi drept unică sursă de carbon, iar 0,002-0,025% pot face acest lucru cu uleiuri vegetale (este vorba strict de microorganisme cultivabile; tabelul 3). În stația A predomină net microorganismele ce oxidează hidrocarburi ușoare (benzina: C_4-C_{12}), în timp ce în stația C, cu sediment fin, sunt mai frecvenți degradatorii de hidrocarburi superioare ($C_{10}-C_{40}$).

Aceste densități sunt similare celor determinate de alți autori în sedimente litorale necontaminate din diverse părți ale lumii: 10^1-10^5 MPN/g (Walker & Colwell, 1976, Roubal & Atlas, 1977, Higashihara et al., 1978, Venkateswaran et al., 1991, Delille & Delille, 2000, Ramsay et al., 2000, Swannell et al., 2000, Braddock et al., 2004, Røberg et al., 2007, Chikere et al., 2009).

În ceea ce privește uleiurile vegetale, uleiul de măsline a fost utilizat ca substrat de cel mai mare număr de microorganisme. Un număr redus de organisme s-au dezvoltat pe mediu cu ulei de in, deși există cercetări care arată că acesta ar fi mai ușor degradabil decât cel de floarea-soarelui, de exemplu (Pereira et al., 1998, cit. de Al-Darbi et al., 2005).

Tabel 3. Numărul estimativ de microorganisme capabile să degradeze hidrocarburi și uleiuri lipidice vegetale ($\times 10^3$) per cm^3 de sediment pentru fiecare stație studiată.

Substrat	Stația A	Stația C
Eter de petrol (0,5%)	0	0,6
Benzină (0,5%)	6,5	3,3
Motorină (0,5%)	1,2	2,4
Ceară de parafină (0,5%)	0,6	4
Ulei de floarea-soarelui (1%)	1,8	16
Ulei de măsline (1%)	8,1	23
Ulei de in (1%)	1,7	4,5

5.5.3. Influența nutrienților asupra bioremedierii sedimentelor poluate cu hidrocarburi

În toate microcosmosurile, cantitatea inițială de motorină adăugată a reprezentat 20 000 ppm. Teste preliminare au arătat că, în cazul metodei utilizate, fracțiile volatile, imposibil de determinat din cauza evaporării, reprezintă până la 34% din masa motorinei.

Rezultatele obținute arată că o adiție moderată de nutrienți de 5-25 mg/L NH_4NO_3 , respectiv 0,5-2,5 mg/L KH_2PO_4 (microcosmosurile 2 și 3; fig. 13) duce la o degradare rapidă și eficientă la nivelul coloanei de apă. Per ansamblu, însă, cea mai rapidă scădere a cantității de hidrocarburi s-a înregistrat în microcosmosul martor.

Se știe că azotul și fosforul constituie adesea factori limitativi ai biodegradării hidrocarburilor (Atlas, 1981). Experimente de biostimulare efectuate în diverse medii au demonstrat rolul favorizant pe care îl poate avea adiția, între anumite limite, de compuși azotați și fosfați în accelerarea procesului (Horowitz & Atlas, 1977, Atlas, 1981, Leahy & Colwell, 1990, Harayama et al., 1999, Swannell et al., 2000, Røling et al., 2002, Adoki, 2007, Obahiagbon et al., 2009, Hazen, 2010, Okoro, 2010, Das & Chandran, 2011, Efevbokhan et al., 2011).

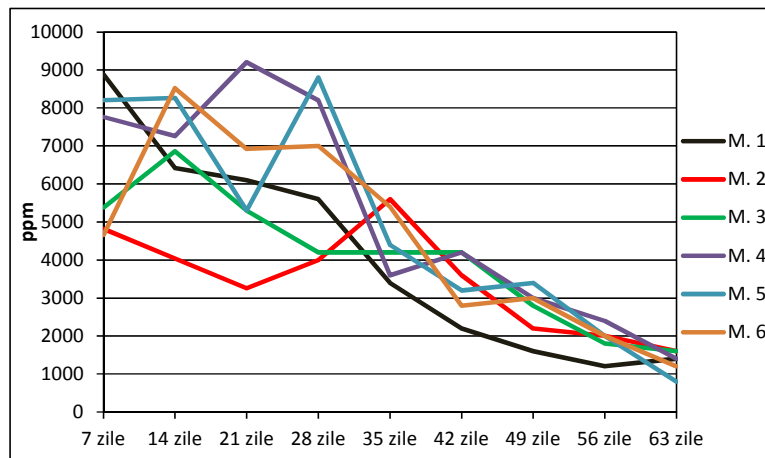


Fig. 13. Evoluția concentrației hidrocarburilor totale în sedimentele din microcosmosuri.

Totuși, există situații în care biostimularea cu azotați și fosfați poate fi puțin sau deloc eficientă (Røling et al., 2002, Heitkamp & Cerniglia, 1989, Leahy & Colwell, 1990, Syafruddin et al., 2010).

În experimentul de față, adiția de azot și fosfor anorganic a dus la o creștere semnificativă a numărului de microorganisme potențial degradative (tabelul 4), însă a inhibat procesul de

biodegradare în sine. Astfel de efecte au fost întâlnite și de alți cercetători (Fayad & Overton, 1995, Walworth et al., 2007, Syafruddin et al., 2010). Principala cauză a inhibării bioremedierii, în mediile acvatice, ar fi eutrofizarea (Korda et al., 1997, Røling et al., 2002), ducând la o dezvoltare excesivă a producătorilor primari. În absența unui hidrodinamism semnificativ, aceasta ar provoca anoxie la nivelul sedimentelor, iar pe de altă parte, bacteriile capabile să oxideze hidrocarburi s-ar reorienta spre o sursă de hrană mai ușor asimilabilă.

Tabel 4. Numărul estimativ de microorganisme capabile să degradeze hidrocarburi ($\times 10^3$) per cm^3 în sedimentele din microcosmosuri (după 35 de zile).

Microcosmos 1	1
Microcosmos 2	0,9
Microcosmos 3	2,6
Microcosmos 4	2,1
Microcosmos 5	8,8
Microcosmos 6	11

Așadar, cel puțin în cazul sedimentelor puțin expuse hidrodinamismului, utilizarea azotaților și fosfaților ca biostimulanți poate afecta negativ degradarea produselor petroliere. În această situație, prioritară ar fi mai degrabă bioventilarea sau alte metode de oxigenare (Syafruddin et al., 2010).

Analiza microscopică a arătat că, dintre bacteriile hidrocarbon-oxidante cultivabile, cel mai mare grup morfo-structural l-au constituit bacilii Gram pozitivi (cu o medie de 45,8%), urmați îndeaproape de cei Gram negativi (42%). Dintre bacteriile hidrocarbon-degradative întâlnite cel mai frecvent în mediile acvatice, în prima categorie ar intra speciile genurilor *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* și *Bacillus*. În cea de-a doua categorie, ar intra genurile *Alcanivorax*, *Pseudomonas*, unele enterobacterii, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* și unele cianobacterii (Atlas, 1981, Leahy & Colwell, 1990, Harayama et al., 1999).

CONCLUZII

1. Sedimentele nisipoase prelevate din diverse stații de-a lungul litoralului românesc au prezentat diferite densități ale populației microbiene, toate de ordinul a 10^7 - 10^8 celule/cm³ (valorile extreme întâlnite fiind de $4,32$ - $12,64 \times 10^7$ celule/cm³).
2. Biomasele microbiene din sedimentele studiate au înregistrat valori cuprinse între $1,63$ și $6,99 \mu\text{g/cm}^3$.
3. Bacteriile baciliforme Gram negative sunt dominante în sedimentele litorale (38-60%), iar biovolumul mediu celular variază între $0,07$ și $0,14 \mu\text{m}^3$. Din totalul celulelor cuantificate, între 30 și 42% aveau integritatea membranei celulare afectată (nu erau viabile la data recoltării probelor).
4. Atât observațiile asupra probelor naturale, cât și experimentele de tip microcosmos au confirmat existența unei relații negative între caracteristicile cantitative ale microbiotei bentice și granulația sedimentelor în care se găsesc, fără ca această relație să fie una absolută sau proporțională.
5. Granulometria influențează și distribuția diferitelor grupe morfo-structurale bacteriene (proporția bacteriilor sferice tinde să crească odată cu granulația sedimentului) și procentajul celulelor viabile (mai mare în sedimentele grosiere).
6. În condițiile microcosmosurilor de laborator, colonizarea bacteriană a sedimentelor sterile decurge extrem de rapid (densități similare celor naturale pot fi atinse în numai două săptămâni), ceea ce pare a indica o origine planctonică a majorității microorganismelor bentice.
7. S-a demonstrat existența unor variații sezoniere ale densității, biomasei și compoziției microbiobentosului litoral. Densitatea celulară și biomasa au prezentat corelații pozitive semnificative cu temperatura apei și cu concentrația pigmentilor clorofilieni din sediment (ca indicator al densității producătorilor primari).
8. Condițiile de mediu nefavorabile (temperaturi scăzute, producții primare scăzute, sedimente cu granulație mai mare) sunt asociate cu o creștere a procentului bacteriilor Gram pozitive și al cocilor Gram negativi de talie mică.
9. Concentrația pigmentilor clorofilieni este și ea dependentă de caracteristicile sedimentului, iar raportul dintre diferitele tipuri de clorofile confirmă rolul diatomeelor ca principali producători primari la nivelul sedimentelor litorale.

10. Prin metoda MPN s-a reușit izolarea și estimarea densității unor microorganisme implicate în diferite faze ale ciclului biochimic al azotului din sedimentele litorale: fixatoare de azot aerobe, amonificatoare, nitritbacterii și denitrificatoare. Densitatea relativ scăzută a amonificatoarelor pare să indice existența unor surse alternative de amoniu la nivelul sedimentelor. Analiza microscopică a arătat că bacteriile fixatoare de azot și cele nitrificatoare cultivabile sunt predominant Gram negative, în timp ce amonificatoarele și denitrificatoarele sunt mai ales Gram pozitive.

11. Densitatea bacteriilor sulfat-reducătoare (predominant Gram negative) diferă mult în funcție de tipul de sediment, atingând valori foarte ridicate în nisipurile fine și slab oxigenate.

12. Deși evident afectată de contaminarea experimentală cu hidrocarburi, revenirea relativ rapidă a microbiotei bentice, ca și prezența unor microorganisme capabile să degradeze diferite tipuri de amestecuri de hidrocarburi (în general cu densități de ordinul a 10^2 - 10^3 bacterii/cm³, în funcție de tipul de sediment și de hidrocarbură consumată) sau uleiuri vegetale (până la peste 10^4 bacterii cultivabile per cm³) indică un important potențial de bioremediere în cazul acestui tip de poluare.

13. Experimentele de tip microcosmos au arătat că, deși adăugarea de nutrienți azotați și fosfați duce la o creștere a densității microorganismelor potențial degradative de hidrocarburi, aceasta nu se traduce neapărat într-o degradare mai rapidă, efectul putând fi chiar advers. De aceea, în cazul biostimulării trebuie să se țină cont și de alți factori, cum ar fi gradul de oxigenare al sedimentelor.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Achuthan, C., Kumar, V.J.R., Manju, N.J., Philip, R., Singh, I.S.B., 2006 – Development of nitrifying bacterial consortia for immobilizing in nitrifying bioreactors designed for penaeid and non-penaeid larval rearing systems in the tropics. *Indian J. Mar. Sci.* 35: 240-248.
2. Adoki, A., 2007 – Uptake of crude petroleum hydrocarbons by mudflat bacteria exposed to nitrogenous fertilizer plant effluents. *Afr. J. Biotechnol.* 6: 1812-1816.
3. Akpoveta, O.V., Egharevba, F., Medjor, O.W., 2011 – A pilot study on the biodegradation of hydrocarbon and its kinetics on kerosene simulated soil. *Int. J. Environ. Sci.* 2: 54-67.
4. Al-Darbi, M.M., Saeed, N.O., Islam, M.R., Lee, K., 2005 – Biodegradation of natural oils in seawater. *Energy Sources* 27: 19-34.
5. Alexander, S.K., Schwarz, J.R., 1980 – Short-term effects of South Louisiana and Kuwait crude oils on glucose utilization by marine bacterial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 341-345.
6. Aluyor, E.O., Obahiagbon, K.O., Ori-Jesu, M., 2009 – Biodegradation of vegetable oils: a review. *Sci. Res. Essays* 4: 543-548.
7. Atlas, R., 1981 – Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45: 180-209.
8. Bennett, P.C., Engel, A.S., Roberts, J.A., 2006 – Counting and imaging bacteria on mineral surfaces, în Patricia, J., Maurice, A., Warren, L.A. (eds.) – Methods of Investigating Microbial-Mineral Interactions. CMS Workshop Lectures, Vol. 14: 37-78, The Clay Mineral Society, Chantilly.
9. Bondar, C. (ed.), 1973 – Marea Neagră în dreptul litoralului românesc, Institutul de Meteorologie și Hidrologie, București, p. 103.
10. Braddock, J.F., Gannon, K.A., Rasley, B.T., 2004 – Petroleum Hydrocarbon-Degrading Microbial Communities in Beaufort-Chukchi Sea Sediments. OCS Study, Coastal Marine Institute, School of Fisheries and Ocean Sciences, University of Alaska, Fairbanks.
11. Brambilla, F., 2006 – Water quality control in coastal aquaculture system: a Tuscany fish farm as a case study, teză de doctorat, University of Insubria.
12. Britton, L.J., Greeson, P.E. (eds.), 1987 – Methods for collection and analysis of aquatic biological and microbiological samples, în United States Geological Survey – Techniques of Water-Resources Investigations of the United States Geological Survey, Vol. 5: Laboratory Analysis, 66-98.
13. Brune, A., Frenzel, P., Cypionka, H., 2000 – Life at the oxic-anoxic interface: microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 691-710.
14. Burton, S.A.Q., Prosser, J.I., 2001 – Autotrophic ammonia oxidation at low pH through urea hydrolysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2952-2957.
15. Bussmann, I., Reichardt, W., 1991 – Sulfate-reducing bacteria in temporarily oxic sediments with bivalves. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 78: 97-102.
16. Cammen, L.M., 1982 – Effect of particle size on organic content and microbial abundance within four marine sediments. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 9: 273-280.
17. Capone, D.G., 1988 – Benthic nitrogen fixation, în Blackburn, T.H., Sørensen, J. (eds.) – Nitrogen Cycling in Coastal Marine Environments, 85-124, John Wiley & sons Ltd., New York.
18. Carman, K.R., Means, J.C., Pomarico, S.C., 1996 – Response of sedimentary bacteria in a Louisiana salt marsh to contamination by diesel fuel. *Aquat. Microb. Ecol.* 10: 231-241.
19. Castro, H.F., Williams, N.H., Ogram, A., 2000 – Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 1-9.
20. Chandrika, V., Nair, P.V.R., Khambhadkar, L.R., 1990 – Distribution of phototrophic thionic bacteria in the anaerobic and micro-aerophilic strata of mangrove system of Cochin. *J. Mar. Biol. Ass. India* 32: 77-84.
21. Chikere, C.B., Okpokwasili, G.C., Ichiakor, O., 2009 – Characterization of hydrocarbon utilizing bacteria in tropical marine sediments. *Afr. J. Biotechnol.* 8: 2541-2544.
22. Dale, N.G., 1974 – Bacteria in intertidal sediments: factors related to their distribution. *Limnol. Oceanogr.* 19: 509-518.
23. Danovaro, R., Fabiano, M., Boyer, M., 1994 – Seasonal changes of benthic bacteria in a seagrass bed (*Posidonia oceanica*) of the Ligurian Sea in relation to origin, composition and fate of the sediment organic matter. *Mar. Biol.* 119: 489-500.
24. Das, N., Chandran, 2011 – Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnol. Res. Int.* doi:10.4061/2011/941810.

25. Delille, D., Delille, B., 2000 – Field observations on the variability of crude oil impact on indigenous hydrocarbon-degrading bacteria from sub-Antarctic intertidal sediments. *Mar. Environ. Res.* 49: 403-417.
26. Delille, D., Vaillant, N., 1990 – The influence of crude oil on the growth of subantarctic marine bacteria. *Antarct. Sci.* 2: 123-127.
27. DeFlaun, M.F., Mayer, L.M., 1983 – Relationships between bacteria and grain surfaces in intertidal sediments. *Limnol. Oceanogr.* 28: 873-881.
28. Dietrich, D., Arndt, H., 2000 – Biomass partitioning of benthic microbes in a Baltic inlet: relationships between bacteria, algae, heterotrophic flagellates and ciliates. *Mar. Biol.* 136: 309-322.
29. Doboş, L., Puia, C., 2010 – Rolul microorganismelor în procesul de remediere a solurilor poluate cu hidrocarburi. *ProEnvironment* 3: 185-188.
30. Epstein, S.S., Alexander, D., Cosman, K., Dompé, A., Gallagher, S., Jarsobski, J., Laning, E., Martinez, R., Panasik, G., Peluso, C., Runde, R., Timmer, E., 1997 – Enumeration of sandy sediment bacteria: Are the counts quantitative or relative? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 151: 11-16.
31. Epstein, S.S., Rossel, J., 1995 – Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 117: 289-298.
32. Efeovbokhan, V.E., Anawe, P.A.L., Makinde, F.A., Odunmbaku, O., 2011 – Comparison of the efficiency of sodium nitrate and superphosphate as nutrients in the bioremediation of petroleum hydrocarbon polluted water. *Am. J. Sci. Ind. Res.* 2: 278-282.
33. Ezekiel, E.N., Hart, A.I., Abowei, J.F.N., 2011 – The sediment physical and chemical characteristics in Sombreiro River, Niger Delta, Nigeria. *Res. J. Environ. Earth Sci.* 3: 341-349.
34. Falcioni, T., Manti, A., Boi, P., Canonico, B., Balsamo, M., Papa, S., 2006 – Comparison of disruption procedures for enumeration of activated sludge floc bacteria by flow cytometry. *Cytometry B: Clin. Cytom.* 70: 149-153.
35. Fayad, N.M., Overton, E., 1995 – A unique biodegradation pattern of the oil spilled during the 1991 Gulf-War. *Mar. Pollut. Bull.* 30: 239-246.
36. Ferrara-Guerrero, M.J., Castellanos-Paéz, M.E., Garza-Mouriño, G., 2007 – Variation of a benthic heterotrophic bacteria community with different respiratory metabolisms in Coyuca de Benitez coastal lagoon (Guerrero, Mexico). *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol.)* 55: 157-169.
37. Forster, S., Snape, J.R., Lappin-Scott, H.M., Porter, J., 2002 – Simultaneous fluorescent Gram staining and activity assessment of activated sludge bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4772-4779.
38. Fry, J.C., 1990 – Direct methods and biomass estimation. *Meth. Microbiol.* 22: 41-85.
39. García-Robledo, E., Corzo, A., Papaspyrou, S., Jiménez-Arias, J.L., Villahermosa, D., 2010 – Freeze-lysolysable inorganic nutrients in intertidal sediments: dependence on microphytobenthos abundance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 403: 155-163.
40. Gillan, D.C., Danis, B., Pernet, P., Joly, G., Dubois, P., 2005 – Structure of sediment-associated microbial communities along a heavy-metal contamination gradient in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 679-690.
41. Gołaś, I., Zmysłowska, I., Harnisz, M., Korzekwa, K., Skowrońska, A., Teodorowicz, M., Górniak, D., Gros, M., Brzozowa, S., 2008 – Nitrogen cycle bacteria in the waters of the river Drwęca. *Pol. J. Environ. Stud.* 17: 215-225.
42. Gomoiu, M.T., 1969 – Studiul sedimentelor nisipoase de la litoralul românesc al Mării Negre. în *Ecologie Marină*, Vol. 3: 227-325, Ed. Academiei R.S.R., Bucureşti.
43. Gonzalez-Acosta, B., Bashan, Y., Hernandez-Saavedra, N.Y., Ascencio, F., De La Cruz-Agüero, G., 2006 – Seasonal seawater temperature as the major determinant for populations of culturable bacteria in the sediments of an intact mangrove in an arid region. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55: 311-321.
44. Grégori, G., Citterio, S., Ghiani, A., Labra, M., Sgorbati, S., Brown, S., Denis, M., 2001 – Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in freshwater and marine waters based on analytical flow cytometry and nucleic acid double staining. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4662-4670.
45. Hansen, L.S., Blackburn, T.H., 1991 – Aerobic and anaerobic mineralization of organic material in marine sediment microcosms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 75: 283-291.
46. Hanson, R.B., Gundersen, K.R., 1976 – Bacterial nitrogen fixation in a polluted coral reef flat ecosystem, Kaneohe Bay, Oahu, Hawaiian Islands. *Pac. Sci.* 30: 385-393.
47. Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y., Shutsubo, K., 1999 – Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.* 1: 63-70.
48. Hazen, T.C., 2010 – Biostimulation, în Timmis, K.N. (ed.) – *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 4517-4530, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
49. Heitkamp, M.A., Cerniglia, C.E., 1989 – Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a *Mycobacterium* sp. In microcosms containing sediment and water from a pristine ecosystem, *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1968-1973.

50. Heitzer, R.D., Ottow, J.C.G., 1976 – New denitrifying bacteria isolated from Red Sea sediments. *Mar. Biol.* 37: 1-10.
51. Henriksen, K., Kemp, W.M., 1988 – Nitrification in estuarine and coastal marine sediments, în Blackburn, T.H., Sørensen, J. (eds.) – Nitrogen Cycling in Coastal Marine Environments, 207-249, John Wiley & sons Ltd., New York.
52. Herbert, R.A., 1999 – Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 563-590.
53. Hewson, I., Jacobson-Meyers, M.E., Fuhrman, J.E., 2007 – Diversity and biogeography of bacterial assemblages in surface sediments across the San Pedro Basin, Southern California Borderlands. *Environ. Microbiol.* 9: 923-933.
54. Higashihara, T., Sato, A., Simidu, U., 1978 – An MPN method for the enumeration of marine hydrocarbon degrading bacteria. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 44: 1127-1134.
55. Hines, M.E., Buck, J.D., 1982 – Distribution of methanogenic and sulfate-reducing bacteria in near-shore marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 447-453.
56. Horowitz, A., Atlas, R.M., 1977 – Response of microorganisms to an accidental gasoline spillage in an Arctic freshwater ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1252-1258.
57. Hymel, S.N., Plante, C.J., 1998 – Improved method of bacterial enumeration in sandy and deposit-feeder gut sediments using the fluorescent stain 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 173: 299-304.
58. International Petroleum Industry Environmental Conservation Association, 2000 – Biological impacts of oil pollution: sedimentary shores. IPIECA Report Series, vol. 9, IPIECA, London.
59. Isnansetyo, A., Seguchi, M., Koriyama, M., 2011 – Nitrification potential rate of different sediment types of the Ariake Sea tidal flat in summer and autumn. *Res. J. Environ. Earth Sci.* 3: 704-716.
60. Kalėdienė, L., Giedraitytė, G., Liužinas, R., 2003 – Effectiveness of bioremediation process in hydrocarbon-contaminated soils. în Hogland, W., Kuznetsova, N. (eds.) – Kalmar Eco-Tech'03: Conference on Bioremediation and Leachate Treatment, November 25-27, Kalmar, Sweden.
61. Kannan, L., 2004 – Strides of CAS in coral reef research. *Seshaiyana* 12: 13-16.
62. Khiyama, H.M., Makemson, J.C., 1973 – Sand beach bacteria: enumeration and characterization. *Appl. Microbiol.* 26: 293-297.
63. Kogure, K., Wada, M., 2005 – Impacts of macrobenthic bioturbation in marine sediment on bacterial metabolic activity. *Microb. Environ.* 20: 191-199.
64. Korda, A., Santas, P., Tenente, A., Santas, R., 1997 – Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 677-686.
65. Kunihiro, T., Shibata, J., Hamaoka, H., Sogabe, A., Moriya, K., Kuwae, M., Ito, K., Katayama, A., Tsutsumi, H., Omori, K., 2012 – Relative biomass of bacteria and microphytobenthos in surface sediments of the Seto inland Sea of Japan. în Kawaguchi, M., Misaki, K., Sato, H., Yokokawa, T., Itai, T., Nguyen, T.M., Ono, J., Tanabe, S. (eds.) Interdisciplinary Study on Environmental Chemistry, Vol. 6: Environmental Pollution and Ecotoxicology, 397-406, Terrapub, Tokyo.
66. Kutty, S.N., 2009 – Marine yeasts from the slope sediments of Arabian Sea and Bay of Bengal, teză de doctorat, Cochin University of Science and Technology.
67. Kuwae, T., Hosokawa, Y., 1999 – Determination of abundance and biovolume of bacteria in sediments by dual staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole and acridine orange: relationship to dispersion treatment and sediment characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3407-3412.
68. Leahy, J.G., Colwell, R.R., 1990 – Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54: 305-315.
69. Llobet-Brossa, E., Roselló-Mora, R., Amann, R., 1998 – Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2691-2696.
70. Loferer-Krößbacher, M., Klima, J., Psenner, R., 1998 – Determination of bacterial cell dry mass by transmission electron microscopy and densitometric image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 688-694.
71. Lucas, F.S., Bertru, G., Höfle, M.G., 2003 – Characterization of free-living and attached bacteria in sediments colonized by *Hediste diversicolor*. *Aquat. Microb. Ecol.* 32: 165-174.
72. 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.* 68: 3509-3513.
73. Lunau, M., Lemke, A., Walther, K., 2005 – An improved method for counting bacteria from sediments and turbid environments by epifluorescence microscopy. *Environ. Microbiol.* 7: 961-968.

74. Mason, D.J., Shanmuganthan, S., Mortimer, F.C., Gant, V.A., 1998 – A fluorescent Gram stain for flow cytometry and epifluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2681-2685.
75. Montagna, P.A., 1982 – Sampling design and enumeration statistics for bacteria extracted from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1366-1372.
76. Moriarty, D.J.W., Hayward, A.C., 1982 – Ultrastructure of bacteria and the proportion of Gram-negative bacteria in marine sediments. *Microb. Ecol.* 8: 1-14.
77. Mudryk, Z.J., Podgórska, B., 2006a – Enzymatic activity of bacterial strains isolated from marine beach sediments. *Pol. J. Environ. Stud.* 15: 441-448.
78. Mudryk, Z.J., Podgórska, B., 2006b – Scanning electron microscopy investigation of bacterial colonization of marine beach sand grains. *Baltic Coastal Zone* 10: 61-72.
79. Mudryk, Z.J., Podgórska, B., Dwulit, M., 2005 – Bacterial utilization of amino acids and carbohydrates in a marine beach. *Baltic Coastal Zone* 9: 29-41.
80. Muşat, N., Werner, U., Knittel, K., Kolb, S., Dodenhof, T., Van Beusekom, J.E.E., De Beer, D., Dubilier, N., Amann, R., 2006 – Microbial community structure of sandy intertidal sediments in the North Sea, Sylt-Rømø Basin, Wadden Sea. *Syst. Appl. Microbiol.* 29: 333-348.
81. Namsaraev, Z.B., 2009 – Application of extinction coefficients for quantification of chlorophylls and bacteriochlorophylls. *Microbiology* 78: 794-797.
82. Noble, R.T., Fuhrman, J.A., 1998 – Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria *Aquat. Microb. Ecol.* 14: 113-118.
83. Novitsky, J.A., MacSween, M.C., 1989 – Microbiology of a high energy beach sediment: evidence for an active and growing community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 52: 71-75.
84. Nwaogu, L.A., Onyeze, G.O.C., Nwabueze, R.N., 2008 – Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. *Afr. J. Biotechnol.* 7: 1939-1943.
85. Obahiagbon, K.O., Akhabue, C.E., Aluyor, E.O., 2009 – Effect of varying concentration of sodium nitrate on biological oxidation of petroleum hydrocarbon polluted water. *J. Eng. Technol. Res.* 1: 50-55.
86. Okoh, A.I., 2006 – Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 1: 38-50.
87. Okoro, C.C., 2010 – Enhanced bioremediation of hydrocarbon contaminated mangrove swamp in the Nigerian oil rich Niger Delta using seawater microbial inocula amended with crude biosurfactants and micronutrients. *Nature and Science* 8: 195-206.
88. Paulson, D.S., 2008 – Biostatistics and Microbiology: A Survival Manual, Springer, New York.
89. Phuong, N.D.T., Yoshikawa, T., Hidaka, M., Maeda, H., Sakata, T., 2006 – Isolation and characterization of sulfate-reducing bacteria from sediments of Kagoshima Bay *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* 55: 69-78.
90. Podgórska, B., Mudryk, Z.J., 2007 – Physiological properties of bacteria inhabiting polluted and unpolluted marine sandy beaches (Southern Baltic Sea) *Pol. J. Ecol.* 55: 15-26.
91. Podgórska, B., Mudryk, Z.J., Skórczewski, P., 2008 – Abundance and production of bacteria in a marine beach (Southern Baltic Sea). *Pol. J. Ecol.* 56: 405-414.
92. Pora, E.A., Oros, I., 1974 – Limnologie şi Oceanologie. Hidrobiologie, Ed. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti.
93. Proctor, L.M., Souza, A.C., 2001 – Method for enumeration of 5-cyano-3,2-ditoyl tetrazolium chloride (CTC)- active cells and cell-specific CTC activity of benthic bacteria in riverine, estuarine and coastal sediments. *J. Microbiol. Meth.* 43: 213-222.
94. Pusceddu, A., Fiordelmondo, C., Danovaro, R., 2005 – Sediment resuspension effects on the benthic microbial loop in experimental microcosms. *Microb. Ecol.* 50: 602-613.
95. Ramsay, M.A., Swannell, R.P.J., Shipton, W.A., Duke, N.C., Hill, R.T., 2000 – Effect of bioremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 41: 413-419.
96. Rezaee, A., Godini, H., Dehestani, S., Kaviani, S., 2010 – Isolation and characterization of a novel denitrifying bacterium with high nitrate removal: *Pseudomonas stutzeri*. *Iran. J. Environ. Health Sci. Eng.* 7: 313-318.
97. Roelfsema, C., 1999 – Spatial distribution of benthic microalgae on coral reefs determined by remote sensing, post graduate thesis, University of Queensland.
98. Roubal, G., Atlas, R.M., 1978 – Distribution of hydrocarbon-utilizing microorganisms and hydrocarbon biodegradation potentials in Alaskan continental shelf areas. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 897-905.
99. Røberg, S., Østerhus, J.I., Landfald, B., 2011 – Dynamics of bacterial community exposed to hydrocarbons and oleophilic fertilizer in high-Arctic intertidal beach. *Polar Biol.* 34: 1455-1465.
100. Røberg, S., Stormo, S.K., Landfald, B., 2007 – Persistence and biodegradation of kerosene in high-arctic intertidal sediment. *Mar. Environ. Res.* 64: 417-428.

101. Röling, W.F.M., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J.P., Head, I.M., 2002 – Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5537-5548.
102. Saitoh, S., Iwasaki, K., Yagi, O., 2003 – Development of a most-probable number method for enumerating denitrifying bacteria by using 96-well microtiter plates and an anaerobic culture system. *Microb. Environ.* 4: 210-215.
103. Shieh, W.Y., Yang, J.T., 1997 – Denitrification in the rhizosphere of two seagrasses *Thalassia hemprichii* (Ehrenb.) Aschers and *Halodule uninervis* (Forsk.) Aschers. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 218: 229-241.
104. Sugahara, I., Kimura, T., Hayashi, K., 1988 – Distribution and generic composition of denitrifying bacteria in coastal and oceanic bottom sediments *Nippon Suisan Gakk.* 54: 1005-1010.
105. Swannell, R.P.J., Mitchell, D.J., Waterhouse, J.C., Miskin, I.P., Head, I.M., Petch, S., Jones, D.M., Willis, A., Lee, K., Lepo, J.E., 2000 – Impact of bioremediation treatments on the biodegradation of buried oil and predominant bacterial populations, în *Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*, 759-765, Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax.
106. Syafruddin, S., Wieshammer, G., Puschenreiter, M., Langer, I., Wieshammer-Zivkovic, M., Wenzel, W.W., 2010 – Effect of N and P fertilisation and aeration on biodegradation of crude oil in aged hydrocarbon contaminated soils. *Plant Soil Environ.* 56: 149-155.
107. Šestanović, S., Solić, M., Krstulović, N., 2009 – The influence of organic matter and phytoplankton pigments on the distribution of bacteria in sediments of Kaštela Bay (Adriatic Sea). *Scientia Marina* 73: 83-94.
108. Šestanović, S., Solić, M., Krstulović, N., Bogner, D., 2005 – Volume, abundance and biomass of sediment bacteria in the eastern mid Adriatic Sea. *Acta Adriat.* 46: 177-191.
109. Takeuchi, J., 2005 – Nitrate-reducing bacterial community in hypernutrified aquatic environments, teză de doctorat, Shizuoka University.
110. Tănase, A.M., 2009 – Analize biochimice și genetice la unele tulpini bacteriene implicate în procese de bioremediere ale ecosistemelor poluate, teză de doctorat, Universitatea București.
111. Tejera, N., Lluch, C., Martínez-Toledo, M.V., González-López, J., 2005 – Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and Soil* 270: 223-232.
112. Torpee, S., 2009 – Selection of free living aerobic nitrogen fixing bacteria and *Bacillus* sp. to use as inoculums for nitrogen and phosphorus fertilizer in straw medium, teză de masterat, Prince of Songkla University.
113. Torrétón, J.P., Fouquet, O., Frouin, P., 1997 – Bacteriobenthos biomass and productivity in relation to organic matter in the lagoon of Tahiti, în Lessios, H.A., Macintyre, I.G. (eds.) – *Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium*, Panama, June 24-29, 1996, 2: 1857-1862, Smithsonian Tropical Research Institute, Balboa.
114. Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P., 2003 – Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 503-549.
115. Velimirov, B., 2001 – Nanobacteria, ultramicrobacteria and starvation forms: a search for the smallest metabolizing bacterium. *Microbes Environ.* 16: 67-77.
116. Venkateswaran, K., Iwabuchi, T., Matsui, Y., Toki, H., Hamada, E., Tanaka, H., 1991 – Distribution and biodegradation potential of oil-degrading bacteria in North-Eastern Japanese coastal waters. *FEMS Microb. Ecol.* 86: 113-122.
117. Walker, J.D., Colwell, R.R., 1976 – Enumeration of petroleum-degrading microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 198-207.
118. Walworth, J., Pond, A., Snape, I., Rayner, J., Ferguson, S., Harvey, P., 2007 – Nitrogen requirements for maximizing petroleum bioremediation in a sub-Antarctic soil. *Cold Reg. Sci. Technol.* 48: 84-91.
119. Weise, W., Rheinheimer, G., 1977 – Scanning electron microscopy and epifluorescence investigation of bacterial colonization of marine sand sediments. *Microb. Ecol.* 4: 175-188.
120. Wrenn, B.A., Venosa, A.D., 1996 – Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Can. J. Microbiol.* 42: 252-258.
121. Zuberer, D.A., Silver, W.S., 1978 – Biological dinitrogen fixation (acetylene reduction) associated with Florida mangroves. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 567-575.