



**UNIVERSITATEA “OVIDIUS” CONSTANȚA
FACULTATEA DE ȘTIINȚE ALE NATURII
ȘI ȘTIINȚE AGRICOLE
ȘCOALA DOCTORALĂ - DOMENIUL BIOLOGIE
SPECIALIZAREA MICROBIOLOGIE**



**REZUMATUL
TEZEI DE DOCTORAT**

**„BIOFILME FORMATE DE CĂTRE
PROCARIOTE MARINE”**

Conducător științific,

Prof. Univ. Dr. Ardelean Ioan

Doctorand,

Moldoveanu Aurelia - Manuela

Constanța 2013

MULȚUMIRI

Domnului **Prof. univ. dr. Ioan Ardelean** în calitate de coordonator al acestei teze, pentru suportul științific și moral oferit de-a lungul anilor de cercetare.

Domnului **Conf. univ. dr. Skolka Marius** pentru suportul științific, sfaturile de redactare și accesul în laboratorul de Biodiversitate marină.

Doamnei **Conf. univ. dr. Onciu Teodora** pentru suportul științific, tehnic, sfaturile de redactare și accesul în laboratorul de Hidrobiologie.

Domnului **Conf. univ. dr. Aonofriesei Florin** pentru suportul științific și bibliografic oferit.

Domnului **Asistent cercet. dr. Tudor Marian** pentru suportul tehnic în realizarea experimentelor.

Domnului **Cercetător Dr. Dan Vasiliu** pentru realizarea probelor chimice de apă marină.

Și nu ultimul rând mulțumesc familiei mele pentru suportul moral oferit în procesul de împlinire profesională atât în realizarea acestei teze cât și în activitățile anterioare acesteia.

CUPRINS

Pag. Teză

Rezumat

INTRODUCERE.....	1	1
-------------------------	----------	----------

PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Capitolul I – PROCARIOTELE MARINE		1
1.1. Caracteristici generale ale procariotelor din Marea Neagră.....	5	
1.2. Diferențele dintre faza liberă și faza fixată a procariotelor.....	7	
1.3. Particularitățile generale ale metabolismului procariotelor.....	8	
1.4. Implicațiile ecologice ale procariotelor.....	9	
2. Capitolul II – FACTORI DE MEDIU		2
2.1. Răspunsul microorganismelor la absența nutrienților.....	22	
2.2. Creșterea microorganismelor la interfețe	23	
3. Capitolul III – ADERENȚA BACTERIANĂ		3
3.1. Mecanismele aderenței procariotelor.....	25	
3.2. Implicații genetice ale fenomenului de aderență	28	
3.3. Metabolismul procariotelor din structura biofilmelor.....	32	
4. Capitolul IV - FORMAREA BIOFILMEI		4
4.1. Structura biofilmelor.....	38	
4.2. Comunicarea intercelulară din biofilm.....	40	
4.3. Avantajele vieții în biofilm	43	
4.4. Impactul biofilmelor bacteriene	45	
4.5. Combaterea biofilmelor și tratamentul suprafețelor	49	
5. Capitolul V – BACTERIONEUSTONUL		4
5.1. Semnificația ecologică a formării bacterioneustonului.....	52	

PARTEA II – CONTRIBUȚII PERSONALE

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE LUCRĂRII.....	56	5
6. Capitolul VI - MATERIALE ȘI METODE		5
6.1. Etapele de formare ale biofilmelor	57	
6.2. Metodele de studiu	59	
6.3. Formarea biofilmelor la nivelul interfeței lichid – solid <i>in vitro</i>	66	7
6.4. Formarea biofilmelor la nivelul interfeței aer – lichid <i>in vitro</i>	71	9

REZULTATE ȘI DISCUȚII

7. Capitolul VII – DINAMICA FORMĂRII BIOFILMELOR *IN VITRO* LA INTERFAȚA LICHID – SOLID

7.1.	Salinitatea	74	11
7.2.	Temperatura	76	12
7.3.	Dinamica apei de mare	81	14
7.4.	Efectul amestecului de aminoacizi, al triptonei, al extractului de levură, glucozei și al amidonului asupra biofilmelor	82	15
7.5.	Suprafețele hidrofile și hidrofobe în condiții statice și dinamice.....	107	21

8. Capitolul VIII – DINAMICA FORMĂRII BIOFILMELOR *IN VITRO* LA INTERFAȚA AER - LICHID (BACTERIONEUSTON)

8.1.	Influența salinității asupra bacterioneustonului	120	26
8.2.	Influența temperaturii asupra bacterioneustonului	123	29
8.3.	Influența peptonei și benzinei asupra bacterioneustonului.....	126	31
9.	CONCLUZII	134	35
10.	BIBLIOGRAFIE	137	37
11.	ANEXĂ PERSONALĂ	164	41

Cuvinte cheie: biofilm, bacterii marine, aderență bacteriană, bioreactor, microcosmos, factori de mediu, substanță organică, hidrofil, hidrofob, bacterioneuston

INTRODUCERE

Suprafețele imersate în mediul marin devin aproape imediat un suport propice pentru atașarea unui strat de polimeri din mediu, fenomenul determinând aderența microorganismelor și formarea unor comunități de microorganisme, alge și particule organice (Parsek și Fuqua, 2004; Cho și colab., 2007).

Importanța subiectului constă în cuantificarea prezenței procariotelor în sisteme de tip recipient prin determinarea numărului total de celule fixate pe substrat sau la nivelul interfeței aer-lichid al celulelor moarte, cu membrană alterată structural și funcțional, și sub efectul factorilor de mediu (temperatură, salinitate, nutrienți, poluanți și tipul de substrat).

CAPITOLUL I

PROCARIOTELE MARINE

În general, numărul procariotelor este maxim în regiunile litorale (mai ales în cele vecine cu marile colectivități urbane), în estuare și scade progresiv în zonele pelagice pe măsura îndepărtării de țărm și odată cu adâncimea (Zarma, 1963; 1965). Numărul acestora este, de asemenea, crescut în zonele de ridicare a apelor reci de la adâncime (*upwelling zones*) și în primii centimetri ai sedimentelor marine unde pot ajunge la valori ridicate. Acesta scade mult odată cu profunzimea sedimentelor datorită anaerobiozei și lipsei nutrienților din aceste zone (Zarnea, 1994).

Microorganismele au un rol esențial în ecosistemele marine având un rol cheie în relațiile trofice din acest tip de ecosisteme, ele reprezintă atât microorganismele (microbiota) care descompun „zăpada” marină, dar valorifică și substanța organică dizolvată și în același timp inițiază formarea epibiozelor (Sleigh, 1987; Zarnea, 1994).

Bacteriile marine cresc optim la concentrații saline între 33-35 ‰ și nu se dezvoltă sau se dezvoltă slab în absența NaCl, sunt psihrotrofe sau psihrofile cu excepția celor din apele tropicale de suprafață. În funcție de habitat sunt barofobe (la suprafața mării), barotolerante sau barofile. Prezintă un pleomorfism accentuat determinat, probabil, de oligotrofie și de efectele presiunilor hidrostatice cu valori ridicate. Cele mai multe (80% - 95%) sunt Gram negative, mobile (75% - 85%), aerobe, facultativ anaerobe, iar cele din adâncul sedimentelor obligat anaerobe (Zarma, 1959^a; Zarnea, 1994).

CAPITOLUL II

FACTORII DE MEDIU

a. Salinitatea

Mediile naturale oferă microorganismelor condiții foarte diferite de salinitate, de la cele cu concentrații foarte mici (ape râuri și lacuri) până la cele cu concentrații mari cum sunt lacurile sărate și mările sau chiar la cele care reprezintă adevărate soluții saturate (Zarnea, 1994).

Salinitatea este un factor variabil în mediul marin, microorganismele din centrul biofilmelor fiind influențate de acesta în funcție de gradul lor de toleranță la concentrația de NaCl (Stanley și Morita, 1968; Zarnea, 1994).

b. Temperatura

Creșterea și multiplicarea microorganismelor este rezultatul unei serii de reacții metabolice coordonate a căror desfășurare normală este asigurată de o temperatură adecvată (Zarnea, 1994; Eddlemann, 1998, Hinrichsen, 2011).

Efectul temperaturii asupra creșterii microorganismelor este corelat cu acțiunea acestora asupra reacțiilor lor enzimatică. Ca urmare, rata celor două procese crește progresiv pe măsură ce temperatura se ridică, până atinge un nivel optim. Peste această limită, viteza lor scade, până când enzima este denaturată de temperatura ridicată (Zarnea, 1994; Hinrichsen, 2011).

c. Curenții

Au o deosebită importanță deoarece determină modificarea uneia dintre cele mai importante proprietăți ale ecosferei marine și anume relativa uniformitate a condițiilor de mediu. Realizând, în funcție de direcția lor (verticală sau orizontală) și de nivelul la care apar (suprafață sau în regiunile profunde), amestecul unor mase importante de apă, ei produc și amestecul nutrienților, dar și o redistribuire a microbiotei (Zarnea, 1994; Lewandowski și Stoodley, 1995).

În cazul biofilmelor prezența curenților influențează cantitatea de nutrienți accesibilă microorganismelor componente și facilitează schimburile dintre celule (Pedersen, 1982^a, Zarnea, 1994; Stepanovic și colab. , 2001).

d. Răspunsul microorganismelor la absența nutrienților

1) Unele utilizează o perioadă limitată de timp constituenți de rezervă celulari prin metabolism endogen sau evoluează spre stadii de latență (spori, chiști etc.) sau alte forme de supraviețuire (Heukelekian și Heller, 1940; Zarnea, 1994; Hood și Zottola, 1997; Matz și Jürgens, 2003).

2) Cele mai multe specii continuă creșterea cu o rata submaximală sau chiar minimală (Penfold și Norris, 1912; Hagstrom și colab., 1984, Zarnea, 1994, Pomeroy și colab., 2007).

e. Influența interfețelor asupra microorganismelor

În mediile naturale, în condițiile fizico-chimice adecvate, orice suprafață expusă unor soluții apoase, care conțin mici cantități de nutrienți este acoperită de o peliculă de microorganisme sub forma unui strat monocelular, a unor microcolonii sau biofilme (Marshall, 1986, Zarnea, 1994).

Fenomenul a fost confirmat de numeroase observații care au evidențiat acumularea și chiar multiplicarea microorganismelor la nivelul de interfață, reprezentată de faza în care se găsesc microorganismele și suprafețele solide sau de altă natură (Marshall, 1986; Zarnea, 1994; James și colab, 1995).

CAPITOLUL III

PROCESUL DE ADERENȚĂ AL PROCARIOTELOR

Procesul de aderență prezintă o importanță fundamentală în biologie, mecanismele de fixare ale procariotelor pe diferite suprafețe, fiind o etapă prealabilă necesară majorității proceselor biologice, fiziologice sau patologice ale microorganismelor (Senet 1995, cit. Lazăr, 2003).

Procariotele au unele dintre proprietățile particulelor coloidale, astfel că aderența lor la diferite substraturi a fost studiată experimental ca un fenomen fizico-chimic aplicând principiile chimiei coloizilor, abordare oarecum simplistă pentru că procariotele nu sunt particule coloidale inerte, suprafața și proprietățile lor modificându-se în timp, în funcție de modificările condițiilor de mediu. Fenomenul a fost studiat cel mai mult în condițiile unei interfețe solid-lichid (van Loosdrecht, 1990, cit. Zarnea, 1994; Marshall, 1992; Cooksey și Wigglesworth-Cooksey, 1995; Moldoveanu, 2010c).

CAPITOLUL IV

FORMAREA BIOFILMELOR

Faze de formare ale biofilmului:

1) *Etapa de transport*, respectiv de deplasare a microorganismelor din mediu la suprafața substratului care, la rândul său, se poate realiza prin trei mecanisme diferite (Lazăr, 2003):

a) deplasarea prin difuziune - consecință a mișcării browniene a celulelor, fiind prezentă în condițiile de mediu liniștit, ca și în cursul proceselor de sedimentare;

b) deplasarea prin curenți de convecție, asociată cu circulația lichidului în care sunt suspendate procariotele și care asigură un transport mai rapid decât modalitatea precedentă;

c) mișcarea activă, cea mai rapidă, poate determina fie contacte întâmplătoare, fie orientate chemotactic, în cazul existenței unui gradient de concentrație între cele două interfețe (Lazăr, 2003; Freney, 2004) v. figura 3.1.

2) *Etapa de aderență inițială* este reversibilă, în sensul unei depuneri pe suprafața-suport, cu menținerea în continuare a mișcării browniene și flagelare și cu posibilitatea de îndepărtare, fie prin propria lor mobilitate, fie prin agitare ușoară (Lazăr, 2003)

CAPITOLUL V

BACTERIONEUSTONUL

În mediul acvatic marin există două tipuri de interfețe extrem de importante cea solid-lichid unde se formează biofilmele clasice și cea aer-lichid unde se formează bacterioneustonul (microstratul de suprafață) (Zook, 1992; Henk, 2004; Agogué și colab., 2004; Hakvåg și colab., 2008).

Interfața aer-lichid (IAL) este un mediu ubicvist care apare la suprafața oricărui tip de ecosistem acvatic și reprezintă o nișă trofică pentru microorganisme. Astfel, orice întindere de apă, fie că este de dimensiuni mici sau mari, de tip natural sau creată de om, are o IAL care se formează între atmosferă și hidrosferă (Goldacre, 1949; Garrett și Duce, 1980; Burchardt și Marshall, 2003, Marshall și Burchardt, 2005). Prin această interfață are loc un schimb dinamic și permanent de gaze, apă și substanțe organice sau anorganice. De asemenea, la nivelul

interfeței au loc o serie de procese cu rol în transformarea energiei sau în formarea aerosolilor. Proprietățile specifice ale moleculelor existente la acest nivel diferă de cele ale acelorași molecule în suspensie. Aceste proprietăți asigură formarea tensiunii superficiale în ecosistemele acvatice (Harvey, 1966; Parker și Barsom, 1970; Zaitsev, 1997; Henk, 2004).

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE LUCRĂRII

Scopul acestei teze de doctorat îl constituie studierea dinamicii formării biofilmelor și a bacterioneustonului de către procariote marine în laborator (recipiente) în condiții controlate de temperatură, salinitate sau încărcătură organică.

Obiectivul 1: Dinamica numărului de celule din biofilme formate în condiții de recipient la diferite temperaturi (6°C și 18°C) și diferite salinități (5 g/L; 10 g/L și 15 g/L).

Obiectivul 2: Dinamica numărului de celule din biofilme formate în condiții statice și dinamice pe suprafețe hidrofile sau hidrofobe.

Obiectivul 3: Dinamica numărului de celule și a tipurilor de celule/colonii din biofilme în condițiile suplimentării apei de mare cu substanțe organice (aminoacizi, triptonă, extract de levură, glucoză, amidon).

Obiectivul 4: Dinamica numărului de celule din bacterioneustonul format în condiții de recipient la diferite salinități (5 g/L; 10 g/L; 15 g/L și 25 g/L) și temperaturi (6°C; 18°C și 23°C).

Obiectivul 5: Influența substanțelor organice (benzină și peptonă) asupra dinamicii numărului de celule din bacterioneustonul în condițiile din recipiente.

CAPITOLUL VI

MATERIALE ȘI METODE

6.1. Metode de obținere a biofilmelor la nivelul interfeței lichid - solid

Sistemele de tip recipient sunt avantajoase datorită faptul că în interiorul lor pot fi controlați anumiți parametri (temperatură, salinitate, concentrația nutrienților sau/și poluanților, fie și doar la începutul experimentului, etc.), realizându-se astfel modele experimentale mai simplificate comparativ cu ecosistemul natural. Simplificarea permite, de regulă, interpretarea mai clară a rezultatelor obținute comparativ cu cele obținute în mediul natural.

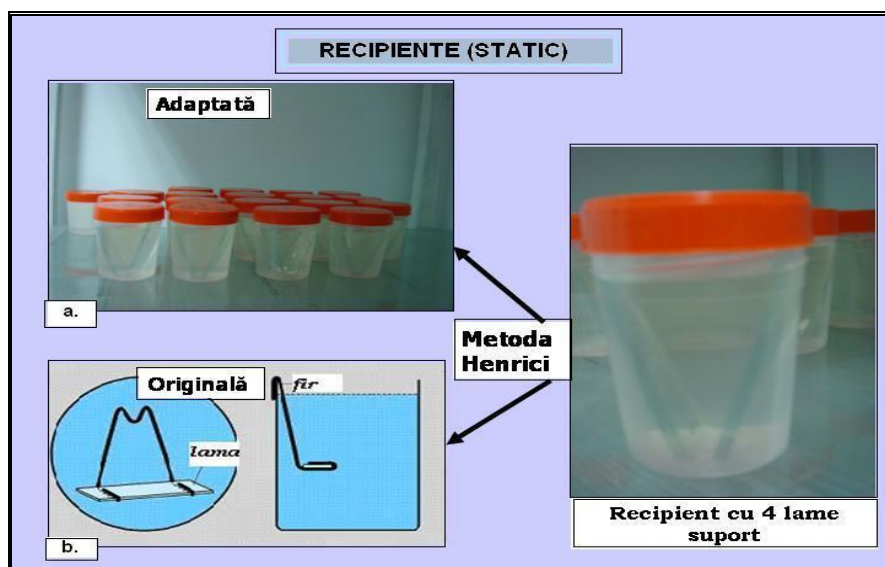


Figura 6.1 Recipiente cu apă de mare pentru formarea biofilmelor a) metoda Henrici adaptată (original); b) metoda Henrici clasică (www.biofilmsonline.com, 2008).

Apa de mare nefiltrată reprezintă un mediu de cultură prielnic pentru biofilme datorită păstrării concentrațiilor de substanțe organice și a bacteriovorilor care influențează formarea biofilmelor marine și în condiții *in situ*.

Capacitatea recipientelor a fost între 100 mL - 2 litri apă de mare, menținute la temperatura camerei, în condiții constante sau variabile de temperatură cu iluminare naturală pe o perioadă de la câteva zile până la trei săptămâni, în care au fost analizate diferite variante experimentale pentru studiul biofilmelor.

Tehnica Henrici constă în ancorarea în mediul natural sau în laborator a unor lame de sticlă sterile cu ajutorul unor cabluri în poziție orizontală pentru a permite formarea biofilmelor pe suprafața acestora (Henrici, 1933^a; 1933^b) v. figura 6.1.

Lamele suport pentru bacteriile aderente au fost poziționate oblic comparativ cu poziționarea din metoda clasică pentru a evita fenomenul de depunere, care determină apariția unor densități crescute a procariotelor marine aderente (Harris, 1972; Pringle și Fletcher, 1983; Kumar și Prasad, 2006) v. figura 6.1.

Astfel, pentru realizarea unor experimente în condiții dinamice au fost folosite recipiente cu circuite pentru realizarea acestor condiții *in vitro*, potrivit modelului sugerat de Harsen și colab. (2007). Am folosit cutii din PVC pentru depozitare cu capacitate de 15 L, la care s-au atașat pompe de acvariu de 200 L/h care asigură circuitul continuu al apei pe suprafețele experimentale.

În aceste recipiente cu circuit s-au utilizat 2,5 L de apă de mare, deasupra căroră au fost poziționate oblic câte 12 lame din sticlă de microscopie fixate cu două baghete din plastic, situate pe un suport deasupra mediului de cultură. Lamele de sticlă au fost în contact doar cu apa de mare care percolează pe suprafața acestora, conform metodei recipientului și metodei „pescuit microbian” (Pedersen, 1982^b, Hansen și Sørensen, 2007; Burmølle și colab., 2007) v. figura 6.2.

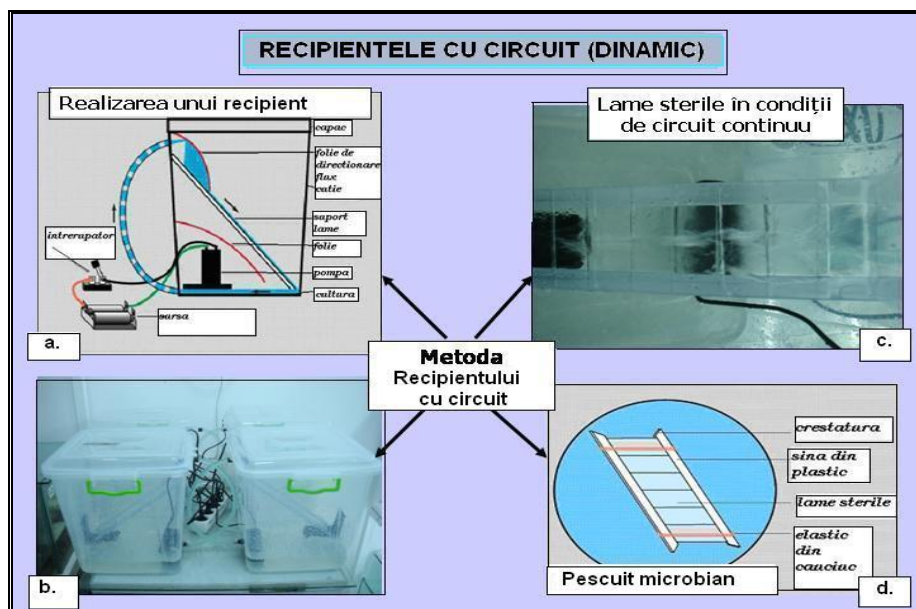


Figura 6.2. Obținerea biofilmelor în condiții dinamice. a, d) schema realizării recipiente cu circuit (www.biofilmsonline.com, 2008) b, c) aspectul recipientelor cu circuitul utilizate în condiții de laborator (original).

6.1.1 Formarea biofilmelor bacteriene sub influența temperaturii și a salinității

Experimentul s-a realizat într-o cameră termostatăă la o temperatură constantă de 18°C în Laboratorul de Investigare a Biodiversității din cadrul Universității Ovidius Constanța și într-un frigider la o temperatură constantă de 6°C, utilizându-se 144 de lame de microscopie sterilizate termic și introduse la timpul T_0 în recipiente (Moldoveanu și Ardelean, 2010^a).

Modificarea salinității s-a realizat doar pentru apa de mare din zona litorală, de la 15 g/l valoare normală pentru Marea Neagră s-au creat două variabile experimentale cu o salinitate de 10 g/l (s-a realizat un amestec a 666 ml apă de mare cu 333 ml apă de osmoză) și o salinitate de 5 g/l (prin amestecul a 333 ml apă de mare cu 666 ml apă de osmoză), utilizându-se 216 de lame de microscopie sterilizate termic în apa de mare a cărei salinitate a fost modificată (Moldoveanu și Ardelean, 2010^a).

6.1.2 Obținerea biofilmelor în condiții statice și dinamice

Lamele au fost utilizate într-un recipient conform metodei „pescuit microbial” pe două baghete din plastic, utilizându-se 288 de lame de microscopie drept suprafețe de probă (Moldoveanu și Ardelean, 2010^b).

Sterilizarea lamelor de microscopie, prelevarea și desalinizarea s-au realizat conform protocolului prezentat la experimentul precedent.

Condițiile statice au fost obținute în recipiente conform metodei lamelor de sticlă a lui Henrici, respectiv conform experimentului prezentat anterior (Moldoveanu și Ardelean, 2010^b).

6.1.3 Dinamica biofilmelor sub influența substanței organice

Studiul s-a realizat utilizându-se o formă adaptată a metodei Henrici, în recipientele sterile din plastic cu o capacitate de 100 ml, unde a fost introdusă apă de mare suplimentată cu substanțe organice pure. Au fost realizate per litru de apă de mare o serie de modificări ale cantității de substanță organică cu soluții de 0,1% amestec de aminoacizi (Difco), triptonă (Difco), extract de levură (Difco), glucoză (Merk) și amidon (Merk) - (Moldoveanu, 2011^c), iar analiza chimică a apei a evidențiat diferențe, redate în tabelul 6.3, în special în cazul cantității de substanță organică utilizată în experimente.

6.1.4 Obținerea biofilmelor pe suprafețe hidrofile și hidrofobe

Experimentele s-au realizat în condiții statice și dinamice la temperaturi variabile pe diferite tipuri de suprafețe hidrofile sau hidrofobe (Moldoveanu și Ardelean, 2012^c). Studiul s-a realizat utilizându-se o formă adaptată a metodei Henrici și a metodei recipientului care a permis obținerea biofilmelor în condiții dinamice *in vitro* (Moldoveanu și Ardelean, 2012^c).

Unele experimente s-au realizat la temperatura camerei (23°C) în Laboratorul de Microbiologie sau într-o cameră termostatăată la o temperatură de 18°C în Laboratorul de Investigare a Biodiversității din Universitatea Ovidius Constanța (Moldoveanu și Ardelean, 2012^c).

6.2 Metode de obținere ale biofilmelor la interfața aer - lichid (Bacterioneuston)

Datorită modului de formare al bacterioneustonului la nivelul interfețelor, recoltarea acestora este mai dificilă. Pentru colectarea bacterioneustonului marin există o serie de metode, una dintre acestea fiind tehnica lamelor de sticlă (Harvey și Burzell, 1972; Henk, 2003; Henk, 2004).

Metoda constă în prelevarea procariotelor din stratul de suprafață prin poziționarea unei lame de sticlă sau a unei suprafețe de dimensiuni mari acoperită cu un strat de aderență (gelatină filtrată).

Am utilizat 15 cutii dreptunghiulare din PVC cu o capacitate de 1,5 L, în care s-au adăugat 600 de mL de apă de mare nefiltrată și au fost modificați diferiți factori de mediu, v. figura 6.3

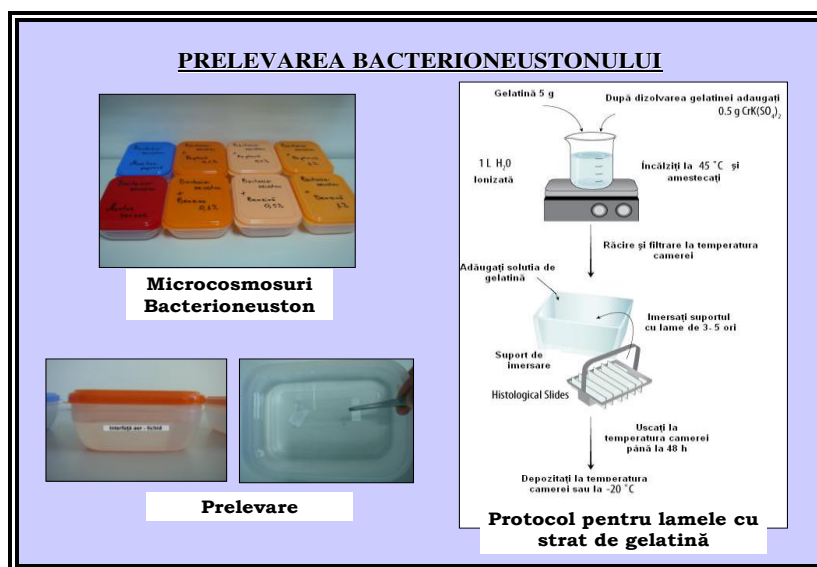


Figura 6.3 Recipienturile utilizate în experimente a) probe martor și probele experimentale (originale), b), c) prelevare probe (originale), d) schema realizării lamelor cu strat de gelatină (R&D Products & Protocol Guide, 2012)

6.2.1 Dinamica bacterioneustonului marin sub influența temperaturii și a salinității

Salinitatea a fost primul factor de mediu analizat și au fost alese patru valori variabile: o valoare scăzută de 5 g/L, similară cu valorile din zona de vărsare a Dunării, două valori medii de 10 g/L și 15g/L frecvente în zona costieră și o valoare de 25 g/L similară cu cea din zona de contact cu Marea Mediterană. Pentru a obține valorile mai scăzute s-a adăugat apă distilată în proporții variabile sau a fost adăugată sare de mare pentru a crește valoarea salinității din recipiente(Moldoveanu și Ardelean, 2012^a), iar analiza chimică a apei a evidențiat o serie de diferențe notate în tabelul 6.3.

Valorile temperaturii au fost asemănătoare cu variațiile sezoniere din Marea Neagră: o valoare scăzută de 6°C (o temperatură medie în perioadă de iarnă), o valoare medie și constantă de 18°C (o temperatură medie în perioadă de primăvară, obținută în condițiile dintr-o cameră termostatăată cu lumină difuză) și o valoare ridicată de 23°C (o temperatură medie în perioada de vară, obținută la temperatura camerei cu lumină naturală) - (Moldoveanu și Ardelean, 2012^a).

6.2.2 Dinamica bacterioneustonului marin în condiții variabile ale nutrienților

În acest caz s-a realizat o suplimentare a apei de mare cu substanțe organice de concentrații variabile de 0,1%, 0,5%, 1% peptonă pentru a simula o poluare cu materie organică și concentrații similare de benzină pentru a simula o poluare cu hidrocarburi a bacterioneustonului *in vitro* (Moldoveanu și Ardelean, 2012^b).

CAPITOLUL VII

DINAMICA FORMĂRII BIOFILMELOR *IN VITRO* LA INTERFAȚA LICHID – SOLID

7.1. Influența salinității

Salinitatea reprezintă un factor important care contribuie la formarea unui profil specific pentru comunitățile de microorganisme din apele de mică adâncime. Deoarece Marea Neagră este considerată o mare atipică, dacă ar fi să o comparăm cu alte mări, este de așteptat ca microorganismele să prezinte o serie de particularități. În apele continentale unde există fluctuații permanente ale salinității, microorganismele prezintă modificări spațio-temporale ale activității lor. Stresul osmotic creat de modificările bruște ale salinității pot influența metabolismul celular și densitatea bacteriană (Gauthier și colab., 1990, 1991). Adaptarea microorganismelor la condițiile stresului osmotic este datorată unor enzime protectoare care pot crește rata preluării unor compuși osmoprotectori (Lim și colab., 1996).

În figura 7.1 sunt prezentate datele experimentale referitoare la dinamica formării biofilmului în condiții de salinitate diferită. Pe lamele imersate în recipientele cu apă de mare cu o salinitate de 15 g/L se observă o creștere a densității celulelor bacteriene de la valoarea de $12 \cdot 10^2$ celule/mm² la o oră de la imersare, spre o valoare de $25 \cdot 10^2$ celule/mm² după opt ore.

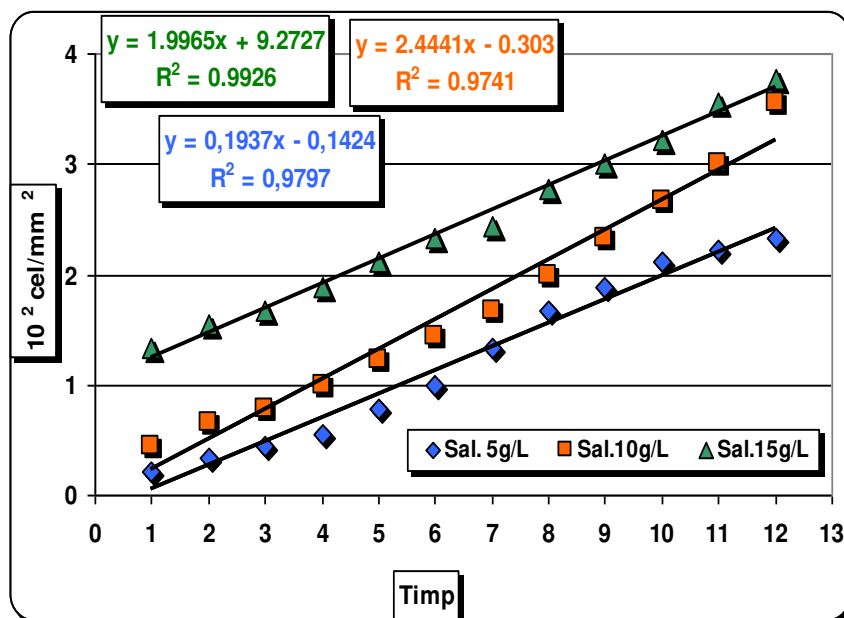


Figura 7.1. Dinamica densității bacteriene în cursul formării biofilmului în recipiente cu apă de mare la salinități variabile (5 g/L, 10 g/L și 15 g/L)

Densitatea celulelor din biofilmele formate la diferite salinități a prezentat o rată de creștere modificată la o salinitate de 5 g/L (panta dreptei 0,19) rata este mai mică decât în cazul biofilmelor formate la salinitatea de 15 g/L (panta dreptei 2,44) și 10 g/L (panta dreptei 1,99). Aceste valori arată că la salinități mai crescute microorganismele colonizează mai rapid suprafețele. De asemenea, coeficientul de linearitate (R) au fost între 0,99 și 0,97 ceea ce demonstrează o creștere lineară progresivă.

În literatura sunt date referitoare la formarea biofilmelor în condiții de salinitate diferită. Pentru studiul colonizării suprafețelor cu bacteria *Bdellovibrio bacteriovorus*, Kelley și colab. (1997) au realizat experimente sub influența unor salinități diferite și au observat existența unei tendințe de colonizare și de formare a biofilmelor pentru valori situate între 34 g/L și 35 g/L. Salinitatea a influențat formarea biofilmelor chiar și la valori situate sub cea de 5 g/L. Astfel la o salinitate de 4 g/L s-a observat o scădere a numărului de celule de la $3,5 \cdot 10^6$ UFC/cm² la valoarea de $3,8 \cdot 10^4$ UFC/cm² după 5 zile de la imersarea suprafețelor în apă.

Rolul salinității (între 12 g/L și 80 g/L) în coroziunea suprafețelor a fost studiat de De Franca și colab. (2000). Ei au utilizat ca substrat oțelul inoxidabil și au evidențiat existența unei creșteri a valorii densității celulare odată cu modificarea salinității probelor de apă de mare. Ulterior, un maxim al coroziunii s-a înregistrat la 35 g/L cu valori ale densității celulelor bacteriene cuprinse între $1,7 \cdot 10^9$ UFC/cm² și $2,1 \cdot 10^9$ UFC/cm² pentru speciile aerobe și anaerobe.

7.2. Influența temperaturii

Temperatura apei poate influența în proporție de circa 55% variația temporală a densității bacteriene (Sommaruga și Conde, 1997, cit. Aonofriesei, 2004). Alte studii indică corelații pozitive între temperatură și creșterea bacteriilor în fază planctonică (Tibes, 1996, Wikner și colab., 1999, cit. Aonofriesei, 2004).

Efectul temperaturii asupra creșterii bacteriene este dependent concentrația nutrienților. Astfel, în mediile și ecosistemele bogate în nutrienți temperatura are un efect nesemnificativ, dar oligotrofe temperatura are un efect semnificativ (Filip și colab., 1996).

În figura 7.2 este prezentată dinamica densității celulelor bacteriene în cursul formării biofilmului pe lame de microscopie la temperatura de 18°C și respectiv de 6°C.

Pentru apa de mare din recipientele ținute la 6°C se observă o creștere progresivă de la valoarea de $0,5 \cdot 10^3$ celule/mm² la o oră de la imersare și o dublare a acesteia după șapte ore la $1,0 \cdot 10^3$ celule/mm², precum și o triplare la $1,5 \cdot 10^3$ celule/mm² după opt ore.

Analiza datelor a evidențiat existența unei dinamici de formare a biofilmelor, astfel că, în cazul biofilmelor formate la 18°C se poate observa la o oră de la imersarea lamelor o valoare a densității celulare de $1,2 \cdot 10^3$ celule/mm², valoare care se dublează după opt ore la $2,5 \cdot 10^3$ celule/mm² și crește progresiv până când are loc o tendință de triplare a densității celulare la o valoare de $3,7 \cdot 10^3$ celule/mm² după 11 ore.

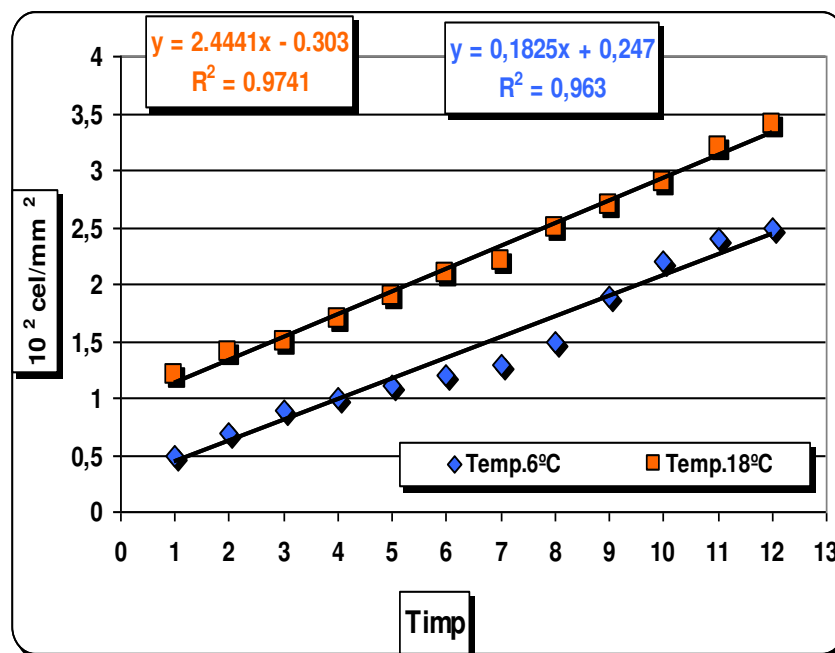


Figura 7.2. Dinamica densității bacteriene în cursul formării biofilmului în recipientele cu apă de mare la temperaturi variabile (6°C și 18°C)

Rogers și colab. (1994) au analizat pe diferite tipuri de suprafețe (cupru, PVC și polibutilen) fenomenul de aderență la diferite temperaturi: 20°C, 40°C, 50°C și 60°C , cu specia *Legionella pneumophila* (specie cu limite largi de toleranță ale temperaturii (între 5,7 și 63°C) și alte tulpini *non-Legionella* pe o perioadă de 21 de zile. S-a observat că tulpinile utilizate au prezentat o creștere logaritmică cu o atingere în faza de creștere a unor valori ale densității de $1,3 \cdot 10^4$ celule/cm² și $7,56 \cdot 10^4$ celule/cm² pe suprafața polibutilenei și PVC pentru tulpinile de *non-Legionella* la 20°C și de $4,25 \cdot 10^4$ celule/cm² pe suprafața polibutilenului la 60°C. Este evidentă o colonizare mai intensă a suprafețelor hidrofobe la 20°C față de 60°C când are loc o scădere a numărului de celule bacteriene datorită depășirii temperaturii optime de dezvoltare.

Kelley și colab. (1997) au realizat experimente privind colonizarea suprafețelor cu *Bdellovibrio bacteriovorus* sub influența unor temperaturi diferite (între 4°C și 29° C), utilizând ca substrat valvele de scoică, sticlă și polistiren. Au observat existența unei corelații pozitive în cazul temperaturii și în procesul de formare a biofilmelor, cu o asociere maximă a celulelor din biofilme la 18°C și una minimă la 14°C, precum și o scădere semnificativă a densității la temperaturi de sub 5°C, după o perioadă de 24 de ore. Aceasta perioadă este urmată ulterior de o creștere progresivă a valorilor densității până la 120 de ore .

Di Bonaventura și colab. (2007^b) au analizat capacitatea unor izolate de *Stenotrophomonas maltophilia* de a forma biofilme, în condiții variabile de temperatură (18°C, 32°C, 37°C). Prin intermediul unor probele experimentale cu tulpini diferite s-a observat o creștere a densității celulelor bacteriene prezente în biofilme, în special pentru tulpinile expuse la o temperatură de 32°C timp o zi la acțiunea unei cantități de 0,680 infuzie creier-inimă (ICI) comparativ cu cele expuse la o temperatură de 18°C (0,557 ICI) și respectiv 37°C (0,491 ICI). În ceea ce privește distribuția celulelor bacteriene din tulpinile utilizate, temperatura nu a modificat-o semnificativ, astfel distribuția acestora a fost de 82 % pentru tulpinile care au format biofilme și doar 2% pentru cele care nu au format biofilme. O tulpină a format biofilme doar la 18°C și două tulpini doar la 32°C.

7.3. Influența dinamicii mediului de cultură (apă de mare)

Biofilmele au fost analizate în condiții hidrodinamice variate (circuitul laminar sau turbulent) și s-a observat că acestea reacționează în mod diferit la condițiile dinamice alterate. Viteza circuitului de apă sau hidrodinamica influențează structura biofilmului și induce modificări asupra biofilmului. Cele care se formează în circuitul lamelar sunt fragmentate și

prezintă agregate de celule cu aspect rugos, separate prin spații interstițiale. Biofilmele formate în condiții de circuit turbulent sunt de asemenea fragmentate, dar au forme variate și alungite care ajung și în lichidul din jurul biofilmului (Kokare, 2009).

Lamele din sticlă din recipiente și recipientele cu circuit au fost examinate la microscop și după numărarea câmpurilor s-a observat o creștere progresivă a densității celulare în cazul biofilmelor formate în apa de mare din recipiente, de la valoarea de $1,2 \cdot 10^3$ celule/mm², la o oră de la imersare la $2,5 \cdot 10^3$ celule/mm², la opt ore și o triplare a valorii acesteia după 16 ore de la imersarea suprafețelor, figura 7.3.

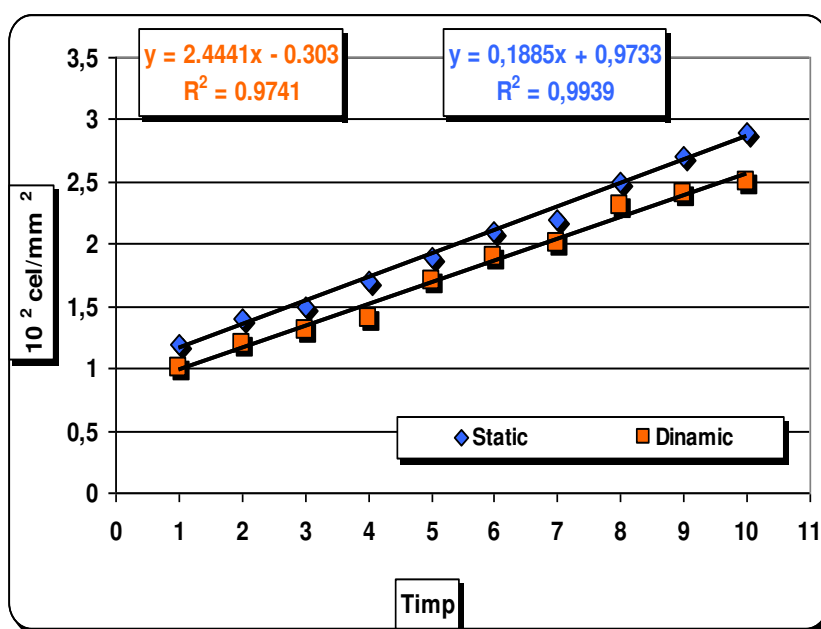


Figura 7.3. Dinamica densității bacteriene în cursul formării biofilmului în recipiente în condiții statice și dinamice

Modificările densității celulelor din biofilme au fost determinate de o rata de creștere a procariotelor marine mai rapidă, panta fiind de 2,44 pentru lamele de microscopie imersate în recipiente (static) comparativ cu valoarea de 0,18 obținută în cazul recipiente cu circuit în regim dinamic.

Valorile densității celulare obținute în experimente sunt mai scăzute față de cele obținute de Rijnaarts și colab. (1993) care, în condiții asemănătoare au observat o creștere a densității bacteriene între $5 \cdot 10^4$ celule/cm² - $1,6 \cdot 10^7$ celule/cm², în condiții statice și $5 \cdot 10^4$ celule/cm² - $3,6 \cdot 10^7$ celule/cm² pentru condițiile dinamice. Diferența foarte mare poate fi datorată vitezei de recirculare a apei, care într-un ritm mai lent permite un aport de substanțe pentru celulele biofilmului, dar și o fixare mai bună pe suprafețele de probă.

Astfel de experimente în condiții statice și dinamice s-au realizat și *in situ* de către Casse și Swan (2006) care au obținut un procent mai mare cu 80% în cazul densității celulelor bacteriene formate pe suprafețe imersate în condiții statice, comparativ cu densitățile celulelor fixate pe suprafețe imersate fără aplicarea unor substanțe antifling în condițiile dinamice ale mediului marin.

7.4. Efectul substanțelor organice asupra creșterii totale a celulelor din biofilme

Procariotele marine planctonice pot prezenta anumite modificări. Ele se pot fixa pe suprafețele solide și pot încorpora particule organice, unele chiar cu un înalt grad de selectivitate față de aceste componente, astfel că multe dintre ele în stadiul sesil capătă dimensiuni mai mari comparativ cu forma lor planctonică (Münster și Chrost, 1990).

Din datele obținute în proba martor, fără suplimentare cu materie organică a rezultat o densitate bacteriană totală de $41,4 \cdot 10^3$ celule/mm². Ulterior suplimentarea apei de mare cu o cantitate mică de amestec de aminoacizi de 3 mg/L, a influențat metabolismul bacterian și valoarea densității celulare a fost de $50,6 \cdot 10^3$ celule/mm². Utilizarea unei concentrații mai mari de 5 mg/L de amestec de aminoacizi determină o densitate totală de $56,3 \cdot 10^3$ celule/mm². Creșterea a fost chiar mai mare în cazul suplimentării cu 7 mg/L de amestec, astfel încât densitatea bacteriană a fost de $69,4 \cdot 10^3$ celule/mm², urmând ca la o cantitate mai crescută de 9 mg/L densitatea să fie de $83,2 \cdot 10^3$ celule/mm² (figura 7.4).

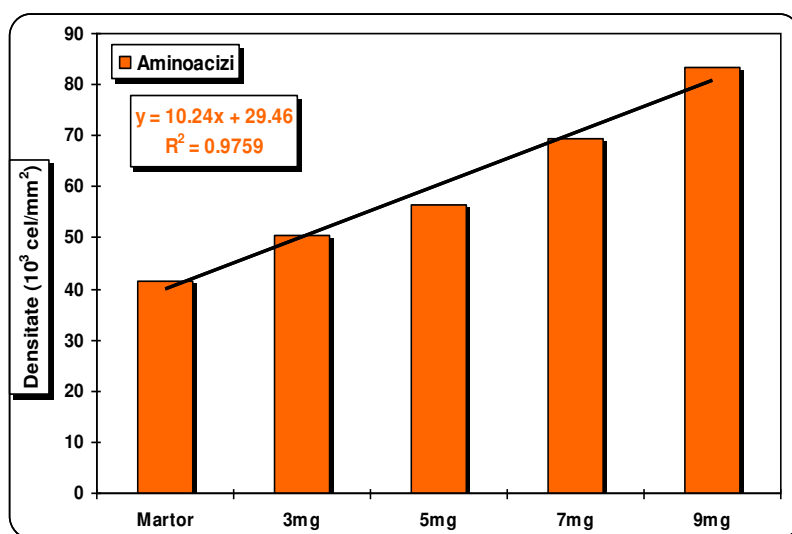


Figura 7.4. Densitatea bacteriană finală după 72 de ore în recipiente cu diferite concentrații ale amestecului de aminoacizi

O altă sursă de proteine utilizată a fost triptona, care este o sursă de azot pentru procariotele marine.

În proba martor, fără suplimentare cu materie organică, s-a determinat o densitate bacteriană totală de $39,5 \cdot 10^3$ celule/mm². Ulterior suplimentarea apei de mare cu o cantitate mică de amestec de aminoacizi de 3 mg/L, a influențat metabolismul bacterian, iar valoarea densității celulare a fost de $46,4 \cdot 10^3$ celule/mm². Utilizarea unei concentrații de 5 mg/L triptonă a determinat o densitate totală de $57,1 \cdot 10^3$ celule/mm². Creșterea a fost chiar mai ridicată în cazurile suplimentării cu 7 mg/L de amestec, când densitatea bacteriană a fost de $69,4 \cdot 10^3$ celule/mm² și respectiv la cantitatea de 9 mg/L, densitatea să fie de $78,3 \cdot 10^3$ celule/mm² (figura 7.5).

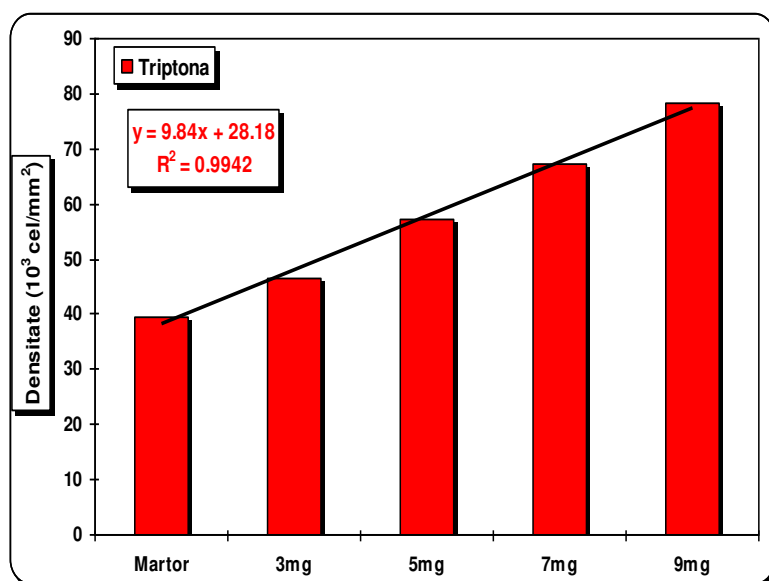


Figura 7.5. Densitatea bacteriană finală după 72 de ore în recipiente cu diferite concentrații ale triptonei

Pe baza comparației valorilor densității celulare se observă o serie de diferențe între proba martor și cele suplimentate cu amestecul de aminoacizi, astfel că o suplimentare cu 3 mg/L a determinat o diferență de $9,2 \cdot 10^3$ celule/mm², iar creșterea procariotelor fiind de 22,3% din valoarea inițială a densității celulelor pe suprafețe, pe când la adăugarea a 5 mg/L a determinat o diferență de $14,9 \cdot 10^3$ celule/mm², cu o valoare de 36,2% din valoarea inițială. Pentru probele suplimentate cu o cantitate mai mare de amestec, de 7 mg/L diferența a fost de $28 \cdot 10^3$ celule/mm², cu o valoare de 68,12% din creșterea inițială și de 9 mg/L, când diferența a fost de $41,4 \cdot 10^3$ celule/mm², ceea ce a determinat o creștere a densității celulelor cu peste 101,7% din valoarea inițială de $41,4 \cdot 10^3$ celule/mm².

Glucoza este un zahăr simplu (monozaharid) și reprezintă cea mai importantă sursă de energie pentru metabolismul celular, inclusiv respirația celulară.

În proba martor, fără suplimentare cu materie organică a rezultat o densitate bacteriană totală de $39 \cdot 10^3$ celule/mm². Ulterior suplimentarea apei de mare cu o cantitate mică de glucoză de 3 mg/L, a influențat metabolismul bacterian și valoarea densității celulare a fost de $45 \cdot 10^3$ celule/mm². Utilizarea unei concentrații mai mari de 5 mg/L de glucoză determină o densitate totală de $51 \cdot 10^3$ celule/mm². Creșterea a fost chiar mai mare în cazurile suplimentării cu 7 mg/L de glucoză, când densitatea bacteriană a fost de $64 \cdot 10^3$ celule/mm², urmând ca la o cantitate de 9 mg/L densitatea să fie $70 \cdot 10^3$ celule/mm² (Figura 7.6).

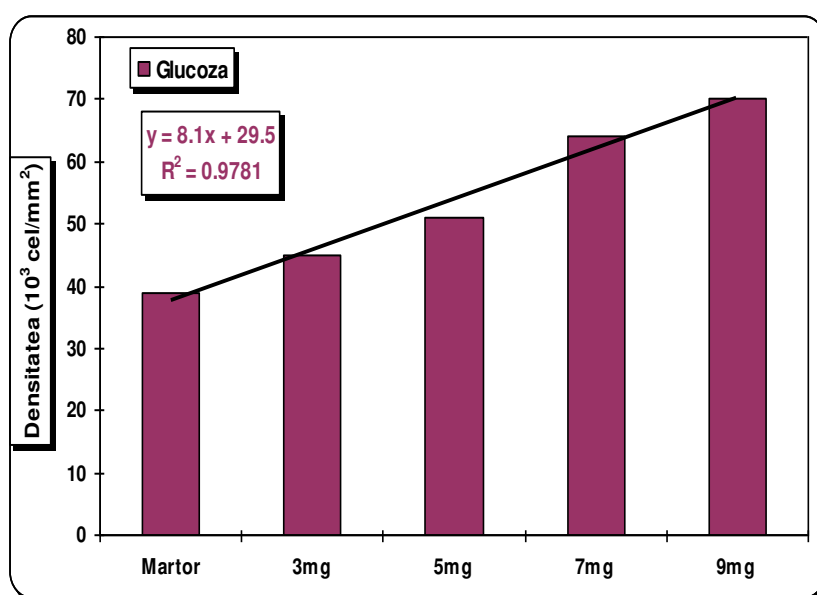


Figura 7.6. Densitatea bacteriană finală după 72 de ore în recipiente cu diferite concentrații ale glucozei

Un procent mai redus de procariote marine sunt capabile să folosească glucide de tipul polizaharidelor (amidon), deoarece amidonul nu este o sursă de energie la fel de ușor catabolizabilă precum glucoza.

În proba martor, fără suplimentare cu amidon densitatea bacteriană totală de a fost de $40 \cdot 10^3$ celule/mm². Suplimentarea apei de mare cu o cantitate mică de amidon de doar 3 mg/L, a influențat metabolismul bacterian și valoarea densității celulare a fost de $43 \cdot 10^3$ celule/mm². Utilizarea unei concentrații mai mari de 5 mg/L de amidon a determinat o densitate totală a procariotelor de $50 \cdot 10^3$ celule/mm². Creșterea a fost chiar mai mare în cazurile suplimentării cu 7 mg/L de amidon, astfel că densitatea bacteriană a fost de $58 \cdot 10^3$ celule/mm², urmând ca la o cantitate crescută de 9 mg/L densitatea să fie $67 \cdot 10^3$ celule/mm² (figura 7.7).

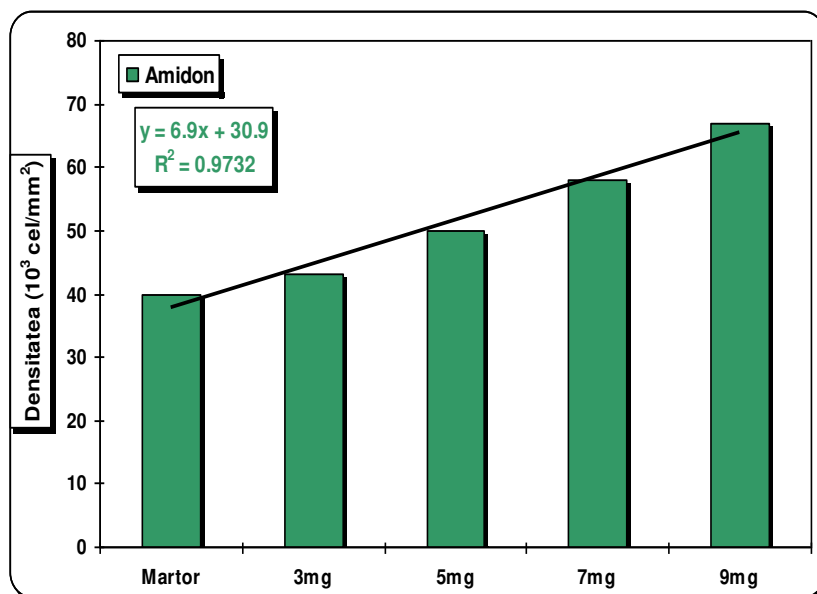


Figura 7.7. Densitatea bacteriană finală după 72 de ore în recipiente cu diferite concentrații ale amidonului

Pe baza comparației valorilor densității celulare se observă o serie de diferențe între proba martor și cele suplimentate cu amidon, astfel o suplimentare cu 3 mg/L a determinat o diferență de $6,9 \cdot 10^3$ celule/mm² și creșterea procariotelor de 15,3% din valoarea inițială a densității celulelor pe suprafețe, suplimentarea cu 5 mg/L determină o diferență de $12 \cdot 10^3$ celule/mm² cu o valoare de 30,7% din valoarea inițială. Pentru probele suplimentate cu o cantitate mai mare de glucoză de 7 mg/L, diferența a fost de $25 \cdot 10^3$ celule/mm², reprezentând 64,1% din creșterea inițială când s-au adăugat de 9 mg/L, diferența a fost de $17,6 \cdot 10^3$ celule/mm² ceea ce a determinat o creștere a densității celulare cu peste 79,4% din valoarea inițială de $39 \cdot 10^3$ celule/mm²

Panta de creștere a densității celulare a fost de peste 8,1 pentru glucoză și de 6,9 pentru amidon pentru biofilmele formate, coeficientul de linearitate a fost la fel de 0,97.

Extractul de levură este un produs hidrosolubil, care conține un procent ridicat de vitamine din complexul B pe lângă alte elemente și este utilizat în bacteriologie ca un excelent stimulator al creșterii bacteriene, dar valorile obținute de noi au fost mult mai mici comparativ cu cele obținute cu alte tipuri de substanțe organice adăugate în apa de mare.

În proba martor, fără suplimentare cu extract de levură, densitatea bacteriană totală este de $39,7 \cdot 10^3$ celule/mm². Ulterior suplimentarea apei de mare cu o cantitate mică de 3 mg/L extract de levură, a influențat metabolismul bacterian, iar valoarea densității a fost de $42,8 \cdot 10^3$ celule/mm². Utilizarea unei concentrații mai mari de 5 mg/L determină o densitate totală de $48,9 \cdot 10^3$ celule/mm². Creșterea a fost chiar mai mare în cazurile suplimentării cu 7 mg/L

de extract de levură, astfel încât densitatea bacteriană a fost de $53,5 \cdot 10^3$ celule/mm², urmând ca la o cantitate de 9 mg/L densitatea să fie de $83,2 \cdot 10^3$ celule/mm² (figura 7.14).

Comparând valorile densității celulare se observă o serie de diferențe între proba martor și cele suplimentate cu extract de levură, astfel că o suplimentare cu 3 mg/L a determinat o diferență de $2,5 \cdot 10^3$ celule/mm² și o creștere a procariotelor de 22,3% din valoarea inițială a densității celulelor pe suprafețe, pe când adăugarea de 5 mg/L a determinat o diferență de $9,2 \cdot 10^3$ celule/mm² cu o valoare de 36,2% din valoarea inițială. Pentru probele suplimentate cu o cantitate mai mare, de 7 mg/L, diferența a fost de $13,8 \cdot 10^3$ celule/mm², cu o valoare de 68,12% din creșterea inițială, iar în cazul adăugării de 9 mg/L, diferența să ajungă la $31 \cdot 10^3$ celule/mm², aceasta determinând o creștere a densității celulare cu peste 101,7% din valoarea inițială de $26,8 \cdot 10^3$ celule/mm² (figura 7.8).

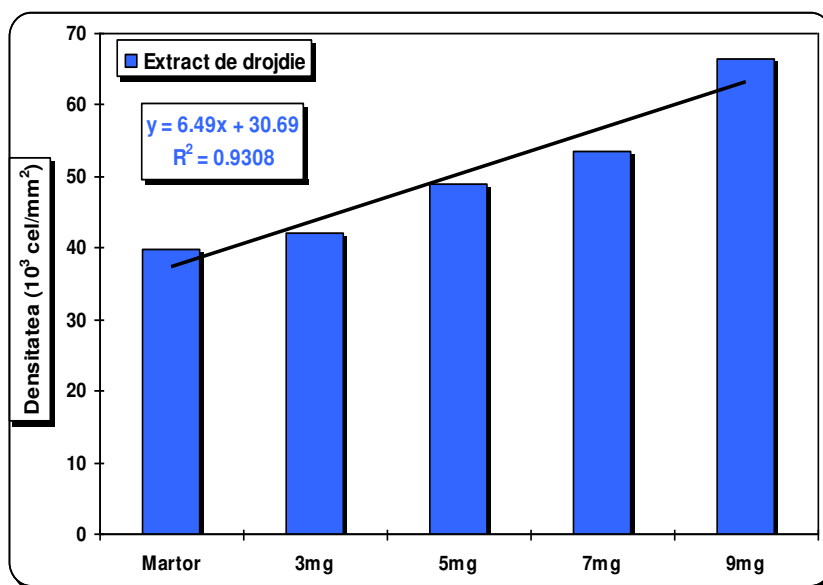


Figura 7.8. Densitatea bacteriană finală după 72 de ore în recipiente cu diferite concentrații ale extractului de levură

Progresia de creștere a densității celulare a fost de peste 6,49 pentru biofilmele formate, iar coeficientul de linearitate a fost 0,93.

Din datele prelucrate statistic a reieșit că densitatea bacteriană totală după suplimentarea cu substanțe organice a fost de $25,8 \cdot 10^3$ celule/mm² în amestecul de aminoacizi, de $24,9 \cdot 10^3$ celule/mm² pentru triptonă și de $21,1 \cdot 10^3$ celule/mm² pentru extractul de levură. În cazul adăugării de glucide densitatea bacteriană a fost de $23 \cdot 10^3$ celule/mm² pentru glucoză și de $21,8 \cdot 10^3$ celule/mm² pentru amidon.

7.5. Influența substratului

În general orice material care intra în contact direct cu diferite lichide care conțin bacterii, poate deveni un substrat pentru formarea biofilmelor. Suprafețele pot avea o serie de caracteristicile fizico-chimice care influențează rata de aderență și gradul de extindere al microorganismelor pe substrat. Aceste proprietăți includ suprafața disponibilă, hidrofobicitatea, energia de suprafață, toxicitatea sau caracterul de nutrient al compușilor desprinși de pe substrat și o serie de defecte fizice cum ar fi: structura granulară a suprafeței, adânciturile, ridicăturile, fisuri (Donlan și Costerton 2002). La baza biofilmelor dezvoltate pe substraturilor inerte, celulele bacteriene sunt mai înfometate comparativ cu cele fixate pe substrat celular, astfel moartea și autoliza celulelor bazale, producerea de gaze în grosimea biofilmului contribuie la destabilizarea acestuia și la detașarea de fragmente, responsabile de diseminările la distanță (Lazăr, 2003).

Procariotele marine s-au fixat pe diferitele tipuri de suprafețe artificiale hidrofile și hidrofobe în condiții variabile de temperatură, statice sau dinamice formând biofilme.

În primele șase ore s-a observat o creștere evidentă pe ambele tipuri de suprafețe artificiale utilizate în experiment, următoarea serie de experimente s-a realizat pentru a analiza influența temperaturii și a fenomenului de hidrofobicitate asupra formării biofilmelor bacteriene în condiții *in vitro*.

Un prim tip de experiment a fost realizat pentru a urmări modificările aderenței celulare la un interval de recoltare de o oră la temperatura camerei (23°C). Inițial pe suprafața hidrofilă a sticlei la o oră creșterea este de $1,67 \cdot 10^3$ celule/mm², urmând ca după trei ore densitatea bacteriană să atingă valoarea de $3,05 \cdot 10^3$ celule/mm² și după un interval de șase ore creșterea să atingă valoarea de $4,86 \cdot 10^3$ celule/mm² (figura 7.9).

Pe suprafața hidrofobă a parafilmului densitatea bacteriană a atins inițial valoarea de $2,59 \cdot 10^3$ celule/mm² și după un interval de patru ore ajungându-se la valoarea de $5,07 \cdot 10^3$ celule/mm², iar la intervalul de șase ore de la recoltare, se ajunge la o valoare de $6,08 \cdot 10^3$ celule/mm² (figura 7.9).

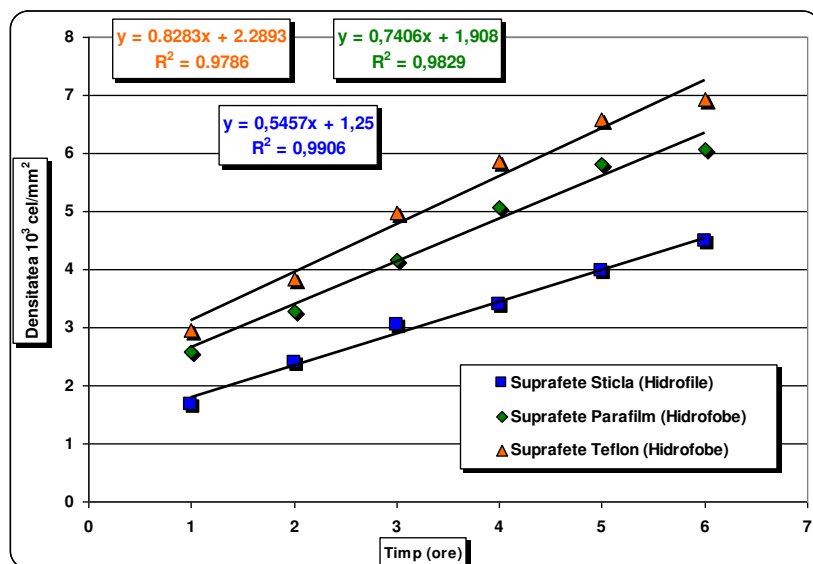


Figura 7.9. Dinamica densității bacteriene în cursul formării biofilmului la 23°C în recipiente pe suprafețe hidrofile (sticlă) și hidrofobe (parafilm, teflon)

În cazul filmului de teflon densitatea bacteriană a atins inițial valoarea de $2,96 \cdot 10^3$ celule/mm², urmând ca după un interval de patru ore să apară o dublare a creșterii bacteriene la valoarea de $4,5 \cdot 10^3$ celule/mm².

Valorile coeficientului de linearitate (R) au fost cuprinse între 0,99 și 0,97 ceea ce demonstrează o creștere liniară progresivă, panta dreptei a fost de 0,54 în cazul sticlei, de 0,74 pentru parafilm și respectiv de 0,82 pentru teflon, aceste valori demonstrând o variație a valorilor densității între cele trei tipuri de suprafețe.

Pentru a observa influența temperaturii s-a realizat un al doilea experiment la o temperatură constantă mai scăzută de 18°C, iar intervalul de recoltare a crescut la opt ore de imersare pe suprafețele hidrofile și hidrofobe.

În cazul suprafeței din sticlă procariotele prezintă inițial o densitate de $1,11 \cdot 10^3$ celule/mm², urmând ca după un interval de patru ore să apară o dublare a numărului de celule bacteriene aderente la valoarea de $2,89 \cdot 10^3$ celule/mm² și după un interval de șase ore apare o triplare a valorii inițiale la $3,88 \cdot 10^3$ celule/mm², urmând ca după un interval de opt ore densitatea să atingă valoarea de $4,86 \cdot 10^3$ celule/mm². Această valoare este apropiată de cea obținută la temperatura de 23°C, la intervalul de șase ore (figura 7.10).

Pe suprafața parafilmului în condițiile de temperatură constantă s-a observat inițial o creștere a densității de $1,79 \cdot 10^3$ celule/mm², după un interval de trei-patru ore când are loc o dublare a creșterii bacteriene ce atinge valoarea de $4,12 \cdot 10^3$ celule/mm², urmând ca după șapte ore să apară o triplare la valoarea de $5,85 \cdot 10^3$ celule/mm², iar valoarea obținută după

intervalul de opt de $6,28 \cdot 10^3$ celule/mm² să fie din nou apropiată de cea de la intervalul de șase ore în cazul experimentului realizat la temperatura camerei (figura 7.10).

Filmul de teflon a prezentat cele mai mari valori ale densității, de la o valoare inițială de $2,14 \cdot 10^3$ celule/mm² la o dublare a acesteia după un interval de patru ore, la valoarea de $4,83 \cdot 10^3$ celule/mm² și o triplare la un interval de șapte ore de la recoltare la valoarea de $6,57 \cdot 10^3$ celule/mm², urmând ca după un interval de opt ore densitatea bacteriană să ajungă la $7,18 \cdot 10^3$ celule/mm², valoare apropiată la intervalul de șase ore la temperatura de 23°C de $5,86 \cdot 10^3$ celule/mm² (figura 7.10).

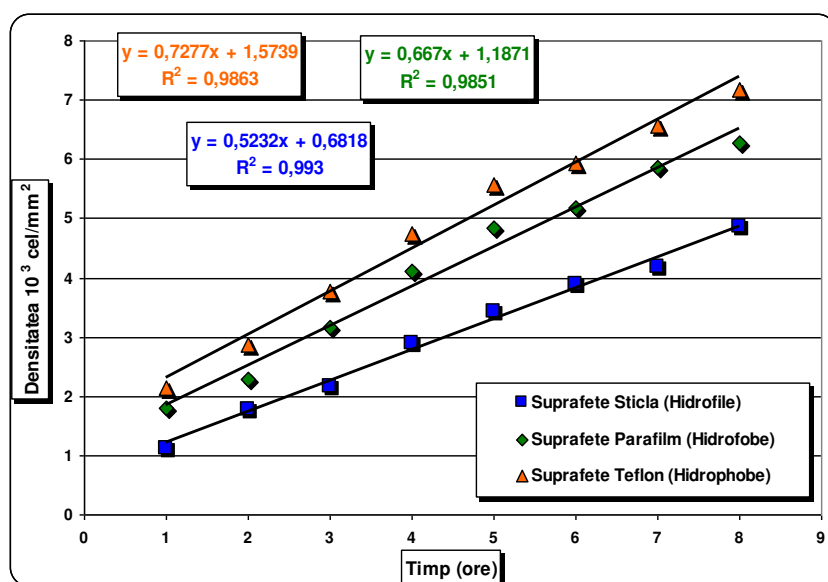


Figura 7.10. Dinamica densității bacteriene în cursul formării biofilmului la 18°C în recipiente (cutii de depozitare) pe suprafețe hidrofile (sticlă) și hidrofobe (parafilm, teflon)

În condiții de temperatură constantă, coeficientul de linearitate (R) a fost cuprins între 0,98 și 0,99 ceea ce demonstrează o creștere liniară progresivă, panta dreptei fiind de 0,52 în cazul sticlei, de 0,66 pentru parafilm și respectiv de 0,72 pentru teflon, aceste valori prezentând creștere constantă a pantei între cele trei tipuri de suprafețe, un factor de influență fiind temperatura. Araujo și colab. (2004) au investigat biofilmele anaerobe formate pe suprafața hidrofobă a polipropilenei și pe suprafața hidrofilă a sticlei în interiorul dispozitivului Robbins modificat (DRM).

După prima zi de creștere biofilmul bacterian format este de $4,6 \cdot 10^4$ celule/mm² pe suprafața polipropilenei, comparativ cu suprafața sticlei unde biofilmul format a avut o densitate de $8,2 \cdot 10^3$ celule/mm². Totuși după nouă zile, valorile au fost similare de $6,3 \cdot 10^5$ celule/mm² pentru polipropilena și de $7,2 \cdot 10^5$ celule/mm², în cazul sticlei. Datele obținute

arată că biofilmele nu sunt influențate major de hidrofobicitate în cazul obținerii acestora cu ajutorul dispozitivului Robbins (DRM) - (Araujo și colab., 2004).

Au fost efectuate experimente privind colonizarea suprafețelor cu *Bdellovibrio bacteriovorus* utilizând ca substrat valvele de scoică, sticlă și polistiren (Kelley și colab., 1997). Acești autori au observat existența unei corelații pozitive în cazul factorului temperatură și formarea de biofilme, cu o asociere maximă a celulelor din biofilme la 18°C și una minimă la 14°C precum și o scădere semnificativă a densității la temperaturi sub 5°C, după o perioadă de 24 ore, este urmată de o creștere progresivă a valorii densității, după 120 de ore de la începutul experimentelor. Valorile obținute au demonstrat o creștere a numărului celulelor aderente de la valoarea de $1,1 \cdot 10^5$ UFC/cm² la $1,4 \cdot 10^5$ UFC/cm² pentru valvele de scoică, de $1,7 \cdot 10^3$ UFC/cm² și de $1,8 \cdot 10^4$ UFC/cm² pentru sticlă și de $5,4 \cdot 10^3$ UFC/cm² și de $1,0 \cdot 10^4$ UFC/cm² pentru polietilenă (Kelley și colab., 1997).

Chavant și colab. (2002) au analizat influența a diferite tipuri de suprafețe folosind mediul MCDB 202 ca supliment și au obținut valori de 10^7 UFC/cm² după două ore de la contactul procariotelor cu suprafețele studiate. Inițial, la 37°C pe suprafața oțelului inoxidabil s-a obținut de la 0,2 la 0,6 unit log, iar pe suprafața teflonului la 20°C valorile au fost mai crescute de la 0,4 la 0,5 unit. log, exceptând temperatura de 8°C pe suprafața teflonului, numărul procariotelor a fost mai crescut (0,4 – 1,4 unit. log). Valorile maxime ale aderenței au fost atinse după una, două, cinci sau șapte zile în cazul celor două suprafețe la temperaturile de 37°C, 20°C, respectiv 8°C. La 37°C și 8°C se observă o creștere mai evidentă pe suprafața oțelului inoxidabil față de teflon.

În primele 48 de ore la 20°C s-a observat exact situația opusă, iar după acest termen populația de procariote pe teflon descrește și cea de pe oțelul inoxidabil a crescut ușor. La temperaturi mai reduse se observă o reducere a populației de procariote aderente mai evident pe suprafața teflonului (Chavant și colab., 2002).

În condițiile inoculării cu procariote în fază de *lag* sau staționară, la temperaturi variabile, nu s-au observat diferențe în capacitatea de colonizare, dar apar diferențe clare între suprafețele hidrofile și hidrofobe. Densitatea bacteriană a fost de 10^8 UFC/cm² pentru oțelul inoxidabil, la temperaturi de la 15°C la 37°C, dar și la 48 de ore creșterea nu scade sub 10^7 UFC/cm². Densitatea pe suprafața teflonului este mai crescută decât pe oțelul inoxidabil de 10^8 UFC/cm² la temperaturi între 18°C și 30°C, după 24 de ore sau patru zile. După această perioadă apar valori ușor mai reduse în cazul acestor temperaturi (Cerca și colab., 2005).

Datele din literatura de specialitate confirmă existența unei creșteri a densității bacteriene în funcție de timpul de expunere a suprafețelor la mediul lichid și creșterea valorii

temperaturii mediului. Astfel, la 18°C se observă un optim al creșterii bacteriene până la temperaturi de 25°C- 30°C. Dar creșterea temperaturii peste 35°C, 40°C, 50°C afectează formarea biofilmelor, deoarece se depășesc limitele optime de supraviețuire ale unor specii bacteriene (Zarnea, 1994).

În condițiile mediului marin, dinamismul apei este un factor extrem de important care influențează fenomenul de aderență bacteriană. Pentru realizarea unor condiții dinamice *in vitro* s-au utilizat recipiente cu circuit care reprezintă cel mai corespunzător tip de instalație pentru experimentele de laborator.

Analiza suprafețelor a evidențiat o creștere bacteriană progresivă, dar valorile densității obținute au fost mult mai scăzute decât cele obținute în condiții statice la temperatura camerei datorită circuitului continuu al apei de mare.

Pe suprafața sticlei, inițial, se observă o valoare a densității de $0,85 \cdot 10^3$ celule/mm², urmând ca, după un interval de două - trei ore să apară o dublare a creșterii la valoarea de $1,87 \cdot 10^3$ celule/mm² și după intervalul de patru ore apare o triplare a valorii inițiale la $2,74 \cdot 10^3$ celule/mm², ca la intervalul de șase ore valoarea densității bacteriene să fie de $3,76 \cdot 10^3$ celule/mm² (figura 7.11).

În cazul parafilmului se observă o creștere inițială de $1,64 \cdot 10^3$ celule/mm², după un interval de trei-patru ore are loc o dublare la valoarea de $4,01 \cdot 10^3$ celule/mm², iar după intervalul de șase ore se ajunge la valoarea de $5,02 \cdot 10^3$ celule/mm² (figura 7.11).

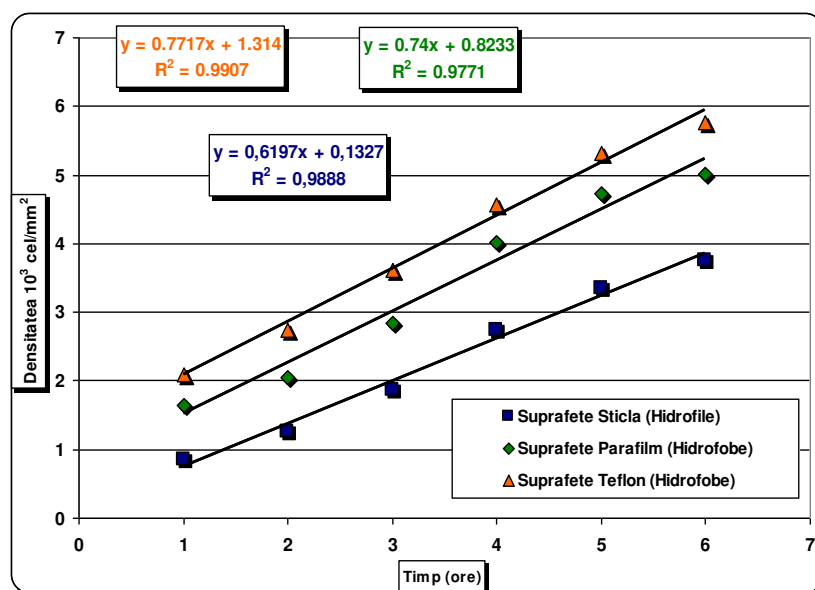


Figura 7.11. Dinamica densității bacteriene în cursul formării biofilmului în recipiente cu circuit pe suprafețe hidrofile (sticlă) și hidrofobe (parafilm, teflon)

Filmul de teflon a prezentat cele mai mari valori ale densității, de la o valoare inițială de $2,1 \cdot 10^3$ celule/mm² la o dublare a acesteia după un interval de patru ore, la valoarea de $4,56 \cdot 10^3$ celule/mm² și o triplare la un interval de șapte ore de la recoltare la valoarea de $5,76 \cdot 10^3$ celule/mm² (figura 7.11).

În condiții dinamice (recipient cu circuit), coeficientul de linearitate (R) a fost cuprins între 0,98 și 0,99 ceea ce demonstrează o creștere liniară progresivă, panta dreptei fiind de 0,61 în cazul sticlei, de 0,74 pentru parafilm și respectiv de 0,77 pentru teflon, aceste valori prezentând creștere constantă a pantei între cele trei tipuri de suprafețe.

CAPITOLUL VIII

DINAMICA FORMĂRII BIOFILMELOR *IN VITRO* LA INTERFAȚA AER – LICHID

Interfața aer-lichid asigură condiții diferite, aceasta este o interfață cu proprietăți fizico-chimice speciale, concentrații ale unor anumite tipuri de nutrienți și frecvent există cantități mari de radiații. Organismele care trăiesc în această nișă au adaptări la aceste condiții și prezintă caracteristici care le permit să populeze aceste zone (Henk, 2003).

8.1. Influența salinității asupra bacterioneustonului

Biofilmele formate au fost analizate în de monostrat, ideal pentru analiza la microscopul cu epifluorescență și formarea bacterioneustonului în condiții *in vitro* reprezintă un proces complex care poate fi influențat de modificarea unor parametri fizico-chimici, cu influență majoră asupra migrației bacteriilor planctonice spre interfața aer-lichid.

În urma analizei suprafețelor de probă se observă o creștere a densității celulelor bacteriene din structura bacterioneustonului în primele faze experimentale prin variația salinității și a temperaturii în condiții de laborator în recipiente.

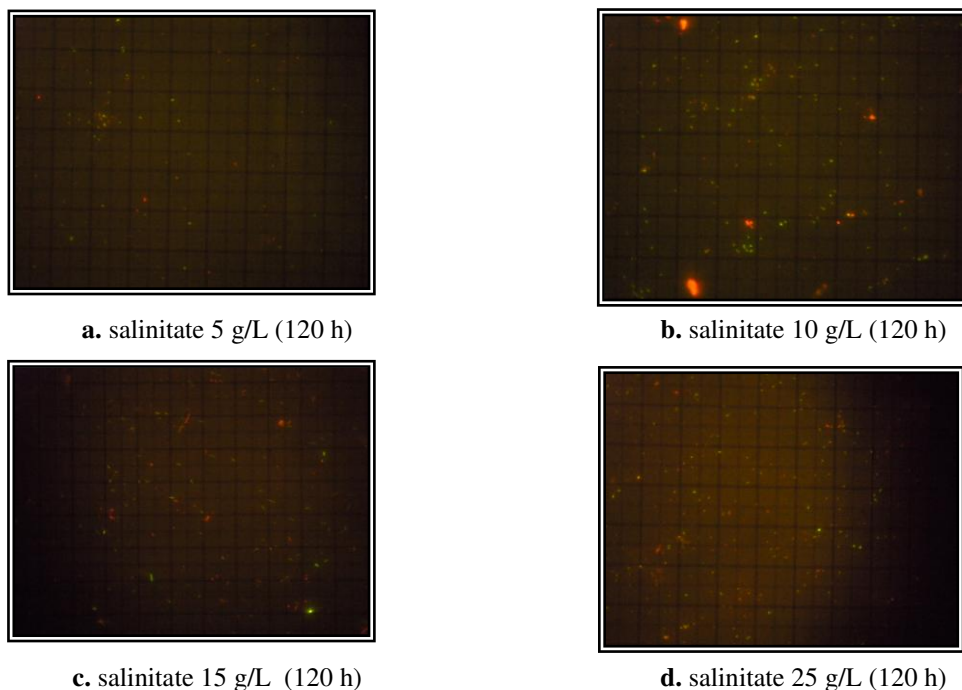


Figura 8.1. Imagini ale procariotelor marine din structura bacterioneustonului la microscopul cu epifluorescență (suprafața pătratului de $50 \mu\text{m}^2$)

În figura 8.1 sunt prezentate imagini ale bacterioneustonului format după 120 de ore de la inițierea experimentului în condiții de laborator în recipiente cu salinități diferite.

La începutul experimentelor noastre în proba cu salinitate de 5 g/L, după două ore de la imersare, bacteriile sunt în număr redus și după intervalul de 120 de ore bacteriile prezintă o densitate ridicată (figura 8.1a). Densitatea celulară a fost mai ridicată în cazul salinității de 25 g/L (figura 8.1b – 8.1d) și al temperaturii de 23°C .

Dinamica densității celulare este prezentată în figura 8.2 constatându-se următoarele:

La salinitatea scăzută de 5 g/L a apei de mare se observă după două ore o densitate de $0,82 \cdot 10^2$ celule/ mm^2 , după 24 de ore densitatea a fost $3,27 \cdot 10^2$ celule/ mm^2 , când se observă un maxim al creșterii celulare de $4,12 \cdot 10^2$ celule/ mm^2 , ulterior la 72 de ore densitatea a fost $6,24 \cdot 10^3$ celule/ mm^2 (figura 8.2).

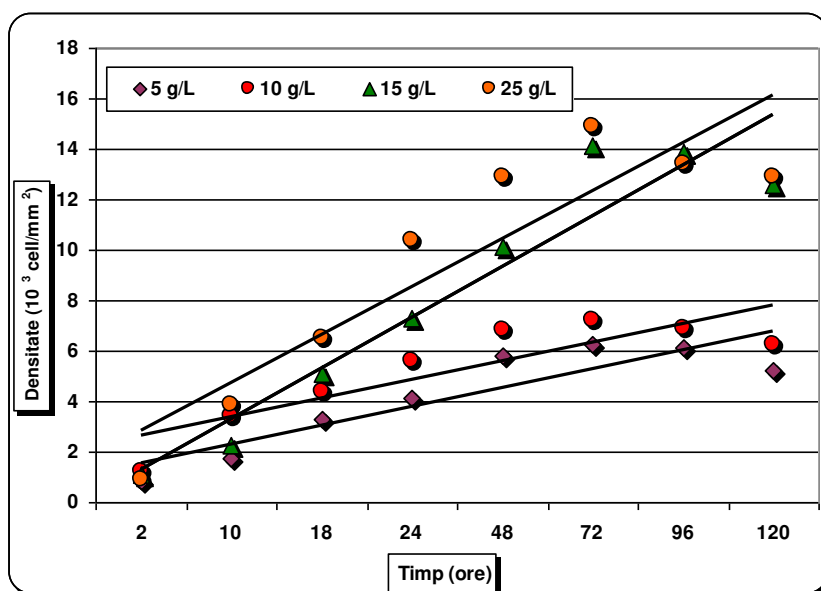


Figura 8.2. Dinamica densității bacteriene în cursul formării bacterioneustonului în recipiente (cutii de depozitare) cu apă de mare la o salinitate variabilă (5 g/L, 10 g/L, 15 g/L și 25 g/L)

În recipientul cu salinitatea medie de 10 g/L a apei de mare se observă o densitate de $1,22 \cdot 10^3$ celule/mm² (după două ore), densitatea a fost de $4,37 \cdot 10^3$ celule/mm² (după 18 ore), de $5,62 \cdot 10^3$ celule/mm² (la 24 de ore), când se observă un maxim al creșterii celulare, ulterior densitatea a fost $7,24 \cdot 10^3$ celule/mm² (72 de ore) - (figura 8.2).

Coeficienții R de linearitate au fost mai scăzuți la 48 de ore de 0,98 pentru salinitatea de 5 g/L, iar în cazul modificării acesteia la valoarea de 10 g/L coeficientul a fost de 0,97. De asemenea, valoarea pantei y a fost mai scăzută de 1,15 față de 2,59.

La o altă valoare medie a salinității de 15 g/L a apei de mare se observă o densitate de $1,12 \cdot 10^3$ celule/mm² (după două ore), densitatea a fost $5,11 \cdot 10^3$ celule/mm² (după 18 ore), când se observă un maxim al creșterii celulare de $7,29 \cdot 10^3$ celule/mm² (24 de ore), densitatea fiind de $7,24 \cdot 10^3$ celule/mm² (72 de ore) (figura 8.2).

La salinitatea ridicată de 25 g/L a apei de mare se observă după două ore o densitate de $0,92 \cdot 10^3$ celule/mm², după 18 ore densitatea a fost de $6,4 \cdot 10^3$ celule/mm², când se observă un maxim al creșterii celulare de $10,39 \cdot 10^3$ celule/mm², ulterior la 72 de ore densitatea a fost de $14,90 \cdot 10^3$ celule/mm² (figura 8.2).

Coeficienții R de linearitate au fost mai scăzuți de 0,96 în cazul modificării salinității la 15 g/L. De asemenea, valoarea pantei y a fost mai scăzută de (2,62) față de (2,88) pentru salinitatea de 25 g/L la 48 de ore.

8.2. Influența temperaturii asupra bacterioneustonului

La temperatura scăzută de 6°C a apei de mare se observă după două ore o densitate de $0,67 \cdot 10^2$ celule/mm², după 18 ore densitatea a fost $2,46 \cdot 10^2$ celule/mm², când se observă un maxim al creșterii celulare de $2,99 \cdot 10^2$ celule/mm², ulterior la 72 de ore densitatea a fost de $4,07 \cdot 10^2$ celule/mm² (figura 8.3).

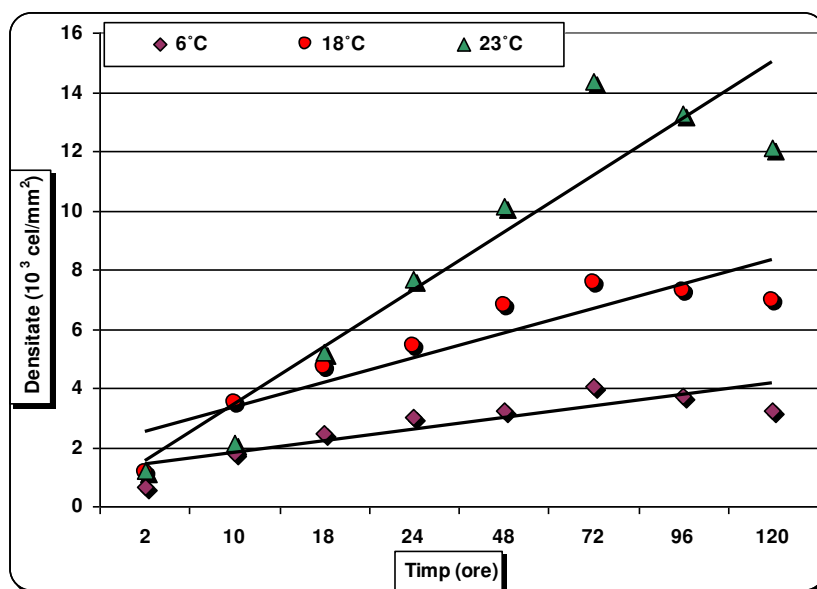


Figura 8.3. Dinamica densității bacteriene în cursul formării bacterioneustonului în recipiente (cutii de depozitare) cu apă de mare la o temperatură variabilă (6°C; 18°C și 23°C)

La temperatura medie de 18°C a apei de mare se observă după două ore o densitate de $1,7 \cdot 10^3$ celule/mm², după 18 ore densitatea a fost de $4,73 \cdot 10^3$ cells/mm², când se observă un maxim al creșterii celulare de $5,42 \cdot 10^3$ celule/mm², ulterior la 72 de ore densitatea a fost de $5,42 \cdot 10^3$ celule/mm² (figura 8.3).

La temperatura medie de 23°C a apei de mare se observă după două ore o densitate de $1,20 \cdot 10^3$ celule/mm², după 18 ore densitatea a fost $5,23 \cdot 10^3$ celule/mm², când se observă un maxim al creșterii celulare de $7,69 \cdot 10^3$ celule/mm², ulterior la 72 de ore densitatea a fost de $14,33 \cdot 10^3$ celule/mm² (figura 8.3).

Coeficienții R de linearitate au fost mai scăzuți la 48 de ore de 0,84, în cazul modificării temperatura de 6°C, comparativ cu valorile de 0,97 și 0,96 pentru temperaturile de 18°C și 23°C. De asemenea, valoarea pantei y a fost mai scăzută de 0,37, față de 1,21 și respectiv 2,63.

În condiții naturale (Marea Mediterană) Agogué și colab. (2005) observă în apele din zona Barcelonei un microstrat de suprafață (SML) cu o densitate de $1,43 \cdot 10^6$ și $1,30 \cdot 10^6$ celule

ml⁻¹, respectiv (n = 10). În zona din Banyuls-sur-Mer s-au observat valori de $0,93 \cdot 10^6$ celule ml⁻¹ și respectiv (n = 13). Aceste valori demonstrează existența unor diferențe cu valori mai ridicate pentru stația Barcelona față de la Banyuls-sur-Mer între stratul analizat și stratul din imediata vecinătate a interfeței apei de mare. Determinarea numărului de celule viabile pe plăci cu agar a arătat o capacitate de cultivare mai ridicată în straturile superioare ale interfeței. În apele din zona Barcelonei acest procent a fost de 4,16% și respectiv de 2,51%, pe când în zona Banyuls-sur-Mer de 1,58% și respectiv de 0,34%, astfel, procentul de procariote cultivabile a fost mai crescut în zona Barcelonei și în stratul de suprafață în ambele zone de studiu (Agogué și colab., 2005).

Tabel 8.1. Dinamica densității celulelor moarte (cu membrană degradată) din bacterioneustonul format la diferite salinități și temperaturi (10^3 celule/mm²)

T (ore)	5 g/L	10 g/L	15 g/L	25 g/L	6°C	18°C	23°C
2	0,12	0,5	0,2	0,3	0,2	0,45	0,21
10	0,31	0,71	0,77	0,87	0,5	0,77	0,77
18	0,57	1,37	1,11	1,14	0,9	1,14	0,98
24	0,62	1,62	1,32	1,32	1,12	1,32	1,49
48	0,81	1,89	2	1,85	1,39	1,85	1,15
72	1	2,04	2,14	2,21	1,07	1,14	2,33
96	1,12	2,5	2,42	2,45	1,42	1,28	2,29
120	1,33	2,8	3	3,16	1,62	1,56	2,89

În concordanță cu experimente din literatură (Agogué și colab., 2005) am determinat numărul celulelor permeabile la iodura de propidiu, celule cu membrana plasmatică modificată structural și funcțional, celule considerate moarte. În tabelul următor sunt prezentate densitățile celulelor moarte din bacterioneustonul format la diferite salinități și la diferite temperaturi.

Datele personale privind densitatea celulelor moarte (cu membrana degradată, permeabilă la iodura de propidiu) din probele experimentale la diferite salinități și temperaturi sunt prezentate în tabelul 8.1 pentru diferite intervale experimentale. Aceste valori sunt mai scăzute decât cele din figurile 8.1 - 8.8, unde valorile totale ale densității prezentate cuprind

atât celulele vii, cât și pe cele moarte. Densitatea celulelor moarte este mai mare după 72 de ore comparativ cu valorile obținute la începutul experimentelor ceea ce sugerează importanța acestui tip de celule în structura bacterioneustonului marin.

8.3. Influența substanței organice asupra bacterioneustonului

Suplimentarea apei de mare cu substanțe organice are un efect termodinamic previzibil fiind afectată temperatura și procesul de conversie termică de la nivelul interfeței. Tipurile de substanțe organice folosite pot fi descrise cantitativ sau în funcție de concentrație. Posibilul efect al substanțelor organice poate fi analizat pe baza fenomenului de capilaritate, prin perturbarea și întreruperea transferului de gaze (CO_2 , O_2 , N_2) la nivel de interfață, suspendarea procesului de formare a bulelor de aer și generarea de particule organice agregate. Formarea acestor agregate poate influența prezența ionilor metalici la nivel de interfață (Lion and Leckie, 1981; Carlucci și colab., 1991).

Indiferent de tipul de substanță utilizată, componentele organice de la nivelul interfeței aer-lichid au o compoziție chimică unică și sunt substanțe cu o concentrație ridicată care permit formarea unor compuși de tipul metal-substanță organică. Dintre ioni metalici prezenți în astfel de compuși pot fi menționați cei de Cu, Ni, Pb sau Fe (Lion and Leckie, 1981; Wurl și Holmes, 2008).

Creșterea bacteriană a evidențiat influența substanței organice comparativ cu proba martor. Astfel, la începutul experimentelor în proba control, după două ore bacteriile au o densitate mai scăzută comparativ cu datele obținute la 120 de ore, când bacteriile au o densitate mai ridicată. Creșterea cea mai importantă s-a observat în cazul adității de peptonă cu o concentrație ridicată.

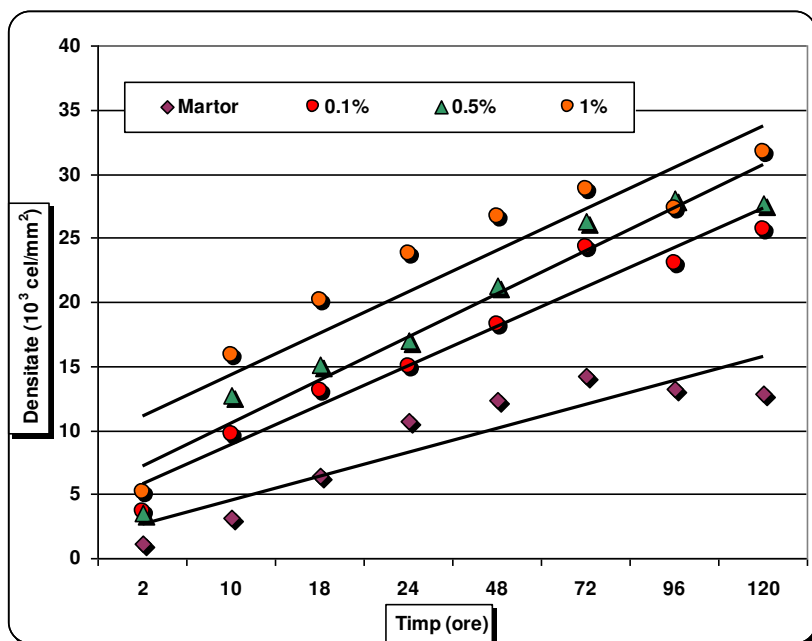


Figura 8.4. Dinamica densității bacteriene în cursul formării bacterioneustonului în recipiente (cutii de depozitare) cu apă de mare suplimentată cu peptonă (0,1%, 0,5%, 1%)

Dinamica densității celulare din bacterioneustonul format în condițiile suplimentării apei de mare cu diferite cantități de peptonă este prezentată în figura 8.5 constatându-se următoarele:

În proba martor (fără adădire de substanță organică) după două ore de la recoltare densitatea bacteriană a fost de $1,12 \cdot 10^3$ celule/mm², după 18 ore ajunge la valoarea de $6,40 \cdot 10^3$ celule/mm² și după 24 de ore la $10,70 \cdot 10^3$ celule/mm², urmând ca la 72 de ore densitatea celulară să atingă valoarea de $14,20 \cdot 10^3$ celule/mm² (figura 8.5).

În cazul adădiei unei concentrații scăzute de peptonă de 0,1 %, după două ore de la recoltare densitatea bacteriană a fost de $3,60 \cdot 10^3$ celule/mm², după 18 ore ajunge la valoarea de $13,10 \cdot 10^3$ celule/mm² și după 24 de ore la $15,00 \cdot 10^3$ celule/mm², urmând ca la 72 de ore să atingă valoarea de $15,00 \cdot 10^3$ celule/mm² (figura 8.5).

În recipientul cu peptonă de 0,5%, densitatea bacteriană a fost de $3,50 \cdot 10^3$ celule/mm² (după două ore), ajunge la valoarea de $15,10 \cdot 10^3$ celule/mm² după 18 ore și la $17,70 \cdot 10^3$ celule/mm² (după 24 de ore), urmând ca la 72 de ore să atingă valoarea de $27,65 \cdot 10^3$ celule/mm² (figura 8.5).

În recipientul cu peptonă de 1%, după recoltare densitatea bacteriană a fost de $5,20 \cdot 10^3$ celule/mm² (după două ore), ajunge la valoarea de $20,10 \cdot 10^3$ celule/mm² după 18 ore și la $23,80 \cdot 10^3$ celule/mm² (după 24 de ore), urmând ca la 72 de ore să atingă valoarea de $28,80 \cdot 10^3$ celule/mm² (figura 8.5). Coeficientul de linearitate a fost mai scăzut de 0,83 la 48 de ore,

în cazul adărilor de substanțe organică 0,95. De asemenea, valoarea pantei y a fost de 3,06 comparativ cu proba control 1,86.

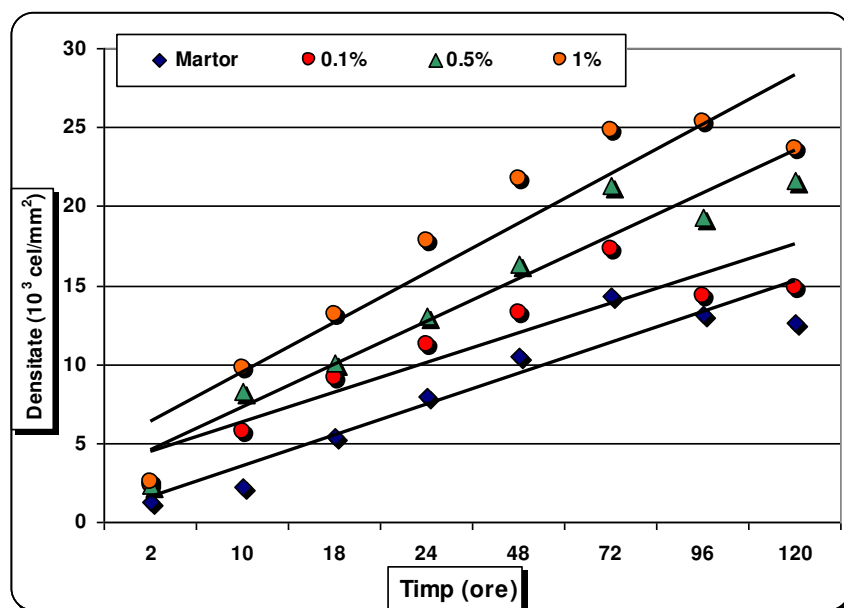


Figura 8.5. Dinamica densității bacteriene în cursul formării bacterioneustonului în recipiente (cutii de depozitare) cu apă de mare suplimentată cu benzină (0,1%, 0,5%, 1%)

Coeficienții R de linearitate au fost mai scăzuți la 48 de ore de 0,97, în cazul suplimentării cu 0,1% peptonă, comparativ cu valorile de 0,94 și 0,91 pentru suplimentarea cu 0,5% și 1%. De asemenea, valoarea pantei y a fost mai scăzută de 3,74, față de 4,04 și respectiv 4,41.

După cum se poate observa în figura 8.6 sunt diferențe majore între dinamica densității celulelor din structura bacterioneustonului în recipienturile cu variații ale concentrației de benzină.

După cum se poate observa în figura 8.6 sunt diferențe majore între dinamica densității celulelor din structura bacterioneustonului în recipientele cu variații ale concentrației de benzină.

În proba martor (fără adărire de substanță organică) după două ore de la recoltare densitatea bacteriană a fost de $1,24 \cdot 10^3$ celule/mm², după 18 ore ajunge la valoarea de $5,40 \cdot 10^3$ celule/mm² și după 24 de ore la $7,90 \cdot 10^3$ celule/mm², urmând ca la 72 de ore să atingă valoarea de $14,30 \cdot 10^3$ celule/mm² (figura 8.6).

În cazul adărierii unei concentrații scăzute de benzină de 0,1 %, după două ore de la recoltare densitatea bacteriană a fost de $9,10 \cdot 10^3$ celule/mm², după 18 ore ajunge la valoarea de $13,10 \cdot 10^3$ celule/mm² și după 24 de ore la $11,22 \cdot 10^3$ celule/mm², urmând ca la 72 de ore să atingă valoarea de $17,30 \cdot 10^3$ celule/mm² (figura 8.6).

În recipientul cu benzină de 0,5% densitatea bacteriană a fost de $2,30 \cdot 10^3$ celule/mm² după două ore de la recoltare, ajunge la valoarea de $10,1 \cdot 10^3$ celule/mm² după 18 ore și la $13,0 \cdot 10^3$ celule/mm² după 24 de ore, urmând ca la 72 de ore să atingă valoarea de $21,30 \cdot 10^3$ celule/mm² (figura 8.6).

În cazul adăugării unei concentrații crescute de benzină de 1%, după două ore de la recoltare densitatea bacteriană a fost de $2,51 \cdot 10^3$ celule/mm², după 18 ore ajunge la valoarea de $13,10 \cdot 10^3$ celule/mm² și după 24 de ore la $17,80 \cdot 10^3$ celule/mm², urmând ca la 72 de ore să atingă valoarea de $24,80 \cdot 10^3$ celule/mm² (Figura 8.6).

Coeficienții R de linearitate au fost mai scăzuți de 0,99, iar în cazul suplimentării cu 0,1% benzină, comparativ cu valorile de 0,97 și 0,98 pentru suplimentarea cu 0,5% și 1%. De asemenea, valoarea pantei y a fost mai scăzută de 2,85, față de 3,78 și respectiv 4,33 la 48 de ore (Figura 8.7).

Cunliffe și colab. au realizat în 2009 o serie de experimente în recipiente cu apă din fiorduri, care au fost suplimentată cu nutrienți (16mM NaNO₃ and 1mM KH₂PO₄) pe o perioada de 11 zile. Monitorizarea probelor a avut loc zilnic, dar probele semnificative s-au colectat la începutul experimentului la cinci zile și după zece zile la sfârșitul experimentului.

Analiza probelor s-a realizat prin două metode, citometria de flux și analiza cantitativă prin PCR (Q-PCR) a genelor bacteriene 16S rARN. Probele au fost colorate cu verde SYBR, iar în urma analizei densitatea bacteriană a probelor mai vechi de cinci zile, imersate în apa de mare a fost între $2,8 \cdot 10^5$ și $8,0 \cdot 10^5$ celule mL⁻¹ (adică $5,5 \cdot 10^5$), în probele din recipientele martor și între $1,1 \cdot 10^5$ și $9,6 \cdot 10^5$ celule mL⁻¹ (adică $6,6 \cdot 10^5$) în recipientele cu adăugare de nutrienți. În a zecea zi s-a observat o creștere semnificativă a coeficientului recipientelor cu suplimentare organică (P=0,004), pentru celulele din recipientele cu adăugare de nutrienți, cu o valoare de $7,6 \cdot 10^5 - 1,8 \cdot 10^6$ celule mL⁻¹ (adică $1,4 \cdot 10^6$), dar nu și în proba martor cu o valoare de $5,1 \cdot 10^5 - 8,9 \cdot 10^5$ celule mL⁻¹ (adică $6,9 \cdot 10^5$) (v. Cunliffe și colab., 2009).

Densitatea bacteriană în stratul de suprafață urmează același mod de creștere ca cel din probele preluate din stratul din imediata vecinătate a suprafeței. Schimbările valorilor densității celulelor bacteriene din stratul de suprafață mai de vechi de cinci zile de la imersare, în apa de mare au fost între $5 \cdot 10^5 - 7,1 \cdot 10^5$ celule mL⁻¹ (adică $6 \cdot 10^5$), în probele de recipient martor și între $6,1 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$ celule mL⁻¹ (adică $7,7 \cdot 10^5$) în recipientele cu supliment de nutrienți. Odată cu creșterea bacteriană din probe după a zecea zi s-a observat o creștere semnificativă a coeficientului recipientelor cu suplimentare organică (P=0,001), pentru celulele din recipientele cu adăugare de nutrienți, cu o valoare de $8 \cdot 10^5 - 1,9 \cdot 10^6$ celule mL⁻¹ (adică $1,5 \cdot 10^6$), dar nu și în proba martor cu o valoare de $4 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$ celule mL⁻¹.

(adică $6,1 \cdot 10^5$). Densitatea bacteriană din stratul de suprafață era mai mică de $1,4 \cdot 10^5$ celule mL^{-1} (Cunliffe și colab. 2009).

Numărul de bacterii heterotrofe din stratul de suprafață (UFC 22°C) a fost cu 2,0 – 13.3 ori mai mare decât numărul bacteriilor din stratul învecinat ($P < 0,001$) unde numărul de celule a fost între $1,48$ și $12,52 \cdot 10^3$ celule mL^{-1} , în timp ce UFC a variat între $0,35$ și $0,94 \cdot 10^3$ celule mL^{-1} conform cu observațiilor lui Kalwasińska și Donderski (2005).

Studiile au demonstrat că numărul de bacterii din stratul de suprafață este mai crescut decât cel al bacteriilor din stratul învecinat potrivit observațiilor lui Apine (1989), cit. de Kalwasińska și Donderski (2005), Maki și Herwig (1991), dar și Donderski și colab. (1998), Mudryk și colab. (1999). Numărul crescut al bacteriilor din stratul de suprafață este favorizat de concentrația mai crescută a nutrienților din acest strat care funcționează ca un stimulator pentru bacteriile de la acest nivel (Kalwasińska și Donderski, 2005).

Walczak a realizat în 2008 un studiu asupra densității celulelor bacteriene de la nivelul stratului de suprafață și cele din stratul adiacent prin analiza probelor de apă în recipiente sterile din care au fost colectate probele de 10 ml. Analiza probelor a vizat numărului total de bacterii (NTB), numărului de bacterii active metabolic (NTAB), activitatea dehidrogenazei, rata proteinelor și sinteza ADN-ului. Probele au fost filtrate, colorate cu acridine orange și analizate prin metode de cuantificare directă la microscopul cu epifluorescență.

Schimbările valorilor (NTAB) după 24 de ore au fost mai crescute comparativ cu cele obținute în cazul (NTB). În luna mai valorile medii ale lui NTAB, pe timpul zilei, în microstratul de suprafață a fost de $8,35 \cdot 10^6$ celule cm^{-3} , în timp ce în perioadele nocturne au ajuns la valoarea de $17,14 \cdot 10^6$ celule cm^{-3} . Valorile metabolismului celular au fost mai ridicate în perioadele nocturne din luna iulie Walczak (2008).

CONCLUZII GENERALE

1. Formarea biofilmelor pe sticlă este mai rapidă în apă de mare cu salinități apropiate (10 g/L și 15 g/L) de salinitatea naturală medie (17 g/L) decât la 5 g/L. După 12 ore densitățile celulare în biofilmele formate la 5 g/L, 10 g/L și 15 g/L sunt de $13,4 \cdot 10^2$ celule/ mm^2 , $18,7 \cdot 10^2$ celule/ mm^2 și respectiv la $26,7 \cdot 10^2$ celule/ mm^2 .

2. Formarea biofilmelor pe sticlă este mai rapidă la temperatura de 18°C decât la 6°C, după 12 ore densitățile celulare în biofilme fiind de $26,7 \cdot 10^3$ celule/mm² și de respectiv $17,2 \cdot 10^2$ celule/mm².
3. Formarea biofilmelor pe sticlă este mai rapidă în condiții statice comparativ cu situația experimentală a circulației acesteia prin pompe, densitatea celulară în biofilme fiind după 12 ore de $21,2 \cdot 10^2$ celule/mm² și de respectiv $17,4 \cdot 10^2$ celule/mm².
4. Suplimentarea apei de mare cu substanțe organice în concentrație de 0,1% a condus după 72 de ore la creșterea densității celulare în biofilme de la valoarea de $30,9 \cdot 10^4$ celule/mm² în cazul amestecului de aminoacizi, $28,85 \cdot 10^4$ celule/mm² în cazul triptonei, $26,9 \cdot 10^4$ celule/mm² în cazul glucozei, $25,8 \cdot 10^4$ celule/mm², în cazul amidonului și respectiv de $25,8 \cdot 10^4$ celule/mm², în cazul extractului de levură, comparativ cu proba martor la care densitatea celulelor a fost de $39,5 \cdot 10^3$ celule/mm².
5. Formarea biofilmelor pe suportul hidrofil (sticlă) este mai lentă decât pe suport hidrofob (parafilm și teflon), după opt ore de la inițierea experimentelor densitatea celulelor din biofilm fiind de $1,70 \cdot 10^5$ celule/mm² (sticlă) comparativ cu densitatea de $3,35 \cdot 10^5$ celule/mm² (parafilm) și respectiv de $3,88 \cdot 10^5$ celule/mm² (teflon).
6. Formarea bacterioneustonului este mai rapidă în apă de mare cu salinități apropiate (15 g/L și 25 g/L) de salinitatea naturală medie (17g/L) a Mării Negre decât la 10 g/L și 5 g/L. După 72 ore densitățile celulare în biofilmele formate la 15 g/L ($14,10 \cdot 10^3$ celule/mm²) și 25 g/L ($14,90 \cdot 10^3$ celule/mm²) sunt mai mari comparativ cu rezultatele obținute la salinitatea de 5 g/L ($6,24 \cdot 10^2$ celule/mm²) și 10 g/L ($7,24 \cdot 10^3$ celule/mm²).
7. Formarea bacterioneustonului este mai rapidă la temperatura de 23°C sau 18°C decât la 6°C, după 72 ore densitățile celulare în biofilme fiind de $14,33 \cdot 10^3$ celule/mm², $7,56 \cdot 10^3$ celule/mm² și respectiv de $0,40 \cdot 10^3$ celule/mm².
8. Densitatea celulelor moarte crește în timp (de la 24 la 72 ore), atât în bacterioneustonul format la salinității de 5 g/L ($1 \cdot 10^3$ celule/mm²), 10 g/L ($2,04 \cdot 10^3$ celule/mm²), 15 g/L ($2,14 \cdot 10^3$ celule/mm²), 25 g/L ($2,21 \cdot 10^3$ celule/mm²), cât și în bacterioneustonul format la

temperaturi diferite 6°C ($1,07 \cdot 10^3$ celule/mm²), 18°C ($1,14 \cdot 10^3$ celule/mm²) și 23°C ($2,33 \cdot 10^3$ celule/mm²).

9. Suplimentarea cu peptonă în concentrații de 0,1%, 0,5% și 1% a determinat după 72 de ore de la inițierea experimentelor o creștere a densității celulare din bacterioneuston de $24,30 \cdot 10^3$ celule/mm², $26,30 \cdot 10^4$ celule/mm², respectiv de $28,80 \cdot 10^5$ celule/mm², comparativ cu proba martor la care densitatea celulară după 72 de ore este de $14,30 \cdot 10^3$ celule/mm².

10. Adăugarea de benzină în concentrații de 0,1%, 0,5% și 1% a determinat după 72 de ore de la inițierea experimentelor o creștere a densității celulare, până la valori de $17,30 \cdot 10^3$ celule/mm², $21,30 \cdot 10^3$ celule/mm² și respectiv de $24,80 \cdot 10^4$ celule/mm², comparativ cu proba martor la care densitatea celulară după 72 de ore a fost de $14,20 \cdot 10^3$ celule/mm².

PERSPECTIVELE CERCETĂRII

- Determinarea taxonomică a procariotelor marine din structura biofilmelor obținute în condiții *in vitro*.
- Analiza biofilmelor prin microscopie electronică.
- Utilizarea unor substanțe cu rol în prevenirea și combaterea formării biofilmelor pe suprafețe.
- Analiza activității enzimactice a biofilmelor formate în condiții *in vitro*.
- Analiza chimică a exopolizaharidelor din structura biofilmelor formate *in vitro*.
- Utilizarea unor suprafețe modificate fizic sau chimic pentru formarea biofilmelor în condiții *in vitro*.
- Realizarea unor experimente privind formarea biofilmelor în condiții *in situ*.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Agogué H., Casamayor E. O., Bourrain M., Obernosterer I., Joux F., Herndl G. J. and Lebaron P., 2005^a - A survey on bacteria inhabiting the sea surface microlayer of coastal ecosystems, FEMS Microbiology Ecology, 54, pp. 269–280.
2. Agogué H., Casamayor E. O., Joux F., Obernosterer I., Dupuy C., Lantoine F., Catala P., Weinbauer M. G. Reinthaler T., Herndl G. J. and Lebaron P., 2004 - Comparison of samples for the biological characterization of the sea surface microlayer, Limnology and *Oceanography*: Methods, 2, pp. 213–225.
3. Aonofriesei F., 2004 – Studii asupra comunităților bacteriene din zona litorală românească (traducerea în limba engleză a tezei de doctorat), Editura ExPonto, pp. 1- 83.
4. Araujo J. C., Mortara R., Campos J. R. and Vazoller R. F., 2004 - Development and analysis of anaerobic biofilms onto hydrophobic and hydrophilic surfaces, Environmental Technology, 25 (7), pp. 809 – 17.
5. Burchardt L. and Marshall H. G., 2003 - Algal composition and abundance in the neuston surface micro layer from a lake and pond in Virginia (U.S.A.), Journal of Limnology, pp. 139-142.

6. **Carlucci A. F., Craven D. B. and Wolgast D. M., 1991** - Microbial populations in surface films and subsurface waters: amino acids metabolism and growth, *Marine Biology*, 108, pp. 329 - 339.
7. **Casse F. and Swain G.W., 2006** - The development of microfouling on four commercial antifouling coatings under static and dynamic immersion, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 57, pp. 179–185.
8. **Cerca N., Pier G.B., Vilanova M., Oliveira R. and Azeredo J., 2005** - Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*, *Research in Microbiology*, 156(4), pp. 506–514.
9. **Chavant P., Martinie B., Meylheuc T., Bellon-Fontaine M. N. and Hebraud M., 2002** - *Listeria monocytogenes* LO28: Surface Physicochemical Properties and Ability to Form Biofilms at Different Temperatures and Growth Phases, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), pp. 728–737.
10. **Cho H. J., Jönsson H., Campbell K., Melke P., Williams J. W., Jedynak B. Stevens A. M., Groisman A. and Levchenko A., 2007** - Self-Organization in High-Density Bacterial Colonies: Efficient Crowd Control, *Plos Biology*, 5(11), pp. 2614-2623.
11. **Cooksey K. E. and Wigglesworth - Cooksey B., 1995** - Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea: a review, *Aquatic Microbial Ecology*, 9, pp. 87- 96.
12. **Cunliffe M., Salter M., Mann P. J., Whiteley A. S., Upstill - Goddard R. C. and Murrell J. C., 2009** - Dissolved organic carbon and bacterial populations in the gelatinous surface microlayer of a Norwegian fjord mesocosm, *FEMS Microbiol Letters*, 299, pp. 248 –254.
13. **De Franca F. P., Ferreira C. A. and Lutterbach M. T. S., 2000** - Effect of different salinities of a dynamic water system on biofilm formation, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25, pp. 45 – 48
14. **Di Bonaventura G., Piccolomini R., Paludi D., D’Orio V., Vergara A., Conter M. and Ianieri A., 2007^a** - Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity, *Journal of Applied Microbiology*, 104, pp. 1552–1561.
15. **Donderski W., Mudryk Z. and Walczak M., 1998** - Utilization of low molecular weight organic compounds by marine neustonic and planktonic bacteria, *Polish Journal of Environmental Studies*, 7, pp. 279-283.
16. **Donlan R. M. and Costerton J. W., 2002** - Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clinical Microbiology Reviews*, 15, pp. 167-193.
17. **Eddleman H., 1998** - Optimum Temperature for Growth of Bacteria, Indiana Biolab, 14045 Huff St., Palmyra IN 47164.
18. **Filip M., Pace M. L. and Cole J. J., 1996** - Regulation of planktonic bacterial growth rates: the effect of temperature and resources, *Microbial Ecology*, 31, pp. 15-28.
19. **Garrett W. D. and Duce R. A., 1980** - Surface microlayer samplers, In: F. Dobson, L. Hasse, R. Davis (Eds), *Air-Sea Interaction* Plenum, New York, pp. 471- 490.
20. **Gauthier M. J., Flatau G. N. and Clément R. L., 1990** - Influence of phosphate ions and alkaline phosphatase activity of cells on the survival of *Escherichia coli* in sea water, *Microbial*, 20, pp. 245-251.
21. **Gauthier M. J., Flatau G. N., Le Rudulier D., Clément R. L. and Combarro Combarro M. P., 1991** - Intracellular accumulation of potassium and glutamate specifically enhances survival of *Escherichia coli* in seawater, *Applied Environmental Microbiology*, 57(1), pp. 272- 276.
22. **Goldacre R. J., 1949** - Surface films on natural bodies of water, *Journal of Animal Ecology*, 18, pp. 36-39.

23. Hagstrom A., Ammerman J. W., Henrichs S. and Azam F., 1984 - Bacterioplankton growth in seawater: II. Organic matter utilization during steady-state growth in seawater cultures, Marine Ecology Progress Series, 18, pp. 41 – 48.
24. Hakvåg S., Fjærvik E., Josefsen K. D., Ian E. , Ellingsen T. E. and Zotchev S. B., 2008 - Characterization of Streptomyces spp. Isolated from the Sea Surface Microlayer in the Trondheim Fjord, Norway Marine Drugs, 6, pp. 620 – 635.
25. Hansen M. L. H. and Sørensen S. J., 2007 - Establishment and early succession of a multispecies biofilm composed of soil bacteria, Microbial Ecology, 54, pp. 352 – 362.
26. Hansen S. K., Rainey P. B., Haagenzen J. A. and Molin S., 2007 - Evolution of species interactions in a biofilm community, Nature, 445, pp. 533-536.
27. Harvey G. W., 1966 - Microlayer collection from the sea surface: a new method and initial results., Limnology and Oceanography, 11, pp. 608 - 613.
28. Henk M. C., 2004 - Method for Collecting Air-Water Interface Microbes Suitable for Subsequent Microscopy and Molecular Analysis in Research and Teaching Laboratories, Applied Environmental Microbiology, 70 (4), pp. 2486 – 2493.
29. Henk M. C., 2003 - Microscopy of natural and experimental biofilms in the undergraduate laboratory: A simple collection kit with multiple applications. Pages 59-75, in Tested studies for laboratory teaching, Volume 24 (M. A. O'Donnell, Editor). Proceedings of the 24th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), pp. 334
30. Henrici A. T., 1933 - Studies of Freshwater Bactria: I. A Direct Microscopic Technique, Journal of Bacteriology, 25, pp. 277 – 286.
31. Heukelekian, H., and Heller A., 1940 - Relation between food concentration and surface for bacterial growth, Journal of Bacteriology, 40, pp. 547 – 558.
32. Hinrichsen E., 2011 - Effect of Temperature on Salinity, The Hub for bright minds, Marine Engineering, pp. 1 – 3.
33. James G. A., Beaudette L. and Costerton J. W., 1995 - Interspecies bacterial interactions in biofilms, Journal of Industrial Microbiology, 15, pp. 257–62.
34. Kalwasińska A. and Donderski W., 2005 - Neustonic versus planktonic bacteria in eutrophic lake, Polish Journal of Ecology, 53(4), pp. 571 – 577.
35. Kelley J. I., Turng B. F, Williams H. N., and Baer M. L., 1997 - Effects of Temperature, Salinity, and Substrate on the Colonization of Surfaces in situ by Aquatic Bdellovibrios, Applied Environmental Microbiology, 63(1), pp. 84 – 90.
36. Kokare C. R., Chakraborty S., Khopade A. N. and Mahadik K. R., 2009 – *Biofilm: Importance and applications*, Indian Journal of Biotechnology, 8, pp. 159-168.
37. Lawrence J. R., Kotber D. R., Hoyle B. D., Costerton W., Caldwell D. E., 1991 - Optical Sectioning of Microbial Biofilms, Journal of Bacteriology, 173(20), pp. 6558 -6567.
38. Lazăr V., 2003 - Aderența microbiană, Editura Academiei Române, București, pp. 1 – 216.
39. Lewandowski Z. and Stoodley P., 1995 - Flow induced vibrations, drag force, and pressure drop in conduits covered with biofilm, International IAWQ Conference Workshop on Biofilm Structure, Growth, and Dynamics, Noordwijkerhout, The Netherlands.

40. **Lim C. H., Oykanca R., Flint K.P., 1996** - The effect of osmotic stress on survival and alkaline phosphatase activity of *Aeromonas hydrophila*, *FEMS Microbiology Letters*, 137, pp. 19-24.
41. **Lion W. L. and Leckie J. O., 1981** - The biogeochemistry of the air-sea interface, *Annual Reviews Earth Planet Science*, 9, pp. 449- 486.
42. **Maki J. and Herwig R., 1991** - A diel study of neuston and plankton bacteria in an Antarctic ponds, *Antarctic Science*, 3, pp. 47- 51.
43. **Marshall H. G. and Burchardt L., 2005** - Neuston: Its definition with a historical review regarding its concept and community structure, *Archiv für Hydrobiologie*, 164, pp. 429–448.
44. **Marshall K. C., 1986** - Adsorption and adhesion processes in microbial growth at interfaces, *Advances in Colloid and Interface Science*, 25, pp. 59–86.
45. **Marshall K. C., 1992** - Planktonic versus sessile life of prokaryotes. In *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. 2nd Edn. (A. Balows, H.G. Tröter, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer), pp. 262 – 275.
46. **Mudryk Z. and Skórczewski P., 1998** - Utilization of dissolved amino acids by marine bacteria isolated from surface and subsurface layers of the Gdańsk Deep. *Polish Journal of Environmental Studies*, 7, pp. 289 - 293.
47. **Müster U. and Chrost R. J., 1990** - Origin composition and microbial utilization of dissolved organic matter. In Overbeck J. and Chrost R. J. *Aquatic Ecology, Biochemical and Molecular Approaches*, Springer, New York, pp. 8 – 46.
48. **Parker B. and Barsom G., 1970** - Biological and chemical significance of surface microlayers in aquatic ecosystems, *BioScience*, 20, pp. 87- 93.
49. **Parsek M. R. and Fuqua C., 2004** - Biofilms 2003: Emerging Themes and Challenges Surface Associated Microbial Life, *Journal of Bacteriology*, pp. 4427–4440.
50. **Pedersen K., 1982^a** - Factors Regulating Microbial Biofilm Development in a System with Slowly Flowing Seawater, *Applied and Environmental Microbiology*, 44(5), pp. 1196 -1204.
51. **Pedersen K., 1982^b** - Method for Studying Microbial Biofilms in Flowing - Water Systems, *Applied and Environmental Microbiology*, 43, pp. 6 – 13.
52. **Penfold W. J and Norris D., 1912** - The relation of concentration of food supply to the generation –time of bacteria , *Biology of Bacteria, Journal of Hygiene*, pp. 527 – 531
53. **Rijnaarts H. M., Norde W., Bouwer J., Lyklema J., Zehnder A., 1993** - Bacterial Adhesion under Static and Dynamic Conditions, *Applied Environmental Microbiology*, 59(10), pp. 3255 – 3265.
54. **Rogers J., Dowsett A. B., Dennis P. J., Lee J. V. and Keevil C. W., 1994** - Influence of Temperature and Plumbing Material Selection on Biofilm Formation and Growth of *Legionella pneumophila* in a Model Potable Water System Containing Complex Microbial Flora, *Applied Environmental Microbiology*, 60 (5), pp. 1585 – 1592.
55. **Sleigh A. M, 1987-** *Microbes of the sea*, John Wiley and Sons, Inc., New York., pp. 241.
56. **Sonak S. and Bhosle N., 1995** - A simple method to assess bacterial attachment to surfaces, *Biofouling*, 9 (1), pp. 31 – 38.
57. **Stanley S. O. and Morita R. Y., 1968** - Salinity Effect on the Maximal Growth Temperature of Some Bacteria Isolated from Marine Environments, *Journal of Bacteriology*, 95 (1), pp. 169 – 173.

58. **Stepanovic S., Vukovic D., Jezek P., Pavlovic M. and Svabic-Vlahovic M., 2001** - Influence of dynamic conditions on biofilm formation by Staphylococci, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 20, pp. 502-504.
59. **Suci P. A., Siedleki K. J., Palmer R. J., White D. C. and Geesey G. G., 1997** -Combined Light Microscopy and Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Integration of Biofilm Structure, Distribution, and Chemistry at Solid-Liquid Interfaces, *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (11) , pp. 4600 – 4603.
60. **Surman S. B., Walkerb J. T., Goddard D.T. and Mortond L. H. G., 1996** - Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms, *Journal of Microbiological Methods*, 2 (5), pp. 57 – 70.
61. **Sutherland I.W., 2001**- The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment, *Trends in Microbiology*, 9, pp. 222-227.
62. **Walczak M., 2008** - Day – to – night activity of bacteria in the surface microlayer eutrophic lake, *Polish Jurnal of Ecology*, 56 (3), pp. 379 – 389.
63. **Wurl O. and Holmes M., 2008** - The gelatinous nature of the sea-surface microlayer, *Marine Chemistry*, 110, pp. 89–97.
64. **Yuehuei H. A. and Friedman R. J., 1997**- Laboratory methods for studies of bacterial adhesion, *Journal of Microbiological Methods*, pp.141-152.
65. **Zaitsev Yu. P., 1997** - Neuston of seas and ocean, In: P. Liss, R. Duce (Eds), *The Sea Surface And Global Change*, Cambridge, University Press, New York, pp. 371- 382.
66. **Zarma M., 1959^a** – Microbiologie marină, Cercetării sovietice în perioadă 1946 – 1957, Ed. Academiei R.P.R., București.
67. **Zarma M., 1963** – Les bacteries sulfato reducrices denitrifiantes de la Mer Noire, Rapport et proces – verbaux des reunions CISMM, Paris, 17, pp. 679 – 687.
68. **Zarma M., 1965** – Quelques donnes concernant le nombres des bacteries et de la biomass bacterienne dans l’ eau de la plat – forme continentale de la Mer Noire a niveau de la ville Constantza, Rapport et proces – verbaux des reunions CISMM, Paris, 18, 3, pp. 635 – 643.
69. **Zarnea Gh., 1994** - Tratat de Microbiologie generală. Bazele teoretice ale Ecologiei microorganismelor, Microorganisme și mediile lor naturale, Editura Academiei Române, București, pp. 1- 1078.
70. **Zook D., 1992** - The Microcosms Curriculum Guide to Exploring Microbial Space, Kendall Hunt Publishing Company, Dubuque, pp. 480.

ANEXA PERSONALĂ

I. LUCRĂRI PUBLICATE PE PARCURSUL ELABORĂRII TEZEI:

Publicații incluse în conținutul tezei

1. Lucrări științifice publicate în volumele conferințelor internaționale cotate ISI Proceedings:

- **Moldoveanu A. M. and Ardelean I. I., 2012^a** – The dynamics of marine bacterioneuston in laboratory microcosms: 1. The influence of salinity and temperature, *SGEM Conference Proceedings*, 3, pp. 1001 – 1008.
- **Moldoveanu A. M. and Ardelean I. I., 2012^b** – The dynamics of marine bacterioneuston in laboratory microcosms: 2.The influence of organic matter, *SGEM Conference Proceedings*, 3, pp. 1009 – 1016.

2. Lucrări științifice publicate în reviste românești indexate BDI:

- **Moldoveanu A. M., 2010^b** – Analysis of biofilm temporal dynamic on the hydrophile and hydrophobe surfaces in recipient conditions, *Annals of RSBC*, 15(2), pp. 235 – 242.
- **Moldoveanu A. M., 2011^d** – The influence of organic matter on bacterial colonies and cell forms in bacterial biofilms, *Scientific Annals of Al. I. Cuza University Jassy, Animal biology*, 58, pp. 167 – 175.
- **Moldoveanu A. M., 2011^c** – Bacterial biofilms utilization of low concentrations of organic matter on hydrophile surfaces submerged in sea water, *Scientific Annals of Al. I. Cuza University Jassy, Section II, Genetics and Molecular Biology*, 12(4), pp. 165 – 175.

3. Lucrări științifice publicate în românești recunoscute de CNCSIS - categoria B+:

- **Moldoveanu A. M. and Ardelean I. I., 2010^b** – Studies regarding the formation and temporal dynamics of bacterial biofilms on the hydrophile surfaces of glass in static and dynamic condition, *Journal of Science and Arts*, 13(2), pp. 313 – 318.
- **Moldoveanu A. M., 2010^a** – Preliminary studies regarding cell density and temporal dynamic of bacterial biofilms formed at liquid- sediment interface using bright field and epifluorescence microscopy, *Scientific Study and Research – Biology*, 19, pp. 75 -81.

3. Lucrări științifice publicate în reviste românești recunoscute de CNCSIS – alte categorii:

- **Moldoveanu A. M. and Ardelean I. I., 2010^a** - The formation of bacterial biofilms on the hidrofile surface of glass in laboratory static conditions: the effect of temperature and salinity, *Ovidius University Annals of Natural Sciences, Biology - Ecology Series*, 14, pp. 147-156.
- **Moldoveanu A. M., 2011^f** – The use of methods to obtain and investigate bacterial biofilms in the studies of surface colonization, *Ovidius University Annals of Natural Sciences, Biology – Ecology Series*, 15, pp. 81-93.

4. Lucrări științifice publicate în volumele unor conferințe naționale:

- **Moldoveanu A. M., 2007** – Microbiology reasearches and the microorganisms role in the Black Sea ecology, *Ecological education in the romanian costal area good practice protocols*, pp. 68 – 73.
- **Moldoveanu A. M., 2010^c** – Bacterial biofilm formation in laboratory conditions, quality and monitoring of the marine environment, *UMC Nautica press*, 1, pp. 93 – 101.
- **Moldoveanu A. M., 2011^e** – Bacterial biofilms implications in marine microfouling formation, Quality and monitoring of the marine environment, *UMC Nautica press*, 2, pp.19 – 29.

Publicații care nu au fost incluse în conținutul tezei**1. Lucrări științifice publicate în volumele conferințelor organizate de societăți profesionale internaționale:**

- **Moldoveanu A. M., 2011^a** – The influence of green algae extract on bacterial biofilms in static conditions, *Science and Technology*, 1(2), pp. 7-11.
- **Moldoveanu A. M., 2011^b** – The temporal dynamic of bacterial biofilms in intermittent and continuous conditions in recipients, *Science and Technology*, 1(2), pp. 12 – 16.

2. Lucrări științifice publicate în reviste românești indexate BDI:

- **Moldoveanu A. M., 2012^b** – The influences of *Mytilus* extract on biofilm cells attachment, *Annals of RSBC*, 17(1), pp. 111 – 117.
- **Moldoveanu A. M., 2012^a** – Environmental factors influences on bacterial biofilm formation, *Annals of RSBC*, 17(1), pp. 118 – 126.

II. PARTICIPARI LA SESIUNI STINȚIFICE:

1. Sesiuni științifice naționale

- Sesiunea de comunicări științifice **„EDUCAȚIE PENTRU MEDIU ÎN ZONA COSTIERĂ ROMANESCĂ”**, Organizația Mare Nostrum, 31 octombrie 2007, CONSTANȚA
- Sesiunea de comunicări științifice **„A DOUĂ SESIUNE DE NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚE APLICATE ÎN STUDIUL MEDIULUI ÎNCONJURĂTOR ȘI MATERIALELOR”**, Universitatea Valahia, 28-30 aprilie 2010, TÂRGOVIȘTE
- Sesiunea de comunicări științifice **„BIODIVERSITATE- PREZENT ȘI PERSPECTIVE”**, Universitatea Ovidius, 7-8 iunie 2010, CONSTANȚA
- Sesiunea de comunicări științifice **„A XXVIII-A SESIUNE ȘTIINȚIFICĂ A SOCIETĂȚII ROMÂNE DE BIOLOGIE CELULARĂ”**, Universitatea Ovidius și SRBC, 9-12 iunie 2010, CONSTANȚA
- Sesiunea de comunicări științifice **„INTERACȚIUNII MOLECULARE ÎN LUMEA VIE”**, Universitatea Al. I. Cuza, 15-16 octombrie 2010, IAȘI
- Sesiunea de comunicări științifice **„BIODIVERSITATE ȘI DEZVOLTARE DURABILĂ”**, Universitatea Al. I. Cuza, 15-16 octombrie 2010, IAȘI
- Sesiunea de comunicări științifice **„CALITATEA ȘI MONITORINGUL MEDIULUI ÎNCONJURĂTOR - DEZVOLATAREA DURABILĂ ÎN MEDIUL NATURAL”**, Universitatea Maritimă, 31 octombrie 2010, CONSTANȚA
- Sesiunea de comunicări științifice **„A XXI-A SESIUNE DE COMUNICĂRI ȘTIINȚIFICE A CADRELOR DIDACTICE ȘI STUDENȚILOR”**, Universitatea Ovidius, 25-26 martie 2011, CONSTANȚA
- Sesiunea de comunicări științifice **„MANAGEMENTUL ECOLOGIC AL Mării NEGRE ÎN MILENIUL III”**, INCDM, 29-30 octombrie 2011, CONSTANȚA
- Sesiunea de comunicări științifice **„IMPACTUL UMAN ASUPRA BIODIVERSITĂȚII ZONELOR Mării NEGRE”**, STAȚIUNEA BIOLOGICĂ AGIGEA, 29-30 octombrie 2011, CONSTANȚA
- Sesiunea de comunicări științifice **„BIODIVERSITATEA *IN SITU* ȘI *EX SITU* – BCIS”**, 21- 25 martie 2012, CONSTANȚA

2. Sesiuni științifice internaționale

- Sesiunea de comunicări științifice **„A 21^A CONFERINȚĂ INTERNAȚIONALĂ”**, Universitatea Tracia - Asociația Omenilor de Știință, 2-3 iunie 2011, STARA ZAGORA, BULGARIA
- Sesiunea de comunicări științifice **„AL 3^{LEA} CONGRES INTERNAȚIONAL SNBC”**, 8-12 iunie 2011, Universitatea Vasile Goldis Arad, Romania – Centrul Biologic, SZEGED, UNGARIA
- Sesiunea de comunicări științifice **„CONGRESUL MULTIDISCIPLINAR SGEM”**, 17 - 23 iunie 2012, ALBENA, BULGARIA

III. COMUNICĂRI ORALE:

- **„Cercetări microbiologice și rolul microorganismelor marine în ecologia Mării Negre”**, Moldoveanu Aurelia Manuela, Sesiunea Mare Nostrum, 31 octombrie 2007
- **„Formarea biofilmelor în condiții de laborator”**, Sesiune Marea Neagra UMC, 31 octombrie 2010
- **„The influence of green algae extract on bacterial biofilms in static conditions”**, Moldoveanu Aurelia Manuela, Sesiune Bulgaria 2-3 iunie 2011

- „The temporal dynamic of bacterial biofilms in intermittent and continuous conditions in recipients”, Moldoveanu Aurelia Manuela, Sesiune Bulgaria 2-3 iunie 2011
- „The influences of Mytilus extract on biofilm celule attachment”, Moldoveanu Aurelia Manuela, Sesiune Arad 8-12 iunie 2011
- „Environmental factors influences on bacterial biofilm formation”, Moldoveanu Aurelia Manuela, Sesiune Arad 8-12 iunie 2011
- „Marine biofilms temporal dynamics from formation to detachment phase”, Moldoveanu Aurelia Manuela, Sesiune BCIS 21-25 martie 2012
- „The dynamics of marine bacterioneuston in laboratory microcosms: 1. The influence of salinity and temperature”, Moldoveanu Aurelia Manuela, Sesiune SGEM 17 - 23 iunie 2012

IV. POSTERE:

- „Studii privind dinamica temporală și formarea biofilmelor bacteriene pe suprafața hidrofilă a sticlei în condiții statice și dinamice”, Moldoveanu Aurelia Manuela, Ioan I. Ardelean, Universitatea Valahia, 28-30 aprilie 2010, TÂRGOVIȘTE
- „Formarea biofilmelor bacteriene pe suprafața hidrofilă a sticlei în condiții statice de laborator: efectul salinității și temperaturii”, Moldoveanu Aurelia Manuela, Ioan I. Ardelean, Universitatea Ovidius , 7-8 iunie 2010, CONSTANȚA
- „Analiza dinamicii temporale a biofilmelor bacteriene formate pe suprafețe hidrofile și hidrofobe în condiții de recipient”, Moldoveanu Aurelia Manuela, Universitatea Ovidius și SRBC, 9-12 iunie 2010, CONSTANȚA
- „Utilizarea concentrațiilor scăzute de substanță organică de către procariotele marine fixate pe suprafețele hidrofile imersate în apa marină”, Moldoveanu Aurelia Manuela, Universitatea Al. I. Cuza , 15-16 octombrie 2010, IASI
- „Influența substanțelor organice asupra formării coloniilor bacteriene și tipurilor de celule prezente în biofilme”, Moldoveanu Aurelia Manuela, Universitatea Al. I. Cuza, 15-16 octombrie 2010, IASI
- „Dinamica formării biofilmelor marine pe suprafețe hidrofile și hidrofobe în condiții de laborator” , Moldoveanu Aurelia Manuela, Ioan I. Ardelean Universitatea Ovidius , 25-26 martie 2011, CONSTANȚA
- „The influence of interfaces on marine biofilms in static conditions”, Moldoveanu Aurelia Manuela, Ioan I. Ardelean, Universitatea Ovidius , 20-22 octombrie 2011, AGIGEA – CONSTANȚA
- „The dynamics of marine bacterioneuston in laboratory microcosms: 2. The influence of organic matter”, Moldoveanu Aurelia Manuela, Ioan I. Ardelean Universitatea Ovidius , 17 - 23 iunie 2012, SGEM, ALBENA, BULGARIA

V. REZUMATE:

- „The influence of interfaces on marine biofilms in static conditions”, Moldoveanu Aurelia Manuela, Ioan I. Ardelean
- „Marine biofilms temporal dynamics from formation to detachment phase”, Moldoveanu Aurelia Manuela

VI. CURSURI POSTUNIVERSITARE :

- Cursul Postuniversitar de studii avansate „Realizări și perspective în Biologie” organizat de Institutul de Biologie al Academiei Române, ediția 2008, cu tema: „Impactul factorilor de mediu asupra Biodiversității”, 5 – 7 noiembrie 2008

- **Cursul Postuniversitar** de studii avansate „**Realizări și perspective în Biologie**”, organizat de Institutul de Biologie al Academiei Române, ediția 2009, cu tema: „Complexitatea biologică sub aspect macro, micro, nano”, 8 – 10 iulie 2009
- **Sesiunea de Training** în Autorat Științific din cadrul proiectului „**Doctoratul în Scoli de Excelență**”, 27 - 28 August 2009