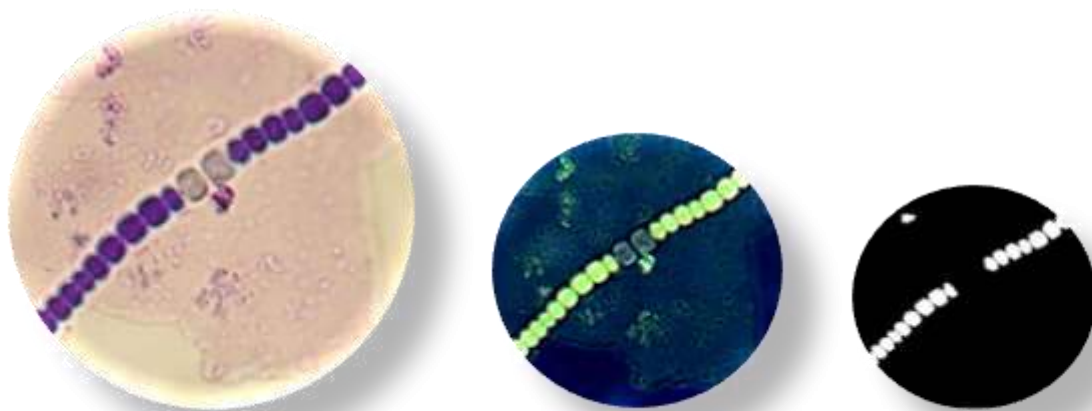


MINISTERUL EDUCAȚIEI, CERCETĂRII, TINERETULUI ȘI SPORTULUI
UNIVERSITATEA “OVIDIUS” CONSTANȚA
FACULTATEA DE ȘTIINȚE ALE NATURII ȘI ȘTIINȚE AGRICOLE
ȘCOALA DOCTORALĂ - DOMENIUL BIOLOGIE

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

*“Cianobacterii din ape mezotermale sulfuroase
(Obanul Mare – Mangalia)”*



Coordonator științific,
Prof. Univ. Dr. IOAN ARDELEAN

Doctorand,
BENLIAN (SARCHIZIAN) IRIS

CONSTANȚA
2012

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

	Teza	Rezumat
INTRODUCERE.....	1	1
PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII CIANOBACTERIILOR RAPORTAT LA CELE MAI RECENTE DATE DIN LITERATURA DE SPECIALITATE		
CAPITOLUL 1. CIANOBACTERIILE – ASPECTE GENERALE	3	2
1.1. Caracteristicile generale ale cianobacteriilor.....	4	
1.1.1. Diversitatea morfologică a cianobacteriilor.....	6	
1.1.2. Diversitatea fiziologică a cianobacteriilor.....	14	
1.1.2.1. Cianobacterii criofile.....	18	
1.1.2.2. Cianobacterii mezofile.....	18	
1.1.2.3. Cianobacterii termofile.....	19	
1.2. Clasificarea cianobacteriilor.....	21	
CAPITOLUL 2. IMPORTANȚA TEORETICĂ ȘI APLICATIVĂ A CIANOBACTERIILOR		3
2.1. Cianobacteriile - sursă de oxigen a planetei în trecut și în prezent.....	28	
2.2. Importanța fotosintezei și respirației la cianobacterii.....	29	
2.3. Cianobacteriile și biotehnologia.....	35	
2.3.1. Cianobacteriile – model de sistem biologic pentru studiul nanoparticulelor asupra procariotelor.....	39	
2.3.2. Cianobacteriile – model de sistem biologic pentru producerea de nanoparticule.....	40	
PARTEA A II-A. CONTRIBUȚII PERSONALE		
OBIECTIVELE CERCETĂRII.....	42	5
CAPITOLUL 3. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE		6
3.1. Prelevarea probelor și descrierea zonei de studiu.....	43	
3.2. Metode de fixare și conservare a probelor de apă.....	48	
3.3. Metode de colorare utilizate în studierea cianobacteriilor.....	49	
3.3.1. Metoda de colorare cu fuxină bazică.....	50	
3.3.2. Metoda de colorare cu cristal violet (colorația Gram).....	50	
3.3.3. Metoda negativă de colorare a capsulei cu tuș de India/China.....	50	
3.3.4. Metoda de colorare dublă cu anilin blue și tuș de China.....	52	
3.3.5. Metoda de colorare cu albastru de metilen alcalin Loeffler.....	52	
3.4. Metode de colorare și vizualizare a cianobacteriilor utilizând microscopia de epifluorescență.....	52	
3.4.1. Metoda de vizualizare a fluorescenței naturale a clorofilei <i>a</i>	53	
3.4.2. Metoda de colorație cu acridin orange sau DAPI.....	54	
3.4.3. Metoda de colorare cu aniline blue.....	55	
3.4.4. Metoda de colorare cu doturi cuantice.....	56	
3.5. Metode de izolare a unor noi tulpini de cianobacterii din izvorul sulfuros mezotermal de la Obanul Mare – Mangalia.....	57	
3.5.1. Metode de izolare și cultivare a cianobacteriilor unicelulare din genul <i>Synechocystis</i> sp.....	58	
3.5.2. Metode de izolare și cultivare a cianobacteriilor filamentoase oxigenice diazotrofe din genul <i>Nostoc</i> sp.....	59	
3.5.3. Metode de izolare și cultivare a cianobacteriilor filamentoase oxigenice fără heterochiști din genul <i>Anabaena</i> sp.....	60	
3.5.4. Metode de izolare și cultivare a cianobacteriilor filamentoase oxigenice din genul <i>Tychonema</i> sp.....	60	

3.5.5. Metode de izolare și cultivare a cianobacteriilor unicelulare și filamentoase anoxigenice.....	61
3.5.6. Metode de izolare și cultivare a cianobacteriilor filamentoase oxigenice și anoxigenice termotolerante.....	62
3.6. Metode de purificare izolatelor de cianobacterii.....	62
3.6.1. Obținerea culturilor axenice de cianobacterii diazotrofe prin utilizarea antibioticelor tienam, augmentin, acid nalidixic și cefalexina.....	64
3.6.2. Obținerea culturilor axenice de cianobacterii utilizând lizozimul.....	70
3.7. Metode de identificare a tulpinilor noi de cianobacterii izolate.....	77
3.7.1. Cheia de identificare a Subsecțiunii III.....	77
3.7.2. Cheia de identificare a Subsecțiunii IV.....	80
3.7.3. Utilizarea analizei de imagine digitală pentru studierea caracterelor morfologice și fiziologice ale cianobacteriilor izolate.....	83
3.7.3.1. Vizualizarea și studierea caracterelor morfologice ale cianobacteriilor utilizând programul CellC.....	85
3.7.3.2. Vizualizarea și studierea caracterelor morfologice ale cianobacteriilor utilizând programul ImageJ.....	88
3.8. Metode de determinare a ratei de creștere a cianobacteriilor în diverse condiții – fotosinteza oxigenică pe mediul BG ₀ și mediul BG ₁₁	89
3.8.1. Metoda spectrofotometrică de determinare a conținutului de azotați și amoniu.....	89
3.8.2. Metode de determinare a ratei de creștere a cianobacteriilor prin metoda spectrofotometrică.....	94
3.8.3. Metode de determinare a ratei de creștere a cianobacteriilor prin calculul frecvenței celulelor aflate în diviziune.....	94
3.8.3.1. Determinarea ratei de creștere la tulpina de cianobacterii formatoare de heterochiști din genul <i>Anabaena</i> sp.....	95
3.8.3.2. Determinarea ratei de creștere la tulpina de <i>Tychonema</i> sp.....	96
3.8.4. Metode de determinare numerică a celulelor capabile de creștere și multiplicare prin metoda desrîșă de Kogure și colaboratorii (1979).....	97
3.8.4.1. Determinarea directă a celulelor capabile de creștere și multiplicare la tulpina <i>Anabaena</i> sp.....	99
3.8.4.2. Determinarea directă a celulelor capabile de creștere și multiplicare la tulpina <i>Synechocystis</i> PCC 6803.....	100
3.8.4.3. Determinarea directă a celulelor capabile de creștere și multiplicare la tulpina de cianobacterii unicelulare din genul <i>Synechocystis</i> sp.....	100
3.8.4.4. Determinarea directă a celulelor capabile de creștere și multiplicare la populații naturale de cianobacterii.....	101
3.9. Metode de studiere a proprietăților redox la nivel celular la unele izolate.....	102
3.9.1. Măsurarea spectrofotometrică a activității dehidrogenazice la unele populații de cianobacterii.....	104
3.9.2. Cuantificarea proprietăților redox la nivel de individ biologic (filamentul de cianobacterie) la <i>Anabaena</i> sp.....	106
3.9.3. Cuantificarea proprietăților redox la nivel de celulă individuală din filamentul de cianobacterie la tulpina <i>Anabaena</i> sp.....	109
3.10. Metode de investigare a interacțiunii dintre doturile cuantice (CdSe/ZnS) și populațiile de cianobacterii.....	110
3.10.1. Marcarea cu doturi cuantice a cianobacteriilor din probe naturale și culturi îmbogățite.....	110

3.10.2. Evidențierea în fluorescență a cianobacteriilor marcate cu doturi cuantice.....	112	
3.10.3. Metode de studiere a efectului citotoxic al doturilor cuantice asupra cianobacteriilor.....	120	
CAPITOLUL 4. REZULTATE ȘI DISCUȚII		7
4.1. Populații de cianobacterii unicelulare și filamentoase din probe naturale recoltate din izvorul sulfuros mezotermal de la Obanul Mare – Mangalia.....	122	
4.2. Izolarea unor noi tulpini de cianobacterii.....	140	
4.3. Obținerea culturilor axenice de cianobacterii diazotrofe prin utilizarea antibioticelor tienam, augmentin, acid nalidixic, cefalexina.....	141	
4.4. Utilizarea lizozimului pentru obținerea culturilor axenice de cianobacterii.....	148	
4.5. Identificarea izolatelor din culturile axenice.....	152	
4.6. Studiarea unor aspecte fiziologice la tulpinile de cianobacterii izolate.....	155	
4.6.1. Determinarea ratei de creștere a cianobacteriilor prin metoda spectrofotometrică.....	155	
4.6.2. Determinarea ratei de creștere a cianobacteriilor prin calculul frecvenței celulelor aflate în diviziune.....	159	
4.6.2.1. Determinarea ratei de creștere la <i>Anabaena</i> sp.....	160	
4.6.2.2. Determinarea ratei de creștere la <i>Tychonema</i> sp.....	164	
4.6.3. Determinarea numerică a celulelor capabile de creștere și multiplicare la diferite tulpini de cianobacterii.....	166	
4.6.3.1. Determinarea directă a celulelor capabile de creștere și multiplicare la <i>Anabaena</i> sp.....	167	
4.6.3.2. Determinarea directă a celulelor capabile de creștere și multiplicare tulpina <i>Synechocystis</i> PCC 6803.....	169	
4.6.3.3. Determinarea directă a celulelor capabile de creștere și izolatul unicelular <i>Synechocystis</i> sp.....	173	
4.6.3.4. Determinarea directă a celulelor capabile de creștere și multiplicare la populații naturale de cianobacterii.....	175	
4.6.4. Cuantificarea proprietăților redox la unele tulpini de cianobacterii		
4.6.4.1. Măsurarea spectrofotometrică a activității dehidrogenazice la unele populații de cianobacterii.....	178	
4.6.4.2. Cuantificarea proprietăților redox la nivel de individ biologic (filamentul de cianobacterie de <i>Anabaena</i> sp.).....	178	
4.6.4.3. Cuantificarea proprietăților redox la nivel de celulă individuală din filamentul de <i>Anabaena</i> sp.....	192	
4.6.5. Utilizarea doturilor cuantice în studierea citotoxicității cianobacteriilor.....	195	
4.6.5.1. Marcarea cianobacteriilor din probe naturale și culturi îmbogățite utilizând doturi cuantice.....	196	
4.6.5.2. Studiul efectului citotoxic al doturilor cuantice asupra cianobacteriilor.....	210	
CONCLUZII GENERALE	216	25
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	222	28
ANEXA PERSONALĂ	253	32

Cuvinte-cheie: cianobacterii; identificare; rata de creștere; determinarea numerică a celulelor capabile de creștere și multiplicare; studiarea proprietăților redox la nivel populațional și la nivel de celulă individuală; citotoxicitatea doturilor cuantice (CdSe/ZnS); analiza automată a imaginilor microscopice.

INTRODUCERE

Cianobacteriile s-au aflat întotdeauna în atenția lumii științifice, interesul manifestat față de acest grup de organisme fiind determinat și de faptul că cianobacteriile constituie un grup de procariote fotosintezatoare cu un rol esențial și specific în evoluția biosferei. Astfel, spre a reaminti doar diversitatea metabolică care le asigură existența într-un spectru larg de factori ecologici, inclusiv în condiții extreme, cum ar fi mediul acvatic sulfuros, subiectul tezei de doctorat se încadrează în cercetările care au loc la nivel internațional.

Alegerea temei de cercetare cu titlul *“Cianobacterii din ape mezotermale sulfuroase (Obanul Mare – Mangalia)”* a fost realizată în urma consultării literaturii existente, dar insuficiența datelor referitoare la cianobacteriile din mediile acvatice sulfuroase din țara noastră m-a determinat să abordez acest subiect nou și fascinant.

Importanța temei de cercetare doctorală asupra căreia m-am oprit rezidă din faptul că studiile științifice ridică doar întrebări și probleme, astfel că demersul parcurs în activitatea de cercetare proprie a fost destul de anevoios, evidențiind originalitatea îmbinării metodelor de cercetare teoretice cu cele practice, a celor clasice cu cele moderne, care au condus la concluziile generale ale tezei de doctorat.

Scopul tezei de doctorat este izolarea, purificarea și identificarea la nivel de gen pe principiile taxonomiei bacteriene a unor tulpini de cianobacterii izolate din probe naturale recoltate din izvorul sulfuros mezotermal de la Obanul Mare – Mangalia, utilizând metode clasice îmbunătățite prin adăugarea sursei de carbon înaintea antibioticului; studierea unor aspecte fiziologice ale unor izolate, cum ar fi: determinarea prin metode spectrofotometrice a ratei de creștere a cianobacteriilor cultivate aerob pe medii de cultură diferite: BG₀ și BG₁₁ sau prin calculul frecvenței celulelor în diviziune; determinarea numerică a celulelor capabile de creștere și multiplicare prin metoda desră de Kogure și colaboratorii pentru bacteriile heterotrofe (1979); studierea prin metode spectrofotometrice a proprietăților redox la nivel populațional la unele tulpini de cianobacterii izolate precum și prin analiză automată a imaginilor digitale obținute la microscop; marcarea cianobacteriilor cu doturi cuantice (CdSe/ZnS) și studierea efectului citotoxic al doturilor cuantice asupra cianobacteriilor.

Teza este structurată în cinci capitole, cuprinse în cele două părți: stadiul actual al cunoașterii cianobacteriilor raportat la cele mai recente date din literatura de specialitate (două capitole) și cercetarea experimentală (cuprinzând două capitole) și un capitol de concluzii generale.

În primul rând, teza de doctorat se remarcă prin actualitatea subiectului abordat, deoarece introducerea acestuia în sfera de preocupări a specialiștilor români și străini s-a

produs relativ târziu, nefiind posibilă dezvoltarea în țara noastră a unor tehnici avansate în domeniul microbiologiei la nivel de celulă individuală, combinată cu analiza de imagine digitală.

În vederea documentării și realizării acestei teze am consultat aproximativ 380 de titluri și referințe bibliografice sugestive, din care aproximativ 60 fiind publicate în ultimii cinci ani, ceea ce mi-a permis obținerea rezultatelor experimentale noi corelate cu cele obținute pe plan internațional. Dintre acestea, sunt de evidențiat cele ce deschid cercetările de microbiologie, biologie în general, către analiza automată a imaginilor digitale, o direcție de mare actualitate pe plan internațional și național, fapt ce a fost posibil printr-o permanentă colaborare cu specialiști internaționali, ceea ce a permis o dezvoltare aparte în cadrul acestei teze de doctorat.

Pe linia contribuțiilor proprii se înscriu, de asemenea, modul de prelucrare a informațiilor, capacitatea de sinteză și maniera de interpretare a datelor, precum și transdisciplinaritatea, care au permis argumentarea opiniilor personale strecurate pe tot parcursul lucrării, pentru a accentua viziunea proprie asupra fenomenelor analizate.

Nu în ultimul rând, o contribuție proprie este prezentă și sub forma propunerilor adresate la finalul capitolelor, cu privire la metodele moderne de lucru folosite cu scopul ușurării efortului depus de către cercetător pentru prelucrarea unui set mare de date precise și reproductibile, într-un timp relativ scurt.

CAPITOLUL 1. CIANOBACTERIILE – ASPECTE GENERALE

Capitolul 1 expune caracteristicilor generale ale cianobacteriilor, a diversității morfologice și fiziologice a acestora, precum și cu principalele caracteristici ale cianobacteriilor criofile, mezofile și termofile.

Cianobacteriile reprezintă cel mai mare și mai divers grup de bacterii fotosintetizante oxigenice. Inițial, cianobacteriile au fost considerate alge datorită următoarelor caracteristici: dimensiuni mari; sunt organisme fototrofe oxigenice (folosesc H_2O ca donator de electroni cu producere de O_2); conțin fotosistemele I și II responsabile de descompunerea H_2O cu ajutorul energiei luminoase absorbite; conțin clorofila *a* și β -caroten, ficobiliproteine în calitate de pigmenți accesorii: fotosinteza este asemănătoare cu cea a plantelor.

Cianobacteriile pot fi găsite în toate ecosistemele acvatice, variind de la izvoare hidrotermale, până la zonele arctice (Carmichael și colab., 1990).

Fiind cele mai vechi microorganisme producătoare de oxigen (Schöpf, 2000), cianobacteriile au jucat un rol-cheie în evoluția Terrei încă de la prima lor apariție acum 2,15 miliarde de ani în urmă (Hoffmann, 1975; Knopf 2006; Ramussen 2008). Lunga istorie a cianobacteriilor este responsabilă de capacitatea lor de a fi bine adaptate la mediu de stres, inclusiv la substanțe nutritive rare și abundente (Paerl, 2006), expunerea la radiații UV, la radiații solare înaltă și mai presus de toate la temperaturi ridicate (Paerl et al 1985; Robarts & Zohary 1987; Briand, 2004). Aceste condiții speciale pot favoriza poziția dominantă a cianobacteriilor în multe habitate acvatice. Capacitatea cianobacteriilor de a fi foarte tolerante atunci când sunt supuse la factori de stres diverși sugerează că cianobacterii sunt susceptibile de a beneficia de schimbările de mediu asociate cu încălzirea globală (Paerl și Huisman, 2008; Paerl 2009).

Recent, Whitton și Potts (2000) au demonstrat diversitatea morfologică a cianobacteriilor - forme filamentose și unicelulare - care se pot agrega în colonii, celulele din colonii putând fi aranjate în moduri diferite (radial, plane sau neregulate). Unele prezintă celule specializate pentru fixarea azotului (heterocisti), celule care pot supraviețui în condiții de stres (akineti) și pentru dispersie (hormogonii).

Capitolul se încheie cu prezentarea clasificării cianobacteriilor, ca procariote, ilustrată în *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (2001), care încadrează cianobacteriile în grupul *Cyanobacteria*, ce conține cinci ordine cu 34 de genuri (Castenholz, 2001).

CAPITOLUL 2. IMPORTANȚA TEORETICĂ ȘI APLICATIVĂ A CIANOBACTERIILOR

Pentru a înțelege cât mai bine structura cianobacteriilor, am studiat importanța teoretică și aplicativă a acestora, deoarece cianobacteriile reprezintă una dintre puținele grupe de organisme care pot efectua simultan fotosinteză oxigenică și respirația în același compartiment, unele specii fiind capabile să fixeze azot. Această combinație de căi metabolice este neobișnuită, iar flexibilitatea metabolică poate fi responsabilă de evoluția cianobacteriilor, precum și de capacitatea lor de a se dezvolta în condiții extreme. Cianobacteriile sunt cele mai vechi organisme din punct de vedere al evoluției: microfosilele găsite ca având o vechime de 3,5 miliarde ani au fost atribuite ca aparținând cianobacteriilor (Schopf, 1993). O cauză importantă pentru evoluția cianobacteriilor este combinația reușită a căilor metabolice.

Caracteristica tuturor speciilor de cianobacterii este operarea fotosistemul I și II, precum și folosirea apei ca sursă de electroni pentru fotosinteză. Toți reprezentanții cianobacteriilor conțin clorofila a și sunt capabili de creștere fotoautotrofa, cu toate că și creșterea fotoheterotrofă și cea chemoautotrofă sunt comune la multe specii. Morfologia și ciclul de viață al acestui grup este foarte complex. Combinarea fotosintezei și respirației într-un singur compartiment este unică. Fotosinteza și respirația necesită căi de transport a electronilor catalizate de proteine complexe la nivelul membranelor.

Importanța fotosintezei și respirației la cianobacterii, precum și utilizarea cianobacteriilor ca model de sistem biologic pentru studiul nanoparticulelor asupra procariotelor sau ca model de sistem biologic pentru producerea de nanoparticule a reprezentat un capitol foarte incitant din punct de vedere al informațiilor prezentate. Astfel, nanotehnologia este în curs de extindere în multe domenii, chiar și țările în curs de dezvoltare au decis de asemenea că această nouă tehnologie ar putea reprezenta o investiție care nu poate fi ignorată, aducând beneficii asupra viitorului economic și bunăstării sociale. În cazul noilor tehnologii, există o preocupare crescută cu privire la posibilele efecte secundare provenite în urma utilizării de nanoparticule. Datorită utilizării crescute a nanotehnologiilor, trebuie să fie bine înțelese riscurile asociate cu expunerea la nanoparticule, rutele de intrare și mecanismele moleculare de citotoxicitate. Doturile cuantice sunt solubile în apă, având aplicații biologice, sunt de obicei pasivizate de diferite straturi anorganice și/sau organice în vederea creșterii randamentului fluorescenței (Kloepfer et al, 2004). Aceste învelișuri măresc foarte mult mărimea particulelor, făcând imposibilă absorbția lor de către microorganisme.

Doturile cuantice semiconductoare fluorescente pot servi ca nivele on/off pentru bacterii și alte celule vii; ele afectează transportul de electroni referitor la metabolismul energetic, atât la bacteriile fototrofe, cât și la bacteriile heterotrofe. Pentru a explica aceste rezultate s-a luat în considerare proprietățile fizico-chimice ale doturilor cuantice în legătură cu diferențele ultrastructurale ale bacteriilor Gram-negative și Gram-pozitive și cu localizarea celulară a principalelor procese energetice, respirație și fotosinteză. În acest sens, o atenție deosebită se concentrează din ce în ce mai mult pe interacțiunea dintre doturile cuantice și cianobacterii pentru perioade mai lungi de timp, deoarece aceste procariote oxigenice fototrofe au contribuții majore la sinteza materiei organice în mediile acvatice pe care le populează, la consumul de dioxid de carbon și la producția oxigen molecular.

O problemă importantă în toate aceste experimente se referă la relația fizică dintre populațiile microbiene și diferite doturi cuantice, cu accent special pe poziția doturilor cuantice față de peretele celular și membrana celulei. Se pare logic să presupunem că primul

sit de interacțiune între aceste nanoparticule și celule este la nivelul peretelui celular, cu toate acestea peretele celular are o structură destul de diferită în bacteriilor Gram-negative (inclusiv cianobacterii) și Gram-pozitive bacterii.

Accesul fizic al doturilor cuantice la fața externă a membranei celulare (spre peretele celular) este încă o problemă deschisă, precum și abilitatea doturilor cuantice cu dimensiuni nanometrice de a trece prin membrana celulară intactă (sau anterior deteriorată!) pentru a intra în citoplasmă (Ardelean și colab., 2011).

OBIECTIVELE CERCETĂRIILOR

1. Izolarea unor tulpini de cianobacterii din probe naturale recoltate din izvorul sulfuros mezotermal de la Obanul Mare – Mangalia;
2. Purificarea unor tulpini de cianobacterii utilizând metode clasice;
3. Îmbunătățirea metodelor de purificare clasice prin adăugarea sursei de carbon înainte de antibioticul;
4. Identificarea la nivel de gen a unora dintre tulpinile de cianobacterii purificate, pe principiile taxonomiei bacteriene;
5. Studiarea următoarelor aspecte fiziologice ale unor izolate :
 - a. Determinarea prin metode spectrofotometrice a ratei de creștere a cianobacteriilor cultivate aerob (fotosinteza oxigenică) pe medii de cultură diferite - BG₀ și BG₁₁;
 - b. Determinarea ratei de creștere a cianobacteriilor prin calculul frecvenței celulelor în diviziune;
 - c. Determinarea numerică a celulelor capabile de creștere și multiplicare prin metoda descrisă de Kogure și colaboratorii (1979);
 - d. Studiarea prin metode spectrofotometrice a proprietăților redox la nivel populațional la unele tulpini de cianobacterii izolate;
 - e. Studiarea proprietăților redox la nivel celular la unele tulpini de cianobacterii izolate prin analiză automată a imaginilor microscopice;
 - f. Marcarea cianobacteriilor cu doturi cuantice (CdSe/ZnS);
 - g. Studiarea efectului citotoxic al doturilor cuantice asupra cianobacteriilor.

CAPITOLUL 3. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Acest prim capitol din partea experimentală a tezei este axat pe descrierea zonei de studiu (fiind pentru prima dată când se studiază cianobacteriile din izvorul sulfuros mezotermal de la Obanul Mare), a modului de prelevare a probelor, de fixare și conservare a probelor de apă, a metodelor de colorare utilizate în studierea cianobacteriilor, a metode de vizualizare a cianobacteriilor utilizând microscopia în comp luminos și în (epi)fluorescență. Sunt deasemenea descrise cu precizie metodele de izolare și cultivare a unor tulpini de cianobacterii din izvorul sulfuros mezotermal de la Obanul Mare – Mangalia (din genul *Synechocystis* sp., *Nostoc* sp., *Anabaena* sp., *Tychonema* sp., a cianobacteriilor unicelulare și filamentoase anoxigenice, a cianobacteriilor filamentoase oxigenice și anoxigenice termotolerante) precum și purificarea izolatelor de cianobacterii și obținerea culturilor axenice de cianobacterii diazotrofe prin utilizarea antibioticelor tienam, augmentin, acid nalidixic și cefalexina, lizozim.

Identificarea tulpinilor de cianobacterii izolate, precum și utilizarea analizei de imagine digitală pentru studierea caracterelor morfologice și fiziologice ale cianobacteriilor izolate, studierea caracterelor morfologice ale cianobacteriilor utilizând programul CellC și ImageJ sunt descrise în amănunțime în acest capitol.

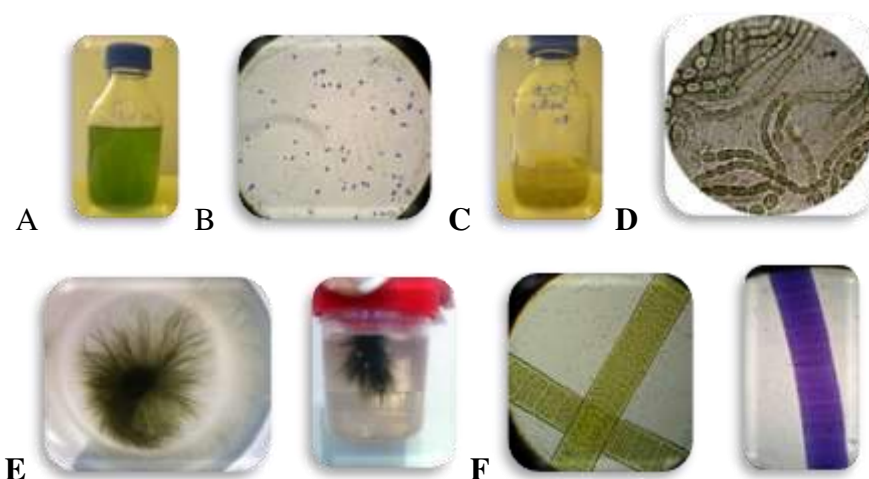


Figura 1. (Figura 3.7., 3.9., 3.10). Aspectul macroscopic (A,C, E) și microscopic (B,D,F) al culturii îmbogățite de cianobacterii unicelulare și filamentoase; E - Aspectul macroscopic al culturii îmbogățite cultivate pe mediu lichid BG₁₁ (A); aspectul microscopic al culturii îmbogățite cultivate pe mediu lichid BG₁₁ după colorare cu cristal violet (original).

De asemenea, sunt prezentate și metodele de determinare a ratei de creștere a cianobacteriilor în diverse condiții atât prin clasică metodă spectrofotometrică dar și prin determinare și calcularea frecvenței celulelor aflate în diviziune la tulpina de cianobacterii formatoare de heterochiști din genul *Anabaena* sp. și la tulpina de *Tychonema* sp.;

determinarea numerică a celulelor capabile de creștere și multiplicare prin metoda descrisă de Kogure și colaboratorii (1979) la tulpina *Anabaena* sp. , la tulpina *Synechocystis* PCC 6803, precum și la tulpina de cianobacterii unicelulare din genul *Synechocystis* sp., ultima metoda fiind aplicata și populațiilor naturale de cianobacterii din izvorul sulfuros mezotermal. Studiarea proprietăților redox la nivel celular la unele izolate prin analiza automata a imaginilor digitale, măsurarea spectrofotometrică a activității dehidrogenazice la unele populații de cianobacterii precum și cuantificarea proprietăților redox la nivel de individ biologic (filamentul de cianobacterie) la *Anabaena* sp., constituie tot atatea metodologii bine utilizate de către doctorandă, împreună cu investigarea interacțiunii dintre doturile cuantice (CdSe/ZnS) și populațiile de și a evidențierii în fluorescență a cianobacteriilor marcate cu doturi cuantice, precum și studierea efectului citotoxic al doturilor cuantice asupra cianobacteriilor.

CAPITOLUL 4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Următorul capitol intitulat “Rezultate și discuții” cuprinde rezultatele originale ale experimentelor realizate referitoare la izolarea, cultivarea și îmbunătățirea metodelor de purificare a unor tulpini de cianobacterii. Utilizarea metodei de analiză a imaginilor digitale obținute la microscop prin combinarea algoritmilor matematici din programele CellC și ImageJ a făcut posibilă pentru prima dată, după consultarea literaturii de specialitate internaționale, identificarea precisă într-un timp relativ scurt a numărului celulelor analizate din filamentele cianobacteriene din imagini digitale realizate în câmp luminos. Cele două programe mi-au permis să obțin cu succes imagini automate din imagini cu fundal luminos prin etape care reprezintă practic pașii-cheie în obținerea datelor experimentale.

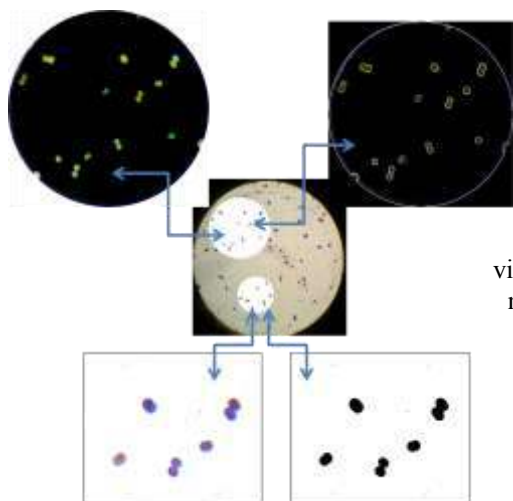


Figura 2 (Figura 4.3.). Vizualizarea în câmp luminos a cianobacteriilor unicelulare din genul *Synechocystis* sp. prin colorație cu cristal violet 0,02%: A – detaliu al câmpului microscopic cu cianobacterii unicelulare din probele naturale colectate; B – detectarea formei celulelor și a conturului acestora; C - imaginea câmpului microscopic cu cianobacterii unicelulare; D – detalii ale diferitelor regiuni de interes analizate; E- vizualizarea cianobacteriilor unicelulare utilizand numai alb și negru (Oc.10x, Ob.40x) (scala de marime 10 μm) (original).

În cazul izolatelor noastre am identificat următoarele genuri de cianobacterii, conform manualului Bergey 2001: *Synechocystis sp.*, *Synechocystis sp. – anoxygenic*, *Synechococcus sp.*, *Anabaena sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Nostoc 1 sp.*, *Nostoc 2 sp.*, *Tychonema sp.*

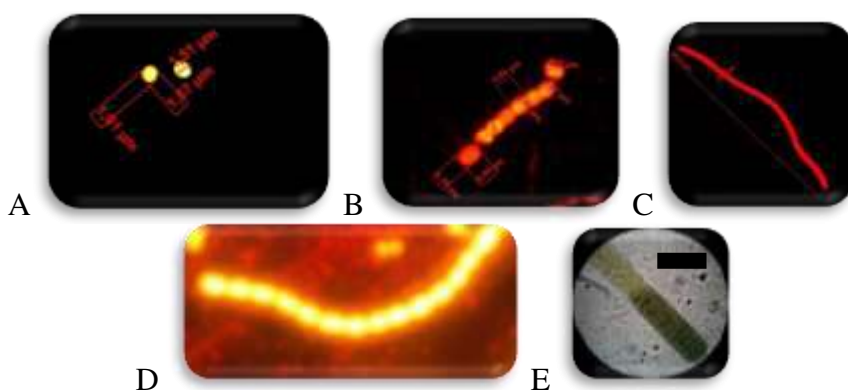


Figura 3 (Figura 4.27., 4.28, 4.29, 4.30, 4.32). A - Izolatul *Synechocystis sp.* oxygenic, B- Izolatul *Anabaena sp.* ;C - Izolatul *Oscillatoria sp.*, D - Izolatul *Nostoc 1 sp.*, Izolatul *Tychonema sp.* (original).

Scopul subcapitolului de determinare a ratei de creștere a cianobacteriilor prin metoda spectrofotometrică este de a determina rata de creștere a izolatelor de cianobacterii aflate în studiu în condiții aerobe utilizând cititorul microplaci cu spectrofotometru ultrarapid, care acoperă o gamă foarte largă de lungimi de undă, de la 220 nm la 850 nm, permițând colectarea datelor în format Excell și interpretarea lor în timp scurt. Măsurătorile s-ar realizat la D.O. 750 nm, la timpul inițial, după 3 ore, după 22 ore, după 28 ore, după 124 ore de la incubare la lumină continuă. Culturile de cianobacterii aflate în studiu au fost distribuite în godeurile microplăcii, iar citirea automată a fost realizată la 750 nm, realizandu-se concomitant câte 8 citiri (coloanae A-H), pentru fiecare cultură și pentru fiecare timp de probă analizat.

Tabelul 1 (Tabelul 4.3). Densitățile optice ale culturilor de cianobacterii cultivate pe mediul BG₀.

Timpul (ore)	D.O.750nm <i>Nostoc sp.</i>	D.O.750nm <i>Oscillatoria sp.</i>	D.O.750nm <i>Nostoc sp.</i>	D.O.750nm <i>Synechocystis sp.</i>	D.O.750nm <i>Anabaena sp.</i>	D.O.750nm <i>Synechocystis sp.</i>
0	0,07	0,079	0,097	0,566	0,097	0,184
22	0,091	0,126	0,108	0,784	0,127	0,212
28	0,095	0,236	0,139	1,178	0,308	0,258
124	0,266	0,294	0,246	1,413	1,222	0,297

Tabelul 2 (Tabelul 4.4). Densitățile optice ale culturilor de cianobacterii cultivate pe mediul BG₁₁ (original).

Timpul (ore)	D.O.750nm <i>Nostoc sp.</i>	D.O.750nm <i>Oscillatoria sp.</i>	D.O.750nm <i>Nostoc sp.</i>	D.O.750nm <i>Synechocystis sp.</i>	D.O.750nm <i>Anabaena sp.</i>	D.O.750nm <i>Synechocystis sp.</i>
0	0,07	0,17	0,084	0,7	0,077	0,11
22	0,084	0,292	0,097	0,858	0,109	0,184
28	0,091	0,681	0,178	1,161	0,137	0,237
124	0,205	0,888	0,313	1,618	0,279	0,521

Pentru calcularea timpului de generație am utilizat metoda grafică la toate culturile aflate în studiu, prin comparație, pe mediul de cultura BG₀ și BG₁₁.

Frecvența celulelor aflate în diviziune (FCD) este o măsură indirectă de măsurare a ratei medii de creștere la bacterii (Hagstrom și colab., 1979; Campbell și Carpenter, 1986; Campbell și Carpenter, 1988; Nielsen, 2006), fiind extinsă și aplicată în cadrul cercetărilor realizate pe populațiile de cianobacterii din izvorul sulfuros mezotermal de la Obanul Mare – Mangalia.

Calculul frecvenței celulelor aflate în diviziune în timpul incubării la lumină și la întuneric au arătat în mod clar diferențe importante între incubarea lumină și întuneric, care sunt în corelație puternică cu diferențe în rata de creștere determinate și prin metode clasice, spectrofotometrice. Rezultatul principal în acest experimente se referă la diferențele dintre incubarea lumină și întuneric, rata de creștere fiind mult mai mare la lumină în comparație cu rata de creștere la întuneric, mai ales după 24 de ore, rezultatele obținute prin analiza automata de imagine digitala fiind în concordanță cu cele obținute prin metoda clasică.

Apariția de celulele care se divid în probele incubate la întuneric și corespunzător, a ratelor de creștere aproape similare în primele 24 de ore ar putea fi susținută prin utilizarea la întuneric a rezervelor endogene acumulate în perioada de lumina ca o sursă de carbon și energie, în acord cu semnificația biologică a aceste incluziuni intracitoplasmatic. Scăderea bruscă atât în FCD, precum și în rata de creștere la perioade lungi de incubare la întuneric este explicată prin posibila diminuarea a rezervelor intracelulare organice și cu o schimbare în strategia celulelor de a supraviețui în condiții ostile, scăderea frecvenței de diviziune celulară fiind unul dintre răspunsurile cele mai importante ale bacteriilor împotriva lipsei de carbon și de energie.

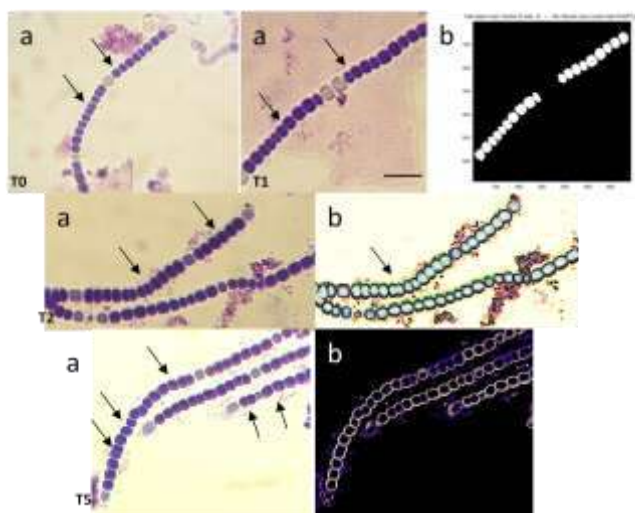


Figura 4 (Figura 4.40). Filamente de *Anabaena* sp. cu celule aflate în diviziune în timpul incubării la lumină, după colorarea cu cristal violet 0,02% la momentul inițial (T0), după 12 ore (T1), 24 ore (T2) și după 60 ore de incubare (T5); a) analiza digitală a imaginilor utilizând programele ImageJ și CellC pentru numărarea celulelor și determinarea septurilor de diviziune, săgețile indică celulele aflate în diviziune (Sarchizian și Ardelean, 2012).

Din rezultatele obținute după calcularea ratei de creștere am constatat că în timpul incubării la lumină continuă, celulele din filamentele de cianobacterii au o rată de creștere pozitivă, în timp ce prin cultivarea la întuneric, rata de creștere este negativă după 48 de ore de cultivare la întuneric, datorită anabolismului fotosintetic absent la întuneric, lipsa energiei necesare pentru creștere și multiplicare, observându-se absența creșterii la întuneric pe medii fără sursă organic.

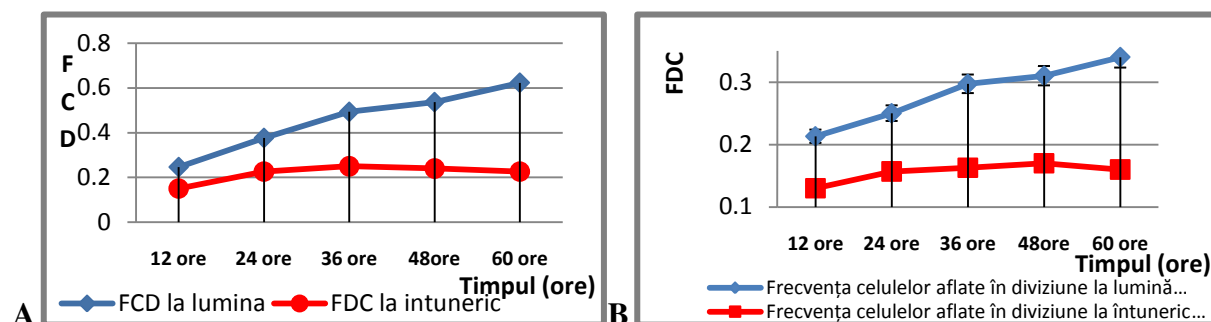


Figura 5. A (Figura 4.41). - Comparație între FCD la tulpina *Anabaena* sp. în condițiile incubării la lumină și la întuneric; **B (Figura 4.44)** - FCD la tulpina *Tychonema* sp. în condițiile incubării la lumină (linia albastră) și la întuneric (linia roșie) (original).

Rezultatele obținute în cazul tulpinii de cianobacterii neformatoare de heterochiști sunt asemănătoare cu cele obținute la tulpina formatoare de heterochiști *Anabaena* sp. Argumentarea, bazată pe diminuarea rezervelor intracelulare organice și/sau cu o schimbare în strategia celulelor cu scopul de a supraviețui în condiții ostile, probabil, sunt valabile, de asemenea, și pentru tulpina *Tychonema* sp., iar experimente programate a fi efectuate post teza, au ca scop verificarea acestei ipoteze logice de altfel, în contextul mai amplu al continuării cercetării științifice personale.

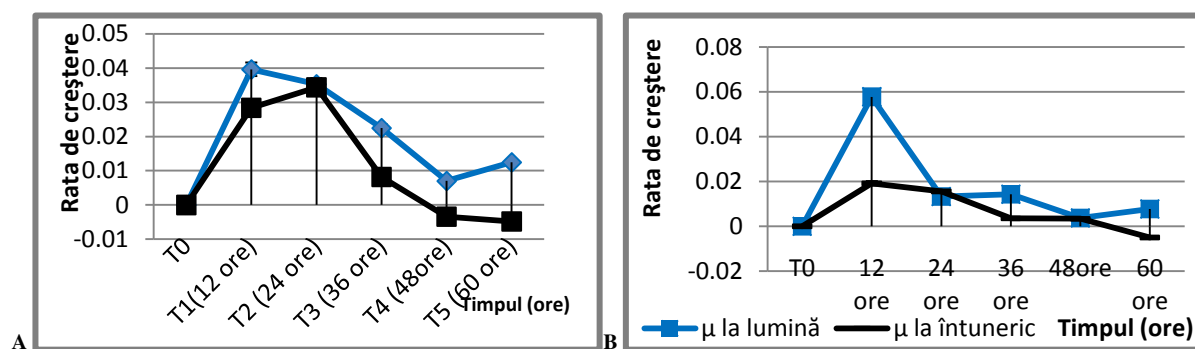


Figura 6.A - (Figura 4.42) Rata de creștere (μ) la cultura *Anabaena* sp. incubată la lumină și întuneric (linia albastră indică cultivarea la lumină; linia neagră indică cultivarea la întuneric); **B -(Figura 4.45.)**- Rata de creștere (μ) la cultura *Tychonema* sp. incubată la lumină și întuneric (linia albastră indică rata de creștere la lumină; linia neagră indică rata de creștere la întuneric) (original).

O cuantificare directă a celulelor active metabolic a fost utilizată de Kogure și colaboratorii (1987) pentru enumerarea celulelor bacteriene vii folosind o simplă incubare a probelor în prezența acidului nalidixic în diferite concentrații (Lucila și colab., 1996). Determinarea directă a celulelor capabile de creștere și multiplicare la *Anabaena* sp. a permis

obținerea datelor referitoare la creșterea dimensiunilor medii ale celulelor din fialmentele de cianobacterii analizate, de la 1,819 μm la timpul inițial, la 3,354 μm după 84 ore de incubare, de asemenea valorile minime ale celulelor cianobacteriene au crescut de-a lungul experimentului de la 0,778 μm la timpul inițial, la 1,887 μm după 84 ore de incubare, concomitent cu creșterea dimensiunilor maxime a celulelor de la 3,469 μm la timpul inițial, la 8,133 μm după 84 ore de incubare.

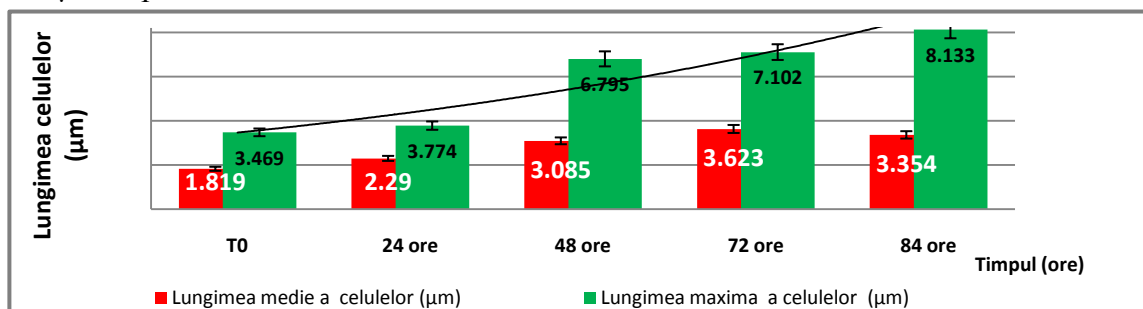


Figura 7 (Figura 4.47). Evoluția dimensiunilor medii și maxime ale celulelor din filamentele de *Anabaena* sp. la momentul inițial, după 24, 48, 72, 84 ore de incubare în prezența acidului nalidixic (Sarchizian și Ardelean, 2012).

Analizând datele experimentale am constatat că 64% din celule sunt capabile de creștere și diviziune, 7% din celulele care aparțin primei clase de dimensiuni ($< 1 \mu\text{m}$) și 57% (89%-32%) din celulele aparținând clasei 1-3 μm se pot regăsi la finalul experimentului în clasele de mărimi 3 - 6 μm (67% - 4% = 63%) și 6-9 μm (1%).

Tabelul 3 (Tabelul 4.9). Repartiția pe clase de dimensiuni a celulelor de cianobacterii din filamentele supuse incubării cu acid nalidixic (original).

Timpul de proba	Distribuția dimensiunilor celulare (%)			
	$< 1 \mu\text{m}$	1-3 μm	3-6 μm	6-9 μm
T0	7%	89%	4%	0%
12 ore	0%	94%	6%	0%
24 ore	0%	90%	10%	0%
36 ore	0%	92%	8%	0%
48 ore	0%	52%	46%	2%
60 ore	0%	80%	19%	1%
72 ore	0%	19%	79%	2%
84 ore	0%	32%	67%	1%

În ceea ce privește determinarea directă a celulelor capabile de creștere și multiplicare tulpina *Synechocystis* PCC 6803, Figura 8 prezintă aspectul microscopic al celulelor de *Synechocystis* PCC 6803 în timpul incubării cu acid nalidixic, după colorare cu cristal violet 0,02% și determinarea formei celulelor cu ajutorul programului ImageJ. Se observă creșterea în dimensiuni a celulelor de-a lungul timpului experimental, precum și alungirea acestora.

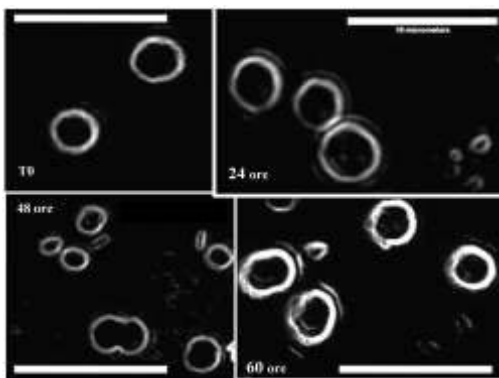


Figura 8 (Figura 4.48). Aspectul microscopic al celulelor de *Synechocystis* PCC 6803 în timpul incubării cu acid nalidixic, după colorare cu cristal violet 0,02% și determinarea formei celulelor cu ajutorul programului ImageJ, utilizând scala de mărime 10 μm (Sarchizian și Ardelean, 2012).

Din analiza evoluției dimensiunilor celulelor pe clase de mărimi (valorile procentuale) am constatat o creștere semnificativă a numărului de celule din clasa 2 - 3 μm după 2 ore de incubare la lumină în prezența acidului nalidixic, concomitent cu creșterea în dimensiuni a numărului de celule din clasa 1 - 2 μm , care ajung la valoarea de 47% la finalul celor 3 ore de incubare.

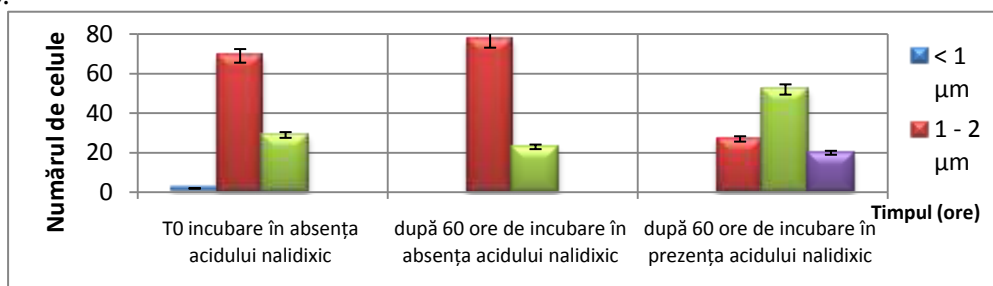


Figura 9 (Figura 4.49). Distribuția pe clase de mărimi a celulelor de *Synechocystis* PCC 6803 incubate în absența sau prezența acidului nalidixic, la începutul experimentului (T0 – 0 ore) și la finalul celor 60 ore de incubare (Sarchizian și Ardelean, 2012).

Creșterea în densitate optică a culturii este practic aceeași în absența ori în prezența acidului nalidixic, nu am constatat diferențe majore în cazul măsurării D.O. la 750 nm.

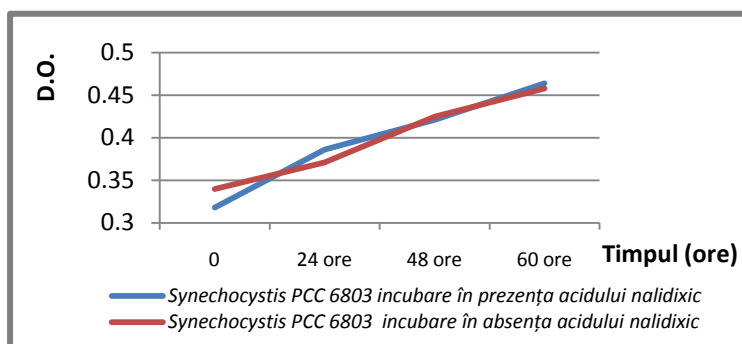


Figura 10 (Figura 4.50). Evoluția în timp a densității optice în culturile de *Synechocystis* PCC 6803 crescute în prezența sau absența acidului nalidixic (Sarchizian și Ardelean, 2012).

În subcapitolul referitor la cuantificarea proprietăților redox la unele tulpini de cianobacterii experimentele efectuate au urmărit măsurarea spectrofotometrică a activității dehidrogenazice la unele populații de cianobacterii, analizând modificările de culoare atât la nivel de filament, cât și la nivel de celulă individuală din filament. Experimente preliminare efectuate susțin cuantificarea reducerii MTT sau a 2,6 diclorfenol indofenol (ca atare sau în prezența unui transportator de electroni lipofil - fenazin metosulfat sau 2,6 dicloro

benzoquinonă) paralel cu reducerea MTT la nivel celular, măsurată ca scădere numerică în canalul albastru.

Măsurarea spectrofotometrică a activității dehidrogenazice s-a realizat în prezența DCPIP și separat în prezența DCPIP și FMT, iar în tabelul 4.18 sunt calculate ratele reducerii la culturile de cianobacterii aflate în studiu.

Tabelul 4 (Tabelul 4.18). Ratele reducerii la culturile de cianobacterii aflate în studiu (original).

Cultura de cianobacterii	Rata reducerii DCPIP ($\mu\text{moli/min/ D.O.750 nm}$)	Rata reducerii DCPIP + FMT ($\mu\text{moli/min/ D.O.750 nm}$)
<i>Synechocystis sp.</i>	3,141	6,666
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	1,047	3,044
<i>Anabaena sp.</i>	3,455	4,14

Scopul subcapitolului ce prezintă cuantificarea proprietăților redox la nivel de individ biologic (filamentul de cianobacterie de *Anabaena sp.*) este de a investiga posibilitatea tulpinii izolate de *Anabaena sp.* de a reduce un acceptor artificial de electroni, cu un accent deosebit pe determinări cantitative la nivelul unei singure celule, utilizând analiza automată de imagine pentru măsurarea precisă a culorilor celulelor din cadrul filamentelor de cianobacterii, fiind până la această dată, primul raport cu privire la utilizarea analizei de imagine automate pentru măsurarea reducerii unui transportator artificial redox la nivelul unei singure celule în cianobacterii. În acest subcapitol sunt prezentate rezultatele cantitative referitoare la potențialul biotehnologic al tulpinii de cianobacterii filamentoase formatoare de heterochiști *Anabaena sp.* și anume capacitatea de a reduce un acceptor artificial de electroni adăugat extracelular, la nivelul celulelor individuale din componența unui filament cianobacterian. Un accent deosebit al acestui capitol este pus pe determinarea cantitativă prin analiza automată de imagine digitală a capacității fiecărei celule din filament de a reduce MTT, un acceptor artificial de electron. Rezultatele noastre au arătat o scădere puternică (de aproape 4 ori în 24 de ore) în semnalul albastru în timpul reducerii MTT de către fiecare celulă individuală analizată, ca o consecință a luminii portocalii absorbite de către MTT redus. În urma consultării literaturii de specialitate internațională, acesta este primul raport cu privire la utilizarea analizei de imagine digitală automată pentru măsurarea capacității de reducere a unui acceptor artificial de electroni la nivel celular, în filamentele de cianobacterii. Aceasta lucrare pledează mai ales pentru importanța metodelor matematice de prelucrare a imaginilor digitale în câmp luminos, o metodologie precisă de analizare detaliată și obiectivă a măsurării intensității culorii fiecărei celule individuale (Sarchizian și colab., 2011).

O modalitate nouă de a aborda a microbiologiei la nivel celular este și analiza automată a imaginilor clasice a celulelor bacteriene individuale obținute folosind diferite

tipuri de microscopie, pentru a cuantifica parametri importanți cum ar fi: enumerare de celule, calculul volumului celular și a frecvenței de diviziune a celulelor, clasificarea *in situ* a bacteriilor, enumerarea bacteriilor active din punct de vedere al respirației, caracterizarea creșterii bacteriene pe un mediu solid, viabilitatea și activitatea fiziologică a biofilmelor (de exemplu, Yang și colab., 2000; Lehmussola și colab., 2008; Chavez de Paz, 2009; Edelstein și colab., 2010).

În Figura 11 este prezentat succesiv aspectul macroscopic al suspensiei de cianobacterii din cultura de *Anabaena* sp. în prezență de MTT, la T0 - timpul inițial, T4 - după 4 ore de incubare la lumină, T6 - după 6 ore incubare la lumină, T24 - după 24 de ore de incubare la lumină la 28°C. Evidențierea reducerii MTT a fost vizualizată cu ajutorul microscopiei optice în câmp luminos, în care se pot observa celulele din filamentele de cianobacterii care își schimbă culoarea ca urmare a reducerii MTT.

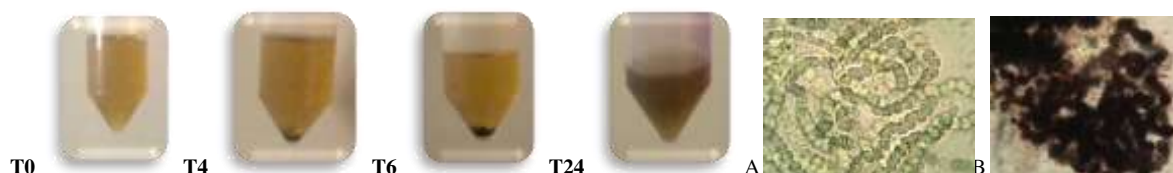
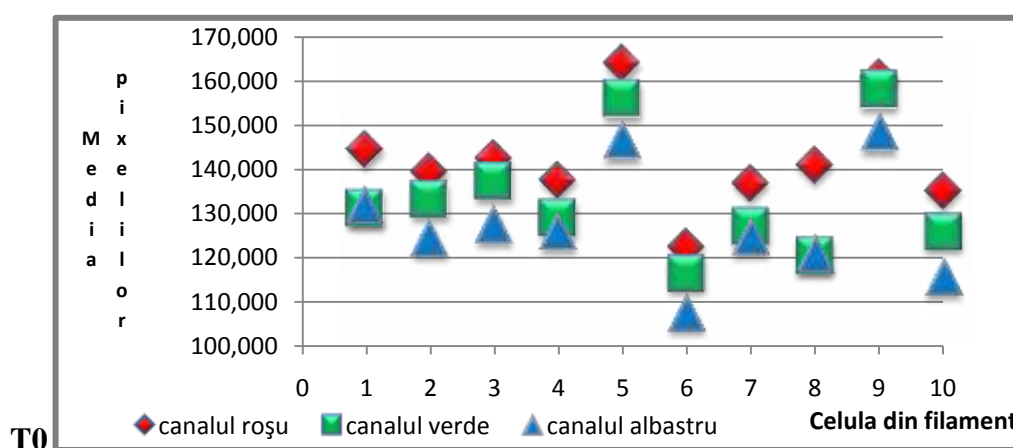


Figura 11 (Figura 4.55). Aspectul macroscopic al suspensiei de cianobacterii în timpul incubării la lumină pentru studierea reducerii MTT (T0- timpul inițial; T4- după 4 ore de incubare la lumină; T6 - după 6 ore incubare la lumină și T24 - după 24 de ore de incubare la lumină) ; **A - (Figura 4.56).** - Imaginea digitală a filamentelor de *Anabaena* sp. fără adiție MTT; **B** – aspectul culturii de *Anabaena* sp. după 24 de ore de incubare la lumină în prezență de MTT (Sarchizian, Cîrnu, Ardelean, 2011).

În Figura 12 sunt prezentate rezultatele analizei automate a imaginilor digitale color, în timp, pentru 10 celule consecutive dintr-un filament de cianobacterie în prezența MTT și rezultatele mediilor de pixeli în cele trei canale RGB.



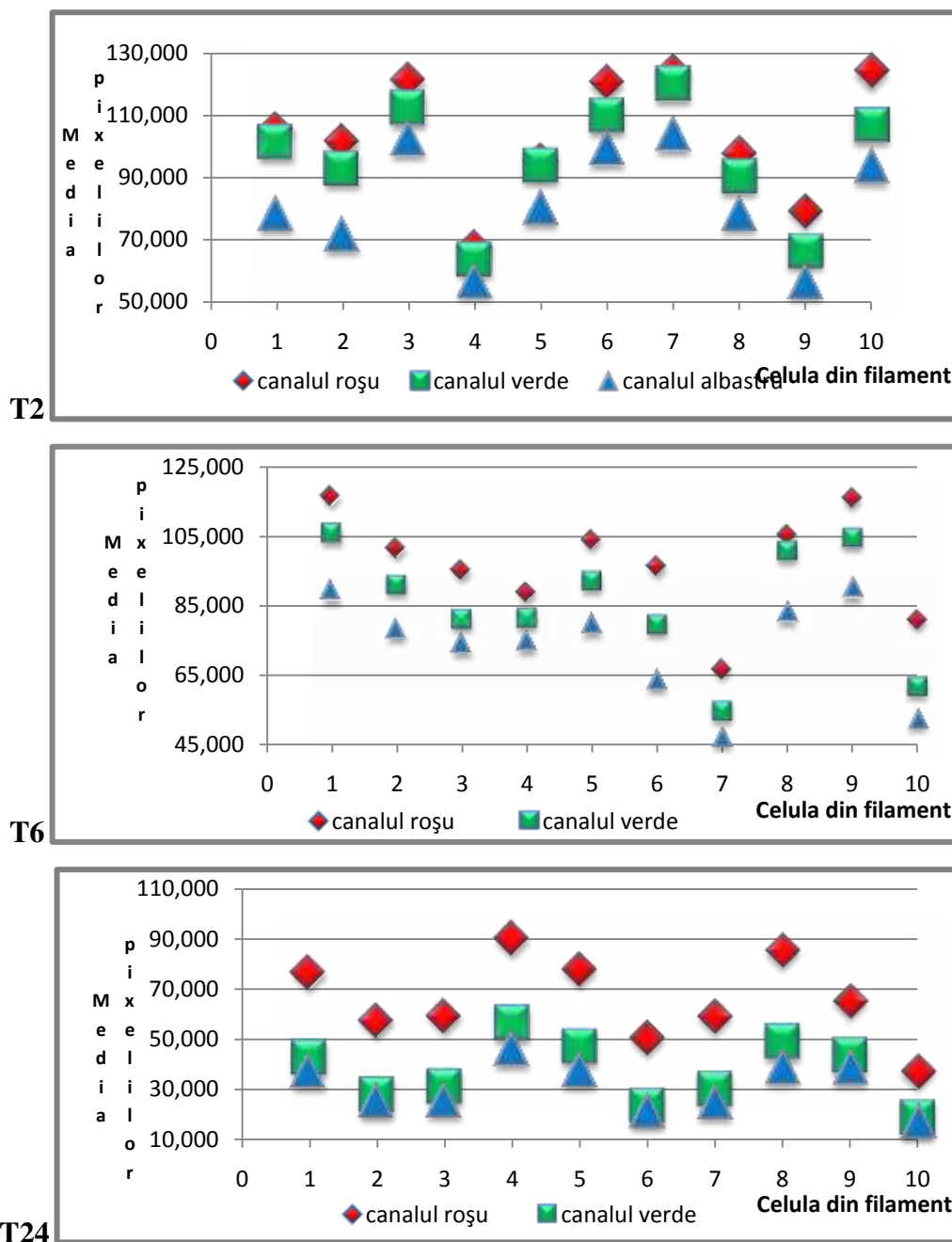


Figura 12 (Figura 4.57). Analiza automată de imagine digitală pentru determinarea schimbării de culoare în timp (T0, T2, T6, T24) pentru câte 10 celule consecutive dintr-un filament de *Anabaena* sp. tratată cu MTT și rezultatele automate ale mediilor pixelilor în trei canale de culoare (Sarchizian, Cîrnu, Ardelean, 2011).

În Figura 12 există o scădere în timp, cu privire la intensitatea totală a luminii care trece prin fiecare celulă a filamentului (scala descrește de la 20.000 de pixeli, la momentul zero la 1000 pixeli după 24 de ore de incubare cu MTT), sugerând că fiecare celulă analizată absoarbe și/sau reflectă lumina incidentă mai mult, prin urmare, mai puțină lumină este disponibilă pentru a trece prin fiecare celulă. Deoarece MTT redus este colorat (violet) și insolubil, atât procesele (în creștere) de absorbție a luminii de către compusul colorat, cât și difuzia luminii (în creștere), de către cristalele de MTT redus ar trebui să fie luate în

considerare pentru lumina diminuată care trece prin fiecare celulă individuală de cianobacterii.

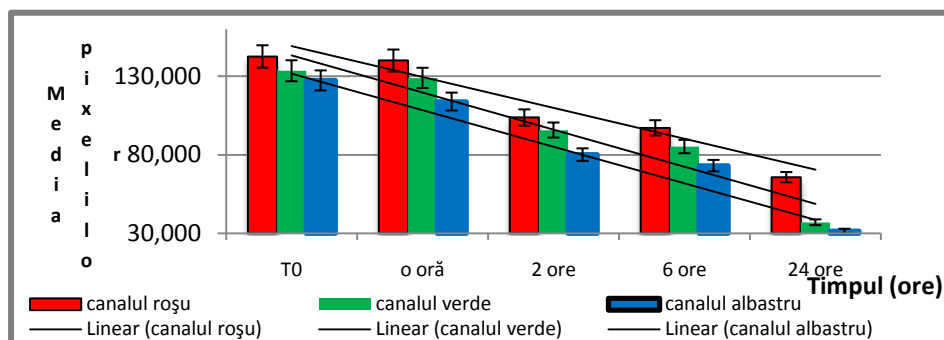
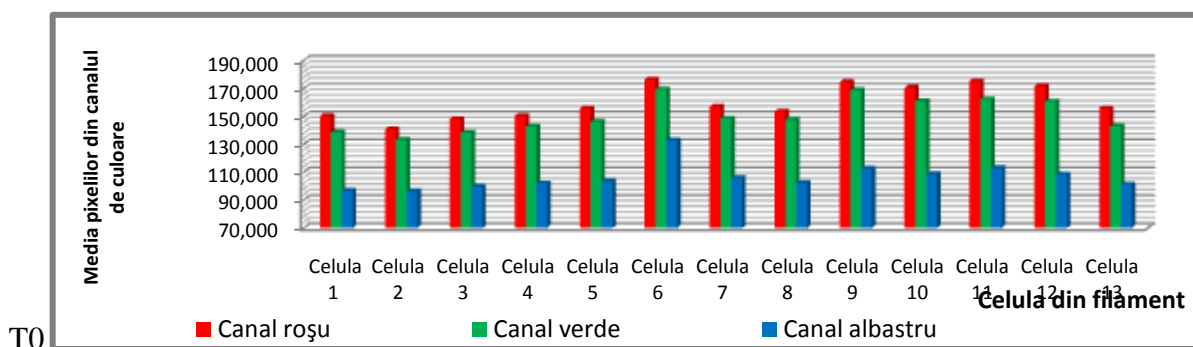


Figura 13 (Figura 4.58). Evoluția mediei aritmetice a pixelilor în cele trei canale de culoare: roșu, verde și albastru pe parcursul perioadei de incubare a suspensiei de cianobacterii în prezența MTT (0,5 mg/mL) (Sarchizian, Cîrnu, Ardelean, 2011).

Scăderea dramatică a mediei pixelilor în canalul albastru ar putea fi atribuită în mod logic absorbției culorii complementare, portocaliu, de către MTT redus (purpuriu); de asemenea, scăderea mediei pixelilor în canalul roșu, ar putea fi atribuită ca urmare a absorbției luminii verzi de către MTT redus. Când este vorba de scăderea pixelilor în canalul verde, semnificația sa este în curs de investigare fiind probabil legată de apariția multiplelor procese ale luminii (absorbție, reflexie, transmisie), ale căror interacțiuni cu diferite componente (colorate) ale celulei și procese, nu este încă elucidat pe deplin, reprezentând o direcție de cercetare viitoare (Sarchizian, Cîrnu, Ardelean, 2011).

Pentru cuantificarea proprietăților redox la nivel de celulă individuală din filamentul de *Anabaena* sp. rezultatele obținute prin analiza de imagine digitală a ficărei celule din filamentele analizate pentru fiecare timp experimental în timpul cultivării la lumină s-au evidențiat regiunile de interes conform userguide ImageJ și s-au analizat histogramele color ale fiecărei celule.

Rezultatele analizei automate de imagine digitală a celulelor dintr-un filament de cianobacterie la momentul T0, T1, T2, T3, T4 s-a luat în considerare filamente format din respectiv 13, 17, 24, 19, 16 celule pe care s-au definit regiunile de interes (ROI) conform userguide ImageJ și s-au analizat histogramele color ale fiecărei celule, obținându-se următoarele rezultate, prezentate succint în Figura 14.



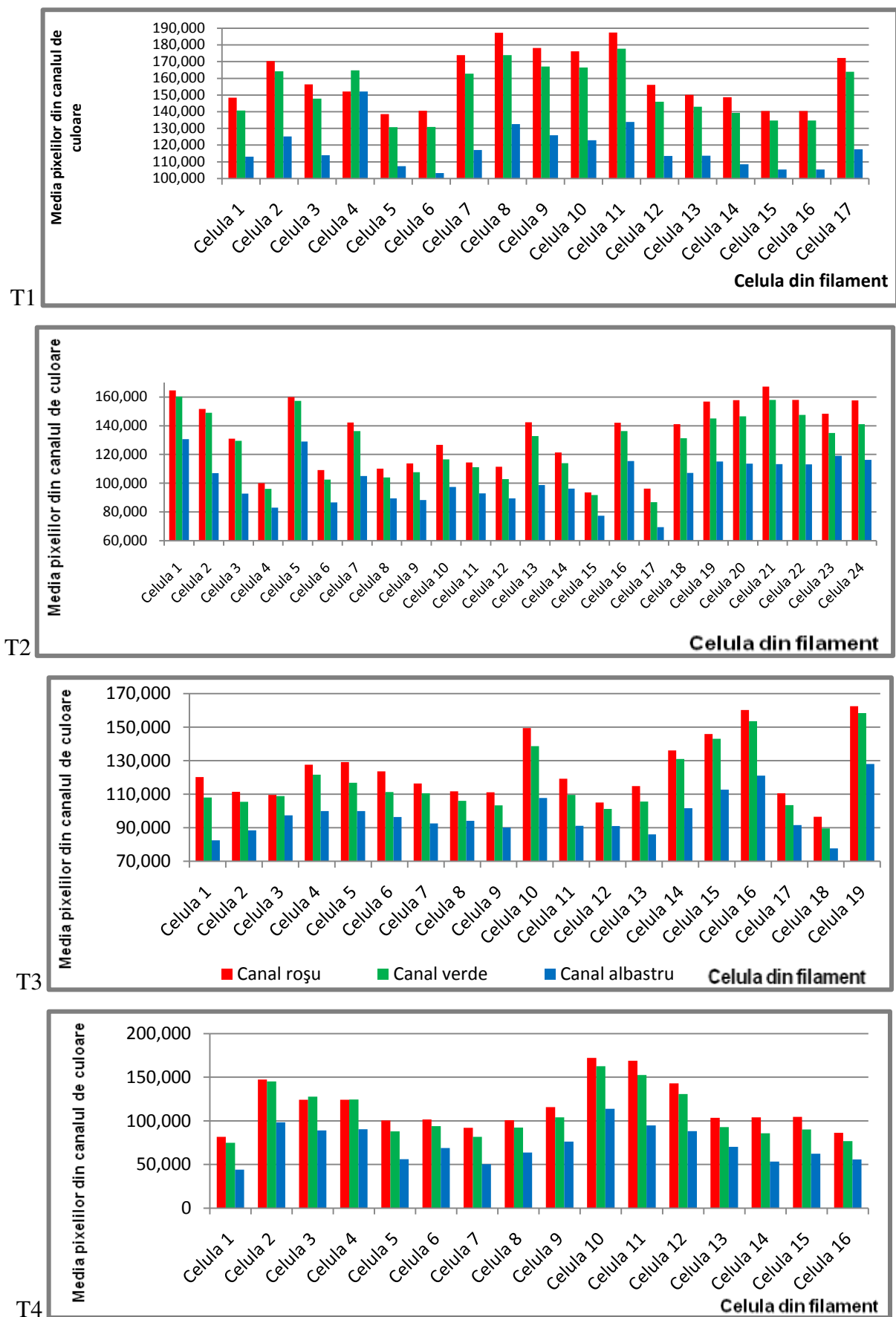


Figura 14 (Figura 4.67). Analiza automată la nivel de celulă de cianobacterie din filamentele studiate (original).

În concluzie, aceste rezultate arată importanța metodelor matematice de procesare a imaginilor și a semnalelor luminoase, utile pentru cercetări microbiologice la nivel de celular.

Rezultatele noastre arată o scădere puternică, în semnalul de albastru în timpul reducerii MTT de către fiecare celulă individuală analizată, ca o consecință a absorbției luminii portocalii de către MTT redus. Acesta reprezintă primul raport cu privire la utilizarea analizei automate de imagine digitală pentru măsurarea reducerii unor transportatori de electroni artificiali la nivel celular în cianobacterii filamentoase formatoare de heterochiști.

De asemenea, aceste rezultate sunt importante pentru cercetări fundamentale în domeniul microbiologiei la nivel celular, dar și pentru cercetarea biotehnologică care leagă proprietățile redox ale cianobacteriilor de folosirea lor ca și convertoare de energie luminoasă în electricitate sau utilizarea acestora ca biosenzori.

Utilizarea doturilor cuantice în studierea citotoxicității cianobacteriilor are ca scop investigarea interacțiunii dintre doturile cuantice (CdSe/ZnS) și cianobacteriile din probele naturale recoltate din izvorul sulfuros mezotermal de la Obanul Mare - Mangalia, precum și din culturile îmbogațite de cianobacterii unicelulare și filamentoase, în paralel cu analiza de imagine digitală a cianobacteriilor (Armășelu și colab., 2011).

Imaginile digitale realizate cu ajutorul microscopului de epifluorescență au indicat faptul că cianobacteriile unicelulare s-au colorat cu doturi cuantice, iar în ceea ce privește cianobacteriile filamentoase, doturile cuantice au migrat în direcția acestora și au rămas fixate pe teaca lor, analiza imaginilor digitale realizată succesiv pe imagini digitale obținute în urma înregistrării video a atașării doturilor cuantice de filamentele cianobacteriene a încercat să explice astfel schimbările de culoare a cianobacteriilor filamentoase etichetate cu doturi cuantice prin adăugarea de cantități suplimentare de doturi cuantice la culturile îmbogațite de cianobacterii.

La adăugarea doturi cuantice 0559 pe filamentele de cianobacterie spiralată am constatat că la o secundă după adăugarea doturilor cuantice, filamentul de cianobacterie are culoare roșu intens, datorită suprapunerii culorii fluorescenței naturale a clorofilei a peste culoarea doturilor cuantice, iar după circa 40 de secunde filamentul de cianobacterie s-a rupt, constatând efectul toxic al doturilor cuantice asupra cianobacteriilor aflate în studiu.

Analiza autoamă de imagine digitală în detaliu realizată în urma înregistrării video, la microscopul cu epifluorescență, a schimbării de culoare a filamentului de cianobacterie după o singură adăugare de doturi cuantice în suspensia de cianobacterii. Fiecare imagine realizată după înregistrarea video a fost analizată automat în cele trei canale de culoare RGB și supuse analizei statistice a datelor cu programul Microsoft Excell. Au fost analizate 11 imagini luate

la interval de 10 secunde cu ajutorul software-ului Microsoft MovieMaker. Astfel, am constatat că valoarea pixelilor în canalul verde crește odată cu atașarea doturilor cuantice de filamentul de cianobacterie, creștere concomitentă cu scăderea valorilor în canalul albastru.

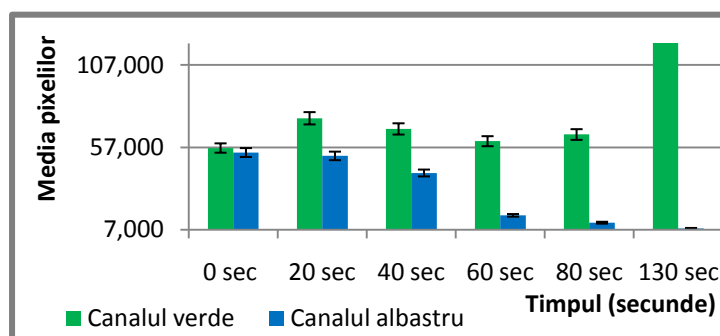


Figura 15 (Figura 4.77). Evoluția pixelilor în canalul verde și albastru (original).

Studii de citotoxicitate au fost realizate și pe cianobacterii izolate din Marea Neagră, vizualizate atât în fluorescență naturală, cât și în câmp luminos, în prezența doturilor cuantice 0560 sau în absența acestora. În acest caz a fost urmărit efectul doturilor cuantice asupra culorii fluorescenței cianobacteriilor aflate în studiu.

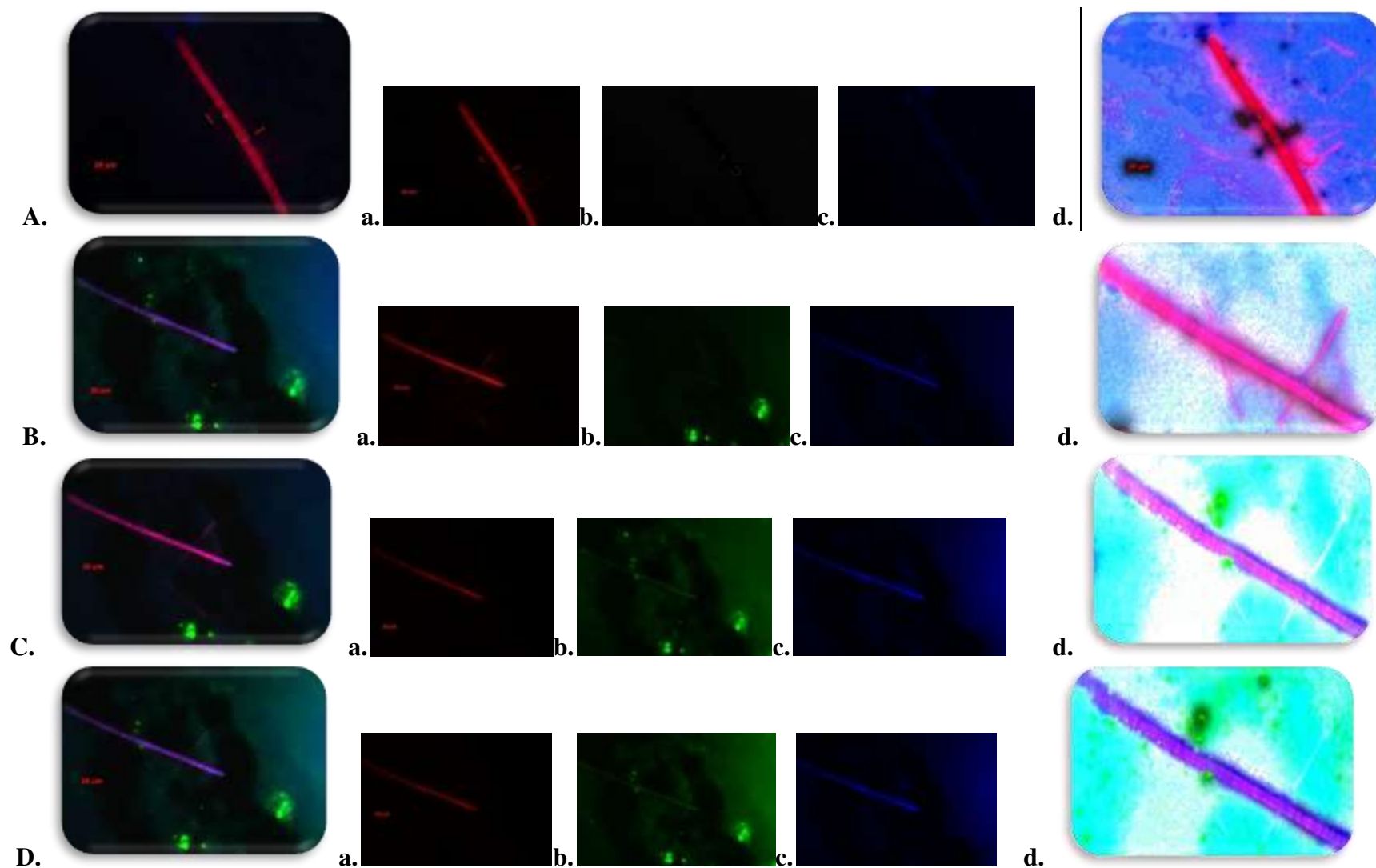
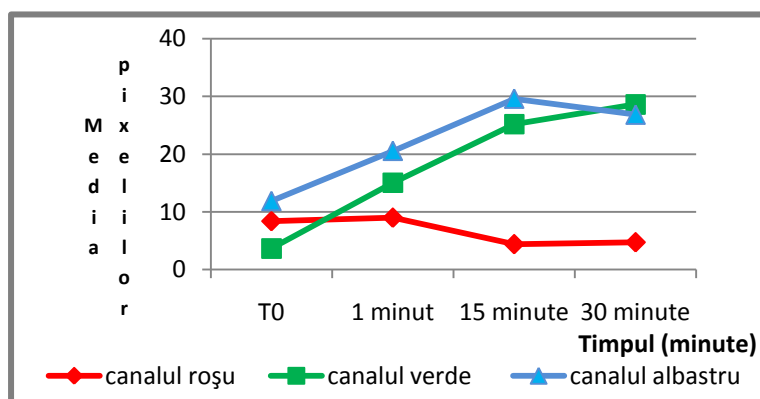


Figura 16 (Figura 4.78). Evoluția fluorescenței filamentului de cianobacterie: A- fluorescență naturală a cianobacteriei; B- culoarea filamentului de cianobacterie după o secundă de la adăugarea de puncte cuantice 0560; C- culoarea filamentului de cianobacterie după un minut de la adăugarea de puncte cuantice 0560; D- culoarea filamentului de cianobacterie după 15 minute de la adăugarea de puncte cuantice 0560; a- imaginea digitală în canalul roșu; b – imaginea digitală în canalul verde; c- imaginea digitală în canalul albastru; d- imaginea regiunii de interes analizate digital după etape de extragere a substratului imaginii (Armașelu și colab., 2011).

Evoluția culorii fluorescente după adăptia, pas cu pas, a doturilor cuantice 0560nm este demonstrată în Fig. 16 (Fig. 4.78). Culoarea fluorescenței naturale a clorofilei din filamentul de cianobacterie este roșie, reprezentând culoarea fluorescentă adecvată a cianobacteriilor. După adăptia de doturi cuantice în cultura de cianobacterii, am constatat că acestea au migrat preferențial spre filamentul de cianobacterie, rămânând fixate pe acestea.

O explicație a schimbării de culoare a fluorescenței naturale de la roșu la purpuriu ar fi aceea a suprapunerii culorilor, cum ar fi fluorescența naturală roșie a clorofilei cu verdele fluorescent al doturilor cuantice utilizate în experiment, iar purpuriul reprezintă o suprapunere a culorii roșii cu cea albastră. Aceste constatări pe care le-am pus în evidență direct prin microscopia de fluorescență au fost ulterior explicate prin analiza de imagine digitală, realizată pe microfotografiile digitale captate în timpul experimentului.

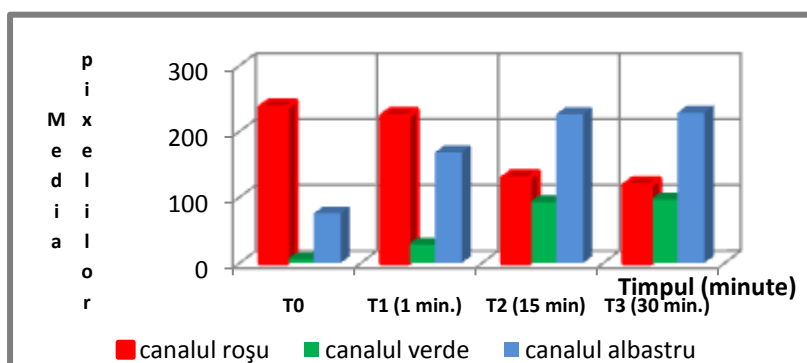
În urma analizei digitale automate utilizând programul ImageJ, a opțiunilor din program de determinare a intensității culorilor primare roșu, verde și albastru prin analiza fiecărei histograme color a imaginilor digitale analizate, precum și prelucrarea datelor obținute, am constat că intensitatea culorii verzi din imaginile digitale analizate crește de la T0 la T3 (după 30 de minute de la adăptia repetată de doturi cuantice în suspensia de cianobacterii), concomitent cu creșterea în intensitate a culorii albastre, în timp ce intensitatea



culorii roșii a prezentat o curbă descendentă.

Figura 17 (Figura 4.79). Analiza digitală a evoluției culorii fluorescente a (Armașelu și colab., 2011).

Din literatura de specialitate consultată, am constat că aceasta este prima raportare de analiză digitală automată care arată schimbarea culorii fluorescente a filamentelor de cianobacterii, rezultate din depunerea, pas cu pas, a doturilor cuantice pe filamente ale cianobacteriilor (Armașelu și



colab., 2011).

Figura 18 (Figura 4.80). Evoluția culorii filamentului de cianobacterie (regiunea de interes analizată automat) în fiecare canal de culoare: canalul roșu, canalul verde și canalul albastru după adăptia constantă a doturilor cuantice 0560 în suspensia de cianobacterie și extragerea substratului fiecărei imagini (original).

De reținut este faptul că intensitatea în canalul verde a crescut de aproximativ 5 ori după adăugarea primei cantități de doturi cuantice. După adăugarea celei de a doua cantitate de doturi cuantice, intensitatea în canalul verde a crescut și mai mult, iar după adăugarea cantităților repetate de doturi cuantice, intensitatea canalului verde rămâne aproape constantă. În ceea ce privește intensitatea fluorescenței în canalul albastru este mai mare decât în canalul de roșu sau în canalul verde chiar în stare naturală (canalul albastru a fost observat în imaginile digitale încă de la începutul analizei digitale automate a cianobacteriilor filamentoase).

Citotoxicitatea doturilor cuantice cu fluorescență la 490nm, 520nm, 560nm și 600nm a fost studiată la diferite specii de cianobacterii unicelulare, cum ar fi cultura de colecție *Synechocystis* PCC 6803 și cultura de cianobacterii unicelulare izolată din izvorul sulfuros mezotermal de la Obanul Mare, notată *Synechocystis* sp. Este cunoscut faptul că doturile cuantice afectează transportul de electroni legat de metabolismul energetic, atât la bacteriile fototrofe, cât și la bacteriile heterotrofe.

La lumină (Figura 19) și la întuneric (Figura 20) în cazul culturii de colecție *Synechocystis* PCC 6803 primele diferențe au fost observate la 3 ore după adăugarea resazurinei, atunci când coloana 9 (doturile cuantice adăugate înainte de adăugarea resazurinei) arată o ușoară schimbare de culoare, ca rezultat al reducerii resazurinei pentru toate tipurile de doturi cuantice utilizate în studiu (483nm, 522nm, 559nm, 609nm și), aceste diferențe fiind mai evidente după 7 ore de reacție (rezultatele nu sunt prezentate). Mai multe diferențe între efectele doturilor cuantice incubate împreună cu cianobacterii, fie la lumină sau la întuneric, au apărut după 24 de ore. La lumină, după 24 de ore de incubare, în prezența resazurinei în coloana 1 și 9 de reducere este mult mai avansată decât la 7 ore, modificările de culoare sunt foarte mici, argumentând astfel că, la lumină, activitatea metabolică este inhibată foarte sever de toate tipurile de doturi cuantice.

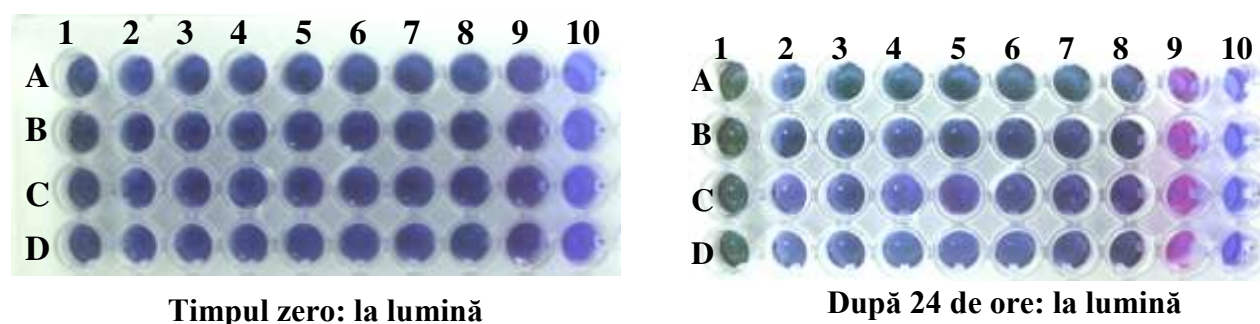


Figura 19 (Figura 4.81) . Reducerea resazurinei (culoarea roz-mov) de către *Synechocystis* PCC 6803 incubat la lumină cu 200 pg doturi cuantice/200μL suspensie de cianobacterii (A- doturi cuantice 483nm; B- doturi cuantice 522nm; C- doturi cuantice 559nm; D- doturi cuantice 609nm), la timpul zero și după 24 de ore de incubare la lumină (Ardelean și colab., 2011).

La întuneric, după 24 de ore de incubare, în coloana 1 și 9 reducerea este mai avansată decât la 7 ore; diferite grade de reducere sunt vizibile în alte godeuri, susținând că, chiar și în perioade de incubare mai lungă, la întuneric, cu toate tipurile de doturi cuantice, capacitatea de a reduce resazurina la forma roz, forma semiredusă (resorufin) este prezentă în toate condițiile experimentale. Aceasta este o diferență importantă în raport cu incubarea lumină, sugerând că citotoxicitatea acestor doturi cuantice asupra culturii de *Synechocystis* PCC 6803 este mai puternică la lumină decât la întuneric. Aceste date reprezintă primul raport cu privire la citotoxicitatea doturilor cuantice asupra cianobacteriilor mai ridicată la lumină decât la întuneric, rezultate care sugerează că interacțiunile dintre celulele fotosintetizatoare și doturile cuantice este mai puternică la lumină, decât la întuneric.

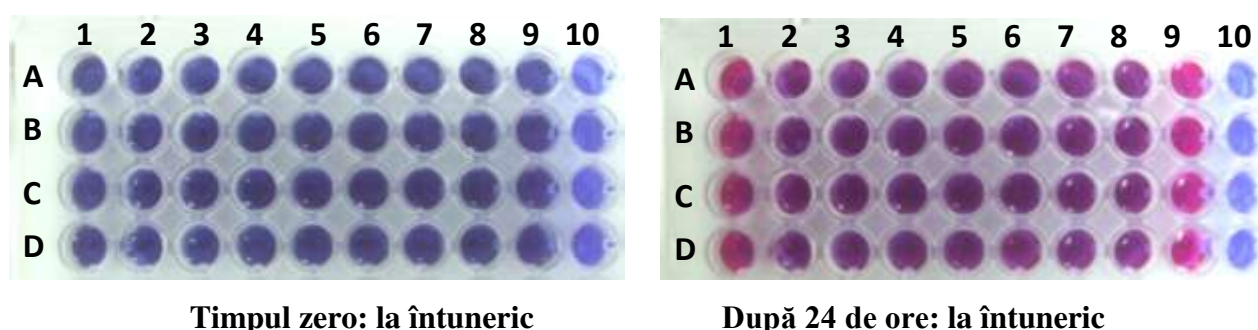


Figura 20 (Figura 4.82). Reducerea resazurinei de către *Synechocystis* PCC 6803 incubat la întuneric cu 200 pg doturi cuantice/200 μ L suspensie de cianobacterii (A- doturi cuantice 483nm; B- doturi cuantice 522nm; C- doturi cuantice 559nm; D- doturi cuantice 609nm), la timpul zero și după 24 de ore de incubare la întuneric (Ardelean și colab., 2011).

Ținând seama de bine-cunoscuta reactivitate chimică mai mare la lumină a acestor nanoparticule semiconductoare se poate crede că această reactivitate mai mare ar putea fi implicată în citotoxicitatea mai ridicată a acestora la lumină. Dacă există sau nu o interacțiune a doturilor cuantice la lumină cu metabolismul fotosintetic al cianobacteriilor intacte este o altă întrebare interesantă. Se poate crede că doturile cuantice situate pe peretele celular sau pe membrana celulară ar trebui să interacționeze cu tilacoidele, membranele situate în interiorul citoplasmei, printr-un mecanism necunoscut sau/și din cauza diametre foarte mici, 4-6 nm a acestor doturi cuantice și pătrunderii lor în interiorul citoplasmei de asemenea, ar putea fi luate în considerare (Ardelean și colab., 2011).

Activitatea dehidrogenazică brută/de ansamblu. Experimente preliminare au arătat că, după 21 de ore de incubare la întuneric sau la lumină, cu toate cele 4 tipuri de doturi cuantice utilizate în aceste experimente, la o concentrație de 1 pg doturi cuantice /1 μ L, atât capacitatea culturii de colecție *Synechocystis* PCC 6803, cât și a culturii de cianobacterii unicelulare *Synechocystis* sp. pentru a reduce DCPIP singur sau în prezența a PMS este complet abolită,

ceea ce demonstrează efectul citotoxic al acestor doturi cuantice în condițiile experimentale date.

În urma acestor rezultate obținute, am lansat noi experimente care au fost proiectate pentru a măsura efectul citotoxic oricât de mic ar fi la un timp de incubare mai mic, și anume o oră sau două ore. Se constata inhibiția totală a reducerii DCPIP în prezența de FMT de către *Synechocystis* sp. incubată timp de 1-2 ore la lumină, demonstrând efectul citotoxic foarte puternic la lumină al doturilor cuantice. Interesant este faptul că incubarea la lumină a culturii de *Synechocystis* PCC 6803 sau a culturii *Synechocystis* sp. împreună cu doturi cuantice pentru una sau două ore, elimină total capacitatea acestor celule de a reduce DCPIP în prezența de FMT susținând încă o dată citotoxicitatea mai ridicată a doturilor cuantice la lumină decât la întuneric, la aceste specii de cianobacterii.

Un scop important, în toate aceste experimente, îl reprezintă relația fizică dintre populațiile microbiene și doturile cuantice, cu un accent deosebit pe poziția a doturilor cuantice față de peretele celular și membrana celulară. Pare logic să presupunem că primul sit de interacțiune între aceste nanoparticule și celule este la nivelul peretelui celular, cu toate acestea peretele celular are o structură destul de diferită la bacterii Gram-negative (inclusiv cianobacterii) și cele Gram-pozitive. Accesul fizic al doturilor cuantice la suprafața externă a membranei celulare (spre peretele celular) este încă o problemă deschisă, precum și abilitatea - dacă există - în cazul în care oricare dintre aceste doturi cuantice cu dimensiuni nanometrice sunt capabile să treacă prin membrana intactă (sau deteriorată anterior!) a celulei pentru a pătrunde în citoplasmă.

CONCLUZII GENERALE

1. Din probele prelevate din izvorul sulfuros mezotermal de la Obanul-Mare (Mangalia) s-au izolat, purificat și identificat la nivel de gen 8 tulpini de cianobacterii.
2. Metodele îmbunătățite de purificare a tulpinilor de cianobacterii au stabilit condițiile optime de eliminare a contaminanților bacterieni heterotrofi prin adaugarea sursei de carbon înaintea antibioticului; antibioticele tienam, augmentin, cefalexina, acid nalidixic au avut efect bactericid asupra bacteriilor heterotrofe din culturile experimentate, fundament pentru punerea la punct a unei metode de obținere a culturilor axenice de cianobacterii; augmentinul a fost folosit pentru prima dată pe culturile de cianobacterii în cadrul acestor experimente, având, de asemenea, un puternic efect bactericid asupra heterotrofilor din culturile de cianobacterii testate.
3. Determinarea ratei de creștere a cianobacteriilor în condiții aerobe la lumină utilizând azotului atmosferic ca unică sursă de azot (mediul de cultură BG₀) sau nitratul (mediul de cultură BG₁₁) a condus la obținerea timpului de generație la tulpinile de cianobacterii aflate în studiu (*Nostoc 1* sp., *Nostoc 2* sp., *Synechocystis* sp., *Oscillatoria* sp., *Anabaena* sp., *Synechocystis* sp. cultivată anoxigenic).
4. Determinarea ratei de creștere la cianobacterii prin calculul frecvenței celulelor aflate în diviziune (FDC) a evidențiat: calculul ratei de creștere la două populații de cianobacterii filamentoase izolate din Obanul Mare (Mangalia), cultivate în laborator, la lumină: pentru tulpina de *Anabaena* sp., rata de creștere maximă pe mediul de cultură BG₀ este de 0,039 ore⁻¹, iar pentru tulpina neformatoare de heterochiști *Tychonema* sp. rata de creștere maximă pe mediul de cultură BG₁₁ este de 0,057 ore⁻¹; pe baza datelor din literatura de specialitate se poate afirma că aceasta este primul raport privind utilizarea metodei de determinare a ratei de creștere utilizând calculul frecvenței celulelor aflate în diviziune (FDC) aplicat pe cianobacterii filamentoase (formatoare de heterochiști sau nu); de asemenea, acesta este primul raport privind utilizarea metodei de determinare a ratei de creștere prin calculul FCD cuplat cu analiza de imagine automată a imaginilor digitale obținute la microscop în câmp luminos.
5. Utilizarea pentru prima dată a metodei de determinare directă a celulelor capabile de creștere și multiplicare prin metoda descrisă de Kogure și colaboratorii (1979) pe cianobacterii filamentoase a condus la următoarele concluzii: în urma experimentelor efectuate că 64% și 71% din celule sunt capabile de creștere și diviziune. Metoda ar putea fi utilizată cu succes pentru determinare directă a celulelor capabile de creștere și multiplicare în

probele naturale care conțin cianobacterii filamentoase, inclusiv a celulelor din cadrul unui singur filament individual sau să se diferențieze filamentele care sunt în creștere (care conțin cel puțin o celulă capabilă de creștere și multiplicare) față de restul filamentelor (care nu conțin nici o astfel de celulă); doar unele celule din filamentele analizate își modifică dimensiunile în timpul experimental, sugerând faptul că, în condiții naturale, doar anumite celule realizează creșterea celulară; din consultările literaturii de specialitate, nu există aplicații ale metodei descrise de Kogure și colab. (1979) pe cianobacterii filamentoase, doar o singura raportare pe cianobacterii unicelulare (Lucilla și colab., 1996); de asemenea, s-au combinat tehnicile de microscopie în câmp luminos cu cele de analiză de imagine digitală în studierea cianobacteriilor filamentoase tratate cu acid nalidixic.

6. Studiarea prin metode spectrofotometrice a proprietăților redox la nivel populațional la unele tulpini de cianobacterii izolate a condus la obținerea diferitelor valori ale activității dehidrogenazice per ansamblu.

7. În timpul incubării la lumină a cianobacteriilor în prezența unui acceptor artificial de electroni (MTT) modificările în intensitatea culorilor la nivel de filament sunt semnificative, comparativ cu timpul inițial, în canalul roșu, verde și albastru, scăderile fiind la 91,7%, 89,8% și respectiv 86,8%, în concordanță cu viteza mai mare de reducere a MTT în condiții de lumină; în timpul incubării la întuneric modificările în intensitatea culorilor la nivel de filament sunt foarte mici comparativ cu timpul inițial (scăderi de până la 95-97%), comparativ și cu rezultatele obținute în timpul incubării la lumină, în concordanță cu viteza de reducere foarte mică a MTT în condiții de întuneric. Existența variabilității pentru fiecare filament individual de cianobacterie sugerează că intensitatea metabolică este diferită pentru diferite filamente de cianobacterii (la nivel de individ biologic); la nivel de celulă individuală, pentru totalitatea celulelor din filament, există o mare variabilitate a valorilor obținute în timpul incubării la lumină, ceea ce sugerează că intensitatea metabolică este diferită pentru celulele din cadrul individului biologic, reprezentat de filamentul cianobacterian; aceste rezultate reprezintă primul raport cu privire la utilizarea analizei automate de imagine digitală pentru măsurarea reducerii unor transportatori de electroni artificiali la nivel celular la cianobacteriile filamentoase formatoare de heterochiști.

8. Prin marcarea cianobacteriilor cu doturi cuantice (CdSe/ZnS) s-a constatat că intensitatea culorii verzi din imaginile digitale analizate crește de la timpul inițial după 30 de minute de la adăugarea repetată de doturi cuantice în suspensia de cianobacterii, ca urmare a acumulării doturilor cuantice la suprafața filamentelor cianobacteriene, concomitent cu creșterea în intensitate a culorii albastre, în timp ce intensitatea culorii roșii a prezentat o

curbă descendentă, astfel la timpul inițial valorile mediei pixelilor în cele trei canale de culoare, constatându-se după un minut că aceste valori au suferit schimbări în cele 3 canale de culoare. Valoarea de intensitate a pixelilor din canalul roșu a scăzut foarte lent după primul tratament cu doturi cuantice, dar după al doilea tratament această valoare scade la jumătate și apoi devine staționar. Acest comportament poate fi atribuit variației fluorescenței roșii a clorofilei a din cianobacteriile filamentoase. Canalul verde poate fi considerat ca fiind următorul canal de variație în intensitate a fluorescenței verzi a doturilor cuantice; metoda experimentată se aplică cu succes atât cianobacteriilor dulcicole, cât și cianobacteriilor marine.

9. Studiarea efectului citotoxic al doturilor cuantice asupra cianobacteriilor la lumină și la întuneric a dus la următoarele concluzii: citotoxicitatea doturi cuantice asupra culturii de *Synechocystis* PCC 6803 (tulpină de colecție) este mai puternică în timpul incubării la lumină decât la întuneric. Interesant este faptul că incubarea la lumină a culturii de *Synechocystis* PCC 6803 sau a culturii izolate *Synechocystis* sp. împreună cu doturi cuantice pentru una sau două ore, elimină total capacitatea acestor celule de a reduce DCPIP în prezența de PMS susținând încă o dată citotoxicitatea mai ridicată a doturilor cuantice la lumină decât la întuneric, la aceste specii de cianobacterii. La lumină, doturile cuantice inhibă total activitatea dehidrogenazică brută, atât la cultura *Synechocystis* PCC 6803, cât și la cultura *Synechocystis* sp., chiar și după o oră de incubare. Până la această dată, consultând literatura de specialitate, acesta este primul raport privind toxicitatea ridicată a doturilor cuantice față de cianobacteriile incubate la lumină, în comparație cu incubarea la întuneric. La întuneric, după 1-2 ore de incubare cu doturi cuantice, se induce în cultura de *Synechocystis* PCC 6803 o creștere puternică a activității dehidrogenazei (de la 260% la 1000%!) în timp ce în cultura *Synechocystis* sp. are loc o scădere de 60-90%.

Din analiza rezultatelor prezentate se poate afirma faptul că toate obiectivele propuse în cadrul tezei au fost atinse, iar rezultatele obținute sunt originale, cu caracter de noutate pe plan național și unele chiar pe plan internațional.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Abramoff M.D., Magelhaes P.J., Ram S.J., 2004. Image processing with Image. *Journal Biophotonics International*, **11**: 36 - 42.
2. Aderem A., Shmulevich I., 2009. Bright field microscopy as an alternative to whole cell fluorescence in automated analysis of macrophage images. *PLoS ONE* 4 (10), pp.9.
3. Affronti L.F., Marshall H.G., 1994. Using frequency of dividing cells in estimating autotrophic picoplankton growth and productivity in the Chesapeake Bay. *Hydrobiologia*, **284**, pp. 193-203.
4. Agawin N.S.R., Agusti S., 1997. Abundance, frequency of dividing cells and growth rates of *Synechococcus* sp. (cyanobacteria) in the stratified Northwest Mediterranean Sea, *Journal of Plankton Research*, Vol.19 no.11, pp.1599-1615.
5. Almesjo L., Rolff C., 2007. Automated measurements of filamentous cyanobacteria by digital image analysis. *Limnology and Oceanography: Methods*, **5**: 217 - 224.
6. Aonofriesei F., 1998. Date privind ecologia populațiilor bacteriene din zona de influență a izvoarelor sulfuroase mezotermale marine de la Mangalia, *An. Univ. „Ovidius” Constanța*, Seria Biologie-Ecologie, vol. II, pp. 65 - 72.
7. Ardelean I., 2006. Biosensors with cyanobacteria and algae in recent advances on applied aspects of indian marine algae with reference to global scenario. *Central Salt & Marine Chemicals Research Institute*, Ed. A. Tewari, vol II, pp. 87 - 103.
8. Ardelean I., Ghiță S., Sarchizian I., 2009. Epifluorescent method for quantification of planktonic marine prokaryotes. *Proceedings of the 2nd International Symposium “New research In Biotechnology”*, Serie F (Special volume), ISSN 1224-7774, pp. 288 - 296.
9. Ardelean I., Ghiță S., Sarchizian I., 2009. Isolation of oxygenic phototrophic and oxic heterotrophic bacteria with potential for gasoline consumption. In *Proceedings of the 2nd International Symposium “New Research in Biotechnology”*, serie F, pp. 278-287.
10. Ardelean I., Mărgineanu D.-G., Vais H., 1983. Electrochemical conversion in biofuel cells using *Clostridium butyricum* or *Staphylococcus aureus*. *Oxford. Bioelectrochem. Bioenerg.*, **11**: 273 - 277.
11. Ardelean I., Mărgineanu, D.-G., Vais H., Zarnea G., 1987. Microorganisms as catalysts for chemoelectrochemical conversion. In *Proc. 4th European Congress on Biotechnology*, Amsterdam, vol. 2, pp. 69 - 73.
12. Ardelean I., Matthijs H.C.P., Havaux M., Joset F., Jeanjean R., 2002. Unexpected changes in Photosystem I function in a cytochrome C6-deficient mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *FEMS Microbiological Letters*, nr. 213, pp. 113 - 119.
13. Ardelean I., Peschek G.A., 2011. The site of respiratory electron transport in cyanobacteria and its implication for the photo-inhibition of respiration. In Peschek G.A., Obinger C., Renger G. (Eds.), *Bioenergetic processes of cyanobacteria – from evolutionary singularity to ecological diversity*, Springer, New York, ISBN 978-9-400-703520, pp. 131 - 136.
14. Ardelean I., Sima L.E., Ghiță S., Sarchizian I., Popoviciu D.R., Lăzăroaie M.M., 2009c. Quantification of marine bacteria in pure culture and microcosms by epifluorescence microscopy and flow cytometry. *FEMS 2009-3rd Congress of European Microbiologists* Gothenburg, Sweden June 28-July 2.
15. Ardelean I., Zarnea G., 1998. Biosensors with intact cyanobacteria for environmental protection. In *Cyanobacterial Biotechnology* (Eds. G.Subramanian, D. Kaushik, G.S. Venkataraman), Publishers M/S Oxford IBH Publishing House, New Dehli, pp. 341 - 346.
16. Ardelean I.I., Ghiță S., Sarchizian I., 2009. Isolation of oxygenic phototrophic and oxic heterotrophic bacteria with potential for gasoline consumption. *Proceedings of the 2nd International Symposium “New Research in Biotechnology”* serie F, Bucharest, ISSN 1224-7774, pp. 278 - 287.
17. Ardelean I.I., Ghiță S., Sarchizian I., 2009. Epifluorescent method for quantification of planktonic marine prokaryotes. In: *Proceedings of the 2nd International Symposium “New Research in Biotechnology”* serie F, Bucharest, ISSN 1224-7774, pp: 288 - 296.
18. Armășelu A., Popescu A., Damian V., Ardelean I., Apostol D., 2011. Fluorescence properties of quantum dots used in the study of microorganisms. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, year 13, nr. 4, pp. 439 - 443.
19. Barcina I., Arana I., Santorum P., Iriberry J., Egea L., 1995. Direct viable count of gram positive and gram negative bacteria using ciprofloxacin as inhibitor of cellular division. *Journal of Microbiology Methods*, **22**: 139 - 150.
20. Bhadauriya P., Gupta R., Singh S., Singh Bisen P., 2008. *n*-alkanes variability in the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena cylindrica* in response to NaCl stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24**: 139 - 141.
21. Bianchi A., Giuliano L., 1996. Enumeration of viable bacteria in the marine pelagic environment. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 174 - 177.
22. Bowden W.B., 1977. Comparison of two direct-count techniques for enumerating aquatic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **33**: 1229 - 1232.
23. Bowyer J.W., Skerman V.B.D., 1968. Production of axenic cultures of soil-borne and endophytic blue-green algae, *Journal of General Microbiology*, **54**: 299 - 306.
24. Burrows P.A., Sazanov L.A., Svab Z., Maliga P., Nixon P.J., 1998. Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *EMBO Journal*, **17**: 868 - 876.
25. Burton S.D., Lee J.D., 1978. Improved enrichment and isolation procedures for obtaining pure cultures of *Beggiatoa*, *Applied and Environmental Microbiology*, **35**: 614 - 617.
26. Callieri C., Stockner J.G., 2002. Freshwater autotrophic picoplankton: a review. *Journal of Limnology*, **61**(1): 1 - 14.
27. Callieri C., Stockner J., 2000. Picocyanobacteria success in oligotrophic lakes: fact or fiction? *Journal of Limnology*, **59** (1): 72 - 76.
28. Campbell L., Carpenter E.J., 1986. Diel patterns of cell division in marine *Synechococcus* spp. (Cyanobacteria): use of the frequency of dividing cells technique to measure growth rate. *Marine Ecology Progress Series*, **32**: 139 - 148.
29. Caraivan G.L., 1992. Izvoarele submarine din fața țărmului sudic românesc al Mării Negre, *Revista Terra*, an IV (XXIV) sept. - oct.
30. Carmichael W.W., Gorham P.R., 1974. An improved method for obtaining axenic clones of planktonic blue-green algae, *Journal of Applied Phycology*, **10**: 238 - 240.
31. Caron D.A., 1983. Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy and comparison with other procedures. *Applied and Environmental Microbiology*, **46**: 491 - 498.
32. Carpenter A.E., Jones T.R., Lamprecht M.R., Clarke C., Kang I.H., Friman O., Guertin D.A., Chang J.H., Lindquist R.A., Moffat J., Golland P., Sabatini D.M., 2006. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biology* 7:R100. PMID.
33. Carpenter E.J., Campbell L., 1988. Diel patterns of cell division and growth rates of *Synechococcus* spp. in Long Island Sound. *Marine Ecology Progress Series*, **47**: 179 - 183.
34. Castenholz R.W., 1970. Laboratory culture of thermophilic cyanophytes, *Schweiz. Z. Hydrol.*, **32**: 538 - 551.
35. Castenholz R.W., 1988. Culturing methods for cyanobacteria. *Methods in Enzymology*, **167**: 68 - 93.
36. Castenholz R.W., 2001. Oxygenic photosynthetic bacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed., New York, Springer, pp. 473 - 599.
37. Castenholz R.W., 2001. Phylum BX. Cyanobacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 1., Edited by D. R. Boone & R. W. Castenholz. New York: Springer, pp.473-599.
38. Castenholz R.W., Lewin R., Rippka R., Waterbury J.B., Whitton B.A., 1989. Oxygenic photosynthetic bacteria, In J. T. Staley, M. P.

- Bryant, N. Pfennig, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 3., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp. 1710 - 1806.
38. **Chavez de Paz L.E.**, 2009. Image Analysis Software Based on Color Segmentation for Characterization of Viability and Physiological Activity of Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**: 1734 – 1739.
 39. **Chirea R., Gomoiu M.T.**, 1986. Some preliminary data on the nutrients influx into the Western Black Sea. *Cercetări marine – Recherches marines*, IRCM, Constanța, **14**: 171 - 187.
 40. **Choi G-G., Bae M-S., Ahn C-Y., Oh H-M.**, 2007. Induction of axenic culture of *Arthrospira (Spirulina) platensis* based on antibiotic sensitivity of contaminating bacteria. *Springer Science Business Media B.V. 2007*, **30**: 87 – 92.
 41. **Choi S.C., Kwon K.K., Sohn J.H., Kim S.J.**, 2002. Evaluation of fertilizer additions to stimulate oil biodegradation in sand seashore mesocosms. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **12**: 431 - 436.
 42. **Ciocârdel R., Protopopescu P.**, 1955. Considerații hidrogeologice asupra Dobrogei, *St. Tehn. Com. Comit. Geol. Hidrogeologic*, București.
 43. **Ciupină V., Petcu A., Rambu P., Baban C., Petcu L.C., Prodan G., Rusu G.I., Pomazan V.**, 2008. Study of structure and optical properties of CdSe thin films. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, **10**: 2993 - 2995.
 44. **Cohen Y.**, 2002. Bioremediation of oil by marine microbial mats. *Methods in Microbiology*, **5**: 189 - 193.
 45. **Cohen Y., Jorgensen B.B., Padan E., Shilo M.**, 1975. Sulfide dependent anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Nature (London)* **257**: 489 - 492.
 46. **Cohen Y., Padan E., Shilo M.**, 1975. Facultative anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Journal of Bacteriology*, **123**: 855 - 861.
 47. **Daley R.J.**, 1979. Direct epifluorescence enumeration of native aquatic bacteria: used, limitations and comparative accuracy. In: *Native Aquatic Bacteria: Enumeration, Activity and Ecology* (Costerton J.W. and Colwell R.R, Eds) ASTM Philadelphia, pp. 29 - 45.
 48. **Damian V., Ardelean I., Armășelu A., Apostol D.**, 2010. Fourier transform spectra of quantum dots. ROMOPTO 2009: *Ninth Conference on Optics: Micro-to Nanophotonics II*. Edited by Vlad, Valentin I. Proceedings of the SPIE, vol. 7469, *Nanophotonics and Quantum Optics* pp. 74690E-74690E-6.
 49. **Duncă S., Aliesei O., Nimitan E., Ștefan M.**, 2007. Microbiologie aplicată, Casa Editorială Demiurg , Iași, pp.70 - 85.
 50. **Dunny G.M., Brown B.L., Clewell D.B.**, 1978. Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: evidence for a bacterial sex pheromone. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, **75**: 3479 – 3483.
 51. **Dvornyk V., Nevo E.**, 2003. Genetic polymorphysm of cyanobacteria under permanent natural stress: A lesson from the „Evolution Canyons”. *Research in Microbiology*, **154**: 79 – 84.
 52. **Edelstein A., Amodaj N., Hoover K., et al.**, 2010. Computer control of microscopes using µManager. *Current Protocols in Molecular Biology*, 14.20.1-14.20.17.
 53. **Embleton K.V., Gibson C.E., Heaney S.I.**, 2003. Automated counting of phytoplankton by pattern recognition: a comparison with a manual counting method. *Journal of Plankton Research*, **25**: 669 - 681.
 54. **Epstein S.S., Shiaris M.P.**, 1992. Size-selective grazing of coastal bacterioplankton by natural assemblages of pigmented flagellates, colorless flagellates, and ciliate. *Microb. & al.*, **23**: 211 - 225.
 55. **Estep K.W., Macintyre F.**, 1989. Counting, sizing, and identification of algae using image analysis. *Sarsia*, **74**: 261 - 268.
 56. **Făgăraș, M.**, 2007. The plant communities from Herghelie Marsh (Mangalia) Natural Reserve, Analele Universității Craiova - Agricultura, Montanologie, Cadastru, Vol. XXXVII/A 2007, Editura Universitaria Craiova, pp. 111-123, ISSN 1841-8317.
 57. **Ferris M.J., Hirsch C.F.**, 1991. Method for isolation and purification of cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **57(5)**: 1448 – 1452.
 58. **Feru, U.M.**, 1973. Studii pentru stabilirea perimetrului de protecție hidrogeologică a apelor minerale și a turbăriei Mangalia, *Rap. Arh.*, **16**, PSMS.
 59. **Fogg G.E.**, 1942. Studies on nitrogen fixation by blue-green algae. 1. Nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. *J. Exp. Biol.*, **19**: 78 – 87.
 60. **Fogg G.E., Stewart W.D.P., Fay P., Walsby A.E.**, 1973. The blue-green algae. *Academic Press Ltd.*, London.
 61. **Fry J.C.**, 1988. Determination of biomass. Methods in aquatic bacteriology, In B. Austin.(ed), *Methods in aquatic bacteriology*, pp. 27 - 72.
 62. **Fry J.C.**, 1990. Direct methods and biomass estimation. *Methods in Microbiology*, **22**: 51 - 67.
 63. **Fuhrman J.A., Azam F.**, 1980. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica, and California. *Applied and Environmental Microbiology*, **39**: 1085 - 1095.
 64. **Garlick S., Oren A., Padan E.**, 1977. Occurrence of facultative anoxygenic photosynthesis among filamentous and unicellular Cyanobacteria. American Society for Microbiology, *Journal of Bacteriology*, **129 (2)**: 623 – 629.
 65. **Gaur J.P., Singh A.K.**, 1990. Growth, photosynthesis and nitrogen fixation of *Anabaena doliolum* exposed to Assam-crude extract. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, **44**: 494 - 500.
 66. **Ghiță S., Ardelean I.I.**, 2010. Dynamics of marine bacterioplankton density in filtered (0.45 µm) microcosms supplemented with gasoline. *3th International Conference on Environmental and Geological Science and Engineering (EG'10)*, Published by WSEAS Press, ISSN: 1792-4685, ISBN: 978-960-474-221-9, pp. 93 - 98.
 67. **Ghiță S., Ardelean I.I.**, 2010. Marine bacterioplankton density dynamics in microcosms supplemented with gasoline. *Rom. J. Biol-Plant Biol.*, vol. **55**, nr. 1, pp. 55 – 61.
 68. **Ghiță S., Ardelean I.I.**, 2011. Total cell count, single cell biomass and growth rate in marine microcosms supplemented with gasoline and gasoline-enriched marine populations. *Journal of Marine Technology and Environment.*, **3 (1)**: 39 – 46.
 69. **Ghiță S., Ardelean L.I.**, 2010. Marine bacterioplankton density dynamics in microcosms supplemented with gasoline. *Rom. J. Biol. - Plant Biol.*, **55**: 55 - 61.
 70. **Ghiță S., Ardelean L.I.**, 2010. Dynamics of marine bacterioplankton density in filtered (0.45 pm) microcosms supplemented with gasoline. *3th International Conference on Environmental and Geological Science and Engineering (EG'10)*, Published by WSEAS Press, pp. 93 - 98, ISSN: 1792-4685; ISBN: 978-960-474-221-9.
 71. **Ghiță S., Sarchizian I., Ardelean L.I.**, 2010. Utilization of epifluorescence microscopy and digital image analysis to study some morphological and functional aspects of prokaryotes. *Ovidius University Annals - Biology-Ecology Series*, **14**: 127-137, ISSN- 1453-1267.
 72. **Ghiță S., Sarchizian I., Tuțuianu A., Ghiță D., Abdulcherim E., Ardelean L.I.**, 2010d. Quantification of actively growing hydrocarbon-oxidizing /tolerant bacteria in marine microcosms supplemented with gasoline. *3th International Symposium of Biotechnology „SimpBTH 2010” serie F*, ISSN 1224-7774, pp: 204 - 212.
 73. **Gomoiu M.T.**, 1997. General data on the marine benthic populations state in the NW Black Sea, in august 1995, Fluvial-Marine Interactions, International Workshop, *Geo-Eco-Marina*, **2**: 179.
 74. **Gomoiu M.T.**, 2002. Structura și funcționarea ecosistemelor marine, Note de curs.
 75. **Gonzale R.C., Woods R.E.**, 2008. Digital Image Processing, 3rd ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.
 76. **Hagstrom, A., Larsson U., Horstedt P., Normark S.**, 1979. Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, **37**: 805 – 812.

77. **Hardman R.A.**, 2006. Toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ Health Perspect*, **114**: 165 – 172.
78. **Heissenberger A., Leppard G.G., Herndl G.J.**, 1996. Relationship between the intracellular integrity and the morphology of the capsular envelope in attached and free-living marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 4521– 4528.
79. **Herrero A., Flores E.**, 2008. The Cyanobacteria: Molecular biology, genomics and evolution. In *Horizon Scientific Press*, pp. 484.
80. **Hobbie J.E., Daley R.J., Jasper S.**, 1977. Use of Nuclepore filters for counting bacteria by epifluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, **33**: 1225 – 1228.
81. **Ishii T., Adachi R., Omori M., Shimizu U., Irie H.**, , 1987. The identification, counting, and measurement of phytoplankton by an image-processing system. *J. Cons. Ciem.*, vol. 43, pp. 253-260.
82. **Ishikawa K., Walker R.F., Tsujimura S., Nakahara H., Kumagai M.**, , 2004. Estimation of *Microcystis* colony size in developing water blooms via image analysis. *J. Japan Society on Water Environ.*, vol. 27, pp. 69-72.
83. **Iturriaga R., Hoppe H-G.**, 1977. Observations of heterotrophic activity on photoassimilated matter. *Marine Biology*, **40**: 101 – 108.
84. **Iturriaga R., Marra I.** 1988. Temporal and spatial variability of chroococcoid cyanobacteria *Synechococcus* spp. Specific growth rates and their contribution to primary production in the Sargasso Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 44, pp. 175-181.
85. **Jiang W., Mashayekhi H., Xing B.**, 2009. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. *Environmental Pollution*, **157**: 1619 – 1625.
86. **Jorgensen B.B.**, 1982. Ecology of the bacteria of the sulfur cycle with special reference to anoxic-oxic interfaces environments, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, **298**: 543 – 561.
87. **Joung S.H., Kim C.J., Ahn C.Y., Jang K.Y., Boo S.M., Oh H.M.** 2006. Simple method for a cell count of the colonial cyanobacterium, *Microcystis* sp. *Journal of Microbiology*, 44(5), pp. 562-565.
88. **Joux F., LeBaron P.**, 1997. Ecological implications of an improved direct viable count method for aquatic bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 3643 – 3647.
89. **Joux F., LeBaron P.**, 2000. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infect.*, vol. 2, pp. 1523-1535.
90. **Kim J-S., Park Y-H., Yoon B-D., Oh H-M.**, 1999. Establishment of axenic cultures of *Anabeana flos-aquae* and *Aphanothece nidulans* (cyanobacteria) by lysozyme treatment. *Journal of Phycology*, **35**: 865 – 869.
91. **Kirchman D.L.**, 1993. Statistical analysis of direct counts of microbial abundance. In: *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*.
92. **Kirchman D.L.**, 2008. Introduction and Overview. In *Microbial Ecology of the Oceans*, Second Edition, Ed. D. L. Kirchmann, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA., pp. 593.
93. **Kirchman D.L., Sigda J., Kapuscinski R., Mitchell R.**, 1982. Statistical analysis of the direct count method for enumerating bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **43**: 376 - 382.
94. **Kogure K., Simidu U., Taga N.**, 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria, *Canadian Journal Microbiology*, **25**: 415 – 420.
95. **Kogure K. & Simidu U., Taga N.**, 1984. An improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Arch. Hydrobiol.*, vol. 102, pp. 117-122.
96. **Kraus M.P.**, 1966. Preparation of pure blue-green algae. *Nature*, pp. 211 – 310.
97. **Lamprecht MR, Sabatini DM, Carpenter AE.**, 2007. CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. *Biotechniques*; pp. 42: 71-5.
98. **Lazăr V., Herelea V., Cernat R., Balotescu M.C., Bulai D., Moraru A.**, 2004. Microbiologie generală – manual de lucrări practice. Ed. Univ. București, București.
99. **Lee S., Fuhrman J.A.**, 1987. Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**: 1298 – 1303.
100. **Lehmussola A., Ruusuvaari P., Selinummi J., Rajala T., Yli-Harja O.**, 2008. Synthetic images of high-throughput microscopy for validation of image analysis methods. *Proceedings of the IEEE*, pp. 1348 – 1360.
101. **Li W.K.W., Dickie P.M.**, 1991. Relationship between the number of dividing and non dividing cells of cyanobacteria in North Atlantic picoplankton. *Journal of Phycology*, 27(5), pp.559–565.
102. **Li W.K.W., Zohary T., Yacobi Y.Z., Wood A.M.**, , 1993. Ultraphytoplankton in the eastern Mediterranean Sea: towards deriving phytoplankton biomass from flow cytometric measurements of abundance, fluorescence and light scatter. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 102, pp. 79-87.
103. **Lin S.J., Bhattacharya P., Rajapakse N.C., Brune D.E., Ke P.C.**, 2009. Effects of quantum dots adsorption on algal photosynthesis. *J. Phys. Chem. C*, **113**: 10962 –109.
104. **Lucila M., Acosta Pomar1 C., Giuffre G.**, 1996. Pico-, nano- and microplankton communities in hydrothermal marine coastal environments of the Eolian Islands (Panarea and Vulcano) in the Mediterranean Sea. *Journal of Plankton Research*, **18** (5): 715 - 730.
105. **Mărgineanu D-G., Vais H., Ardelean I.**, 1985. Bioselective electrodes with immobilized bacteria (minireview). *Journal of Biotechnology*, **3**: 1 – 9.
106. **Maugeri T.L., Acosta Pomar M.L.C., Bruni V.**, 1990. Picoplankton. In Innamorati M., Ferrari I., Donato M. and Ribera D'Alcala Jvl. (eds), *Metodinell'ecologia del plancton marino. Nova Thalassia*, **11**: 199 - 205.
107. **Maugeri T.L., Gugliandolo C., Acosta Pomar M.L.C.**, 1992. Heterotrophic bacterial communities for characterization of a hydrothermal vent. In *6th International Symposium on Microbial Ecology*, Barcelona, Spain, 6-11 September 1992, Abstract 274.
108. **Ogawa M., Tani K., Yamaguchi N., Nasu M.**, 2003. Development of multicolour digital image analysis system to enumerate actively respiring bacteria in natural river water. *Journal of Applied Microbiology*, **95**:120 – 128.
109. **Ogawa T.**, 1991. A gene homologous to the subunit-2 gene of NADH dehydrogenase is essential to inorganic carbon transport of *Synechocystis* PCC6803. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **88**: 4275 – 4279.
110. **Ohkawa H., Price G.D., Badger M.R., Ogawa T.**, 2000. Mutation of *ndh* genes leads to inhibition of CO₂ uptake rather than HCO₃⁻ uptake in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Journal of Bacteriology*, **182**: 2591 – 2596.
111. **Olaizola M.**, 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace, *Biomolecular Engineering*, **20**: 459 – 466.
112. **Onciu T.**, 2000. Donnees preliminaires concernant la faune de nematodes libres de fond rocheux de l'infralittoral en proximite des sources mesothermales sulfureuses (Mangalia). *An. Univ. „Ovidius” Constanța*, Seria Biologie – Ecologie, vol. IV, pp. 27 – 30.
113. **Oren A., Padan E.**, 1978. Induction of anaerobic photoautotrophic growth in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Journal of Bacteriology*, pp.133558 – 133563.
114. **Panin N., Gomoiu M.T., Oaie G., Rădan S.**, 1996. Researches on the River Danube – Black Sea ecosystem carried out by the Romanian Center of Marine Geology and Eco-Geology during 1995 in the framework of European River Ocean Sistem Project (EROS-2000). *Geo-Eco-Marina, RCMGG*, **1**:127 – 154.
115. **Peschek G.A., Bernroither M., Sari S., Pairer M., Obinger C.**, 2011. In *Bioenergetic Processes of Cyanobacteria – from Evolutionary Singularity to Ecological Diversity*, Eds. G.A. Peschek, C. Obinger, G. Renger, Springer, New York, 3.
116. **Peschek G.A., Obinger C., Fromwald S., Bergman B.**, 1994. *FEMS Microbiology Letters* **124**: 431.

117. Petrilă T., Popescu D., Porumbescu M., 1960. Constanța și împrejurimile ei, Editura Științifică, București, pp. 244 – 251.
118. Pettipher G.L., Rodrigues U.M., 1982. Semi-automated counting of bacteria and somatic cells in milk using epifluorescence microscopy and television image analysis. *Journal of Applied Bacteriology*, **53**: 323 – 329.
119. Plante C.J., Shriver A.G., 1998. Differential lysis of sedimentary bacteria by *Arenicola marina* L.: examination of cell wall structure and exopolymeric capsules as correlates, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **229**: 35 – 52.
120. Ploem J.S., Verwoerd N., Bonnet J., et al., 1979. An automated microscope for quantitative cytology combining television image analysis and stage scanning microphotometry. *J. Histochem. Cytochem.*, **27**: 136 – 143.
121. Polne-Fuller M., 1991. A novel technique for preparation of axenic cultures of *Symbiodinium* (Pyrrophyta) through selective digestion by amoebae. *Journal of Phycology*, **27**: 552 – 554.
122. Prudhomme M., Attaiech L., Sanchez G., Martin B., Claverys J-P., 2006. Antibiotic Stress Induces Genetic Transformability in the Human Pathogen *Streptococcus pneumoniae*, *Science*, **313**: 89 – 92.
123. Ray J.N., Ranjit K.T., Manna A.C., 2008. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, **279**: 71 – 76.
124. Rippka R., 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods in Enzymology*, **167**: 3 – 27.
125. Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier R.Y., 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, **111**: 1 – 61.
126. Rippka R., Herdman, H. 1992. *Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria: Catalogue and Taxonomic Handbook. I. Catalogue of Strains*. Paris: Institut Pasteur.
127. Rippka R., Castenholz, R. W. & Herdman, M. 2001. Subsection IV. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 1, pp. 562–589. Edited by D. R. Boone & R. W. Castenholz. New York: Springer.
128. Roszak D. B., Colwell R. R., 1987. Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment. *Microbiological Reviews*, vol. 51, no. 3, pp. 365-379.
129. Sarchizian I., Ardelean I.I., 2010. Axenic culture of a diazotrophic filamentous *Cyanobacterium* isolated from mesothermal sulphurous spring (Obanul Mare - Mangalia). *Rom J. Bio. – Plant Biol*, **55**: 47 – 53.
130. Schmitt F.-J., 2010. Temperature induced conformational changes in hybrid complexes formed from CdSe/ZnS nanocrystals and the phycobiliprotein antenna of *Acaryochloris marina*. *J. Opt.*, year 12, nr. 8 084008 (6pp).
131. Schumacher W. C., Phipps A. J., Dutta P. K., 2009. *Advanced Powder Technology*, **20**: 438.
132. Seckbach J., Oren A., Oxygenic. In: *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments – Cellular*.
133. Selinummi J., 2008. On algorithms for two and three dimensional high throughput light microscopy, Ph.D Thesis for the degree of Doctor of Technology.
134. Selinummi J., Ruusuvaari P., Lehmussola A., Huttunen H., Yli-Harja O., Miettinen R., 2006. Three-dimensional digital image analysis of immunostained neurons in thick tissue sections. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **1**: 4783 – 4786.
135. Selinummi J., Ruusuvaari P., Podolsky I., Ozinsky A., Gold E., Yli-Harja O., Aderem A., Shmulevich I., 2009. Bright field microscopy as an alternative to whole cell fluorescence in automated analysis of macrophage images. *PLoS One* **4**(10): 7497.
136. Selinummi J., Sarkanen R., Niemistö A., Linne M-L., Ylikomi T., Yli-Harja O., Jalonen T., 2006. Quantification of vesicles in differentiating human SH-SY5Y neuroblastoma cells by automated image analysis, *Neuroscience Letters*, **396** (2): 102 – 107.
137. Selinummi J., Seppälä J., Yli-Harja O., Puhakka J.A., 2005. Software for quantification of labeled bacteria from digital microscope images by automated image analysis. *BioTechniques*, **39** (6): 859 – 863.
138. Sherr B., Sherr E., Del Giorgio P., 2001. Enumeration of total and highly active bacteria, *Methods in Microbiology*, **30**: 129 – 159.
139. Shirai M., Matumaru K., Onotake A., Takamura Y., Aida T., Nakono M., 1989. Development of a solid medium for growth and isolation of axenic *Microcystis* strains (cyanobacteria). *Applied and Environmental Microbiology*, **55**: 2569 – 2571.
140. Singh A., Pyle B.H., McFeters G.A., 1989. Rapid enumeration of viable bacteria by image analysis. *Journal of Microbiological Methods*, **10**: 91 – 101.
141. Stanier R.Y., Cohen-Bazire G., 1977. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annual Review of Microbiology*, **31**: 225 – 274.
142. Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G., 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriology Reviews*, **35**: 171 – 205.
143. Stockner J.G., Antia N.J., 1986. Algal picoplankton from marine and freshwater ecosystems: a multidisciplinary perspective. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, vol. 43, pp. 2472-2503.
144. Stoderegger K., Herndl G.J., 1998. Production and release of bacterial capsular material and its subsequent utilization by marine bacterioplankton. *Limnology and Oceanography*, **43**: 877 – 884.
145. Stoderegger K., Herndl G.J., 2001. Visualization of the exopolysaccharide bacterial capsule and its distribution in oceanic environments. *Aquatic Microbial Ecology*, **26**: 195 – 199.
146. Țigănuș V., Aonofriesei F., Onciu T., 1998. Donnees preliminaires sur le organismes de proximite des sources sous-marines sulfureuses du littoral roumain de la Mer Noire. *Rapp. du 35e Congres de la CIESM*, **35**(2): 492 – 493.
147. Țigănuș V., Onciu T., Caraivan G., Aonofriesei F., Dumitrache R., 1997. Structura populațiilor de organisme din zonele influențate de apele mezotermale sulfuroase în perioada de vară, în vederea stabilirii dinamicii sezoniere a acestor populații. Faza II/1997, act adițional 726/1997 la *Identificarea izvoarelor sulfuroase mezotermale marine și influența lor asupra organismelor*, studiu contract 899.
148. Torrella F., Morita R.Y., 1981. Microcultural study of bacterial size changes and microcolony and ultramicrocolony formation by heterotrophic bacteria in seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, **41**: 518 – 527.
149. Tsujimura S., 2003. Application of the frequency of dividing cells technique to estimate the *in situ* growth of *Microcystis* (Cyanobacteria). *Freshwater Biol.*, vol. 48, pp. 2009–2024.
150. Vaara T., Vaara M., Niemela S., 1979. Two improved methods for obtaining axenic cultures of cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **38**(5): 1011 – 1014.
151. Van Den Hoek C., Mann N.H., Jahns H.M., 1995. *Algae, an introduction to phycology*. Cambridge University Press.
152. Van Wambeke F., 1988. Enumeration and size of planktonic bacteria determined by image analysis coupled with epifluorescence. *Ann Inst Pasteur Microbiol.*, **39**(2): 261 – 272.
153. Vázquez-Martínez G., Rodríguez M.H., Hernández-Hernández F., Ibarra J.E., 2004. Strategy to obtain axenic cultures from field-collected samples of the cyanobacterium *Phormidium animalis*. *Journal of Microbiological Methods*, **57**: 115 – 121.
154. Velimirov B., Walenta-Simon M., 1992. Seasonal changes in specific growth rates, production and biomass of a bacterial community in the water column above a Mediterranean seagrass system. *Marine Ecology Progress Series*, **80**: 237 – 248.
155. Vermaas W., 1996. Molecular genetics of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: principles and possible biotechnology applications. *Journal of Applied Phycology*, **8**: 263 – 273.
156. Vermaas W.F.J., Shen G., Styring S., 1994. Electrons generated by photosystem II are utilized by an oxidase in the absence of photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Letters*, **337**: 103 – 108.
157. Vermaas W., 1996. Molecular genetics of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: principles and possible biotechnology applications. *Journal of Applied Phycology*, **8**: 263–273.

158. Villarreal, L.P., 2009. Origin of Group Identity; Viruses, Addiction and Cooperation'. Springer 2009.
159. Van Wambeke F. Enumeration and size of planktonic bacteria determined by image analysis coupled with epifluorescence. Annales de l'Institut Pasteur Microbiology, 139(2), pp.261–72, 1988.
160. Vaulot D. Estimate of phytoplankton division rates by the mitotic index method: the *f_{max}* approach revisited. Limnol. Oceanogr, vol. 37, pp. 644-649, 1992.
161. Watanabe M.M. & Ichimura T. Fresh and salt-water forms of *Spirulina platensis* in axenic cultures. Bull. Jpn. Soc. Phycol., vol. 25 (Suppl), pp. 371–377, 1977.
162. Walsby, A. E., and A. Avery. 1996. Measurement of filamentous cyanobacteria by image analysis. Journal of Microbiological Methods 26:11-20
163. Wang Z., Li J., Zhao J., Xing B., 2011. Toxicity and internalization of CuO nanoparticles to prokaryotic alga *Microcystis aeruginosa* as affected by dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology*, **45** (14): 6032 – 6040.
164. Watanabe M.M., Nakagawa M., Katagiri M., Aizawa K., Hiroki M., Nozaki H., 1998. Purification of freshwater picoplanktonic cyanobacteria by pour-plating in "ultra-lowelling- temperature agarose". *Phycol Rev.*, **42**: 71 – 75.
165. Whitton, D.H., Potts, M., 2000, The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, 669 pp.
166. Yamamoto Y. & Shiah F.K. Relationship between cell growth and frequency of dividing cells of *Microcystis aeruginosa*. Plankton Benthos Res 5(4), pp.131–135, 2010.
167. Yamamoto Y. & Tsukada H. Measurement of in situ specific growth rates of *Microcystis* (cyanobacteria) from the frequency of dividing cells. J. Phycol., vol. 45, pp.1003–1009, 2009.
168. Yamamoto Y. Effect of temperature on recruitment of cyanobacteria from the sediment and bloom formation in a shallow pond. Plankton Benthos Res., vol 4, pp. 95–103, 2009.
169. Yang X., Beyenal H., Harkin G., Lewandowski Z., 2000. Quantifying biofilm structure using image analysis. *Journal of Microbiological Methods*, **39**: 109 – 119
170. Yokomaru D., Yamaguchi N., Nasu M., 2000. Improved Direct Viable Count Procedure for Quantitative Estimation of Bacterial Viability in Freshwater Environments, *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (12): 5544 – 5548.

ANEXA PERSONALĂ

Lucrări științifice publicate în reviste de specialitate cotate ISI:

- **Sarchizian, I.,** Cîrnu, M., Ardelean, I.I., 2011. Isolation of a heterocysts – forming Cyanobacterium and quantification of its biotechnological potential with respect to redox properties at single cell level, Romanian Biotechnological Letters, Vol. 16, No.6, Supplement, p.3-9.
- Armașelu A., Popescu A., Apostol I., Ardelean I., Damian V., Iordache I., **Sarchizian I.,** Apostol D., 2011. Passive nonspecific labeling of cyanobacteria in natural samples using quantum dots, Optoelectronics and Advanced Materials-Rapid Communications, 5(10), p. 1084-1090.

Lucrări științifice publicate în volumele conferințelor internaționale cotate ISI:

- Ardelean, I., **Sarchizian, I.,** Manea, M., Damian, V., Apostol, I., Cîrnu, M., Armașelu, A., Iordache, I., Apostol, D., 2011. CdSe/ZnS quantum dots cytotoxicity against phototrophic and heterotrophic bacteria, Proceeding of NANOCON 2011, Brno, Czech Republic, 21. – 23. 09. 2011. ISBN 978-80-87294-27-7, pp 608-617
- **Sarchizian, I.,** Ardelean, I.I., 2012. Frequency of dividing cells and growth rates In population of filamentous cyanobacteria isolated from sulphurous mesothermal spring Obantul Mare (Mangalia), Proceedings 12th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2012, ISSN 1314-2704, vol 5, pp.423-430.
- **Sarchizian, I.,** Ardelean, I.I., 2012. Quantification of cells capable of growth and multiplication using direct viable count method in filamentous and unicellular cyanobacteria, Proceedings 12th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2012, ISSN 1314-2704, vol.5, pp.655-662.

Lucrări științifice publicate în volumele conferintelor internaționale organizate de societăți profesionale internaționale (indexate BDI):

- Ardelean I.I., Diaz-Pernil D., Gutierrez-Naranjo M.A., Francisco Pena-Cantillana, Raul Reina-Molina, **Iris Sarchizian**, 2012. Counting Cells with Tissue-like P Systems. Proceedings of the Tenth Brainstorming Week on Membrane Computing, January 30 - February 3, 2012, Sevilla (Spain), vol. I, p.69-78.

Articole publicate în reviste românești recunoscute de CNCSIS - categoria B+:

- Ardelean I.I., Ghiță S., **Sarchizian I.**, 2009. Epifluorescent method for quantification of planktonic marine prokaryotes. Proceedings of the 2nd International Symposium "New Research in Biotechnology" serie F, Bucharest, ISSN 1224-7774, p: 288-296.
- Ardelean I.I., Ghiță S., **Sarchizian I.**; 2009. Isolation of oxygenic phototrophic and oxic heterotrophic bacteria with potential for gasoline consumption. Proceedings of the 2nd International Symposium "New Research in Biotechnology" serie F, Bucharest, ISSN 1224-7774, p: 278-287.
- Ghiță S., **Sarchizian I.**, Țuțuianu A., Ghiță D., Abdulcherim E., Ardelean I.I., 2010. Quantification of actively growing hydrocarbon-oxydizing /tolerant bacteria in marine microcosms supplemented with gasoline. Proceedings of the 3rd International Symposium of Biotechnology „SimpBTH 2010” serie F, Bucharest, ISSN 1224-7774, p: 204-212.

Articole publicate în reviste românești recunoscute de CNCSIS - alte categorii:

- **Sarchizian I.**, Ardelean I.I., 2010. Axenic culture of a diazotrophic filamentous cyanobacterium isolated from mesothermal sulphurous springs (Obanul Mare - Mangalia), Rom. J.Biol- Plant Biol., vol. 55, No.1, p. 47-53.
- **Sarchizian I.**, Ardelean I.I., 2010. Improved Lysozyme Method to Obtain Cyanobacteria in Axenic Cultures, ROM. J. BIOL. – PLANT BIOL., vol. 55, No 1, p. 47–53.
- Ghiță S., **Sarchizian I.**, Ardelean I.I., 2010. Utilization of epifluorescence microscopy and digital image analysis to study some morphological and functional aspects of prokaryotes. Ovidius University Annals - Biology-Ecology Series. Vol. 14, No. 1, ISSN-1453-1267, p. 127-137.

Lucrări publicate în volumele unor conferințe naționale:

- Ghiță S., **Sarchizian I.**, Ardelean I.I.; Enumerarea și evidențierea celulelor bacteriene din medii marine poluate cu hidrocarburi- recomandări metodologice pentru aplicații în cercetarea de laborator. Sesiune științifică „Dezvoltare durabilă în regiunea Mării Negre” Univ. Maritimă Constanța, ISSN 2069-248X, Ed. Nautica, p: 109-117, (2010).
- **Sarchizian I.**, Ghiță S., Ardelean I.I.; Aplicații ale analizei de imagine digitală pentru măsurarea și enumerarea bacteriilor heterotrofe și fotosintetizante utilizând microscopia de epifluorescență. Sesiune științifică „Dezvoltare durabilă în regiunea Mării Negre” Univ. Maritimă Constanța, ISSN 2069-248X Ed. Nautica, p: 102-108, (2010).

Participări la manifestări științifice internaționale:

- **Sarchizian, I.**, 2011. Automated Analysis of Unicellular and Filamentous cyanobacteria in bright field and fluorescence microscopy – preliminary results and perspectives , First International School on Biomolecular and Biocellular Computing, Escuela Universitaria de Osuna, Sevilla, Spain, 5-7 Sept.2011 (**prezentare orală**).

Rezumate publicate:

- Ardelean, I.I., Cîrnu, M., Pascu, D., **Sarchizian, I.**, Damian, V., Apostol, I., Iordache, I., Apostol, D., 2012. Metallic Nanoparticle (Gold, Silver, Aluminium) Citotoxicity against Phototrophic and Heterotrophic Bacteria, NANOCON 2012, 23 – 25. 10. 2012, Brno, Czech Republic.
- Ardelean, I., **Sarchizian, I.**, Manea, M., Damian, V., Apostol, I., Cîrnu, M., Armaselu, A., Iordache, I., Apostol, D., 2011. CdSe/ZnS Quantum dots citotoxicity against phototrophic and heterotrophic bacteria, NANOCON 2011, 21 – 23. 9. 2011, Brno, Czech Republic.
- **Sarchizian I.**, Ghiță S., Manea M., Ignat M., Moiescu C., Ardelean I. 2010. Isolation of axenic cultures of cyanobacteria from sulphurous spring and marine environments; screening for the biotechnological signification of the isolates. International Symposium on Phycological Research, Varanasi 221005, India, ABT29 .
- Ardelean I.I., **Sarchizian I.**, Damian V., Apostol I., Manea M., Ghiță S., Armaselu A., Iordache I., Apostol D. 2011. Interaction of quantum dots with phototrophic and heterotrophic bacteria: nonspecific labeling and citotoxicity. EURONANOFORUM Budapesta .
- Ghiță S., **Sarchizian I.**, Țuțuianu A., Ghiță D., Abdulcherim E., Ardelean I.I. 2010. Quantification of actively growing hydrocarbon-oxdizing /tolerant bacteria in marine microcosms supplemented with gasoline. Proceedings of the 3rd International Symposium of Biotechnology „SimpBTH 2010” serie F, Bucharest, ISSN 1224-7774, p: 204-212 .
- Ardelean I.I., Ghiță S., **Sarchizian I.**, 2009. Epifluorescent method for quantification of planktonic marine prokaryotes. Proceedings of the 2nd International Symposium “New Research in Biotechnology” serie F, Bucharest, ISSN 1224-7774, p: 288-296 .
- Ardelean I.I., Ghiță S., **Sarchizian I.**, 2009. Isolation of oxygenic phototrophic and oxic heterotrophic bacteria with potential for gasoline consumption. Proceedings of the 2nd International Symposium “New Research in Biotechnology” serie F, Bucharest, ISSN 1224-7774, p: 278-287.
- Ardelean I.I., Sima L.E., Ghiță S., **Sarchizian I.**, Popoviciu D.R., Lăzăroaie M.M, 2009. Quantification of marine bacteria in pure culture and microcosms by epifluorescence microscopy and flow cytometry. FEMS 2009-3rd Congress of European Microbiologists Gothenburg, Sweden June 28-July 2.
- Ardelean I.I., Damian V., **Sarchizian I.**, Ghiță S., Armaselu A., Apostol D., 2010. Visualisation of axenic and nonaxenic cultures of cyanobacteria using semiconductor quantum dots. International Symposium on Phycological Research, Varanasi 221005, India, AEE28 .
- Ardelean I.I., Ghiță S., Popoviciu D.R., Damian V., **Sarchizian I.**, Manea M., Apostol I., Iordache I., Armaselu A., Apostol D., 2010. Microbial dynamics and diversity in marine microcosms studied by the use of quantum dots and fluorescent molecules. 14th Evolutionary Biology Meeting at Marseilles september 21st-24th 2010, poster 22, Association pour l’etude de l’evolution biologique .
- Ardelean I.I., Damian V., **Sarchizian I.**, Ghiță S., Manea M., Apostol I., Popoviciu D.R., Iordache I., Armaselu A., D. Apostol D., 2010. The use of quantum dots to visualize heterotrophic and photosynthetic bacteria in pure cultures and microcosms. IBB sept. 2010, poster 36 .

- **Sarchizian I.**, Ardelean I.I., 2012. Frequency of dividing cells and growth rates In population of filamentous cyanobacteria isolated from sulphurous mesothermal spring obanul mare (Mangalia), Proceedings 12th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2012, ISSN 1314-2704 .
- **Sarchizian I.**, Ardelean I.I., 2012. Quantification of cells capable of growth and multiplication using direct viable count method in filamentous and unicellular cyanobacteria, Proceedings 12th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2012, ISSN 1314-2704 .
- **Sarchizian I.**, Ardelean I.I.; Evidențierea celulelor capabile de creștere și diviziune în populații naturale de cianobacterii filamentoase din izvorul sulfuros mezotermal de la Obanul Mare (Mangalia); A XXI-a Sesiune de Comunicări științifice, Univ. Ovidius Constanța, 25-26 martie 2011.
- Ghiță S., **Sarchizian I.**, Ardelean I.I.; Utilization of epifluorescence microscopy and digital image analysis to study some morphological and functional aspects of prokaryotes. Ovidius University Annals - Biology-Ecology Series. Vol. 14, No. 1, ISSN-1453-1267, p: 127-137, (2010).

Participări la manifestări științifice naționale :

- **Sarchizian I.**, Ardelean I.I., Ghiță S. Perspective ale analizei de imagine digitală a cianobacteriilor unicelulare și filamentoase pentru studierea proprietăților redox la nivel celular, Sesiune de comunicări științifice „Calitatea și Monitoringul Mediului Înconjurător”, Univ. Maritimă Constanța, 31 octombrie 2011 (**prezentare orală**).
- **Sarchizian I.**; Izolarea unei cianobacterii diazotrofe din izvorul sulfuros mezotermal de la Obanul Mare (Mangalia); A XIX-a Sesiune de Comunicări științifice, Univ. Ovidius Constanța, 27-28 martie 2009 (**prezentare orală**).
- **Sarchizian I.**, Ghiță S., Ardelean I.I.; Obținerea culturilor axenice de cianobacterii. Sesiune de comunicări științifice „Calitatea și Monitoringul Mediului Înconjurător”, Univ. Maritimă Constanța, 31 octombrie (2009) (**prezentare orală**).
- **Sarchizian I.**, Ghiță S., Ardelean I.I.; Aplicații ale analizei de imagine digitală pentru măsurarea și enumerarea bacteriilor heterotrofe și fotosintetizante utilizând microscopia de epifluorescență. Sesiune științifică „Dezvoltare durabilă în regiunea Mării Negre” Univ. Maritimă Constanța, ISSN 2069-248X Ed. Nautica, p: 102-108, (2010) (**prezentare orală**).
- Ghiță S., **Sarchizian I.**, Ardelean I.I.; Cuantificarea procariotelor marine în condiții de microcosmos. Sesiune de comunicări științifice „Calitatea și Monitoringul Mediului Înconjurător”, Univ. Maritimă Constanța, 31 octombrie (2009) (**prezentare orală**).
- Ghiță S., **Sarchizian I.**, Ardelean I.I.; Enumerarea și evidențierea celulelor bacteriene din medii marine poluate cu hidrocarburi- recomandări metodologice pentru aplicații în cercetarea de laborator. Sesiune științifică „Dezvoltare durabilă în regiunea Mării Negre” Univ. Maritimă Constanța, ISSN 2069-248X, Ed. Nautica, p: 109-117, (2010) (**prezentare orală**).
- Ardelean I.I., Ghiță S., **Sarchizian I.**, Moldoveanu M., Popoviciu D.R.; Studiul descriptiv al microbiotei marine în sisteme microcosmos: de la rezultate microscopice în microbiologia marină la perspective predictive în oceanografia microbiologică. Sesiune științifică națională cu participare internațională “Biodiversitate și impact antropic în Marea

Neagră și în ecosistemele litorale ale Mării Negre” 21- 22 octombrie 2011 (**prezentare orală**).

- **Sarchizian I.**, Ardelean I.I., Ghiță S.; 2011. Perspective ale analizei de imagine digitală a cianobacteriilor unicelulare și filamentoase pentru studierea proprietăților redox la nivel celular, Simpozionul “Calitatea și monitoringul mediului marin”, Ed. Nautica ISSN 2069-248X. (**prezentare orală**).

Participarea la contracte de cercetare naționale și internaționale:

- Sistem de producere cu laser de nanoparticule pentru biotehnologii (Laser-based manufacturing system for biotech nanoparticles production) (BIO.NANO.LAS) program „*PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE*”.
- Contract nr. 159/28/10/2011 proiectul PN-II-ID-PCE-2011-3-0742 “Biodiversitate și distribuție cronologică a microorganismelor în straturile de gheață perenă din ghetarul Scarisoara (România) – program IDEI.
- Am obținut bursă pentru participarea la *First International School on Biomolecular and Biocellular Computing* la Universitatea din Sevilla, Spania, în septembrie 2011.