



ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul De Biologie București

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**DIVERSITATEA GENETICĂ A COMUNITĂȚILOR
BENTALE DIN SISTEMUL
DUNĂRE - DELTA DUNĂRII - MAREA NEAGRĂ**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
CSI Dr. Cristina Ligia PURCĂREA

DOCTORAND:
Selma MENABIT

2024

CUPRINS

LISTĂ ABREVIERI	5
INTRODUCERE	6
1. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	10
1.1. Nevertebrate bentale	10
1.2. Microbiomul nevertebratelor bentale	16
1.3. Biodiversitatea comunităților bentale în sistemul Dunăre - Delta Dunării - Marea Neagră	18
1.4. Tehnici de evaluare a biodiversității acvatice	21
CONTRIBUȚII PERSONALE	28
2. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI	28
3. MATERIALE ȘI METODE	29
3.1. Descrierea zonelor de studiu	29
3.1.1. Cursul inferior al Dunării	29
3.1.2. Cele trei brațe principale ale Dunării	30
3.1.3. Zona costieră românească a Mării Negre	31
3.2. Colectarea probelor de bentos	31
3.3. Determinarea parametrilor fizico-chimici ai probelor de apă colectate	33
3.4. Prelucrarea probelor de macrozoobentos și sedimente colectate	34
3.5. Analiza cantitativă și taxonomică a comunităților bentale dulcicole	35
3.6. Identificarea moleculară a organismelor bentale	35
3.7. Analiza filogenetică și calcularea distanțelor genetice intra- și interspecifice	37
3.8. Evaluarea diversității comunităților bacteriene asociate speciilor de nevertebrate și sedimentelor adiacente	37
3.9. Diversitatea funcțională a comunităților bacteriene	39
3.10. Analize statistice	39
4. REZULTATE: IDENTIFICAREA ȘI DISTRIBUȚIA LARVELOR DE INSECTE ACVATICE ÎN CURSUL INFERIOR AL DUNĂRII	40
4.1. Colectarea probelor de macrozoobentos și caracteristicile habitatului acestora	40
4.2. Diversitatea taxonomică și distribuția larvelor de insecte	44
4.3. Discuții	52
4.4. Concluzii	56
5. REZULTATE: IDENTIFICAREA ȘI DISTRIBUȚIA SPECIILOR DE GASTROPODE ȘI CRUSTACEE ÎN CURSUL INFERIOR AL DUNĂRII	57
5.1. Colectarea probelor de macrozoobentos și caracteristicile habitatului acestora	57
5.2. Diversitatea taxonomică și analiza filogenetică a speciilor de gastropode și crustacee din cursul inferior al Dunării	59
5.3. Distribuția spațială și ecologia speciilor de gastropode și crustacee în cursul inferior al Dunării	67
5.4. Discuții	72
5.5. Concluzii	76
6. REZULTATE: EVALUAREA COMUNITĂȚILOR BACTERIENE ASOCIATE SPECIEI DE POLICHET MARIN <i>MELINNA PALMATA</i> GRUBE, 1870 ȘI SEDIMENTELOR ADIACENTE DIN MAREA NEAGRĂ	77
6.1. Colectarea probelor de macrozoobentos și caracteristicile habitatului zonei investigate	77

6.2. Diversitatea bacteriană în țesuturile de <i>M. palmata</i> și sedimentele asociate	79
6.3. Structura comunităților bacteriene asociate țesuturilor <i>M. palmata</i> și sedimentelor adiacente	85
6.4. Profilul funcțional al comunităților bacteriene care colonizează <i>M. palmata</i> și sedimentele asociate	91
6.5. Discuții	93
6.6. Concluzii	97
7. REZULTATE: EVALUAREA COMUNITĂȚILOR BACTERIENE ASOCIATE DIFERITELOR TIPURI DE ORGANE ALE BIVALVEI MYA ARENARIA LINNAEUS, 1758 ȘI SEDIMENTELOR ADIACENTE DIN MAREA NEAGRĂ	99
7.1. Colectarea probelor de macrozoobentos și caracteristicile habitatului zonei investigate	99
7.2. Comunitatea bacteriană în organele bivalvei <i>M. arenaria</i> și sedimentele asociate	101
7.3. Structura comunităților bacteriene asociate organelor (sifon, branhii și stomac) <i>M. arenaria</i> și sedimentelor adiacente	106
7.4. Diversitatea funcțională a comunităților bacteriene care colonizează organele <i>M. arenaria</i> și sedimentele asociate	112
7.5. Discuții	114
7.6. Concluzii	118
8. CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE	119
ANEXE CU TABELE SUPLIMENTARE	124
DISEMINAREA REZULTATELOR	145
BIBLIOGRAFIE	149

INTRODUCERE

Biodiversitatea este esențială pentru bunăstarea umană, sănătatea planetei și prosperitatea economică globală, facilitând un trai echilibrat și armonios cu mediul natural. Ecosistemele furnizează resurse indispensabile precum alimente, medicamente, energie, aer și apă, în același timp oferind protecție împotriva dezastrelor naturale. De asemenea, ele contribuie semnificativ la îmbogățirea culturală, susținând integritatea tuturor sistemelor vitale de pe Pământ (CBD, 2024).

În sistemul Dunăre - Delta Dunării - Marea Neagră, înainte de adoptarea pe scară largă a tehnicilor moleculare, evaluarea biodiversității s-a bazat pe tehnici tradiționale. Astfel, timp de multe decenii, studiile s-au concentrat pe distribuția și ecologia speciilor, mai degrabă decât pe analize moleculare. Cu toate acestea, în ultimii ani, tehnici moleculare precum codul de bare ADN și eDNA (ADN de mediu) au început să fie instrumente din ce în ce mai utilizate în studiile de biodiversitate.

În ultimele decenii, distribuția, ecologia și diversitatea nevertebratelor bentale, inclusiv a larvelor de insecte acvatică, a speciilor de gastropode și crustacee ce populează fluviul Dunărea au făcut obiectul mai multor studii (Graf și colab. 2006; Tubić și colab., 2013; Farkas și colab., 2014; Krno și colab., 2018; Navara și colab., 2020). Numeroase cercetări au evaluat aceste aspecte și în sectorul Dunării ce traversează teritoriul României (Chiriac, 2004; Glöer și Sîrbu, 2005; Gomoiu și colab., 2008; Paraschiv și colab., 2010; Graf și colab., 2014; Pavel și colab. 2018; Begun și colab., 2020; Pavel și colab, 2021; Pavel și colab, 2023).

În schimb, identificarea moleculară prin codul de bare ADN, bazată pe analiza fragmentelor genei citocrom oxidazei 1 (CO1) a insectelor care colonizează habitatele terestre din România, a fost puțin abordată, de exemplu, un studiu ce a vizat 180 de specii de fluturi (Dincă și colab., 2011), în timp ce această tehnică nu a mai fost utilizată până în momentul de față pentru identificarea insectelor acvatice.

De asemenea, informațiile referitoare la amfipodele și mizidele Ponto-Caspice din sectorul inferior al Dunării sunt limitate (Begun, 2006; Paraschiv și colab., 2007; Graf și colab., 2008; Borza și colab., 2010; Stoica și colab., 2014), iar identificarea moleculară a amfipodelor (Cristescu și colab., 2003; Rewics și colab., 2015; Jażdżewska și colab., 2020) și a misidelor (Audzijonyte și colab., 2006; Cristescu și Hebert, 2005) din sectorul inferior al Dunării și Delta Dunării a vizat doar câteva specii. În plus, studiile efectuate de către

Audzijonyte și colab. (2006); Jażdżewska și colab. (2020); Cristescu și Hebert (2005) au inclus exemplare colectate din locații nespecificate din Delta Dunării. Totodată, până în prezent, nu au fost efectuate astfel de studii moleculare asupra faunei de gastropode ce populează cursul inferior al Dunării.

Având în vedere caracterul anoxic al Mării Negre, acest bazin reprezintă un mediu propice pentru dezvoltarea microorganismelor anaerobe și eucariotelor extremofile care reprezintă un mare potențial pentru noi produse ce pot fi utilizate în diferite domenii (Black Sea SRIA Implementation Plan, 2023). Deoarece mare parte din diversitatea microbiană a Mării Negre este insuficient documentată, una din acțiunile strategice ale Planului de Implementare al Agendei Strategice de Cercetare și Inovare la Marea Neagră pune accentul pe stabilirea unui sistem de cunoaștere a speciilor (inclusiv a microorganismelor) cu potențial de generare a compușilor bioactivi, precum produse farmaceutice noi, biocombustibili, enzime și biopolimeri (Black Sea SRIA Implementation Plan, 2023).

O serie de cercetări în Marea Neagră s-au concentrat pe investigarea populațiilor microbiene ce colonizează sedimentele (Schulz și colab., 1999; Thamdrup și colab., 2000; Leloup și colab., 2007; Schäfer și colab., 2007; Coolen și Shtereva, 2009; Schippers și colab., 2012) și habitatele pelagice (Jørgensen și colab., 1991; Sorokin și colab., 1995; Glaubitz și colab., 2010; Bryukhanov și colab., 2015; Ruginescu și colab., 2022). Cu toate acestea, doar un singur studiu a caracterizat bacteriile asociate bivalvei *Mytilaster lineatus* (Onyshechenko și colab., 2005), în timp ce până în prezent, nu au fost efectuate cercetări privind bacteriile ce colonizează alte organisme bentale.

Având în vedere aceste aspecte, studiile efectuate în cadrul acestei teze de doctorat au urmărit evaluarea distribuției și ecologiei unor nevertebrate bentale ce populează sectorul Dunării ce traversează teritoriul României, prin integrarea tehnicii moleculare codul de bare ADN, aducând astfel noi informații despre diversitatea și ecologia nevertebratelor din fluviul Dunărea. Totodată, cercetările au vizat și evaluarea comunităților bacteriene ce colonizează două nevertebrate bentale și sedimentele adiacente din zona șelfului românesc al Mării Negre, utilizând secvențierea Illumina a genei ARNr 16S. Acest studiu a realizat o premieră prin exploarea microbiomului speciei *Melinna palmata* și a adus noi informații prin investigarea, pentru prima dată, a variației compoziționale a microbiomului bivalvei *Mya arenaria* la nivel de organ.

Obiectivele principale ale tezei de doctorat au cuprins:

- Identificarea moleculară a unor larve de insecte acvatice prin tehnica codului de bare ADN, precum și evaluarea distribuției lor spațiale în sectorul românesc al Dunării, în raport cu tipul de substrat, oxigenul dizolvat și adâncimea apei;
- Identificarea moleculară prin tehnica codului de bare ADN și evaluarea distribuției spațiale a unor specii de crustacee (amfipode și mizide), precum și a unor gastropode în sectorul inferior al Dunării (inclusiv Delta Dunării), în relație cu tipul de substrat și adâncimea apei;
- Caracterizarea microbiomului asociat nevertebratelor marine *Melinna palmata* și *Mya arenaria* și sedimentelor înconjurătoare din zona șelfului românesc al Mării Negre.

Lucrarea de doctorat este structurată în două părți principale. Prima parte oferă o prezentare a datelor curente asupra comunităților macrozoobentale, a microbiomului asociat acestora și a particularităților privind diversitatea macrozoobentosului din zonele investigate, precum și a tehnicilor utilizate în evaluarea biodiversității acvatice. A doua parte a tezei de doctorat este dedicată contribuțiilor personale, care cuprinde un capitol dedicat metodelor utilizate și patru capitole de rezultate originale cu discuții și concluzii aferente fiecărui studiu de caz. Cele patru studii originale efectuate includ (1) Identificarea și distribuția larvelor de insecte acvatice din cursul inferior al Dunării, (2) Identificarea și distribuția speciilor de gastropode și crustacee din cursul inferior al Dunării, (3) Evaluarea comunităților bacteriene asociate speciei de polichet marin *M. palmata* și sedimentelor adiacente din Marea Neagră și (4) Evaluarea comunităților bacteriene asociate diferitelor tipuri de organe ale bivalvei *M. arenaria* și sedimentelor adiacente din Marea Neagră. Lucrarea de doctorat se încheie cu un capitol ce sintetizează concluziile generale și oferă perspective pentru viitoare cercetări. În plus, sunt incluse anexele cu date suplimentare, lista de articole publicate în baza subiectului tezei și referințele bibliografice.

1. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1.1 Nevertebrate bentale

Nevertebratele bentale sunt organisme care trăiesc în sau pe sedimentele de pe fundul mărilor, râurilor, cursurilor de apă și lacurilor, distribuția lor fiind puternic influențată de mediul în care trăiesc, inclusiv de compoziția și calitatea sedimentelor, de calitatea apei și de factorii hidrologici. Nevertebratele bentale sunt considerate unele dintre cele mai importante componente ale ecosistemelor acvatice (Castella și colab., 1984), oferind servicii ecosistemice esențiale în ciclul nutrienților și fluxul de energie (Sivaramakrishnan și colab., 2014).

Insecte acvatice

Insectele acvatice reprezintă un grup numeros și complex derivat din diverși strămoși terestri ce au repopulat mediile acvatice, cuprinzând aproximativ 76 000 de specii adaptate la diverse habitate de apă dulce (Samways și Deacon, 2021). Aceste organisme constituie o componentă importantă a rețelelor trofice acvatice (și uneori terestre), jucând un rol esențial în procesele de reciclare a nutrienților (Balian și colab., 2008).

Gastropode

Gastropodele reprezintă una dintre cele mai importante grupe de organisme bentale din punct de vedere al diversității speciilor și abundenței lor (Gomes și colab., 2004; Tubić și colab., 2013). Având un rol esențial în sistemele riverane, reglează dezvoltarea comunităților de alge (Rosemond și colab., 1993) și reprezintă o sursă importantă de hrană pentru unele specii de pești (Brown și colab., 1998).

Crustacee

Speciile de crustacee joacă un rol cheie în evaluarea calității apei, în studiile de ecologie (Glazier și colab., 2014) și ecotoxicologie, fiind sensibile la anumiți contaminanți ce înregistrează concentrații semnificative pentru mediu (Roast și colab., 1998). Luând în considerare distribuția lor largă, rolul lor ecologic în lanțul trofic și sensibilitatea lor la poluanți, aceste organisme sunt frecvent utilizate ca bioindicatori (Alonso și colab., 2019; Grabowski și colab., 2014).

Melinna palmata Grube, 1870

Specia de polichet tubicol *Melinna palmata* are o distribuție Boreal-Mediteraneană (Grehan, 1991). În Marea Neagră, specia prezenta exemplare destul de rare în zona șelfului românesc până în anii '70 (Gomoiu, 1982). În prezent, în această regiune, reprezintă una dintre speciile conducătoare ale habitatului circalitoral cu *M. palmata* și/sau *Spisula subtruncata*, atingând o densitate medie de 3450 exemplare m⁻² în zona de influență a Dunării (Teacă și colab., 2020).

Mya arenaria Linnaeus, 1758

Bivalva Boreal-Atlantică *Mya arenaria* este originară din Atlanticul de Nord, din zona coastelor Americii și Canadei (Strasser, 1998). În Marea Neagră, a fost citată pentru prima dată în 1966, lângă Odessa (Beshevli și Kolyagin, 1967; Gomoiu și Porumb, 1969). La începutul anilor '80, *M. arenaria* s-a stabilit pe platforma continentală românească, până la 35 m adâncime (Skolka și Gomoiu, 2004).

1.2. Microbiomul nevertebratelor bentale

Organismele bentale sunt colonizate în mod natural de microorganisme, ce sunt implicate în biologia gazdelor lor (Kelman și colab., 2009; Ketchum și colab., 2018), jucând un rol important în imunitatea, metabolismul, fiziologia (Mcfall-Ngai și colab., 2013; Bordenstein și Theis, 2015; Theis și colab., 2016), precum și în dezvoltarea, adaptarea și evoluția acestor nevertebrate (Rosenberg și colab., 2007; Zilber-Rosenberg și Rosenberg, 2008). Nevertebratele filtratoare și detritivore pot concentra bacteriile din apă și sedimente, devenind astfel bioindicatori ai diversității microbiene în mediile acvatice (Burkhardt și colab., 1992; Graczyk și colab., 2002; Marino și colab., 2005).

Comunitățile bacteriene asociate polichetelor tubicole ar putea avea o contribuție importantă în procesele biogeochimice care au loc la interfața dintre organismele bentale și habitatul lor (Konhauser și colab., 2020). De asemenea, microbiomul bivalvelor joacă un rol esențial în sănătatea gazdei, componenta bacteriană fiind cunoscută ca fiind implicată într-o serie de funcții, inclusiv digestia, ciclul nutrienților și apărarea imunitară (Pierce și Ward, 2018; Timmins-Schiffman și colab., 2021).

1.3. Biodiversitatea comunităților bentale în sistemul Dunăre - Delta Dunării - Marea Neagră

În sectorul inferior al Dunării, compoziția macrozoobentosului este determinată în principal de tipul de habitat. Per ansamblu, habitatele organice furnizează cel mai mare număr de specii indicatoare, diversitatea cea mai mare fiind întâlnită în zonele cu resturi vegetale, cu comunități în mare parte formate din specii de diptere, gastropode, oligochete, bivalve, amfipode (ICPDR, 2015). La litoralul românesc al Mării Negre, habitatele care cuprind și zonele investigate în cadrul acestei lucrări de doctorat sunt reprezentate de: 1. mâlurile terigene circalitorale cu *M. palmata* și 2. mâluri nisipoase circalitorale cu fauna variată și recifi de *Mytilus galloprovincialis*.

1.4. Tehnici de evaluare a biodiversității acvatice

Tehnicile taxonomice tradiționale

Taxonomia clasică sau tradițională, cunoscută și sub numele de sistemul Linnean implică utilizarea caracteristicilor morfo-anatomice ale organismelor în clasificarea și identificarea organismelor (Uno și colab., 2001).

Codul de bare ADN

Codul de bare ADN reprezintă un instrument important în evaluarea biodiversității (Hebert și colab., 2003). Pentru regnul animal, eforturile s-au concentrat în principal pe regiunea „Folmer”, de ~ 650 perechi de baze a subunității I a citocromului c oxidază (CO1) (Folmer și colab., 1994). Aceasta tehnică oferă o soluție eficientă pentru abordarea dificultăților asociate cu identificarea taxonomică tradițională, asigurând în același timp o identificare rapidă, precisă și fiabilă a speciilor (Baird și colab., 2012).

Secvențierea de nouă generație NGS (ADN-Metabarcoding)

În cazul acestei metode, o regiune specifică de ADN din toate genomurile prezente în proba de mediu este amplificată și secvențializată pentru a obține un profil al comunității (Kelly, 2016). Această tehnică (ADN- metabarcoding) constă în amplificarea ADN-ul prin PCR cu ajutorul unor amorse care vizează caracteristici genetice mai mult sau mai puțin specifice, iar după secvențializarea ulterioară a produșilor PCR, secvențele sunt prelucrate bioinformatic, ceea ce duce la atribuirea taxonomică a secvențelor în raport cu o bază de date de referință (Pilloni și colab., 2012).

CONTRIBUȚII PERSONALE

2. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI

Având în vedere stadiul cunoașterii macrozoobentosului din sistemul Dunăre – Delta Dunării – Marea Neagră și a microbiomului acestor specii, cercetările ce au stat la baza acestei lucrări de doctorat au urmărit evaluarea distribuției și ecologiei unor nevertebrate bentale în cursul inferior al Dunării, prin integrarea tehnicii de biologie moleculară codul de bare ADN, furnizând astfel informații noi despre biodiversitatea și ecologia speciilor de nevertebrate din fluviul Dunărea. De asemenea, cercetările s-au concentrat și pe caracterizarea diversității structurale și funcționale a comunităților bacteriene ce colonizează două nevertebrate bentale (polichetul tubicol *Melinna palmata* și bivalva *Mya arenaria*) și sedimentele înconjurătoare din zona șelfului românesc al Mării Negre, bazată pe secvențierea Illumina a genei ARNr 16S. Astfel, studiul a adus contribuții semnificative prin investigarea în premieră a microbiomului speciei *M. palmata*, și prin analizarea pentru prima dată a variației compoziționale a microbiomului bivalvei *M. arenaria* la nivel de organ.

Obiectivele principale care au stat la baza elaborării tezei de doctorat:

- identificarea unor larve de insecte prin tehnica codului de bare ADN bazată pe secvențializarea genei mitocondriale CO1, precum și evaluarea distribuției lor în sectorul românesc al Dunării, în raport cu tipul de substrat, oxigenul dizolvat și adâncimea apei;
- identificarea moleculară bazată pe secvențierea genei CO1 și evaluarea distribuției spațiale a unor specii de crustacee amfipode și mizide Ponto-Caspice, precum și a unor gastropode în sectorul inferior al Dunării (inclusiv Delta Dunării), în raport cu tipul de substrat și adâncimea apei;
- caracterizarea microbiomului ce colonizează două specii de nevertebrate marine (polichetul *M. palmata* și bivalva *M. arenaria*) și sedimentele adiacente de la litoralul românesc al Mării Negre.

3. MATERIALE ȘI METODE

3.1. Descrierea zonelor de studiu

Habitatele investigate aparțin unor zone fluviale și marine localizate în regiunea cursului inferior al Dunării, în Delta Dunării și în zona costieră românească a Mării Negre.

3.2. Colectarea probelor de bentos

În cazul larvelor de insecte, speciilor de gastropode și crustacee din cursul inferior al Dunării și Delta Dunării, probele de bentos au fost colectate cu ajutorul a două bodengreifere de tip Van Veen. În plus, pentru colectarea organismelor fitofile, vegetația a fost spălată cu ajutorul unui fileu limnologic.

Pentru investigarea specimenelor de *Melinna palmata*, probele de sedimente marine au fost colectate cu ajutorul unui Box Correr, iar pentru specia *Mya arenaria*, probele de sedimente au fost colectate cu ajutorul unui bodengreifer de tip Van Veen.

3.3. Determinarea parametrilor fizico-chimici ai probelor de apă colectate

Pentru probele colectate din cursul inferior al Dunării și brațul Sulina, conținutul de oxigen dizolvat a fost măsurat cu ajutorul unui oximetru Oxi 320 (WTW Germania). Pentru cele colectate din Marea Neagră, determinarea temperaturii, salinității, oxigenului dizolvat și pH-ului apei a fost efectuată cu o sondă multiparametru EXO2 (YSI Incorporated, Yellow Springs, SUA).

3.4. Prelucrarea probelor de macrozoobentos și sedimente colectate

Indivizii selectați pentru analize genetice au fost spălați cu apă ultrapură, introduși în 200 μl soluție tampon Tris-EDTA pH 8 și stocați la -20°C (Ross și colab., 1990). Pentru identificarea morfologică, speciile au fost conservate într-o soluție de formaldehidă 4% și stocate în containere din plastic de 250 mL.

3.5. Analiza cantitativă și taxonomică a comunităților bentale dulcicole

Pentru probele colectate cu dispozitivele Van Veen, numărul de indivizi colectați pe unitatea de suprafață (1 m²) a fost calculat pe baza numărului total de indivizi din fiecare probă. Pentru cele colectate cu fileul limnologic, abundența a fost exprimată ca număr total de indivizi colectați. Identificarea taxonomică bazată pe criterii morfologice a fost realizată în conformitate cu cheile de identificare prevăzute pentru fiecare grup de organism.

3.6. Identificarea moleculară a organismelor benthice

AND-ul total a fost extras cu ajutorul kitului DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germania). Identificarea moleculară a speciilor de nevertebrate s-a efectuat prin metoda Codului de bare ADN (DNA barcoding) bazată pe amplificarea PCR a genei mitocondriale citocrom oxidaza 1 (CO1) (Hebert și colab., 2003). Secvențele genei CO1 ale indivizilor (larve de insecte, gastropode și crustacee) identificați prin Codul de bare ADN au fost depuse în bazele de date internaționale GenBank.

3.7. Analiza filogenetică și calcularea distanțelor genetice intra- și interspecifice

Analiza filogenetică bazată pe secvențele CO1, atât pentru speciile de gasteropode, cât și pentru cele de crustacee, a fost efectuată prin metoda statistică de maximă probabilitate. Distanțele genetice intraspecifice și interspecifice au fost calculate cu ajutorul modelului Kimura 2 parameter (K2P).

3.8. Evaluarea diversității comunităților bacteriene asociate speciilor de nevertebrate și sedimentelor adiacente

Investigarea diversității bacteriene asociată speciilor de nevertebrate acvatice *M. palmata* și *M. arenaria* și a sedimentelor adiacente din habitatele specifice acestora s-a realizat prin secvențializarea Illumina a genei ARNr 16S a comunităților bacteriene. Pentru organisme, AND-ul total a fost extras cu ajutorul kitului DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germania). Pentru probele de sedimente, ADN-ul a fost izolat cu ajutorul kitului DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen, Hilden, Germania). Secvențializarea regiunilor V3-V4 amplificate ale genei ARNr 16S a fost efectuată cu ajutorul unei platforme Illumina MiSeq 300PE (Macrogen, Seul, Coreea de Sud). Secvențele obținute au fost analizate utilizând metode bioinformatică și statistice.

3.9. Diversitatea funcțională a comunităților bacteriene

Diversitatea funcțională a comunităților bacteriene identificate prin secvențializare a genei 16S ARNr a fost estimată utilizând programul de conversie Tax4Fun (Aßhauer și colab., 2015).

4. REZULTATE: IDENTIFICAREA ȘI DISTRIBUȚIA LARVELOR DE INSECTE ACVATICE DIN CURSUL INFERIOR AL DUNĂRII

4.1. Colectarea probelor de macrozoobentos și caracteristicile habitatului acestora

Probele de larve de insecte au fost prelevate la sfârșitul primăverii (mai) 2019 și 2020 din 36 de locații de-a lungul cursului inferior al fluviului Dunărea, în secțiunea cuprinsă între km 2 și km 811, incluzând brațul Sulina.

4.2. Diversitatea taxonomică și distribuția larvelor de insecte

Identificarea genetică a larvelor de insecte izolate din toate locațiile de-a lungul cursului inferior al Dunării pe baza procentului de identitate a secvenței ampliconului citocrom oxidaza (CO1) a pus în evidență prezența larvelor de insecte ale speciilor *Erythromma viridulum*, *Gomphus flavipes*, *Triaenodes bicolor*, *Hydropsyche bulgaromanorum*, *Heptagenia flava*, *Acentria ephemerella* și *Sialis morio* aparținând ordinilor Odonata, Trichoptera, Ephemeroptera, Lepidoptera și respectiv Megaloptera.

Secvențele CO1 corespunzătoare fiecărui individ identificat prin codul de bare ADN au fost introduse în GenBank cu numerele de acces [MW139674] pentru *E. viridulum*, [MW139673] pentru *G. flavipes*, [MW139670] pentru *T. bicolor*, [MW139677] pentru *H. bulgaromanorum*, [MW139671] pentru *H. flava*, [MW139675] pentru *A. ephemerella* și [MW139669] pentru *S. morio*.

Prezența și densitățile înregistrate ale celor șapte specii de insecte au variat în funcție de tipul de sediment din care au fost colectate. Datele au indicat prezența tuturor speciilor analizate în sedimente nisipoase și nisip cu elemente de pietriș, cu excepția larvei *S. morio*. În schimb, zonele dominate de mâl nisipos au fost populate doar de *H. bulgaromanorum*, *T. bicolor* și *S. morio*, iar cele caracterizate de mâl cu elemente de pietriș și pietriș mîlos nisipos au fost colonizate de către o singură specie (*H. bulgaromanorum*).

Distribuția spațială a acestor specii de larve acvatice în diversele sectoare ale cursului inferior al Dunării a fost neuniformă (Figura IV.2), probabil ca urmare a influenței factorilor de mediu. Astfel, larvele de *H. bulgaromanorum* au fost identificate în toate zonele (inclusiv pe brațul Sulina) (Figura IV.2). Sectorul Bechet a fost populat de către majoritatea speciilor (cu excepția larvelor *G. flavipes* și *S. morio*), în timp ce sectorul Cetate a fost populat doar de către 2 specii, reprezentate de *E. viridulum* și *H. bulgaromanorum* (Figura IV.2).

În cazul celor 7 specii de insecte acvatice investigate, densitatea estimată a comunităților de larve colectate din toate situri fluviale a fost caracterizată de o largă variabilitate dependentă de locație și anul colectării, precum și de prezența plantelor macrofitelor în habitatul acestora.

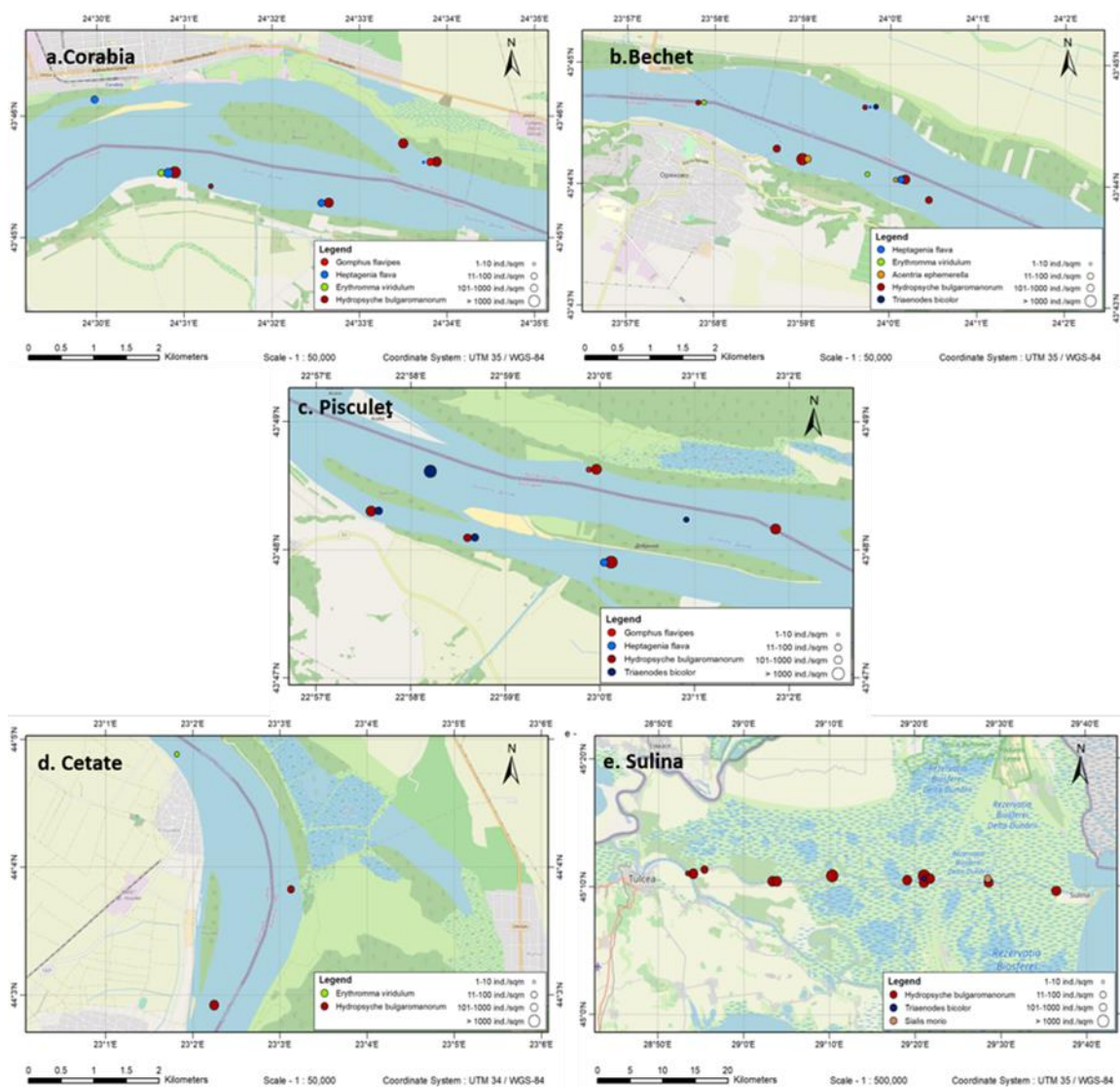


Figura IV.2. Distribuția larvelor de insecte în sectoarele Corabia, Bechet, Pisculeț, Cetate și brațul Sulina (Menabiti și colab., 2022)

Ansamblul variabilelor luate în considerare pentru elucidarea factorilor care influențează prezența și distribuția speciilor de larve aparținând celor 7 specii de insecte acvatice investigate (Figura IV.3) indică o dominare a speciilor *H. bulgaromanorum* și *H. flava* în sectoare extinse dar nesuprapuse ale cursului inferior al Dunării.

5. REZULTATE: IDENTIFICAREA ȘI DISTRIBUȚIA SPECIILOR DE GASTROPODE ȘI CRUSTACEE DIN CURSUL INFERIOR AL DUNĂRII

5.1. Colectarea probelor de macrozoobentos și caracteristicile habitatului acestora

Pentru investigarea speciilor de macrozoobentos, probele de nevertebrate au fost colectate din 8 stații situate de-a lungul cursului inferior al Dunării, acoperind o perioadă de 3 ani de observații consecutive (2019 – 2021), în cadrul a 3 campanii pe teren desfășurate în lunile mai și iunie.

5.2. Diversitatea taxonomică și analiza filogenetică a speciilor de gastropode și crustacee din cursul inferior al Dunării

Toate speciile de gastropode și crustacee colectate din cele 8 stații de probare au fost identificate prin tehnica codul de bare ADN, dintre care 16 gasteropode și 12 crustacee.

Secvențele CO1 corespunzătoare fiecărui individ au fost introduse în baza de date GenBank, cu numerele de acces [ON000192] și [ON000184] pentru *Holandriana holandrii*, [MW139680] pentru *Microcolpia daudebartii acicularis*, [ON000180], [ON000191] și [ON000197] pentru *Viviparus viviparus*, [MW139681] și [MW139682] pentru *Bithynia tentaculata*, [MW139678] pentru *Theodoxus transversalis*, [MW600073], [ON000193] și [ON036036] pentru *Ampullaceana lagotis*, [MW600069] pentru *Physa fontinalis*, [MW600083] pentru *Planorbarius corneus*, [ON000188] și [ON000194] pentru *Gyraulus parvus*, [MW139683] și [ON000195] pentru *Chelicorophium robustum*, [MW600074], [MW600089], [ON000187] și [ON000189] pentru *Dikerogammarus haemobaphes*, [MW600090] pentru *D. villosus*, [MW600070], [MW600071], [MW600072] și [ON000186] pentru *Limnomysis benedeni* și [MW600085] pentru *Paramysis (Serrapalpis) lacustris*.

Cele 9 specii de gastropode identificate în acest studiu aparțin ordinilor Caenogastropoda, Architaenioglossa, Littorinimorpha, Cycloneritida și Hygrophila și celor 8 familii Amphimelaniidae, Melanopsidae, Viviparidae, Bithyniidae, Neritidae, Lymnaidae, Physidae și Planorbidae, iar cele 5 specii de crustacee din ordinele Amphipoda și Mysida sunt încadrate în trei familii (Corophiidae, Gammaridae și Misidae)

Analiza filogenetică a speciilor de gastropode și de crustacee identificate a evidențiat apartenența indivizilor colectați unor grupuri monofiletice de nevertebrate, confirmând acuratețea tehnicii codului de bare ADN în identificarea taxonomică.

Astfel, pentru speciile de gasteropode, arborele filogenetic a fost construit pe baza secvențelor CO1 ce aparțin la 28 de indivizi (Figura V.2). Dintre acestea, 16 au fost obținute în studiul curent, iar 10 secvențe suplimentare au fost preluate din baza de date NCBI GenBank (Figura V.2). Toate speciile identificate ca fiind din aceeași specie au aparținut unor grupuri monofiletice pe arborele filogenetic (Figura V.2). Fiecare grup a corespuns unei singure ramificații și a prezentat valori "bootstrap" ridicate (Figura V.2).

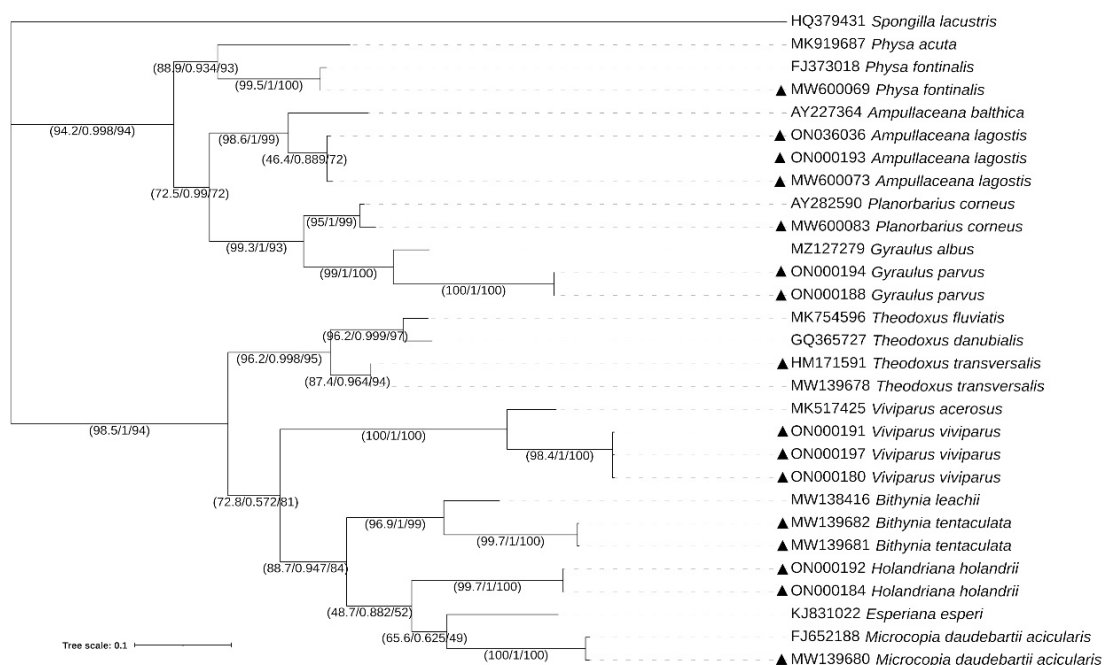


Figura V.2. Arbore filogenetic al speciilor de gastropode obținut pe baza secvențelor genei CO1. ▲: secvențe din studiul curent; CO1 a speciei *Spongilla lacustris* (HQ379431) a fost folosită ca "outgroup"; valorile din paranteze reprezintă SH-aLRT support (%)/aBayes support/ultrafast bootstrap support (%) (Menabit și colab., 2022)

Pentru speciile de crustacee, arborele filogenetic creat pe baza secvențelor ce aparțin la 16 indivizi, dintre care 12 din studiul de față și 4 secvențe aparținând speciilor omoloage preluate din baza de date GenBank (Figura V.3). Ca și în cazul gastropodelor, reconstrucția filogenetică a evidențiat apartenența tuturor indivizilor aceleiași specii analizate unor grupuri distincte, cu valori "bootstrap" ridicate (Figura V.3).

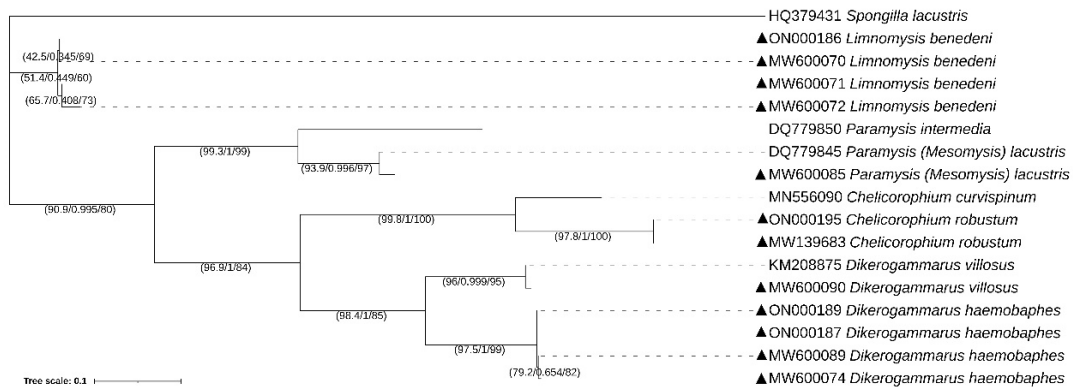


Figura V.3. Arbore filogenetic al speciilor de crustacee obținut pe baza secvențelor genei CO1. ▲: secvențe din studiul curent; CO1 a speciei *Spongilla lacustris* (HQ379431) a fost folosită ca “outgroup”; valorile din paranteze reprezintă SH-aLRT support (%) / aBayes support / ultrafast bootstrap support (%) (Menabit și colab., 2022)

5.3. Distribuția spațială și ecologia speciilor de gastropode și crustacee în cursul inferior al Dunării

În cadrul acestui studiu, speciile de gastropode au fost identificate în 4 din cele 7 stații de probare localizate de-a lungul celor 3 brațe principale ale Dunării, precum și în stația localizată în sectorul Bechet. În schimb, speciile de crustacee au fost observate în toate cele 7 stații de pe brațele Dunării pe parcursul celor 3 ani de studiu.

Speciile de gastropode *M. daudebartii acicularis*, *V. viviparus*, *B. tentaculata*, *P. fontinalis* și *P. corneus* au fost prezente doar pe brațele Chilia și Sulina ale Dunării (Figura V.4). În schimb, zona Bechet a fost colonizată de speciile de gastropode fitofile *H. holandrii*, *T. transversalis* și *G. parvus*.

Speciile de crustacee (amfipodele și mizidele) au fost observate în stațiile situate pe toate cele trei brațe ale Dunării, Chilia, Sulina și Sf. Gheorghe, având o distribuție variabilă. În timp ce *D. haemobaphes* a populat cele trei brațe ale Dunării, *D. villosus* a fost identificată doar pe brațele Sulina și St. Gheorghe iar *C. robustum* doar pe Chilia și Sulina. Cele două specii de mizide identificate (*L. benedeni* și *P. lacustris*) au fost prezente doar pe brațul Sulina.

6. REZULTATE: EVALUAREA COMUNITĂȚILOR BACTERIENE ASOCIATE SPECIEI DE POLICHET MARIN *MELINNA PALMATA* GRUBE, 1870 ȘI SEDIMENTELOR ADIACENTE DIN MAREA NEAGRĂ

6.1. Colectarea probelor de macrozoobentos și caracteristicile habitatului zonei investigate

Probele de sedimente au fost colectate din 4 stații localizate în partea de nord-vest a șelfului românesc al Mării Negre, campania de prelevare a probelor având loc în luna iunie 2020.

Substratul acestui polichet marin din toate cele 4 stații de probare a constat în sedimente măloase alcătuite din particule de silt și argilă. Măsurătorile *in situ* ale parametrilor fizico-chimici ai apei în cele 4 locații de probare nu au prezentat variații semnificative.

6.2. Diversitatea bacteriană în țesuturile de *M. palmata* și sedimentele asociate

Pentru evidențierea diversității microbiomului din *Melinna palmata* și a variabilității sale în funcție de distribuția spațială a polichetului în Marea Neagră, au fost obținute și analizate 16 probe de ADN microbial extras din țesutul a 8 specimene și 8 sedimente adiacente din cele 4 locații.

Diversitatea și structura comunităților bacteriene asociate cu acest polichet și cu sedimentele reprezentând substratul fiecărui individ investigat au fost determinate în cazul probelor obținute în duplicat prin secvențierea Illumina a genei ARNr 16S.

Numărul total de secvențe ADN rezultate (134975) a corespuns unui număr de 1444 de variante unice de secvențe de ampliconi bacterieni (ASV-uri).

Diversitatea alfa calculată pe baza indicelui Chao1 a evidențiat diferențe semnificative între cele două grupuri analizate (țesuturi și sedimente), cu valori mai ridicate în cazul probelor de sediment (Figura VI.3). În acord cu acest rezultat, indicele de diversitate Fisher a evidențiat aceeași tendință. În ce privește variațiile indicilor de diversitate Chao1 și Shannon de-a lungul gradientului de adâncime, nu s-au remarcat variații semnificative între cele două matrici analizate. Mici variații ale celor 3 indici de diversitate calculați au fost observate atât între diferitele tipuri de probe, cât și între duplicate.

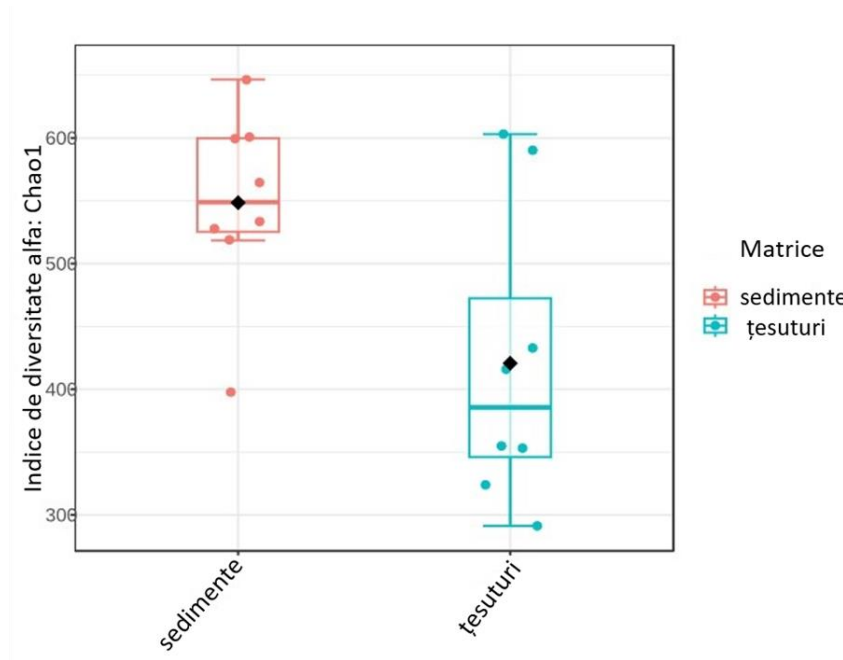


Figura VI.3. Diversitatea alfa (indice Chao1) a comunităților bacteriene pentru probele de *M. palmata* și sedimente (modificată după Menabit și colab., 2024)

Analiza diversității beta a comunităților bacteriene din probele analizate a evidențiat diferențe semnificative în ceea ce privește diversitatea și abundența relativă între țesuturi și sedimente), formând comunități preponderent distincte, și cu diferențe mai pronunțate între microbiomul probelor de țesut.

6.3. Structura comunităților bacteriene asociate țesuturilor *M. palmata* și sedimentelor adiacente

Rezultatele analizelor bioinformatică privind identificarea taxonomică a comunităților microbiene care colonizează polichetul marin *M. palmata* pe baza secvențelor Illumina 16S ARNr au pus în evidență prezența a 12 filumuri, 14 clase, 26 ordine, 26 familii și 30 genuri bacteriene (Anexa 1), în timp ce comunitățile asociate sedimentelor au fost clasificate în 12 filumuri, 19 clase, 34 ordine, 29 familii și 36 genuri (Anexa 1).

Compoziția microbiomului asociat *M. palmata* a fost dominată de filumurile Proteobacteria, Actinobacteriota, Cyanobacteria și Chloroflexi (Figura VI.6A). În schimb, bacteriile ce colonizează sedimentele au fost în special reprezentate de filumurile Actinobacteriota, Chloroflexi, Proteobacteria și Campylobacterota (Figura VI.6A).

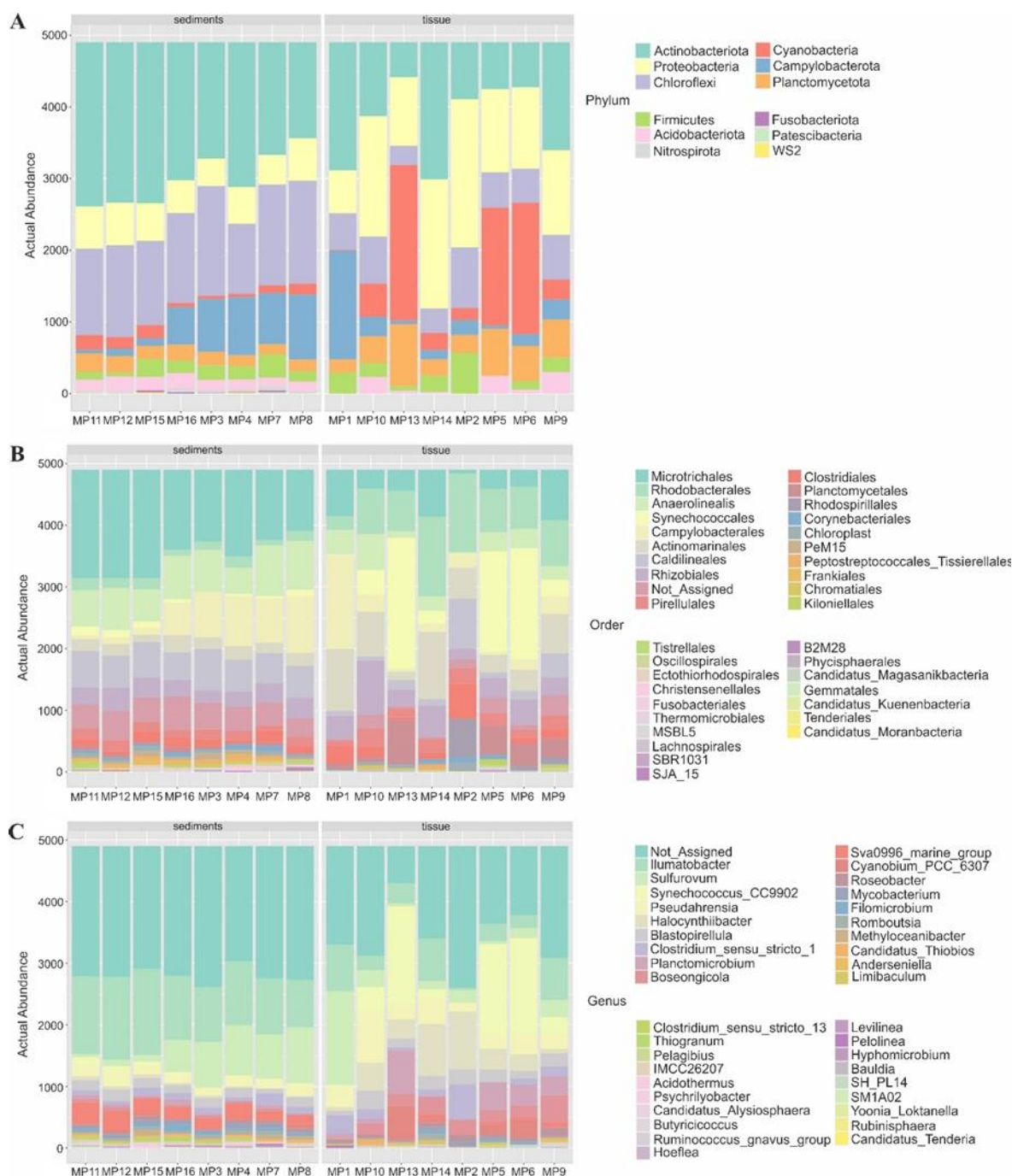


Figura VI.6. Abundența comunităților bacteriene ce colonizează țesuturile și sedimentele la nivel de filum (A), ordin (B) și gen (C) exprimată în ASV (modificată după Menabit și colab., 2024)

6.4. Profilul funcțional al comunităților bacteriene care colonizează *M. palmata* și sedimentele asociate

Profilului funcțional estimat al acestor comunități bacteriene a indicat o prezență ridicată a genelor implicate în metabolismul amino acizilor și carbohidraților, urmată de cele

aferente metabolismului energetic, cofactorilor, vitaminelor, și lipidelor ($p < 0.05$) (Figura VI.11A). De asemenea, un număr ridicat de gene responsabile de degradarea substanțelor xenobiotice, metabolizarea nucleotidelor, terpenoidelor, polichetidelor și pentru biosinteza glicanilor și a altor metaboliți secundari au fost identificate în toate probele analizate (Figura VI.11A).

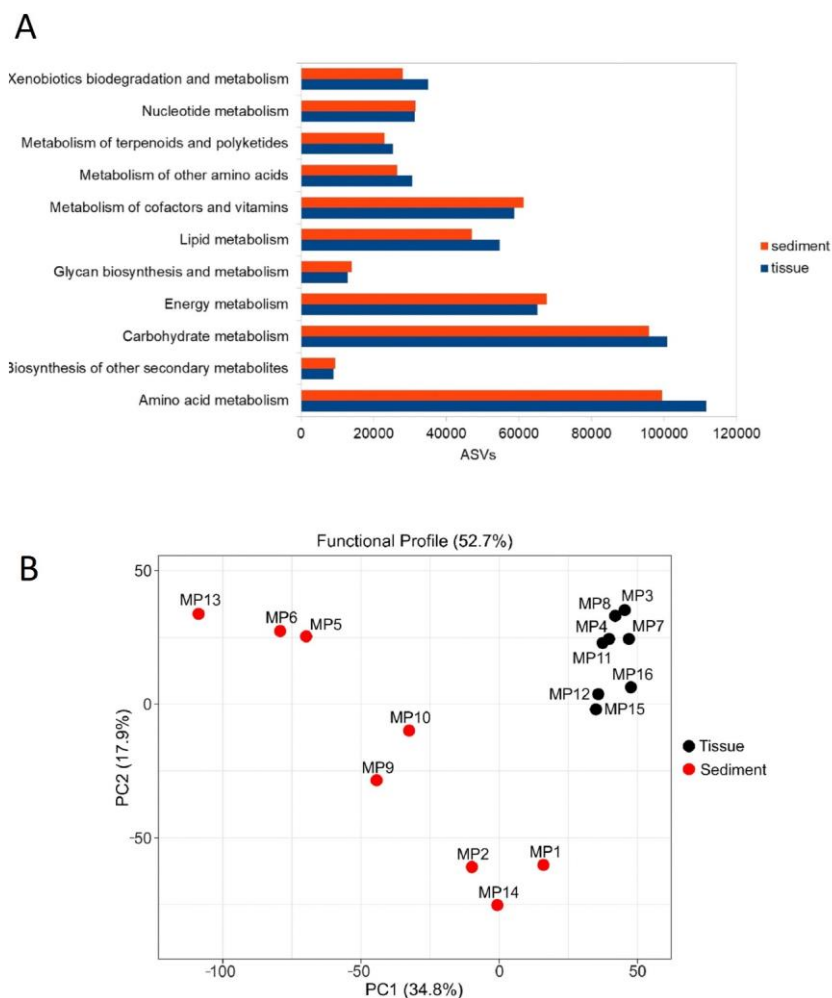


Figura VI.11. Profilul funcțional al comunităților bacteriene din țesuturi și sedimente estimat pe baza abundențelor genelor din căile metabolice KEGG. (A) Numărul de gene funcționale estimate pe baza ASV-urilor din matricile analizate; (B) diversitatea genelor funcționale în matricile analizate pe baza analizei PCA (Menabit și colab., 2024)

Cu toate acestea, analiza componentelor principale (PCA) a genelor funcționale determinate a pus în evidență segregarea clară a profilului metabolic al microbiolului din cele două matrici analizate (Figura VI.11B).

7. REZULTATE: EVALUAREA COMUNITĂȚILOR BACTERIENE ASOCIATE DIFERITELOR TIPURI DE ORGANE ALE BIVALVEI *MYA ARENARIA* LINNAEUS, 1758 ȘI SEDIMENTELOR ADIACENTE DIN MAREA NEAGRĂ

7.1. Colectarea probelor de macrozoobentos și caracteristicile habitatului zonei investigate

Probele de sedimente marine au fost colectate din 2 stații localizate în partea de nord-vest a Mării Negre în luna iulie 2020.

Materialul sedimentar al celor două situri investigate a fost reprezentat de mâluri provenite din depozite aluviale compuse din particule de silt și argilă. Măsurătorile *in situ* ale parametrilor fizico-chimici ai apei în cele 2 locații de probare nu au prezentat variații semnificative.

7.2. Comunitatea bacteriană în organele bivalvei *M. arenaria* și sedimentele asociate

Pentru evaluarea diversității microbiene asociate diferitelor organe ale bivalvei marine *Mya arenaria* și sedimentelor adiacente, au fost obținute și analizate 14 probe de ADN total extras din sifonul (4), branhiile (4) și stomacul (2) acestui nevertebrat și din sedimente (4) colectate din cele 2 stații de probare din Marea Neagră.

Diversitatea și structura comunității microbiomului asociate cu cele trei organe analizate ale bivalvei *M. arenaria* (sifon, branhiile, stomacul) și sedimentele adiacente au fost evaluate prin secvențierea Illumina a genei ARNr 16S. Numărul total de secvențe de ADN rezultate (1.340.099) a corespuns unui număr de 11.223 de variante unice de secvențe de ampliconi bacterieni (ASV-uri).

Diversitatea alfa calculată pe baza indicelui Chao1 a evidențiat diferențe semnificative între comunitățile bacteriene care colonizează organele analizate ale bivalvei și sedimente (Figura VII.4A). Indicii de diversitate Shannon, Fisher și ACE au prezentat o tendință similară, confirmând o diversitate mai redusă pentru bacteriile care colonizează organele în comparație cu cea a sedimentelor adiacente. Au fost observate diferențe atât între probe, cât și între replicate, cu variații mai mari ale diversității între comunitățile asociate diferitelor organe ale nevertebratului. În schimb, nu au fost observate diferențe semnificative între aceste comunități bacteriene în funcție de adâncimea apei (Figura VII.4B). Analiza diversității beta a comunităților bacteriene în raport cu tipul de probă analizat a indicat

diferențe semnificative în ceea ce privește diversitatea microbiană dintre diferitele tipuri de organe și sedimente, cu diferențe mai mari între microbiomul din branhii și stomac și cele din sifon.

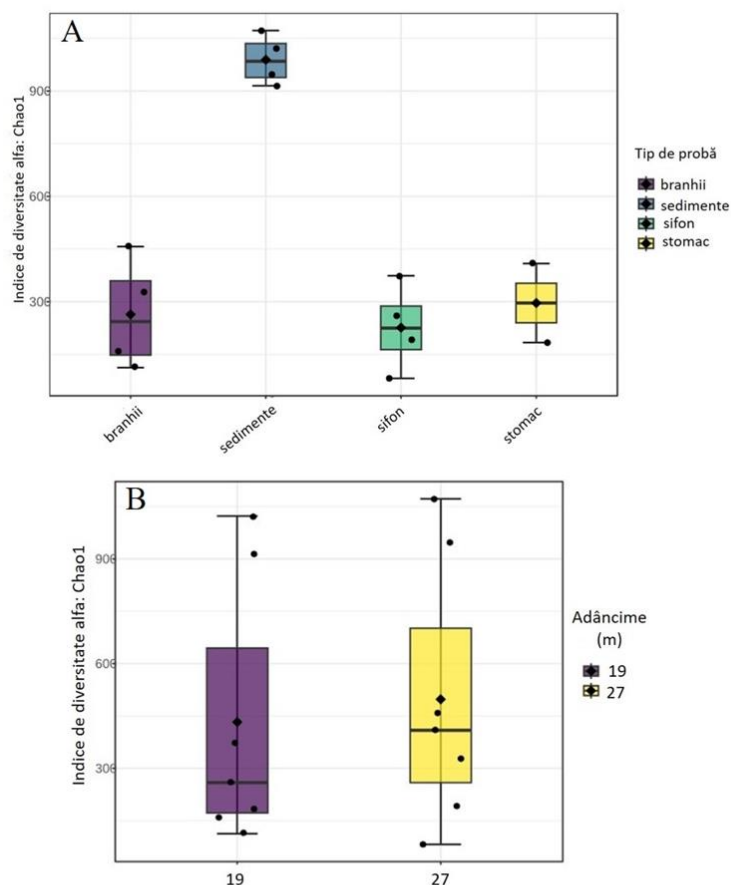


Figura VII.4. Diversitatea alfa a comunităților bacteriene calculată pe baza indicelui Chao1 în funcție de (A). tipul de probă; (B). adâncime

7.3. Structura comunităților bacteriene asociate organelor (sifon, branhii și stomac) *M. arenaria* și sedimentelor adiacente

Identificarea taxonomică a comunităților bacteriene din țesuturile de *M. arenaria* a evidențiat o structură variabilă a acestora. Astfel, taxonii bacterieni din comunitățile asociate sifonului au cuprins 16 filumuri, 23 clase, 34 ordine, 41 familii și 43 genuri pentru. Microbiomul ce colonizează branhiile a fost clasificat în 15 filumuri, 21 clase, 33 ordine, 39 familii și 35 genuri, iar bacteriile asociate stomacului au aparținut la 14 filumuri, 22 clase, 30 ordine, 29 familii și 31 genuri. În cazul microbiomului sedimentelor adiacente acestei

bivalve marine, acesta a cuprins 20 filumuri, 38 clase, 50 ordine, 48 familii și 54 genuri bacteriene.

Distribuția la nivel de filum în probele analizate a evidențiat un profil variabil atât între tipurile de organe, cât și între nevertebrat și sedimentele adiacente (Figura VII.6). Astfel, comunitățile bacteriene prezente în sifonul *M. arenaria* au fost dominate de filumurile Spirochaetota, Verrucomicrobiota, Proteobacteria și Bacteroidota. Bacteriile ce colonizează branhiile au fost în principal reprezentate de Verrucomicrobiota, urmate de Spirochaetota, Firmicutes și Proteobacteria, cu abundențe relative similare (Figura VII.6). Microbiomul stomacului a fost dominat de bacterii aparținând filumului Firmicutes, urmate de Spirochaetota, Verrucomicrobiota și Planctomycetota, cu abundențe comparabile, În schimb, comunitățile din sedimente au fost reprezentate în principal de Proteobacteria, urmat de Desulfbacterota, Bacteroidota și Chloroflexi (Figura VII.6).

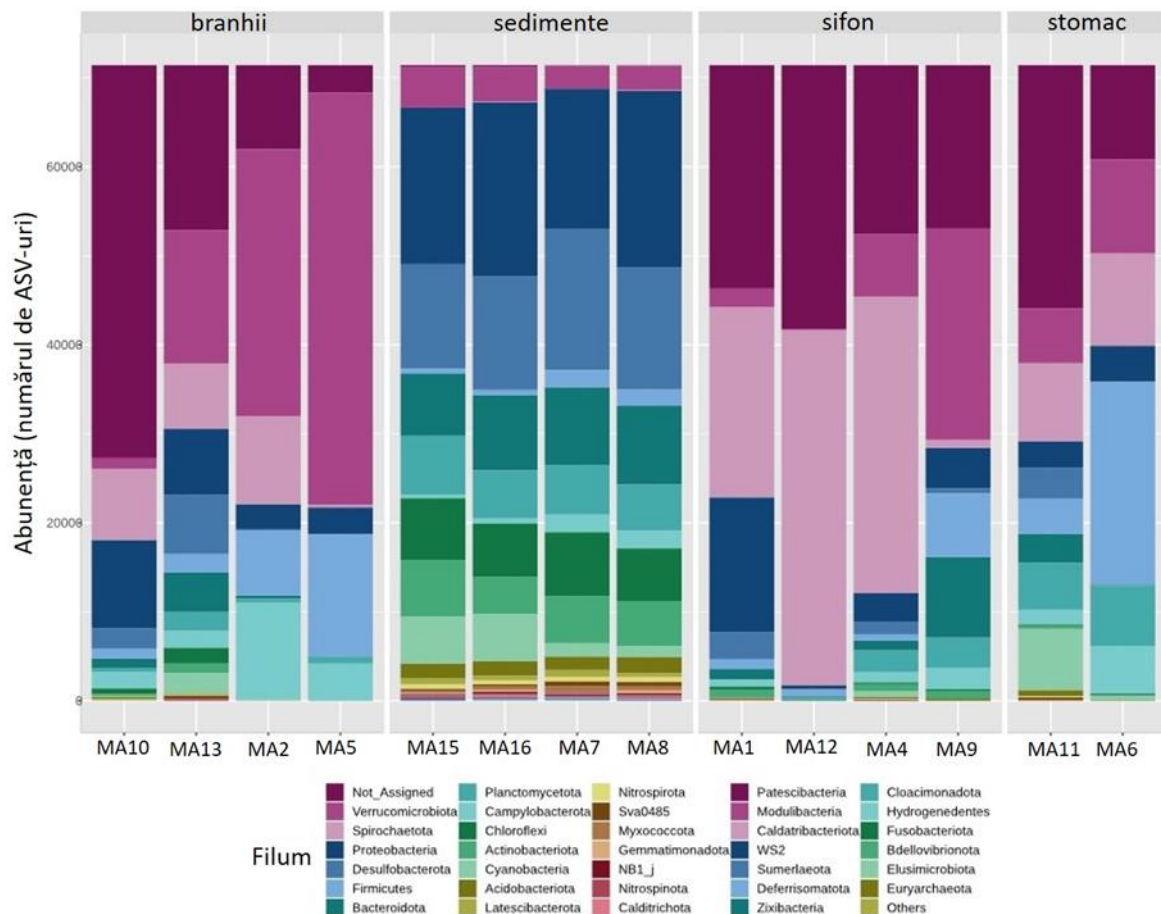


Figura VII.6. Distribuția taxonomică la nivel de filum a comunităților bacteriene asociate organelor *M. arenaria* (branhii, sifon și stomac) și sedimentelor adiacente

7.4. Diversitatea funcțională a comunităților bacteriene care colonizează organele *M. arenaria* și sedimentele asociate

Rezultatele secvențierii genei ARNr 16S au fost utilizate, de asemenea, pentru a estima diferențele căi metabolice în care sunt implicate bacteriile ce colonizează *M. arenaria* și sedimentele adiacente, pe baza similarităților de secvențe cu organismele ale căror genom complet a fost secvențializat și anotat, folosind aplicația Tax4Fun.

Profilul funcțional estimat a arătat o distribuție relativ similară a abundențelor diferitelor gene din diferitele căi metabolice KEGG, cu prevalența celor implicate în metabolismul carbohidraților, amino acizilor și energiei pentru toate probele analizate (Figura VII.12). Deși testul t-Student a evidențiat un conținut semnificativ mai mare doar a genelor implicate în metabolismul nucleotidelor, s-a putut observa o ușoară creștere a numărului de gene aparținând metabolismului lipidelor, energiei, carbohidraților și biodegradarea substanțelor xenobiotice în probele de țesut (Figura VII.12).

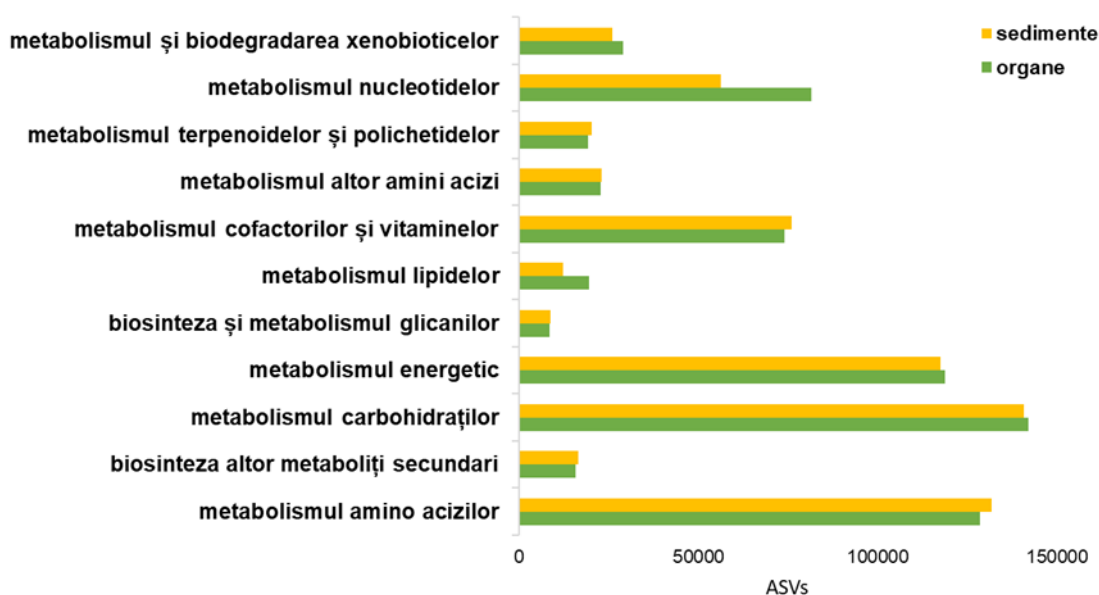


Figura VII.12. Profilul funcțional al comunităților bacteriene din organe și sedimente estimat pe baza abundențelor genelor din căile metabolice KEGG. Numărul de gene funcționale este estimat pe baza ASV-urilor din matricile analizate

8. CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE

Cele patru studii de caz prezentate în cazul lucrării de doctorat oferă o perspectivă detaliată asupra distribuției și ecologiei unor nevertebrate (larve de insecte, gastropode și crustacee) care populează sectorul inferior al Dunării. De asemenea, acestea examinează diversitatea și structura comunităților bacteriene care colonizează două specii de nevertebrate marine (polichetul tubicol *Melinna palmata* și bivalva *Mya arenaria*), precum și sedimentele adiacente de la litoralul românesc al Mării Negre. Aceste cercetări demonstrează totodată utilizarea tehnicilor de biologie moleculară codul de bare ADN și secvențierea Illumina a genei ARNr 16S pentru a aduce informații noi asupra distribuției și diversității genetice a organismelor acvatice studiate și a microbiomurilor asociate acestora și sedimentelor adiacente.

Primul studiu de caz a avut ca scop identificarea a șapte specii de larve de insecte aparținând ordinelor Odonata, Trichoptera, Ephemeroptera, Lepidoptera și Megaloptera, folosind metoda codului de bare ADN bazată pe secvențierea genei mitocondriale care codifică citocrom oxidaza 1 (CO1), precum și evaluarea distribuției lor în sectorul românesc al Dunării, în raport cu tipul de substrat, oxigenul dizolvat și adâncimea apei.

Rezultatele au evidențiat diferențe semnificative în distribuția și densitatea acestor specii în diferitele sectoare analizate ale Dunării. Majoritatea speciilor (*Erythromma viridulum*, *Gomphus flavipes*, *Triaenodes bicolor*, *Hydropsyche bulgaromanorum*, *Heptagenia flava*, *Acentria ephemerella*) au fost identificate în sectoarele Corabia, Bechet, Pisculeț și Cetate, cu excepția *Sialis morio*, prezentă doar pe brațul Sulina.

Aceste date oferă informații noi asupra distribuției unor insecte acvatice, sugerând impactul unor factori de mediu, precum tipul de substrat și adâncimea apei asupra prezenței larvelor acestor specii de insecte în sectorul românesc al Dunării.

Cel de-al doilea studiu de caz a vizat identificarea moleculară și evaluarea distribuției spațiale a unor specii de crustacee amfipode (*Chelicorophium robustum*, *Dikerogammarus villosus* și *D. haemobaphes*) și mizide (*Limnomysis benedeni*, *Paramysis lacustris*) Ponto-Caspice, precum și a unor gastropode (*Viviparus viviparus*, *Bithynia tentaculata*, *Microcolpia daudebartii acicularis*, *Ampulaceana lagotis*, *Planorbarius corneus*, *Holandriana holandrii*, *Theodoxus transversalis* și *Gyraulus parvus*) în sectorul inferior al Dunării, în raport cu tipul de substrat și adâncimea apei.

Astfel, 16 indivizi de gastropode și 12 de crustacee au fost identificați la nivel de specie prin intermediul secvențierii genei CO1, acest studiu oferind prima identificare moleculară a unor specii de gastropode în cursul inferior al Dunării.

Reconstrucția filogenetică a evidențiat apartenența speciilor de gastropode și crustacee la grupuri monofiletice, cu indivizi din aceeași specie grupându-se într-o singură cladă.

Majoritatea speciilor de gastropode vizate (*V. viviparus*, *B. tentaculata*, *M. daudebartii acicularis*, *A. lagotis* și *P. corneus*) au fost identificate de-a lungul brațelor Dunării, în timp ce speciile fitofile *H. holandrii*, *T. transversalis* și *G. parvus* au fost identificate în sectorul Bechet. În ceea ce privește speciile de crustacee (amfipodele și mizidele), acestea au fost observate în stațiile situate pe toate cele trei brațe ale Dunării, având o distribuție variabilă.

Cel de-al treilea studiu de caz a avut ca scop evaluarea microbiomului asociat polichetului marin *M. palmata* și sedimentelor adiacente din zona litoralului românesc al Mării Negre, utilizând secvențierea Illumina a genei ARNr 16S, reprezentând prima caracterizare a comunităților bacteriene ce colonizează această specie.

Rezultatele obținute au condus la identificarea a 134975 ASV-uri bacteriene, comunitățile bacteriene ce colonizează *M. palmata* aparținând la 12 încregături, 14 clase, 26 ordine, 26 familii și 30 genuri, iar cele asociate sedimentelor fiind clasificate în 12 încregături, 19 clase, 34 ordine, 29 familii și 36 genuri.

Din punct de vedere al diversității celor două tipuri de comunități bacteriene analizate, s-au evidențiat diferențe semnificative, cu valori mai ridicate ale indicilor de diversitate în cazul sedimentelor. În schimb, nu au fost observate diferențe semnificative ale diversității microbiene de-a lungul gradientului de adâncime.

Compoziția comunităților bacteriene a indicat o microbiotă specifică pentru *M. palmata*, distinctă de cea a habitatului său fizic, reprezentată în principal de bacteriile aparținând filumului Proteobacteria, în timp ce sedimentele au fost dominate de specii de Actinobacteriota.

Comunitățile bacteriene care colonizează ambele matrici analizate sunt implicate în diverse procese metabolice, prezentând un profil funcțional în care domină metabolismul amino acizilor și al carbohidraților.

Cel de-al patrulea studiu de caz a urmărit evaluarea comunităților bacteriene asociate diferitelor organe ale bivalvei *M. arenaria* (sifon, branhii și stomac) și sedimentelor înconjurătoare de la litoralul românesc al Mării Negre, utilizând secvențierea Illumina a genei ARNr 16S.

Acest studiu reprezintă prima caracterizare a variației microbiomului bivalvei *M. arenaria* la nivel de organ.

Rezultatele obținute au condus la identificarea a 1340099 ASV-uri bacteriene, comunitățile bacteriene asociate sifonului fiind clasificate în 16 filumuri, 23 clase, 34 ordine, 41 familii și 43 genuri, cele ce colonizează branhiile în 15 filumuri, 21 clase, 33 ordine, 39 familii și 35 genuri, iar bacteriile asociate stomacului aparținând la 14 filumuri, 22 clase, 30 ordine, 29 familii și 31 genuri. În cazul microbiomului sedimentelor adiacente, acesta a cuprins 20 filumuri, 38 clase, 50 ordine, 48 familii și 54 genuri bacteriene.

La nivelul diversității microbiene a matricilor investigate, s-au observat diferențe semnificative între comunitățile bacteriene asociate sedimentelor și celor 3 organe investigate ale *M. arenaria*, cu valori mai ridicate ai indicilor de diversitate în cazul microbiomului sedimentelor. În schimb, nu au fost observate diferențe notabile ale diversității microbiene în funcție de adâncimea apei.

La nivel taxonomic, microbiomul asociat sifonului a fost reprezentat în principal de filumul Spirochaetota, speciile de Verrucomicrobiota au prevalat în branhii, iar cele aparținând filumului Firmicutes în stomac, în timp ce bacteriile care colonizează sedimentele au fost dominate de taxonii aparținând filumului Proteobacteria.

La nivel funcțional, comunitățile bacteriene asociate atât organelor bivalvei *M. arenaria*, cât și sedimentelor, sunt implicate în diverse procese metabolice, cu prevalență în metabolismul carbohidraților, amino acizilor și cel energetic.

Perspective

Descifrarea diversității taxonomice și funcționale, a distribuției nevertebratelor în ecosistemul Dunăre - Delta Dunării - Marea Neagră, precum și a rolului comunităților de

bacterii asociate acestor nevertebrate, reprezintă aspecte esențiale pentru înțelegerea funcționării și rezilienței acestor ecosisteme acvatice.

În acest context, continuarea monitorizării acestor organisme și a altor specii de polichete, bivalve, crustacee, precum și spongieri, tunicate, este esențială pentru a înțelege dinamica populațiilor și impactul factorilor de mediu asupra distribuției lor.

Implementarea unor metode de management al biodiversității, bazate și pe datele obținute din analizele genetice, pot servi la conservarea speciilor indigene și la detectarea și controlul celor invazive. Astfel, studiile ulterioare se vor extinde și la alte grupe de nevertebrate, oferind informații esențiale pentru conservarea biodiversității și pentru managementul durabil al resurselor naturale din ecosistemele acvatice.

Pentru o caracterizare detaliată a profilului funcțional al comunităților bacteriene asociate acestor specii de nevertebrate, este necesară efectuarea unor analize moleculare utilizând tehnici avansate de metagenomică și metatranscriptomică, ceea ce va contribui la descifrarea rolului microbiomului organismelor din habitatele Mării Negre și Dunării în adaptarea acestor nevertebrate acvatice la condițiile de mediu.

În plus, investigarea potențialului aplicativ al bacteriilor identificate în aceste studii în biodegradarea poluanților sau în diferite biotehnologii, atât prin testarea unei game largi de activități enzimatică, cât și prin analiza genomică a acestor tulpini, poate deschide noi oportunități de identificare a unor compuși bioactivi cu proprietăți particulare și la extinderea cercetării spre bioprospectarea acestor surse ecologice marine și fluviale pentru identificarea de noi microorganisme utile în bioeconomie.

DISEMINAREA REZULTATELOR

Articole publicate din subiectul tezei de doctorat în reviste cotate ISI

Menabit, S., Lavin, P., Mureșan, M., Begun, T., Teacă, A., Purcarea, C. 2024. First screening of bacteria assemblages associated with the marine polychaete *Melinna pakmata* Grube, 1870 and adjacent sediments. *Front. Mar. Sci.*, 10, 1279849. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1279849> (Q1)

Menabit, S., Begun, S., Teacă, A., Mureșan, M., Lavin, P., Purcarea, C. 2022. DNA barcoding and distribution of gastropods and malacostracans in the Lower Danube region. *Diversity*, 14, 533. <https://doi.org/10.3390/d14070533> (Q2)

Menabit, S., Iancu, L., Pavel, A. B., Popa, A., Lupascu, N., Purcarea, C.. 2022. Molecular identification and distribution of insect larvae in the Lower Danube River. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, vol.51(1), pp. 74-89. <https://doi.org/10.26881/oahs.2022.1.07> (Q4)

Articole publicate din subiecte conexe cu cel al lucrării de doctorat

Ruginescu, R., Lavin, P., Iancu, L., **Menabit, S.**, Purcarea, C. 2022. Bioprospecting for Novel Bacterial Sources of Hydrolytic Enzymes and Antimicrobials in the Romanian Littoral Zone of the Black Sea. *Microorganisms*, 10, 2468. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122468> (Q2)

Pavel, A. B., **Menabit, S.**, Lupașcu, N., Kreuter, S. 2022. Role of environmental parameters in the distribution of meiobenthic fauna (Ostracoda and Foraminifera) in the Romanian Black Sea shelf. *AgroLife Scientific Journal*, 11(1). <https://doi.org/10.17930/AGL2022119> (Q4)

Begun, T., Teacă, A., Mureșan, M., Quijón, P. A., **Menabit, S.**, Surugiu, V. 2022. Habitat and Macrozoobenthic Diversity in Marine Protected Areas of the Southern Romanian Black Sea Coast. *Frontiers in Marine Science*. 9, 845507. doi: 10.3389/fmars.2022.845507 (Q1)

Mureșan, M., Motoc, R., **Menabit, S.**, Teacă, A., Begun, T. 2022. A New Species of Free-Living Nematodes (Desmodorida, Desmodoridae) in the Romanian Black Sea Waters. *Diversity*. 14, 933. <https://doi.org/10.3390/d14110933> (Q2)

Teacă, A., Begun, T., **Menabit, S.**, Mureșan, M. 2022. The First Record of *Marenzelleria neglecta* and the Spread of *Laonome xeprovala* in the Danube Delta–Black Sea Ecosystem. *Diversity*, 14, 423. <https://doi.org/10.3390/d14060423> (Q2)

Pavel, A. B., **Menabit, S.**, Pop, I. C. 2021. New records of soft-shelled monothalamous Foraminifera and gromiids on the Romanian Black Sea shelf. *Biologia* 76, 2241–2251. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00708-x> (Q3)

Pavel., A. B., **Menabit, S.**, Pop, I. C., Stanescu, I., Lupascu, N. 2021. The spatio-temporal distribution of the Ponto-Caspian polychaete in the Lower Sector of the Danube River and in Danube Delta. *Global Ecology and Conservation*, 28, e01623. DOI10.1016/j.gecco.2021.e01623 (Q1)

Teacă, A., Mureșan, M., **Menabit, S.**, Bucșe, A., Begun, T. 2020. Assessment of Romanian circalittoral soft bottom benthic habitats under Danube River influence. *Regional Studies in Marine Science*, 40, 101523. DOI10.1016/j.rsma.2020.101523 (Q3)

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Aßhauer, K.P.; Wemheuer, B.; Daniel, R.; Meinicke, P., 2015. Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics*. 31(17), 2882-4. doi: 10.1093/bioinformatics/btv287. PMID: 25957349; PMCID: PMC4547618.
2. Audzijonyte, A., Daneliya, M., Väinölä, R. 2006. Comparative phylogeography of Ponto-Caspian mysid crustaceans: Isolation and exchange among dynamic inland sea basins. *Mol. Ecol.*, 15, 2969–2984
3. Baird, D. J., Hajibabaei, M. 2012. Biomonitoring 2.0: a new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing. *Molecular Ecology*, 21(8), 2039–2044. <https://doi.org/10.1111/j.1365294X.2012.05519.x> PMID:22590728
4. Balian, E. V., Segers, H, Lévêque, C., Martens, K. 2008. The freshwater animal diversity assessment: An overview of the results. *Hydrobiologia*, 595(1), 627–637. 10.1007/s10750-007-9246-3
5. Begun, T. Complex Ecological Studies of Crustaceans Populations (Cumaceans and Mysidaceans) of the North Western Black Sea Coast. Ph.D. Thesis, University “Ovidius” Constanta, Constanța, Romania, 2006, pp. 276.
6. Begun, T., Teacă, A., Mureșan, M., Pavel, A.B. 2020. Current state of the mollusc populations in the Razim-Sinoe Lagoon System. *Anim. Sci.*, 63, 553–561.
7. Beshevli, L. E., V. A. Kolyagin. 1967. A Find of Mollusk *Mya arenaria* L. (Bivalvia) in Northwestern BlackSea,” *Vestn. Zool.*, No. 3, 82–84.
8. Black Sea SRIA Implementation Plan, 2023.
9. Bordenstein, S. R., Theis, K. R. 2015. Host biology in light of the microbiome: ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS. Biol.*, 13, e1002226. doi: 10.1371/journal.pbio.1002226
10. Borza, P., Csányi, B., Paunović, M. 2010. Corophiids (Amphipoda, Corophioidea) of the river Danube—The results of a longitudinal survey. *Crustaceana*, 83, 839–849.
11. Brown, K. M., Alexander, J. E., Thorp, J. H. 1998. Differences in the ecology and distribution of lotic pulmonate and prosobranch gastropods. *Am. Malacol. Bull.*, 14, 91–101.
12. Bryukhanov, A. L., Korneeva, V. A., Pimenov, N. V. 2015. Detection of anaerobic sulfate reducing bacteria in oxygen containing upper water layers of the Black and

- Baltic seas. Moscow Univ. Biol.Sci. Bull., 70 (4), 184–188. doi: 10.3103/S0096392515040057
13. Burkhardt, W., Watkins, W. D., Rippey, S. R. 1992. Seasonal effects on accumulation of microbial indicator organisms by *Mercenaria mercenaria*. Appl. Environ. Microbiol., 58, 826–831. doi: 10.1128/aem.58.3.826-831.1992
 14. Castella, E., Richardotcoulet, M., Roux, C., Richoux, P. 1984. Macroinvertebrates as describers of morphological and hydrological types of aquatic ecosystems abandoned by the Rhone river. Hydrobiologia, 119(3), 219–225. <https://doi.org/10.1007/bf00015212>
 15. Chiriac, G. 2004. The communities of macro-invertebrates in the Romanian part of the Danube, which were identified along the JDS – 2001 Expedition. Eco Terra (Cluj-Napoca), 3, 23–24.
 16. Convention on Biological Diversity. 2024. <https://www.cbd.int/convention>
 17. Coolen, M. J. L., Shtereva, G. 2009. Vertical distribution of metabolically active eukaryotes in the water column and sediments of the Black Sea. FEMS Microbiology Ecology, 70(3):525–39. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00756.x
 18. Cristescu, M. E., Hebert, P. D., Onciu, T.M. 2003. Phylogeography of Ponto-Caspian crustaceans: A benthic–planktonic comparison. Mol. Ecol., 12, 985–996.
 19. Cristescu, M.E.A.; Hebert, P.D.N. 2005. The ‘Crustacean Seas’—An evolutionary perspective on the Ponto-Caspian peracarids. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 62, 505–551.
 20. Dincă, V., Zakharov, E. V., Hebert, P. D. N., Vila, R. 2011. Complete DNA barcode reference library for a country’s butterfly fauna reveals high performance for temperate Europe. Proceedings. Biological Sciences, 278(1704), 347355. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1089>
 21. Farkas, A., Mérő, T. O., Móra, A., Dévai, G. Y. 2014. Urban dragonflies: Data on the odonata fauna of the Danube at Budapest. Acta Biologica Debrecina Supplementum Oecologica Hungarica., 32, 23–29.
 22. Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotechnol., 3, 294–299.
 23. Glaubitz, S., Labrenz, M., Jost, G., Jurgens, K. 2010. Diversity of active chemolithoautotrophic prokaryotes in the sulfidic zone of a Black Sea pelagic redox cline as determined by rRNA-based stable isotope probing. FEMS Microbiol. Ecol., 74 (1), 32–41. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.00944.x

24. Glöer, P., Sîrbu, I. 2005. New freshwater molluscs species found in the Romanian fauna. *Heldia*, 6, 229–238.
25. Gomes, M. A., Novelli, R., Zalmon, I. R., Souza, C. M. 2004. Malacological assemblages in sediments of eastern Brazilian continental shelf, coordinates 108 and 208 S, between Bahia and Espírito Santo State. *Bios*, 12, 11–24.
26. Gomoiu, M. T. 1982. On the populations of *Melinna palmata* Grube at the Romanian littoral of the Black Sea. *Cercetări Marine, IRCM Constanța*, 15, 115 – 131.
27. Gomoiu, M. T., Begun, T., Opreanu, P., Teaca, A. 2008. Present state of benthic ecosystem in Razelm-Sinoie Lagoon Complex (RSLC). In *Proceedings of the 37th IAD Conference, The Danube River Basin in a Changing World, Chișinău, Moldova, 29 October–1 November 2008*; pp. 108–112
28. Gomoiu, M.-T., Porumb, I. 1969 - *Mya arenaria* L. a bivalve recently penetrated into the Black Sea. *Rev. Roum. Biol., Serie Zool. Ed. Acad. Bucuresti* 14 (3): 199 – 202.
29. Graczyk, T. K., Conn, D. B., Marcogliese, D. J., Graczyk, H., DeLafontaine, Y. 2003. Accumulation of human waterborne parasites by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*). *Parasitol Res.*, 89 (2), 107–112. doi: 10.1007/s00436-002-0729-x
30. Graf, W. J., Waringer, P., Chovanec, P. W., Moog, O. 2006. The river Danube – biodiversity and habitat assessment based on Trichoptera assemblages. In: *Proceedings of the 36th International Conference of the International Association of the Danube*, 241-245. Vienna: Austrian Communications of the Danube Research
31. Graf, W., Csányi, B., Leitner, P., Paunović, M., Huber, T., Szekeres, J., Nagy, C., Borza, P. 2014. Joint Danube Survey 3, Full Report on Macroinvertebrates; ICPDR, International Commission for the Protection of the Danube River: Sofia, Bulgaria, pp. 87.
32. Grehan, A. J. 1991. Demography and reproductive biology of *Melinna palmata* (Amphretida: Polychaeta) in Inner Galway Bay on the west coast of Ireland. *Marine Biology*, 109: 459 – 467.
33. Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., Dewaard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B Boil. Sci.*, 270, 313–321
34. ICPDR, 2015. Joint Danube Survey 3 A Comprehensive Analysis of Danube Water Quality
35. Jażdżewska, A. M., Rewicz, T., Mamos, T., Wattier, R., Băcela-Spychalska, K., Grabowski, M. 2020. Cryptic diversity and mtDNA phylogeography of the invasive

- demon shrimp, *Dikerogammarus haemobaphes* (Eichwald, 1841), in Europe. *NeoBiota*, 57, 53–86
36. Jørgensen, B. B., Fossing, H., Wirsén, C. O., Jannasch, H. W. 1991. Sulfide oxidation in the anoxic Black Sea chemocline. International Commission for the Protection of the Danube River. Vienna International Centre D0412. *Deep-Sea Res.*, 38, S1083–S1103. doi: 10.1016/S0198-0149(10)80025-1
 37. Kelly, R. P. 2016. Making environmental DNA count. *Mol. Ecol. Res.*, 16, 10-12.
 - Kelman, D., Kashman, Y., Hill, R., Rosenberg, E., Loya, Y. 2009. Chemical warfare in the sea: the search for antibiotics from red sea corals and sponges. *Pure. Appl. Chem.*, 81 (6), 1113–1121. doi: 10.1351/PAC-CON-08-10-07
 38. Ketchum, R. N., Smith E. G., Vaughan, G. O., Phippen, B. L., McParland, D., Al-Mansoori, N., et al. 2018. DNA extraction method plays a significant role when defining bacterial community composition in the marine invertebrate *Echinometra mathaei*. *Front. Mar. Sci.*, 5. doi: 10.3389/fmars.2018.00255
 39. Konhauser, K. O., Hao, W., Li, U., Gunten, K., Bishop, B. A., Alessi, D. S., et al. 2020. *Diopatra cuprea* worm burrow parchment: a cautionary tale of infaunal surface reactivity. *Lethaia*. 53, 47–61. doi: 10.1111/let.12335
 40. Krno, I., Beracko, P., Navara, T., Šporka, F., & Mišíková Elexová, E. 2018. Changes in species composition of water insects during 25-year monitoring of the Danube floodplains affected by the Gabčíkovo waterworks. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(7), 412. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6773-5> PMID:29926194
 41. Leloup J., Loy A., Knab N. J., Borowski C., Wagner M., Jørgensen B. B. 2007. Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea. *Environ. Microbiol.* 9 (1), 131–142. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01122.x
 42. Marino, A., Lombardo, L., Fiorentino, C., Orlandella, B., Monticelli, L., Nostro, A., et al. 2005. Uptake of *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* non-O1 and *Enterococcus durans* by, and depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int. J. Food Microbiol.*, 99 (3), 281–286. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.09.003
 43. Mcfall-Ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C., Carey, H. V., Domazet-Lošo, T., Douglas, A. E. 2013. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 110 (9), 3229–3236. doi: 10.1073/pnas.1218525110

44. Menabit, S., Iancu, L., Pavel, A. B., Popa, A., Lupascu, N., Purcarea, C.. 2022. Molecular identification and distribution of insect larvae in the Lower Danube River. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, vol.51(1), pp. 74-89. <https://doi.org/10.26881/oahs.2022.1.07>.
45. Menabit, S., Begun, S., Teacă, A., Mureşan, M., Lavin, P., Purcarea, C. 2022. DNA barcoding and distribution of gastropods and malacostracans in the Lower Danube region. *Diversity*, 14, 533. <https://doi.org/10.3390/d14070533>
46. Menabit, S., Lavin, P., Mureşan, M., Begun, T., Teacă, A., Purcarea, C. 2024. First screening of bacteria assemblages associated with the marine polychaete *Melinna palmata* Grube, 1870 and adjacent sediments. *Front. Mar. Sci.*, 10, 1279849. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1279849>
47. Navara, T., Kokavec, I., Cívik, J., Lukáš, J., & Chvojka, P. 2020. *Adicella syriaca* (Trichoptera: Leptoceridae) in Slovakia – the northernmost record from Central Europe. Spreading of an aquatic insect in the period of climate change? *Biologia*, 75(12), 2321–2326. <https://doi.org/10.2478/s11756-020-00486-y>
48. Onishchenko O. M., Kiprianova E. A. 2006. *Shewanella* genus bacteria isolated from the Black Sea water and molluscs. *Mikrobiol Z.* 68 (2), 12–21.
49. Paraschiv, G. M., Begun, T., Teaca, A., Bucur, M., Tofan, L. 2010. New data about benthic populations of the Golovita and Zmeica lakes. *J. Environ. Prot. Ecol.*, 11, 253–260.
50. Pavel A., B.; Dutu, L.; Patriche, N. 2018. The benthic fauna associations from the meanders area of Danube Sfântu Gheorghe branch, in the period 2016-2017. *Geo-Eco-Marina*, 23, 233-244.
51. Pavel, A. B., Gheablau, C., Kreuter, S., Catianis, I., Scrieci, A., Enache, A., 2023. The Spatio-Temporal Distribution of the Freshwater Bivalves *Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha* in the Lower Sector of the Danube River and the Danube Delta. *Sustainability*, 15, 8526. <https://doi.org/10.3390/su15118526>
52. Pavel., A. B., Menabit, S., Pop, I. C., Stanescu, I., Lupascu, N. 2021. The spatio-temporal distribution of the Ponto-Caspian polychaete in the Lower Sector of the Danube River and in Danube Delta. *Global Ecology and Conservation*, 28, e01623. DOI10.1016/j.gecco.2021.e01623
53. Pierce, M. L., Ward, J. E. 2018. Microbial Ecology of the Bivalvia, with an Emphasis on the Family Ostreidae. *Journal of Shellfish Research*, 37 (4), 793-806.

54. Pilloni, G., Granitsiotis, M. S., Engel, M., Lueders, T. 2012. Testing the limits of 454 pyrotag sequencing: reproducibility, quantitative assessment and comparison to T-RFLP fingerprinting of aquifer microbes. *PLoS ONE* 7, e40467. doi:10.1371/journal.pone.0040467
55. Rewicz, T., Wattier, R., Grabowski, M., Rigaud, T., Băcela-Spychalska, K. 2015. Out of the Black Sea: Phylogeography of the invasive killer shrimp *Dikerogammarus villosus* across Europe. *PLoS ONE*, 10, e0118121
56. Rosemond, A.D., Mullholland, P.J., Ellwood, J.W. 1993. Top-down and bottom-up control of stream periphyton: Effects of nutrients and herbivores. *Ecology*, 74, 1264–1280.
57. Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L. 2007. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.*, 5 (5), 355–362. doi: 10.1038/nrmicro1635
58. 322. Ross, K.S., Haites, N. E., Kelly, K. F. 1990. Repeated freezing and thawing of peripheral blood and DNA in suspension: Effects on DNA yield and integrity. *J. Med. Genet.*, 27, 569–570
59. Ruginescu, R., Lavin, P., Iancu, L., Menabit, S., Purcarea C. 2022. Bioprospecting for novel bacterial sources of hydrolytic enzymes and antimicrobials in the Romanian littoral zone of the Black Sea. *Microorganisms*, 10, 2468. doi: 10.3390/microorganisms10122468
60. Samways, M. J., Deacon, Ch. 2021. Extinction Reprieve for the Ancient and Imperiled Dragonflies at the Southern Tip of Africa. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. <https://doi.org/10.1016/B978-012-821139-7.00047-7>
61. Schäfer, H., Ferdelman, T. G., Fossing, H., Muyzer, G. 2007. Microbial diversity in deep sediments of the Benguela Upwelling System. *Aquat. Microb. Ecol.*, 50 (1), 1–9. doi: 10.3354/ame01164
62. Schippers, A., Kock, D., Höft, C., Köweker, G., Siegert, M. 2012. Quantification of microbial communities in subsurface marine sediments of the Black Sea and off Namibia. *Frontiers in Microbiology*, 3. doi: 10.3389/fmicb.2012.00016
63. Schulz, H. N., Brinkhoff, T., Ferdelman, T. G., Mariné, M. H., Teske, A., Jørgensen, B. B. 1999. Dense populations of a giant sulfur bacterium in Namibian shelf sediments. *Science*, 284 (5413), 493–495. doi: 10.1126/science.284.5413.493

64. Sivaramakrishnan, K. G., Janarthanan, S., Selvakumar, C., Arumugam, M. 2014. Aquatic insect conservation: A molecular genetic approach. *Conservation Genetics Resources*, 6(4), 849–855. <https://doi.org/10.1007/s12686-014-0250-4>
65. Skolka, M., Gomoiu, M.-T., 2004. Specii invazive în Marea Neagră. Impactul ecologic al patrunderii de noi specii in ecosistemele acvatice. Ovidius University Press Constanta
66. Sorokin, Y. I., Sorokin, P. Y., Avdeev, V. A., Sorokin, D. Y., Ilchenko, S. V. 1995. Biomass, production and activity of bacteria in the Black Sea, with special reference to chemosynthesis and the sulfur cycle. *Hydrobiologia*, 308, 61–76. doi: 10.1007/BF00037788
67. Stoica, C., Gheorghe, S., Petre, J., Lucaciu, I., Nita-Lazar, M. 2014. Tools for assessing Danube Delta systems with macro invertebrates. *Environ. Eng. Manag. J.*, 13, 2243–2252.
68. Strasser, M. 1998. *Mya arenaria* — an ancient invader of the North Sea coast. *Helgolander Meeresunters* 52, 309–324. <https://doi.org/10.1007/BF02908905>
69. Teacă, A., Mureșan, M., Menabit, S., Bucșe, A., Begun, T. 2020. Assessment of Romanian circalittoral soft bottom benthic habitats under Danube River influence. *Regional Studies in Marine Science*, 40, 101523. DOI10.1016/j.rsma.2020.101523
70. Thamdrup, B., Rosselló-Mora, R., Amann, R. 2000. Microbial manganese and sulfate reduction in Black Sea shelf sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (7), 2888–2897. doi: 10.1128/AEM.66.7.2888-2897.2000
71. Theis, K. R., Dheilly, N. M., Klassen, J. L., Brucker, R. M., Baines, J. F., Bosch, T. C. G. 2016. Getting the hologenome concept right: An ecoevolutionary framework for hosts and their microbiomes. *mSystems*, 1 (2), e00028–e00016. doi: 10.1128/mSystems.00028-16
72. Timmins-Schiffman, E., White, S. J., Thompson, R. E., Vadopalas, B., Eudeline, B., Nunn, B. L., et al. 2021. Coupled microbiome analyses highlights relative functional roles of bacteria in a bivalve hatchery. *Environ. Microbiome*, 16, 1–12. doi: 10.1186/s40793-021-00376-z
73. Tubić, B., Simić, V., Zorić, K., Gačić, Z., Atanacković, Z., Csányi, B., Paunović, M. 2013. Stream section types of the Danube River in Serbia according to the distribution of macroinvertebrates. *Biologia*, 68, 294–302.
74. Uno, G., Storey, R., Moore, R. 2001. *Principles of Botany*. New York: McGraw Hill, 552p.

75. Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E. 2008. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32 (5), 723–735. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x