

**UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE**

**MICROORGANISME INDICATOARE
ALE POLUĂRII MEDIULUI**

TEZĂ DE DOCTORAT

(rezumat)

SIMULE CODRUȚA VIOLETA

**COND. ȘTIINȚIFIC:
PROF. UNIV. DR. MIHAIL DRĂGAN-BULARDA**

2011

CUPRINS

	Pag.
I. INTRODUCERE	1
II. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE	1
III. DESCRIEREA PUNCTELOR DE PRELEVARE A PROBELOR	3
IV. ANALIZA FIZICO-CHIMICĂ A SOLURILOR	4
IV.1.Recoltarea și păstrarea probelor	4
IV.2.Materiale și metode	5
IV.3.Rezultate și discuții	5
V.STUDIUL DISTRIBUȚIEI POPULAȚIILOR MICROBIENE ÎN SOLURILE POLUATE DIN JUDEȚUL CLUJ	7
V.1.Materiale și metode	7
V.2.Rezultate și discuții	7
VI.ANALIZA ENZIMOLOGICĂ A SOLURILOR	10
VI.1.Materiale și metode	10
VI.2.Rezultate și discuții	11
VII.IMPACTUL POLUĂRII CU ZINC, PLUMB ȘI CADMIU ASUPRA DIMENSIUNII ȘI ACTIVITĂȚII POPULAȚIILOR MICROBIENE DIN SOL	14
VII.1.Materiale și metode	14
VII.2.Rezultate și discuții	15
VII.2.1.Impactul poluării cu zinc, plumb și cadmiu asupra dimensiunii populațiilor microbiene din sol	15
VII.2.2.Impactul poluării cu zinc, plumb și cadmiu asupra activităților enzimatic	18
VII.2.3.Impactul poluării cu zinc, plumb și cadmiu asupra respirației solului	20
VIII.EFECTELE METALELOR ASUPRA VIABILITĂȚII CELULARE	21
VIII.1.Materiale și metode	21
VIII.2.Rezultate și discuții	21
VIII.2.1.Stabilirea efectului metalelor grele asupra viabilității tulpinilor de <i>Azotobacter chroococcum</i> izolate din solul din Cheile Turzii	21
VIII.2.2.Stabilirea efectului metalelor grele asupra viabilității celulare la <i>Pseudomonas putida</i>	22
VIII.2.3.Compararea efectului produs de metalele grele (Zn, Pb, Cd) asupra celulelor de <i>Azotobacter chroococcum</i> și <i>Pseudomonas putida</i>	24
IX.EVALUAREA EFECTELOR METALELOR GRELE ASUPRA CREȘTERII SPECIEI <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i>	25
IX.1.Materiale și metode	25
IX.2.Rezultate și discuții	25
X.CONCLUZII GENERALE	27
BIBLIOGRAFIE	30
LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE DIN SUBIECTUL TEZEI DE DOCTORAT	31

Cuvinte cheie: soluri poluate, grupe ecofiziologice, activități enzimatic, *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas putida*, metale grele

I. INTRODUCERE

Solul este un sistem dinamic vital pentru activitățile umane și pentru menținerea ecosistemelor. Ca interfață dintre scoarța terestră, atmosferă și hidrosferă, solul este o resursă neregenerabilă care îndeplinește numeroase funcții vitale: producerea de biomasă; depozitarea, filtrarea și transformarea unor substanțe organice și minerale; sursă de biodiversitate, habitate, specii și gene; mediu fizic pentru oameni și activitățile umane; sursă de materii prime.

În sens evoluțional, microorganismele (în primul rând microorganismele heterotrofe) sunt agenți reciclatori responsabili cu menținerea biosferei. Acești agenți valorifică termodinamic, favorabil, reacțiile chimice obținând carbon și energie din biomasa moartă. Ca rezultat al proceselor microbiene de degradare, nutrienții esențiali prezenți în biomasa unei generații de organisme sunt disponibile pentru următoarea generație.

Impactul activităților umane asupra calității solului s-a intensificat de-a lungul ultimelor decenii datorită creșterii populației și exploatării extensive a resurselor naturale, inclusiv a solurilor. Următoarele procese pot fi menționate ca principale surse de impact asupra calității solurilor: emisiile în atmosferă provenite în principal din industrie și trafic; tehnicile agricole – în special utilizarea fertilizanților organici sau minerali și a pesticidelor; deșeurile depozitate pe sol.

Ritmul de producere și dispersie a poluanților a depășit, în prezent, procesele naturale de biodegradare. În căutarea remediilor tehnologice a poluării mediului, procesele fizice și chimice pot fi esențiale, dar și procesele microbiologice oferă importante perspective.

II. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE

Scopul acestei cercetări este argumentarea științifică a necesității includerii parametrilor biologici în studiile de evaluare a impactului asupra mediului și în strategiile naționale de monitorizare a calității solurilor, acestea având în prezent la bază numai determinarea parametrilor fizico-chimici.

Analizele chimice măsoară cantitatea de poluanți dar ele nu reflectă consecințele asupra mediului rezultate din mobilizarea lor, acumularea de-a lungul lanțului trofic și în special influența lor asupra proceselor metabolice cheie din sol. Metodele biologice, în

schimb, reflectă impactul asupra organismelor din sol, ele evidențiind intensificări/inhibări ale activităților în condiții de stres.

Dat fiind faptul că solul este supus unor influențe antropice puternice, este de importanță majoră stabilirea efectului poluanților asupra comunităților edafice de microorganisme.

În acest context, obiectivele principale ale tezei de doctorat au fost următoarele:

1) Studiarea abundenței, diversității, dinamicii și semnificației ecologice a unor grupe de bacterii (implicate în circuitul biogeochimic al azotului, sulfului, fierului și carbonului) din solurile poluate din județul Cluj, în relație cu factorii de mediu determinanți;

2) Evaluarea activităților enzimatică (activitatea dehidrogenazică actuală și potențială, catalazică, fosfatazică, ureazică), cu scopul de a stabili potențialul microbial al solurilor;

3) Determinarea indicatorului bacterian al calității solului (IBCS) și a indicatorului enzimatic al calității solului (IECS), aceștia permițând compararea și ierarhizarea probelor analizate;

4) Analizarea corelațiilor existente între parametri microbiologici și cei fizico-chimici, pentru aprecierea variației densității grupelor de bacterii din solurile poluate și a intensității activităților enzimatică, în funcție de factorii fizico-chimici;

5) Determinarea efectului pe care metalele grele (zinc, plumb și cadmiu) îl au asupra populațiilor microbiene, prin studiul dinamicii grupelor ecofiziologice de bacterii și a activităților enzimatică în prezența unor concentrații diferite de poluanți în mediu și identificarea parametrilor bacterieni sensibili la poluare;

6) Determinarea efectului metalelor grele asupra viabilității celulare la *Azotobacter chroococcum* și *Pseudomonas putida*, respectiv a rezistenței speciilor la prezența metalelor grele în mediu de cultură (testul cu albastru tripan);

7) Determinarea efectului metalelor grele asupra bacteriei *Pseudomonas putida* prin testul de inhibiție a creșterii (măsurarea concentrației la care multiplicarea celulelor este inhibată cu 10%, respectiv 50%);

8) Identificarea celor mai adecvați indicatori biologici ai poluării solului, în vederea includerii acestora în studiile de evaluare a impactului și în strategiile de monitorizare a solurilor poluate, aplicabile și în cazul altor ecosisteme.

Teza de doctorat este structurată pe 11 capitole. Fiecare capitol conține o parte teoretică, o parte în care sunt descrise metodele de lucru, o parte care cuprinde rezultatele și discuțiile pe marginea cercetărilor științifice întreprinse și concluziile aferente.

Teza de doctorat aduce contribuții de o reală valoare științifică legate de efectul influențelor antropice asupra calității solurilor, relația acestora cu activitatea microbiană și cu potențialul enzimatic, dar și de fiziologia și viabilitatea tulpinilor de *Azotobacter chroococcum* și *Pseudomonas putida*, toate acestea constituind noutăți pentru literatura de specialitate din domeniul ecologiei microbiene.

Microorganismele și comunitățile microbiene pot constitui o unitate de măsură integrată a calității solului, un aspect care nu poate fi obținut prin determinări fizice sau chimice și/sau analize ale organismelor mari. Pentru prevenirea consecințelor ecologice ireversibile, parametrii bacterieni care s-au dovedit a fi sensibili la poluarea cu metale grele vor putea fi incluși în studiile de evaluare și în strategiile de monitorizare a solurilor poluate.

III. DESCRIEREA PUNCTELOR DE PRELEVARE A PROBELOR

Având în vedere principalele surse de poluare din județul Cluj, au fost luate în studiu soluri reprezentative pentru fiecare tip de poluare, în următoarele opt variante experimentale (**Fig. 1**):

1. sol poluat din zona urbană Cluj-Napoca, ca urmare a traficului rutier intens (Piața Unirii);
2. sol poluat industrial:
 - industria prelucrării materialelor nemetalifere (SC Casirom SA Turda);
 - industria metalurgică (SC Combinatul de Utilaj Greu SA Cluj);
3. sol poluat prin activități agricole din zona fermelor de păsări din Cluj-Napoca (Popești) și respectiv a fermelor de porcine din Bonțida, zone vulnerabile la poluarea cu nitrați;
4. sol poluat prin depozitarea deșeurilor industriale (depozitul de hexaclorciclohexan Turda - HCH Turda);
5. sol poluat prin depozitarea deșeurilor menajere (depozitul Pata Rât Cluj-Napoca);
6. sol nepoluat din aria protejată Cheile Turzii.

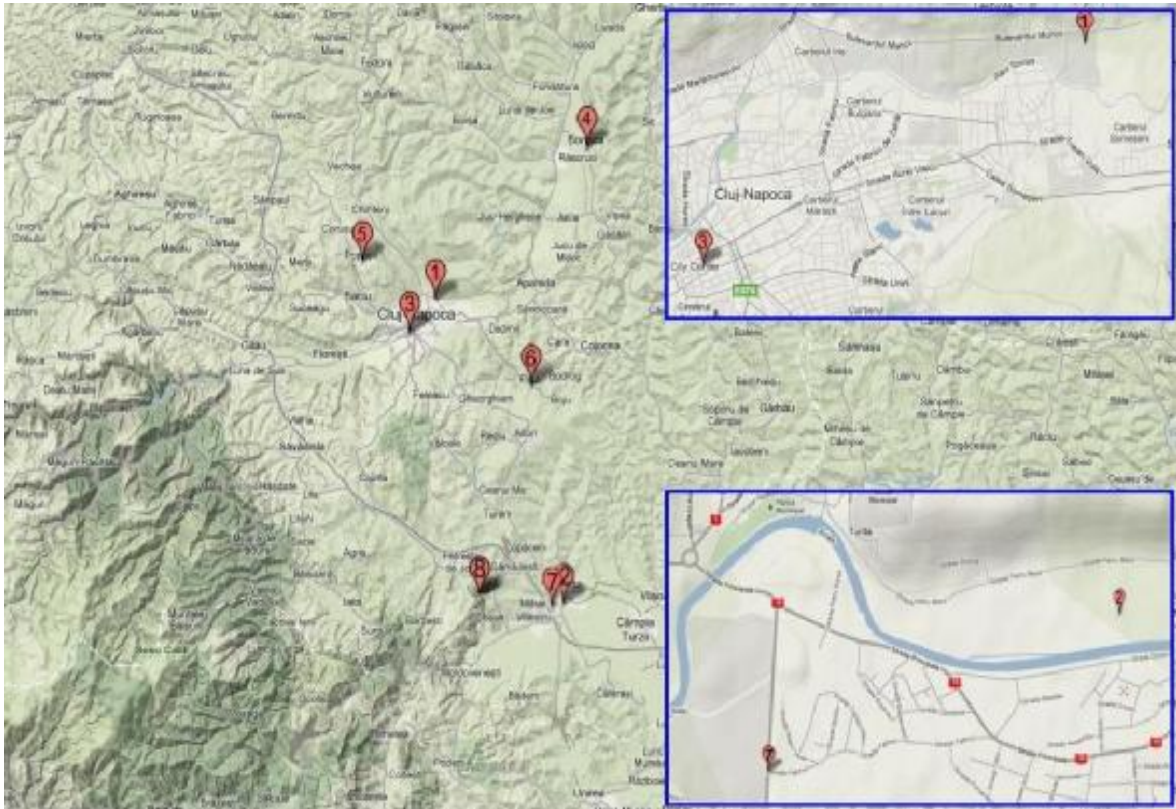


Fig. 1. Poziționarea geografică a zonei studiate

IV. ANALIZA FIZICO-CHIMICĂ A SOLURILOR

IV.1. Recoltarea și păstrarea probelor

Recoltarea probelor de sol destinate analizelor fizico-chimice și biologice s-a făcut conform normelor metodologice prevăzute în STAS 7184/1-84 “Soluri. Recoltarea probelor pentru studii pedologice și agrochimice” și au fost prelucrate în conformitate cu normele standardelor SR ISO 10381-6:1997, “Calitatea solului. Linii directe pentru colectarea, manipularea și conservarea solurilor destinate unui studiu în laborator a proceselor microbiene aerobe” și SR ISO 11464:1998 “Calitatea solului. Pretratamentul eșantioanelor pentru analizele fizico-chimice”.

Pentru analiza fizico-chimică a solurilor au fost utilizate probele prelevate în vara anului 2008, de la adâncimea 0-20 cm, în condiții sterile. Probele individuale au fost recoltate cu ajutorul unui prelevator probe sol tip MOLE din 3 puncte diferite și amestecate împreună pentru obținerea unei probe compuse pentru fiecare zonă analizată. Probele compuse obținute au fost utilizate pentru toate analizele ulterioare. Fiecare eșantion a fost etichetat, fiind

precizat locul prelevării, data și adâncimea de la care s-a efectuat prelevarea. Probele au fost păstrate în frigider, la o temperatură de 4°C, până la prelucrare.

IV.2. Materiale și metode

Parametrii fizico-chimici determinați au fost: temperatura, pH-ul, conductivitatea electrică, umiditate, conținutul de substanțe organice (prin metoda gascromatografică) și concentrația metalelor grele: Cr, Cu, Pb, Ni, Co, Cd (prin metoda spectrofotometrică de absorbție atomică în flacără).

IV.3. Rezultate și discuții

pH-ul probelor analizate a variat între 6,66 (Piața Unirii) și 7,95 (Casirom) iar conductivitatea între 82 $\mu\text{S/cm}$ (Pata Rât) și 322 $\mu\text{S/cm}$ (CUG). Umiditatea, de asemenea, a variat între 7,33% (CUG) și 20,86% (Casirom). Conținutul maxim de substanțe organice a fost înregistrat în punctul de prelevare Cheile Turzii (11,38%) iar cel minim în zona Casirom (3,51%).

Toate metalele analizate au fost prezente în toate punctele de prelevare, ceea ce dovedește existența unei poluări naturale, de fond, peste care se suprapune cea de origine antropică. S-au înregistrat depășiri ale concentrațiilor maxim admise (CMA) stabilite prin Ordinul nr. 756/1997 pentru aprobarea Reglementării privind evaluarea poluării mediului la zinc (CUG, Pata Rât), cupru (CUG, P-ța Unirii, HCH Turda), plumb (CUG, P-ța Unirii, HCH Turda), nichel (CUG, Pata Rât) și cobalt (Popești, HCH Turda). Nu s-au înregistrat depășiri ale valorilor normale la indicatorii crom și cadmiu (**Fig. 2**).

Cele mai mari depășiri ale valorilor normale s-au înregistrat în zona HCH Turda pentru plumb (de 3,2 ori), cobalt (de 3,1 ori) și cupru (de 2,9 ori) iar în zona Pata Rât pentru zinc (de 1,8 ori) și nichel (de 1,2 ori).

Concentrațiile ridicate ale metalelor grele (Pb, Co și Cu) în depozitul de HCH Turda este consecința faptului că în această zonă s-au depozitat deșeuri rezultate din activitatea Uzinei Chimice Turda, al cărei obiect de activitate a fost producerea a peste 18 produse chimice, printre care: HCH (ca înlocuitor la DDT), carbonat de potasiu, clor lichid, polimeri organici, clorura de calciu, hipoclorit de calciu, oxiclorigura cuprică etc.

Nivelul ridicat al metalelor grele (în special Zn și Ni) în zona depozitului de deșeuri menajere Pata Rât este rezultatul depozitării a cca. 3,5 milioane tone deșeuri menajere, în

amestec cu deșeurile industriale, fără o separare prealabilă pe categorii de materiale și fără ca acestea să fie tratate sau neutralizate.

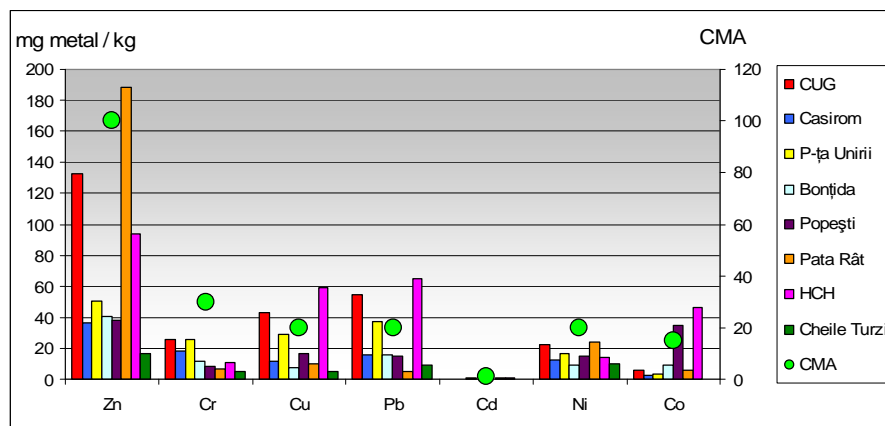


Fig. 2. Concentrațiile metalelor grele determinate în solurile poluate studiate din județul Cluj în vara anului 2008

Analiza HCH în zona depozitului de deșuri industriale din Turda a pus în evidență o concentrație de 472,9 mg/kg, adică de aproximativ 1000 de ori mai mare decât pragul de intervenție prevăzut pentru soluri sensibile prin Ordinul nr. 756/1997.

Concentrația ridicată a poluantului în sol atrage atenția asupra necesității stringente de a fi identificate și implementate măsuri corespunzătoare de remediere a zonei, riscurile pentru mediu și sănătatea umană fiind reale.

V. STUDIUL DISTRIBUȚIEI POPULAȚIILOR MICROBIENE ÎN SOLURILE POLUATE DIN JUDEȚUL CLUJ

V.1. Materiale și metode

Acest studiu realizează pentru prima dată o biomonitorizare complexă a calității solului, pe baza studierii dinamicii populațiilor microbiene și a abundenței a șapte grupe ecofiziolgice de bacterii, care pot constitui indicatori sensibili ai calității solului: bacteriile heterotrofe aerobe (Atlas, 2004), bacteriile amonificatoare (mediu de cultură cu apă peptonată), bacteriile nitrificatoare (Drăgan-Bularda, 2000), bacteriile denitrificatoare (Pochon, 1954), bacteriile fier-reducătoare (Pârvu și colab., 1977) și bacteriile desulfocatoare (Allen, 1957).

Cu excepția bacteriilor aerobe heterotrofe (în cazul cărora s-a utilizat metoda culturilor în plăci), determinarea numărului celui mai probabil de bacterii (NCP) s-a realizat utilizând tehnica diluțiilor zecimale, rezultatele fiind prelucrate cu ajutorul tabelului statistic al lui Alexander (1965). Pentru evaluarea potențialului microbial general al solurilor analizate, pe baza numărului de bacterii din diferitele grupe ecofiziologice analizate s-a calculat indicatorul bacterian al calității solurilor (Muntean, 1995-1996).

Datele obținute au fost analizate statistic utilizând programul SPSS Statistics 17, prin calcularea coeficientului de corelație Pearson la două praguri de semnificație: 0,05 și 0,01.

V.2.Rezultate și discuții

În toate solurile analizate a fost detectată prezența a șase grupe ecofiziologice de bacterii: heterotrofe aerobe (BHA), amonificatoare (BAM), nitritbacterii (NIB), nitratbacterii (NAB), denitrificatoare (BDN), fier-reducătoare (BFR), în timp ce bacteriile desulfocatoare (BDS) au fost determinate numai în probele de sol din Bonțida, Pata Rât și Cheile Turzii (**Tab. 1**).

Bacteriile desulfocatoare au fost detectate numai în trei puncte de prelevare, din cele opt puncte analizate, înregistrând valoarea maximă în zona depozitului Pata Rât, datorită proporției crescute a deșeurilor biodegradabile (61%), care suferă descompuneri anaerobe în interiorul depozitului.

Tab. 1

Limitele de variație numerică ale grupelor ecofiziologice de bacterii analizate în solurile poluate din județul Cluj pe parcursul anului 2008

Bacterii	2008 (minime-maxime)
Bacterii amonificatoare (nr./g s.u.)	2358 - 90520
Nitritbacterii (nr./g s.u.)	236 - 50450
Nitratbacterii (nr./g s.u.)	26 - 2376
Bacterii denitrificatoare (nr./g s.u.)	36 - 4200
Bacterii heterotrofe aerobe (CFU/g s.u.)	20000 - 9600000
Bacterii desulfocatoare (nr./g s.u.)	0 - 42
Bacterii fier-reducătoare (nr./g s.u.)	25 - 940

În ordinea abundenței lor, bacteriile heterotrofe aerobe (10^4 - 10^6 CFU/g s.u.) au fost urmate de către bacteriile amonificatoare (10^3 - 10^4 bacterii/g sol), nitritbacterii (10^2 - 10^4 bacterii/g s.u.), bacteriile denitrificatoare (10^1 - 10^3 bacterii/g s.u.), nitratbacterii (10^1 - 10^3

bacterii/g s.u.), bacteriile fier-reducătoare ($10^1 - 10^2$ bacterii/g s.u.) și bacteriile desulfocatoare ($0 - 10^1$ bacterii/ g s.u.) (**Tab. 1**).

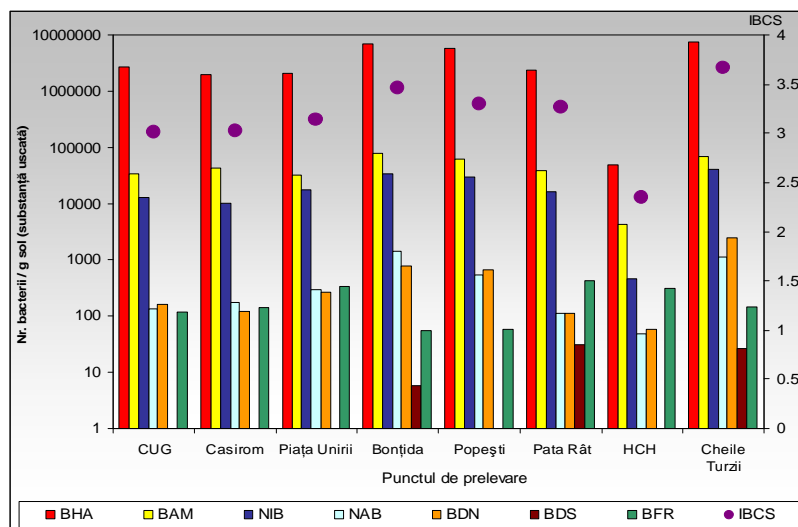


Fig. 3. Densitatea bacteriilor înregistrată în solurile poluate studiate din județul Cluj pe parcursul anului 2008

În cazul grupelor ecofiziologice de bacterii studiate au fost evidențiate fluctuații numerice în funcție de punctele de prelevare a probelor și oscilații sezoniere, cu valori minime iarna și valori maxime atinse în sezoanele calde ale anului (vara și uneori toamna).

Efectul nociv al emisiilor de poluanți ca urmare a traficului rutier, activităților industriale sau al depozitării deșeurilor a fost evident, în cazul tuturor grupelor ecofiziologice studiate valorile înregistrate în zonele poluate fiind mai mici decât în zona martor, nepoluată (**Fig. 3**). Acest efect este și mai sugestiv ilustrat de valorile indicatorului bacterian al calității solurilor (IBCS), calculat pe baza numărului de bacterii care aparțin tuturor grupelor ecofiziologice analizate (Muntean, 1995-1996).

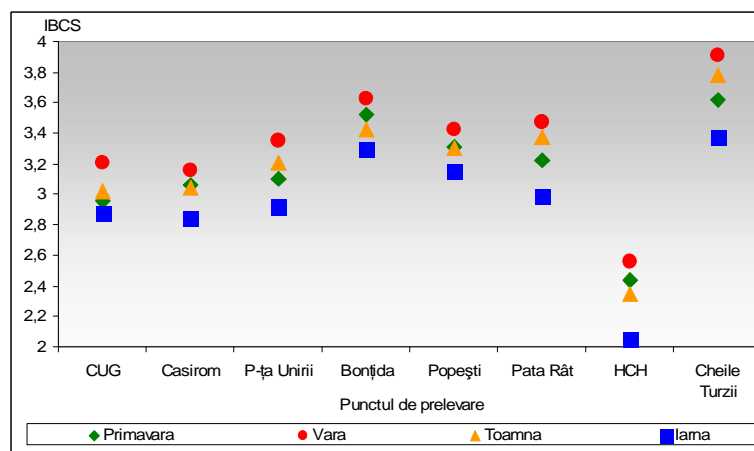


Fig. 4. Variația sezonieră a IBCS în solurile poluate studiate din județul Cluj pe parcursul anului 2008

O primă constatare care se impune este legată de diferența de potențial consemnat în cele patru sezoane. În toate punctele de prelevare, cele mai ridicate valori ale IBCS s-au înregistrat vara, datorită prezenței nutrienților și temperaturii crescute iar cele mai scăzute iarna (**Fig. 4**).

O altă constatare evidentă este nivelul scăzut al potențialului bacterian al solului din zona HCH Turda față de celelalte puncte de prelevare. Valorile IBCS din punctele de prelevare CUG., Casirom și din Piața Unirii au fost mai scăzute decât cele înregistrate în zona Pata Rât, Popești, Bonțida și Cheile Turzii. Valorile crescute ale IBCS în zona depozitului de deșeuri menajere se datorează, probabil, aportului de materii organice care au favorizat dezvoltarea microorganismelor. De asemenea, valorile crescute ale IBCS în punctele de prelevare Popești și Bonțida sunt consecințe ale efectului stimulator al îngrășămintelor naturale aplicate pe terenurile din zonă, la care se adăugă pierderi de ape uzate rezultate de la fermele zootehnice, ca urmare a neetanșeității sistemului de colectare și epurare.

Tab. 2.

Ierarhia solurilor poluate studiate în funcție de valorile IBCS determinate în anul 2008

Nr.	Punct de prelevare	IBCS
1	Cheile Turzii	3,670
2	Bonțida	3,467
3	Popești	3,296
4	Pata Rât	3,266
5	PiațaUnirii	3,143
6	Casirom	3,028
7	CUG	3,016
8	HCH Turda	2,349

În ierarhia solurilor poluate, bazată pe valorile indicatorilor bacterieni, solul din zona protejată Cheile Turzii s-a situat pe prima din cele 8 poziții, ceea ce sugerează existența unei comunități bacteriene activă și echilibrată. Pe ultima poziție s-a situat solul din zona depozitului de hexaclorciclohexan, zonă parțial neacoperită cu plante, din cauza concentrației ridicate de pesticide și metale grele (**Tab. 2**).

CAP.VI. ANALIZA ENZIMOLOGICĂ A SOLURILOR

VI.1. Materiale și metode

În general, activitățile enzimelor din sol se modifică mai devreme decât alți parametri, astfel reprezintă indicatori precoce ai schimbărilor calității solului (Dick și colab., 1996; Lee și colab., 2002; Hu și Cao, 2007; Garcia-Ruiz și colab., 2008). Ca urmare, asupra aceluiași soluri care au fost studiate din punct de vedere microbiologic și fizico-chimic, au fost efectuate și cercetări enzimologice.

Au fost determinate cantitativ următoarele 4 activități enzimatică: activitatea fosfatazică (AF), activitatea catalazică (AC), activitatea ureazică (AU) și activitatea dehidrogenazică actuală (ADA) și potențială (ADP) (Drăgan-Bularda, 2000). Pe baza valorilor absolute ale fiecărei activități enzimatică studiate, a fost calculat indicatorul enzimatic al calității solului (Muntean și colab., 1996).

VI.2. Rezultate și discuții

Activitățile enzimatică studiate au prezentat oscilații (**Tab.3**) în funcție de sezon și de punctul de prelevare al probelor.

Tab. 3.

Limitele de variație numerică ale activităților enzimatică determinate în solurile poluate din județul Cluj pe parcursul anului 2008

Activitate enzimatică	2008 (minime-maxime)
Activitatea dehidrogenazică actuală (mg formazan/g s.u.)	0,01 - 1,77
Activitatea dehidrogenazică potențială (mg formazan/g s.u.)	0,16 - 3,45
Activitatea fosfatazică (mg fenol/g s.u.)	0,19 - 7,95
Activitatea catalazică (mg H ₂ O ₂ /g s.u.)	3,31 - 37,82
Activitatea ureazică (mg NH ₄ ⁺ /g s.u.)	2,0 - 28,47

Activitatea dehidrogenazică a prezentat valori mai mari în solul martor decât în solurile contaminate, fapt ce reflectă sensibilitatea acestei activități, indiferent de sursa de poluare (**Fig.5**).

Activitatea fosfatazică și catalazică au fost mai intense în punctele de prelevare Cheile Turzii, Bonțida, Popești și Pata Rât, comparativ cu zonele afectate de poluarea industrială, traficul rutier sau depozitarea deșeurilor industriale, ceea ce demonstrează efectul inhibitor al poluanților. Prima categorie a solurilor, caracterizate printr-o activitate enzimatică mai crescută, au avut un conținut mai mare de substanțe organice, acestea asigurând o dezvoltare mai bună a microorganismelor.

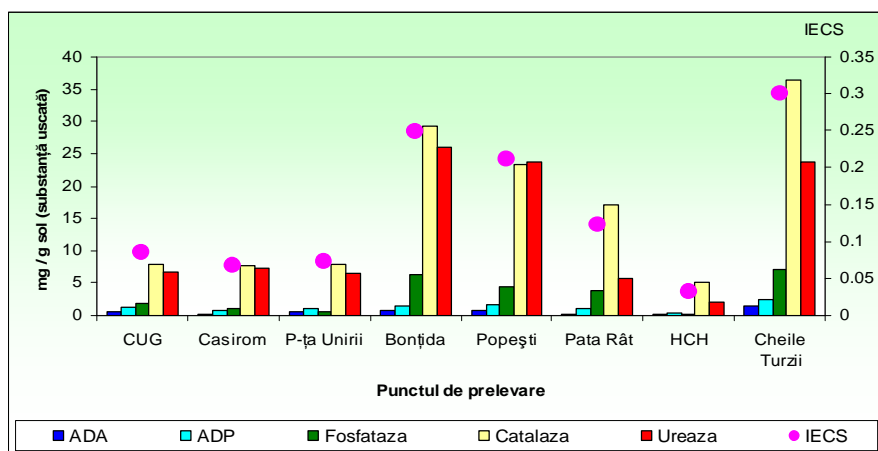


Fig. 5. Intensitatea activităților enzimice: dehidrogenazică actuală și potențială (mg formazan/g s.u.), fosfatazică (mg fenol/g s.u.), catalazică (mg H₂O₂/g s.u.) și ureazică (mg NH₄⁺/g s.u.) înregistrată în solurile poluate studiate din județul Cluj pe parcursul anului 2008

Activitatea ureazică a fost cea mai intensă în zonele Bonțida și Popești, valorile măsurate aici depășindu-le pe cele înregistrate în proba martor, consecință a efectului stimulator exercitat de compușii organici cu azot prezenți în dejecțiile animaliere.

Pentru compararea probelor de sol din punct de vedere enzimologic, pe baza valorilor măsurate ale activităților dehidrogenazică, fosfatazică, catalazică și ureazică, s-a calculat indicatorul enzimatic al calității solurilor.

După cum reflectă valorile indicatorului enzimatic al calității, solurile s-au caracterizat printr-o activitate mai redusă în zonele poluate comparativ cu cele nepoluate. Cea mai ridicată valoare a IECS s-a obținut vara, pentru punctul de prelevare Cheile Turzii (0,336) iar cea mai mică valoare pentru zona HCH Turda, iarna (0,02) (**Fig. 6**).

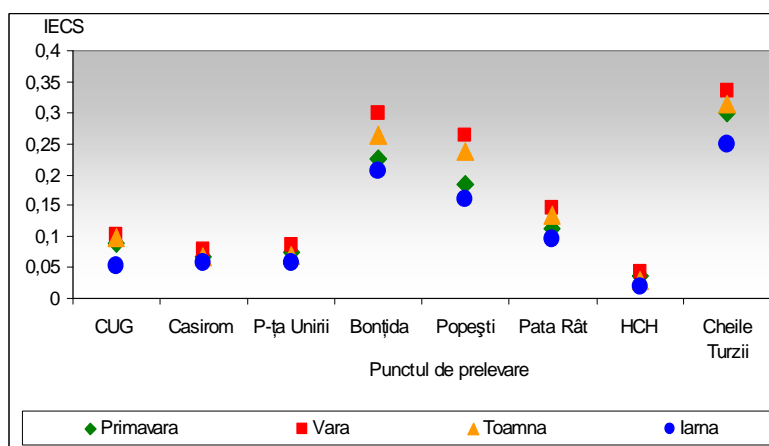


Fig. 6. Evoluția sezonieră a potențialului enzimatic al solurilor poluate studiate din județul Cluj pe parcursul anului 2008

Comparația dintre cele 8 puncte de prelevare indică un potențial enzimatic foarte scăzut în zona HCH Turda, unul scăzut în punctele de prelevare Casirom, Piața Unirii, CUG, unul intermediar în punctul Pata Rât și unul mai ridicat la Popești, Bonțida și Cheile Turzii, situație explicabilă prin efectul inhibitor al poluanților de natură chimică (metalele, pesticidele) evacuați în atmosferă sau depozitați direct pe sol.

Indicatorul enzimatic al calității solului (IECS) nu atinge, în nici una din cele 8 probe analizate, valoarea teoretică maximă (1), ci variază între 0,032 și 0,30. După acest indicator, probele ocupă diferite poziții de calitate (**Tab. 4**).

Tab. 4.

Ierarhia solurilor poluate studiate în funcție de valorile IECS înregistrate pe parcursul anului 2008

Nr.	Punct de prelevare	IECS
1	Cheile Turzii	0,30
2	Bonțida	0,249
3	Popești	0,211
4	Pata Rât	0,122
5	CUG	0,086
6	Piața Unirii	0,072
7	Casirom	0,067
8	HCH Turda	0,032

În zona depozitului de HCH s-a înregistrat cel mai redus potențial enzimatic, existând totuși și în acest caz o variație sezonieră, cu un minim iarna și un maxim vara, ceea ce dovedește faptul că efectul HCH depinde de temperatură.

Cu ajutorul testelor statistice s-a stabilit că solul este un sistem foarte heterogen, în care activitățile enzimatice interacționează în vederea realizării complexelor transformări biochimice.

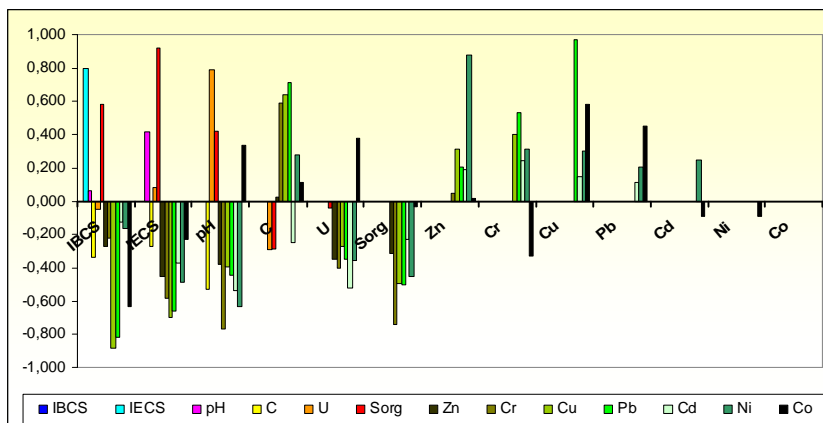


Fig. 7. Corelațiile dintre IBCS, IECS și proprietățile fizico-chimice ale solurilor poluate studiate

Între valorile IBCS și cele ale IECS s-a stabilit existența unei corelații pozitive, semnificative la $p < 0,05$, ceea ce atestă paralelismul dintre potențialul bacterian și cel enzimatic al solurilor, indiferent de punctul de prelevare sau de concentrația poluanților (**Fig. 7**).

Cei doi indicatori care caracterizează solurile (IBCS și IECS), dar și numărul de bacterii, respectiv fiecare activitate enzimatică în parte, s-au corelat negativ cu toate metalele grele analizate (zinc, crom, cupru, plumb, cadmiu, nichel și cobalt), ceea ce denotă efectul inhibitor puternic al metalelor asupra dimensiunii și activității populațiilor bacteriene.

Toate activitățile enzimatică analizate, densitatea bacteriilor din fiecare grup ecofizilogic, respectiv IBCS și IECS, s-au corelat pozitiv cu cantitatea de substanțe organice, rezultat care reconfirmă rolul cheie jucat de concentrația substanțelor organice în ecosistemele edafice.

CAP.VII.IMPACTUL POLUĂRII CU ZINC, PLUMB ȘI CADMIU ASUPRA DIMENSIUNII ȘI ACTIVITĂȚII POPULAȚIILOR MICROBIENE DIN SOL

VII.1.Materiale și metode

În vederea evaluării impactului metalelor grele asupra populațiilor microbiene, probelor de sol prelevate din aria protejată Cheile Turzii li s-au adăugat săruri ale metalelor grele (Zn, Pb și Cd), în diferite concentrații. În acest studiu au fost folosite următoarele săruri ale metalelor grele: $ZnSO_4 \times 7H_2O$, $(CH_3COO)_2Pb \times 3H_2O$ și $Cd(NO_3)_2 \times 4H_2O$.

Concentrațiile metalelor grele au fost alese în funcție de concentrația acestora în solurile din județul Cluj, determinată în cadrul analizelor fizico-chimice. Astfel, a fost aleasă o valoare inferioară celei măsurate în solul din Cheile Turzii, o valoare aproximativ egală cu cea măsurată în acest sol, valoarea maxim admisă de legislația în vigoare (Ordinul nr. 756/1997), o valoare aproximativ egală cu cea mai mare valoare înregistrată în solurile din județul Cluj și două valori superioare. Sistemul de numerotare de la I-VI a concentrațiilor metalelor testate, așa cum este detaliat în **Tab. 5**, este folosit pe tot parcursul lucrării pentru simplificarea prezentării rezultatelor.

În România, limitele normale ale concentrațiilor poluanților în sol au fost stabilite prin Ordinul nr. 756/1997, acestea fiind de 100 mg Zn/kg, 20 mg Pb/kg și 1 mg Cd/kg.

Tab. 5

Concentrațiile metalelor grele (Zn, Pb și Cd) utilizate în evaluarea impactului asupra populațiilor microbiene din sol

Concentrația utilizată	Zinc (mg/kg)	Plumb (mg/kg)	Cadmium (mg/kg)
I	10	5	0,5
II	20	10	1
III	100	20	5
IV	150	40	10
V	200	70	15
VI	400	140	20

Probele au fost menținute în condiții naturale o perioadă de 30 de zile, după care s-a evaluat efectul metalelor grele aplicate asupra bacteriilor heterotrofe aerobe, amonificatoare, nitrificatoare, denitrificatoare, fier-reducătoare și desulfocitoare, asupra activităților dehidrogenazice, fostatazică, catalazică și ureazică, precum și asupra respirației solului.

Activitatea fiziologică globală a microorganismelor din probele de sol analizate, exprimată prin nivelul respirației solului, a fost determinată prin evaluarea cantității de CO₂ eliberată de către spectrul total al microorganismelor din probă, utilizând un sistem alcătuit dintr-o cameră pentru respirația solului tip SRC-1, cuplată cu un analizor CO₂ tip EGM -4.

VII.2.Rezultate și discuții

VIII.2.1.Impactul poluării cu zinc, plumb și cadmiu asupra dimensiunii populațiilor microbiene din sol

În cazul grupelor ecofiziologice de bacterii studiate au fost evidențiate fluctuații numerice în funcție de tipul de metal și de concentrația în care a fost adăugat (**Fig. 8-10**).

Rezultatele obținute au demonstrat că la adăugarea poluanților în sol, diferitele grupe ecofiziologice de microorganisme au avut diferite tipuri de răspuns. Adăugarea de Zn, Pb și Cd în concentrații reduse a avut un efect ușor stimulator sau inhibitor, în timp ce aplicarea metalelor grele în concentrații crescute a avut un efect inhibitor puternic. Bacteriile heterotrofe aerobe au fost cele mai rezistente la poluare, ele menținându-se chiar și în prezența unor concentrații crescute de metale (Zn IV, Pb VI, CdVI) iar bacteriile nitrificatoare au fost cele mai sensibile, urmate de bacteriile denitrificatoare și bacteriile fier-reducătoare. Datorită sensibilității manifestate de bacteriile nitrificatoare față de poluarea cu metale grele,

recomandăm includerea acestui grup de bacterii în studiile de evaluare și monitorizare a solurilor poluate.

Bacteriile heterotrofe aerobe, amonificatoare, nitrificatoare și denitrificatoare au fost mai sensibile la Cd decât la Pb, în timp ce bacteriile desulfocitoare și fier-reducătoare au dovedit o sensibilitate mai mare la Pb.

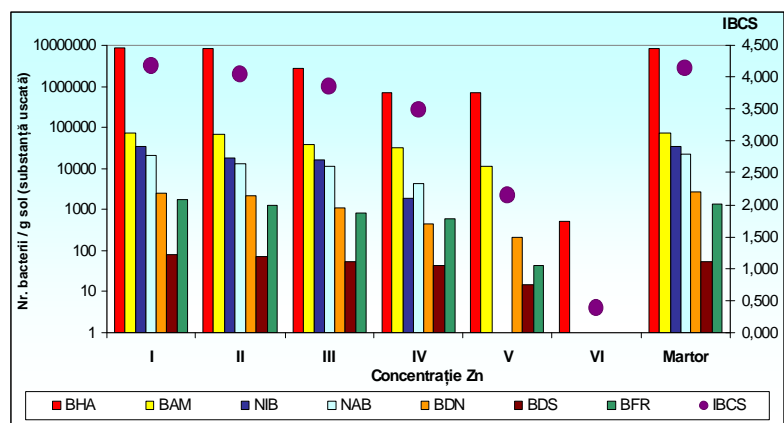


Fig. 8. Efectul Zn asupra numărului de bacterii în probele recoltate din Cheile Turzii în vara anului 2010
Concentrațiile metalelor: vezi **Tab. 5.**

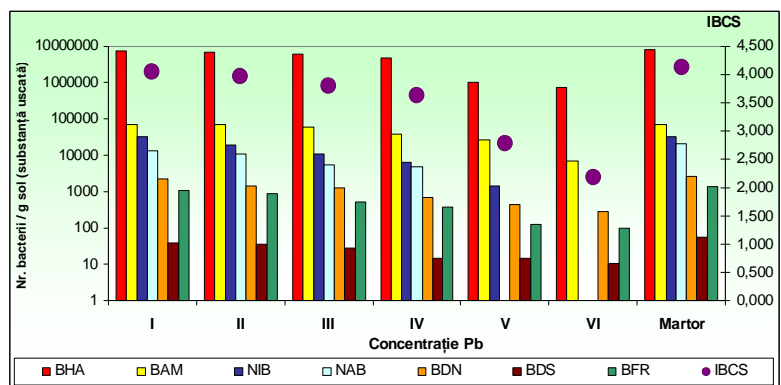


Fig. 9. Efectul Pb asupra numărului de bacterii în probele recoltate din Cheile Turzii în vara anului 2010.
Concentrațiile metalelor: vezi **Tab. 5.**

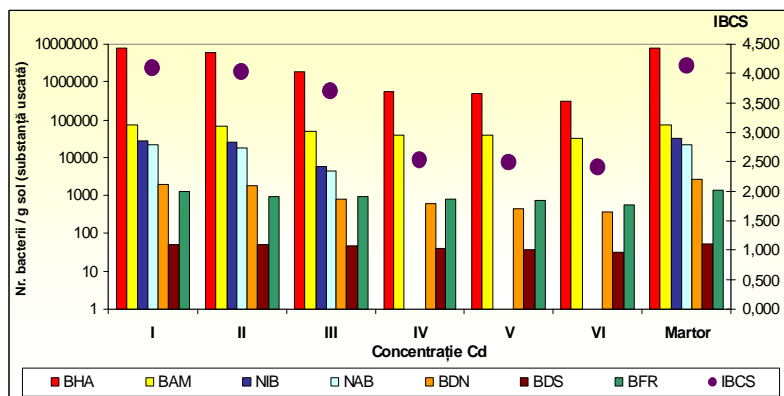


Fig. 10. Efectul Cd asupra numărului de bacterii în probele recoltate din Cheile Turzii în vara anului 2010.
Concentrațiile metalelor: vezi **Tab. 5.**

Efectul nociv al metalelor a fost evident, în cazul tuturor grupelor ecofiziologice studiate valorile înregistrate în probele cu concentrații mari de Zn, Pb sau Cd au fost mai mici decât în probele cu concentrații reduse iar valorile maxime au fost înregistrate în zona martor, fără adaos de metale. Acest efect este și mai sugestiv ilustrat de valorile indicatorului bacterian al calității solurilor (IBCS), calculat pe baza numărului de bacterii care aparțin tuturor grupelor ecofiziologice analizate (Muntean, 1995-1996) (**Fig. 11**).

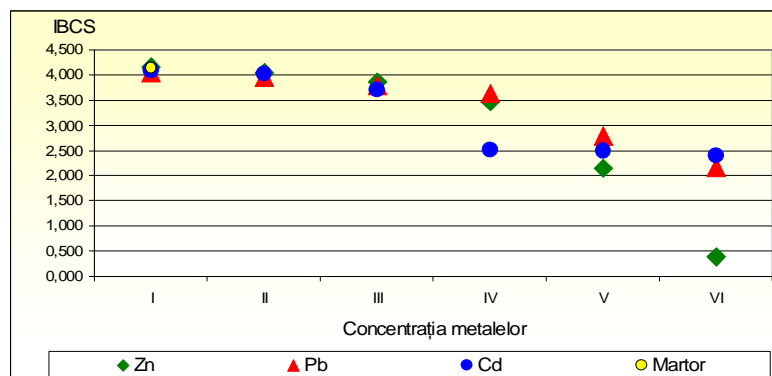


Fig. 11. Evoluția IBCS sub acțiunea metalelor grele (Zn, Pb, Cd)
Concentrațiile metalelor: vezi **Tab. 5**.

Valorile IBCS sunt cuprinse între 4,127 și 0,386, cu o tendință de scădere treptată, pe măsura creșterii concentrației de metal din sol. Valoarea maximă (4,127) a fost calculată pentru proba martor, fără adaos de metale, iar valorile minime în probele Cd VI (2,401), Pb VI (2,167) și respectiv Cd VI (0,385).

VII.2.2. Impactul poluării cu zinc, plumb și cadmiu asupra activităților enzimaticice

Toate activitățile enzimaticice analizate au fost identificate în toate probele, cu variații în funcție de tipul de metal și de concentrația acestuia.

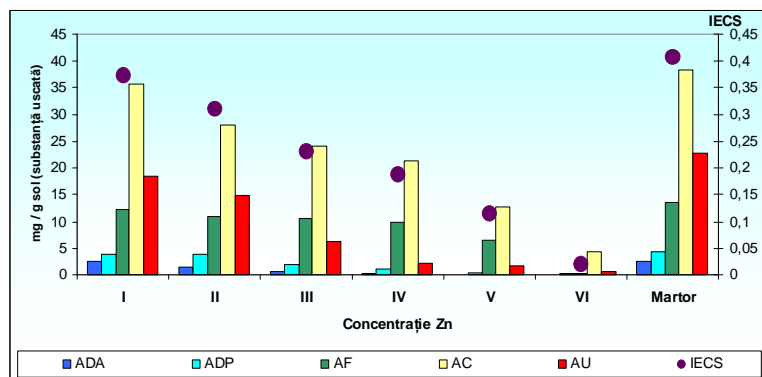


Fig. 12. Efectul Zn asupra intensității activităților enzimaticice în probele recoltate din Cheile Turzii în vara anului 2010. Concentrațiile metalelor: vezi **Tab. 5**.

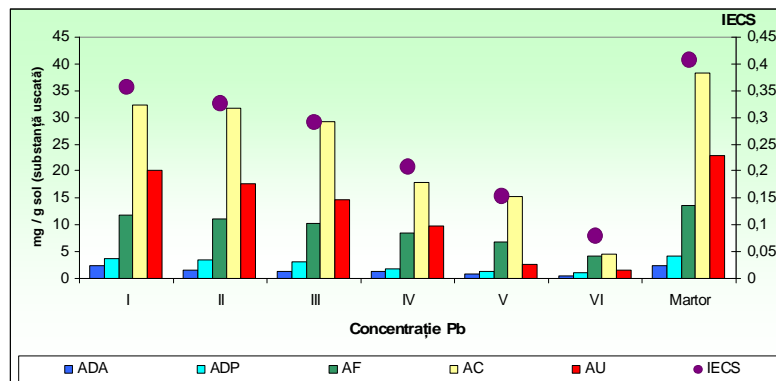


Fig. 13. Efectul Pb asupra intensității activităților enzimatiche în probele recoltate din Cheile Turzii în vara anului 2010. Concentrațiile metalelor: vezi Tab. 5.

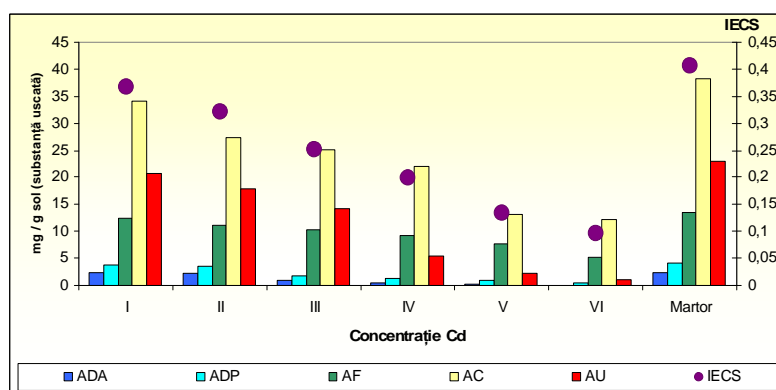


Fig. 14. Efectul Cd asupra intensității activităților enzimatiche în probele recoltate din Cheile Turzii în vara anului 2010. Concentrațiile metalelor: vezi Tab. 5.

Sensibilitatea crescută a activității dehidrogenazice la contaminarea cu metale poate fi explicată prin faptul că dehidrogenaza este activă numai în interiorul celulelor vii, intacte, spre deosebire de alte enzime care acționează și în afara celulelor. Activitatea dehidrogenazică a fost cea mai sensibilă la poluarea cu Cd, urmat de Pb și Zn.

Fosfataza și catalaza au fost cele mai tolerante, fosfataza fiind mai sensibilă decât catalaza în prezența Zn și Pb și mai tolerantă în prezența Cd.

S-a constatat o reducere treptată a IECS pe măsura creșterii concentrației metalelor grele adăugate probelor de sol, datorită efectului inhibitor al poluanților asupra tuturor activităților enzimatiche determinate (Fig. 15)

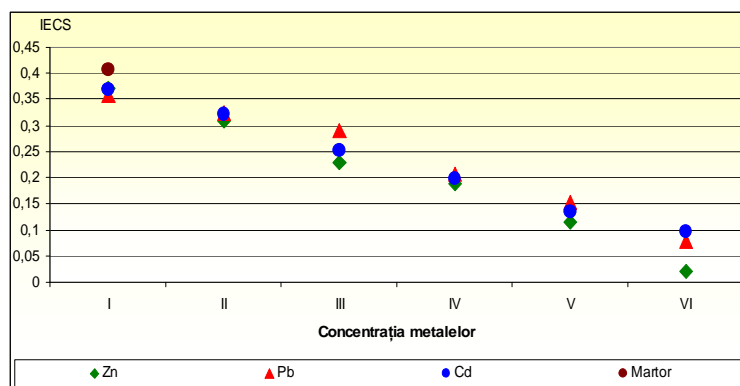


Fig. 15. Evoluția IBCS sub acțiunea metalelor adăugate în diferite concentrații. Concentrațiile metalelor: vezi **Tab. 5**.

Indicatorul enzimatic al calității solului (IECS) nu atinge, în nici una din probe, valoarea teoretică maximă (1), ci variază între 0,407 și 0,02. Valoarea maximă (0,407) a fost înregistrată în proba martor iar valorile minime în probele Cd VI (0,097), Pb VI (0,079) și Zn VI (0,02).

VII.2.3. Impactul poluării cu zinc, plumb și cadmiu asupra respirației solului

Respirația solului a fost mai crescută în solurile mai puțin poluate decât în cele poluate. Totuși, respirația solului pare neafectată de metalele grele prezente în limitele normale stabilite prin OUG 756/1997, cantitatea de CO₂ descrescând semnificativ numai la concentrații mari ale metalelor grele (**Fig. 16**).

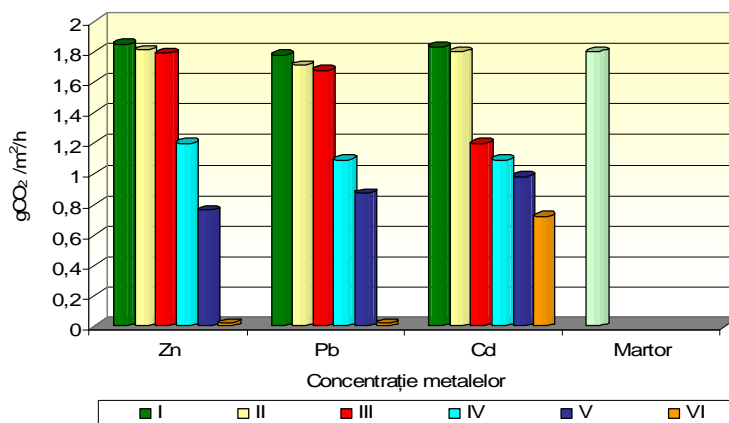


Fig. 16. Efectul diferitelor concentrații de metale grele (Zn, Pb, Cd) asupra respirației solului. Concentrațiile metalelor: vezi **Tab. 5**.

Așadar, respirația solului poate fi un indicator util în studiile de evaluare și monitorizarea a impactului metalelor grele asupra microorganismelor, dar preferabil împreună

cu alți indicatori, întrucât poate fi stimulată în cazul poluării, în timp ce alți parametri sunt inhibați.

Analiza statistică a datelor a demonstrat existența unor corelații negative, statistic semnificative, între toate grupele ecofiziologice de bacterii, activitățile enzimatică, respirația solului și concentrația metalelor grele (Zn, Pb și Cd). Corelații pozitive, semnificative statistic, au fost detectate între dimensiunea populațiilor bacteriene și activitățile enzimatică, respectiv respirația solului.

VIII.EFECTELE METALELOR ASUPRA VIABILITĂȚII CELULARE

VIII.1.Materiale și metode

Viabilitatea celulară a fost cuantificată prin testul cu albastru tripan, o metodă *in vivo*, cunoscută ca metoda excluziei colorantului, care se bazează pe faptul că membrana celulară este impermeabilă pentru unii coloranți, printre care și albastru tripan.

S-a urmărit efectul metalelor grele (Zn, Pb, Cd) asupra viabilității celulare la tulpinile de *Azotobacter chroococcum* izolate din aria protejată Cheile Turzii, precum și la *Pseudomonas putida*, tulpina MIGULA, Berlin 33/2 (DSM 291) din colecția de culturi a Universității Babeș-Bolyai Cluj-Napoca, Laboratorul de Microbiologie.

VIII.2.Rezultate și discuții

VIII.2.1.Stabilirea efectului metalelor grele asupra viabilității tulpinilor de *Azotobacter chroococcum* izolate din solul din Cheile Turzii

Din analiza datelor înregistrate se remarcă o viabilitate celulară maximă în proba martor de 88,3%. Viabilitatea celulară a avut o evoluție descrescătoare în prezența metalelor grele, aceasta variind de la 84,9% până la 2,4% în cazul Zn, între 78,6% și 12,9% în cazul Pb și între 53,2% și 10,4 % în probele cu adaos de Cd, ceea ce dovedește efectul inhibitor al celor trei metale grele chiar și în concentrații reduse (**Fig.17**).

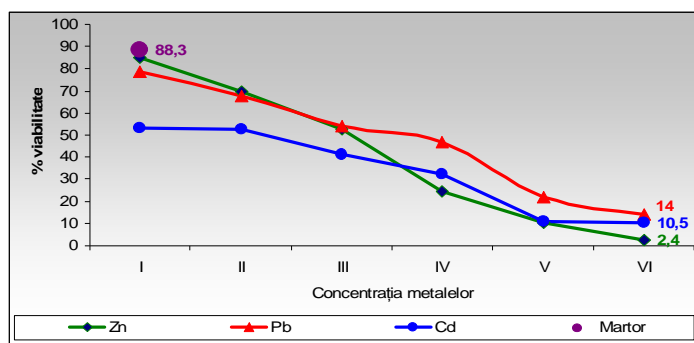


Fig. 17. Efectul diferitelor concentrații de metale grele (Zn, Pb, Cd) asupra viabilității celulelor de *A. chroococcum*. Concentrațiile metalelor: vezi Tab. 5.

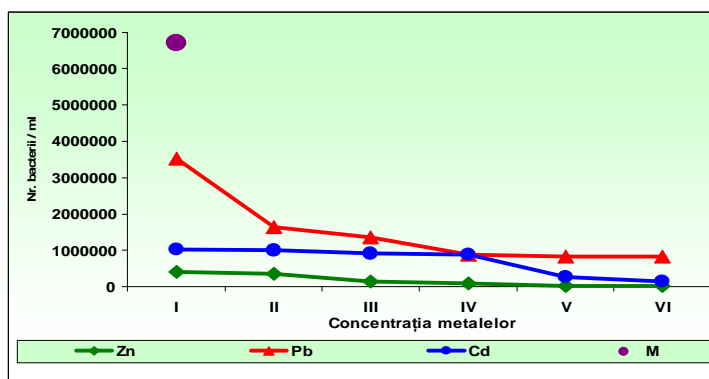


Fig. 18. Efectul diferitelor concentrații de metale (Zn, Pb, Cd) asupra densității celulelor viabile la *A. chroococcum*. Concentrațiile metalelor: vezi Tab. 5.

Cea mai mare densitate a celulelor s-a înregistrat în probele cu Pb I ($3,52 \times 10^6$ /ml), Pb II ($1,65 \times 10^6$ /ml), Pb III ($1,35 \times 10^6$ /ml) și Cd I ($1,03 \times 10^6$ /ml), ordinul de mărime al numărului de celule viabile reducându-se treptat la 10^5 în probele Zn I-III, Pb IV-VI și Cd II-VI și respectiv la 10^4 în probele cu Zn IV-VI. Menținerea celulelor viabile la un nivel relativ ridicat (10^6 - 10^4) în toate probele demonstrează dezvoltarea mecanismelor de rezistență la metale (Fig. 18).

VIII.2.2. Stabilirea efectului metalelor grele asupra viabilității celulare la *Pseudomonas putida*

Viabilitatea celulară a înregistrat procente diferite în funcție de tipul de metal și de concentrația metalului aplicat. Ca și în cazul celulelor de *A. chroococcum*, viabilitatea celulară la *P. putida* s-a redus pe măsura creșterii concentrației metalelor grele (Zn, Pb, Cd), de la 90,5% până la 25,5% în prezența Zn, de la 85,8% la 32,4% în cazul Pb și respectiv de la 87% la 43,4% în probele cu adaos de Cd. Așa cum era de așteptat, viabilitatea celulară maximă s-a înregistrat în proba martor, fără adaos de metale grele (96,7%) (Fig. 19).

Chiar dacă metalele grele au avut un efect inhibitor, se constată că procentul viabilității celulare s-a menținut la un nivel relativ ridicat (25,5% - 43,4%), chiar și la concentrațiile cele mai mari de metale (Zn VI, Pb VI, Cd VI).

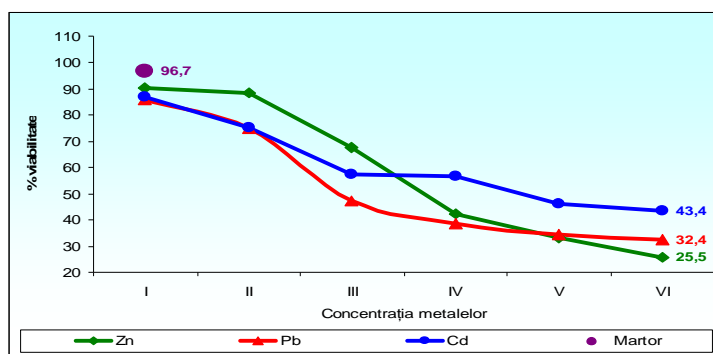


Fig. 19. Efectul diferitelor concentrații de metale grele (Zn, Pb, Cd) asupra viabilității celulelor de *Pseudomonas putida*. Concentrațiile metalelor: vezi Tab. 5.

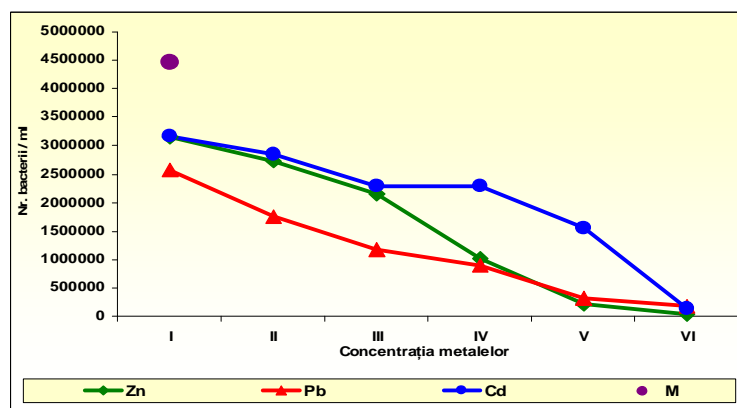


Fig. 20. Efectul diferitelor concentrații de metale grele (Zn, Pb, Cd) asupra densității celulelor viabile la *P. putida*. Concentrațiile metalelor: vezi Tab. 5.

Evaluarea viabilității celulelor cu albastru de tripan a evidențiat prezența unui număr maxim de celule viabile în proba martor ($4,47 \times 10^6/\text{ml}$), numărul acesta reducându-se odată cu creșterea concentrațiilor de metale grele, până la $1,7 \times 10^5/\text{ml}$ (Pb VI), $1,42 \times 10^5/\text{ml}$ (Cd VI) și respectiv $3,22 \times 10^4/\text{ml}$ (Zn VI). Din analiza acestor rezultate se poate observa că numărul de bacterii s-a menținut la un nivel de $10^6/\text{ml}$ în probele cu Zn I-IV, Pb I-III și Cd I-V, scăzând treptat la 10^5 în probele Zn V, Pb IV-VI și Cd VI și respectiv la 10^4 în probele cu Zn VI. Menținerea celulelor viabile la un nivel relativ ridicat ($10^6 - 10^4$) în toate probele demonstrează dezvoltarea mecanismelor de rezistență la toate cele trei metale analizate, ceea ce a permis supraviețuirea în condiții de stres (Fig. 20).

VII.2.2. Compararea efectului produs de metalele grele (Zn, Pb, Cd) asupra celulelor de *Azotobacter chroococcum* și *Pseudomonas putida*

Viabilitatea celulară a înregistrat procente diferite în funcție de microorganism, tipul de metal și de concentrația metalului aplicat. Viabilitatea celulară a avut o evoluție descendentă la ambele microorganisme, consecință a efectului inhibitor exercitat de metalele grele prezente în mediul de cultură. Viabilitatea celulară a fost mai ridicată la *Pseudomonas putida* decât la *Azotobacter chroococcum*, ceea ce demonstrează o rezistență mai mare a speciei *Pseudomonas putida* la poluarea cu metale grele (**Fig. 21**).

Comparând efectul celor trei metale la concentrații egale, se constată că cel mai toxic a fost cadmiul, urmat de plumb și zinc, atât pentru celulele de *A. chroococcum* cât și pentru *P. putida*.

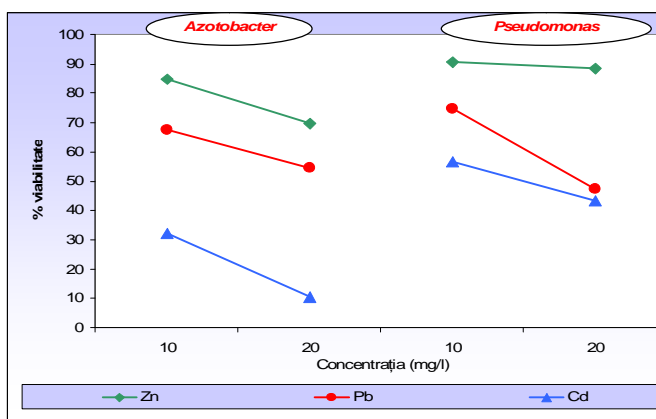


Fig. 21. Efectul metalelor grele (Zn, Pb, Cd) în concentrații egale (10 mg/kg, 20 mg/kg) asupra viabilității celulelor de *A. chroococcum* și *P. Putida*. Efectul Concentrațiilor metalelor: vezi **Tab. 5**.

Raportate la martor, s-a constatat o descreștere a numărului de celule viabile și o creștere a numărului de celule neviabile, pe măsura creșterii concentrației de metale grele din mediul de cultură, datorită toxicității exercitate de poluanți asupra microorganismelor.

Diametrul mediu al celulelor de *A. chroococcum* a variat între 1,5 - 2,2 μm iar al celulelor de *P. putida* între 0,5- 1 μm . Ca răspuns la toxicitatea metalelor grele, creșterea concentrației metalelor grele din mediul de cultură a fost însoțită și de o reducere a diametrului mediu al celulelor viabile, mai evidentă în cazul tulpinilor de *A. chroococcum*, datorită capacității de a se închișta în condiții nefavorabile de mediu.

Dinamică comparativă arată că ambele specii de microorganisme și-au păstrat viabilitatea în prezența tuturor metalelor, la toate concentrațiile, fără să coboare sub nivelul de 10^4 celule/ml (**Fig. 18, 20**). Aceasta dovedește că bacteriile au dezvoltat mecanisme de rezistență la toate cele trei metale grele. Tulpinile de *Azotobacter* sp. au capacitatea de a

forma chisturi, care fac posibilă supraviețuirea în condiții nefavorabile (Malcom, 1994) iar *Pseudomonas* sp. prezintă un metabolism versatil datorită căruia poate face față fluctuațiilor condițiilor de mediu (Berlanga și colab., 2006).

IX.EVALUAREA EFECTELOR METALELOR GRELE ASUPRA CREȘTERII SPECIEI *PSEUDOMONAS PUTIDA*

IX.1.Materiale și metode

Testul de inhibiție a creșterii *Pseudomonas putida* s-a realizat în conformitate cu standardul SR EN ISO 10712/2001. Calitatea apei. Test de inhibiție a creșterii *Pseudomonas putida*. Metoda are la bază determinarea concentrației eșantioanelor la care multiplicarea celulelor este inhibată cu 10%, respectiv 50% în 16 ± 1 h.

IX.2.Rezultate și discuții

În cazul tuturor metalelor analizate s-a constatat o creștere treptată a procentului inhibiției creșterii la *P. putida*, pe măsura creșterii concentrațiilor de metale (**Fig. 22-24**). Concentrațiile efective care au determinat inhibiția creșterii bacteriei *P. putida* în proporție de 10% (EC10), după 16 ore de incubare, au fost de 18,663 mg Zn/l; 8,842 mg Pb/l și 0,417 mg Cd/l. Inhibiția creșterii tulpinii de *P. putida* cu 50% (EC50) a fost înregistrată la concentrațiile de 129,344 mg Zn/l; 31,914 mg Pb/l și respectiv 2,513 mg Cd/l (**Tab. 6**).

În ordinea toxicității, cadmiul a fost cel mai toxic metal pentru *P. putida*, urmat de plumb și de zinc. Zincul a fost cel mai puțin toxic, acest element fiind implicat într-o mare varietate de procese celulare.

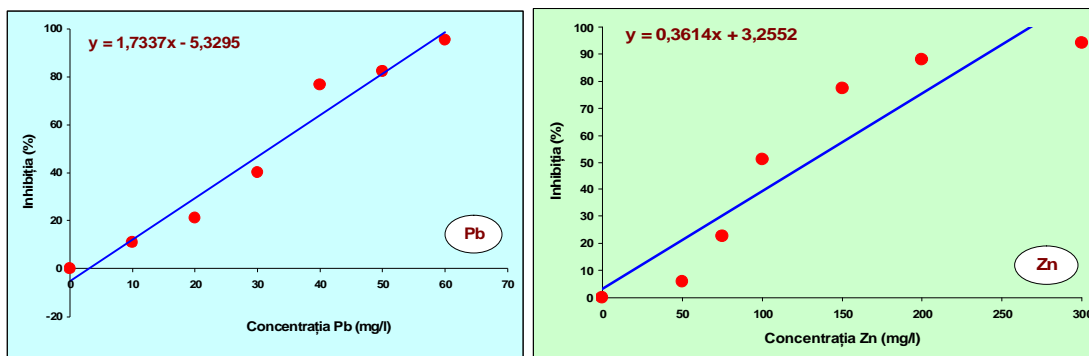


Fig. 22, 23. Efectul zincului și a plumbului asupra creșterii la *P. putida*

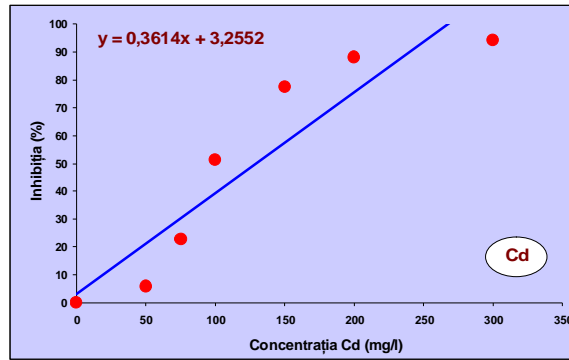


Fig. 24. Efectul cadmiului asupra creșterii la *P. putida*

Tab.6. Valorile concentrațiilor efective care determină inhibiția creșterii la *P. putida* cu 10% și 50%

Concentrația efectivă	Concentrație Zn (mg/l)	Concentrație Pb (mg/l)	Concentrație Cd (mg/l)
EC 10	18,663	8,842	0,417
EC 50	129,344	31,914	2,513
Valoarea maxim admisă (Ordinul 756/1997)	100	20	1

Pentru toate cele trei metale analizate concentrațiile efective care au determinat inhibiția creșterii la *P. putida* cu 50% (EC50) au depășit valorile normale prevăzute de Ordinul 756/1997 pentru aprobarea Reglementării privind evaluarea poluării mediului. EC50 a fost de 1,3 ori mai mare decât valoarea limită normală pentru zinc (100 mg/l), de 1,6 ori mai mare decât limita normală pentru plumb (20 mg/l) și de 2,5 ori mai mare decât limita normală pentru cadmiu (1 mg/l).

Analiza statistică a datelor a evidențiat o corelație pozitivă semnificativă la $p < 0,01$ între procentul inhibiției creșterii tulpinii de *P. putida* și concentrația de zinc ($r = +0,927$), plumb ($r = +0,982$), respectiv cadmiu ($r = + 0,985$) din mediul de cultură, acest rezultat confirmând efectul negativ al metalelor asupra multiplicării bacteriei.

X. CONCLUZII GENERALE

A. Evaluarea microbiologică a solurilor poluate din județul Cluj

- Numărul de bacterii și intensitatea activităților enzimaticice au prezentat oscilații în funcție de sezon și de punctul de prelevare al probelor.
- În ordinea abundenței, bacteriile heterotrofe aerobe au fost urmate de către bacteriile amonificatoare, nitritbacterii, bacteriile denitrificatoare, nitratbacterii, bacteriile fier-reducătoare și bacteriile desulfificatoare.
- Numărul de bacterii și intensitatea activităților enzimaticice în zonele poluate sunt sensibil mai reduse decât în zona martor. Totuși prezența bacteriilor în solurile poluate denotă dezvoltarea, în mod natural, a toleranței la prezența metalelor.
- S-au stabilit corelații negative, statistic semnificative între concentrația metalelor, pe de o parte și numărul de bacterii, respectiv intensitatea activităților enzimaticice, pe de altă parte
- În ierarhia solurilor poluate, bazată pe valorile indicatorilor bacterieni, solul din zona protejată Cheile Turzii s-a situat pe prima din cele 8 poziții, ceea ce sugerează existența unei comunități bacteriene activă și echilibrată iar pe ultima poziție s-a situat solul din zona depozitului de hexaclorciclohexan, zonă parțial acoperită cu vegetație, din cauza concentrației ridicate de pesticide și metale grele.

B. Evaluarea impactului poluării cu Zn, Pb și Cd asupra populațiilor microbiene din sol

- Densitatea bacteriilor și intensitatea activităților enzimaticice au prezentat variații cantitative în funcție de tipul și concentrația metalului.
- Cele mai sensibile la poluare s-au dovedit a fi bacteriile nitrificatoare și activitățile dehidrogenazice.
- Prezența metalelor în concentrații crescute a avut un efect inhibitor puternic asupra speciilor rezistent și a determinat moartea celor sensibile la poluare. Aceste efecte toxice dovedesc faptul că mecanismele de rezistență nu oferă protecție la nivele crescute ale metalelor.

C. Efectele metalelor grele asupra viabilității celulare la *A. chroococcum* și *P. putida*

- Viabilitatea celulară, cuantificată prin testul cu albastru tripan, a variat în funcție de microorganism, tipul de metal și de concentrația metalului aplicat.

- Viabilitatea celulară nu a atins 100% în nici una dintre probe, evoluția fiind descendentă la *A. chroococcum* și *P. putida*, pe măsura creșterii concentrației metalelor, consecință a efectului inhibitor exercitat de metalele grele prezente în mediul de cultură. Viabilitatea celulară a fost mai ridicată la *P. putida* decât la *A. chroococcum*, astfel că *Azotobacter* poate fi considerată un indicator al nivelului de poluare mai sensibil, inclusiv la concentrații mici ale metalelor.
- Dinamica comparativă a arătat că ambele specii de microorganisme și-au păstrat viabilitatea în prezența tuturor metalelor, la toate concentrațiile, fără să coboare sub nivelul de 10^4 celule/ml. Acest lucru este consecința dezvoltării unor mecanisme de rezistență la toate metale analizate, care permit supraviețuirea microorganismelor în medii poluate.

D. Efectele metalelor grele asupra creșterii la *P. putida*

- % inhibiției creșterii la *P. putida* a avut o evoluție ascendentă, pe măsura creșterii concentrațiilor de metale.
- În ordinea toxicității, stabilită în funcție valorile concentrațiilor metalelor care au determinat inhibiția creșterii *P. putida* în proporție de 10% (EC10) și respectiv 50% (EC50), după 16 ore de incubare, cadmiul a fost cel mai toxic metal, urmat de plumb și de zinc.
- Pentru toate cele trei metale analizate EC50 a fost înregistrată la concentrații mai mari decât valorile normale prevăzute de Ordinul 756/1997, ceea ce arată că *P. putida* a răspuns la excesul de Zn^{2+} sau la prezența Cd^{2+} și Pb^{2+} prin mecanisme de rezistență.
- În concluzie, datorită numeroaselor capacități, utilizarea microorganismelor în programele de evaluare și monitorizare sunt necesare, schimbările în microflora unui sit specific indicând schimbări în calitatea mediului.
- Pentru a surprinde cât mai fidel modificările determinate de impactul antropic trebuie utilizați mai mulți indicatori (măsurători ale biomasei microbiene, respirației, microorganisme cheie, activități enzimatic etc.).
- Activitățile enzimelor din sol se modifică mai devreme decât alți parametri. De aceea, determinarea activităților enzimatică sunt mai adecvate, acestea oferind date sugestive într-un timp mult mai scurt decât analizele microbiologice, privind procesele biodegradative din sol.

- Având în vedere rolul deosebit de important al solului, fiind de fapt un mijlocitor activ indispensabil al derulării proceselor care se află la baza vieții pe Terra, este necesară și extrem de importantă biomonitorizarea complexă a calității solului pentru identificarea și înlăturarea surselor de poluare în vederea menținerii unui potențial ecologic maxim. O biomonitorizare precisă este esențială în anticiparea riscurilor pentru mediu și sănătatea umană.
- Totuși, pe viitor, sunt necesare studii aprofundate pentru înțelegerea diversității genetice a populațiilor microbiene sensibile și tolerante la metal și interacțiunilor metal-microorganism în condițiile naturale din sol.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Aleen, O., N.**, 1957, Experiments in Soil Bacteriology, *Burgess*, Minneapolis, Minnesota.
- Alexander, M.**, 1965, Most probable number method for microbial populations, în Black, C., A., Evans, D., D., White, J., L., Ensminger, L., E., Clark, F., E., (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Am. Soc. Agron.*, Madison, Wisconsin, 1467-1472.
- Atlas, R., M.**, 2004, Handbook of Microbiological Media, 3rd edition, *CRC Press*, New York.
- Berlanga, M., Montero, T., Hernández-Borrell, J., Guerrero, R.**, 2006, Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats, *International Microbiology*, **9**, 95-102.
- Dick, R., P., Breakwell, D., P., Turco, R., F.**, 1996, Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators, In: Dick, R., P., Lal, R., Lowery, B., Rice, C., W., Stott, D., E. (eds.): *Methods of assessing soil quality, SSSA Spec. Publ.*, **49**, Madison, 247-271.
- Drăgan-Bularda, M.**, 2000, Microbiologie generală – lucrări practice, ed.III, Universitatea “Babeş-Bolyai”, Cluj-Napoca, 175-189.
- Garcia-Ruiz, R., Ochoa, V., Belen Hinojosa, M., Carreira, J., A.**, 2008, Suitability of enzyme activities for the monitoring of soil quality improvement in organic agricultural systems, *Soil Biology and Biochemistry*, **40**, 2137-2145.
- Hu, C., Cao, Z., P.**, 2007, Size and activity of the soil microbial biomass and soil enzyme activity in long-term field experiments, *World Journal of Agricultural Sciences*, **3**(1), 63-70.
- Lee, I., S., Kim, O., K., Chang, Y., Y., Bae, B., Kim, H., H., Baek, K., H.**, 2002, Heavy metal concentration and enzyme activities in soil from contaminated Korean shooting range, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **94**, 406-411.
- Malcom, P.**, 1994, Desiccation tolerance of prokaryotes, *Microbiol Rev.*, **58**, 755-805.
- Muntean, V.**, 1995-1996, Bacterial indicator of mud quality, *Contribuții Botanice*, **33**, p. 73-76.
- Muntean, V., Groza, G., Nicoară, A., Fărcaș, S., Mureșan, I.**, 2006, Enzymological study on iron mine spoils submitted to bioremediation, *Studii și Cercetări, Biologie (Bistrița)*, **11**, 109-116.
- Pârvu, R., Stanciu, E., Lorinczi, F., Kiss, S., Drăgan-Bularda, M., Rădulescu, D.**, 1977, Iron-reducing capacity of soil micromycetes, Fourth Symp. Soil Biology, 147-154, *Ed. Ceres*, București.
- Pochon, J.**, 1954, Manuel Technique d'Analyse en Microbiologie du Soil, *La Turelle*, Saint-Mande.
- *** (1984) STAS 7184/1-84 Soluri. Recoltarea probelor pentru studii pedologice și agrochimice.
- *** (1997) Ordinul Ministerului Apelor, Pădurilor și Protecției Mediului nr. 756 pentru aprobarea Reglementării privind evaluarea poluării mediului.
- *** (1997) SR ISO 10381-6, Calitatea solului. Linii directoare pentru colectarea, manipularea și conservarea solurilor destinate unui studiu în laborator a proceselor microbiene aere.
- *** (1998) SR ISO 11464:1998 Calitatea solului. Pretratamentul eșantioanelor pentru analizele fizico-chimice.
- *** (2001) SR EN ISO 10712, Calitatea apei, Test de inhibiție a creșterii *Pseudomonas putida* (test de inhibiție a multiplicării celulelor de *Pseudomonas*)