



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

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

CARACTERIZAREA COMUNITĂȚILOR MICROBIENE
DIN MEDII POLUATE

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
CSI Dr. Cristina Ligia PURCĂREA

DOCTORAND:
Aurelia (VLAD) PODOSU

2024

CUPRINS

LISTĂ DE ABREVIERI	5
INTRODUCERE	6
I. DATE BIOGEOGRAFICE ȘI BIOECONOMICE ALE ECOSISTEMULUI RÂULUI PASĂREA	9
I.1. Râul Pasărea și încadrarea sa în bazinul hidrografic de câmpie București – Ilfov	9
I.2. Ecosistemul râului Pasărea și al împrejurimilor.....	10
I.3. Aspecte demografice și economice în bazinul râului Pasărea ca surse potențiale de poluare	12
I.4. Apele uzate captate de râul Pasărea	13
II. STRUCTURA ȘI DINAMICA MICROORGANISMELOR ÎN ECOSISTEMELE ACVATICE	15
II.1. Aspecte generale ale mediilor acvatice	15
II.2. Factori ecologici (fizico-chimici) care influențează bacterioplanctonul	16
II.2.1. Lumina	16
II.2.2. Temperatura	17
II.2.3. Turbiditatea	17
II.2.4. Gazele dizolvate și valoarea pH.....	18
II.2.5. Compoziția ionică	19
II.2.6. Curenții și viteza de curgere	20
II.3. Microorganismele din râuri.....	20
II.4. Rolul microorganismelor în funcționarea ecosistemelor	23
II.4.1. Circuitul biogeochimic al carbonului (C)	25
II.4.2. Circuitul biogeochimic al azotului (N)	26
II.4.3. Circuitul biogeochimic al sulfului (S).....	27
II.5. Enzime microbiene extracelulare.....	28

III. ASPECTE MICROBIOLOGICE PRIVIND POLUAREA ECOSISTEMELOR ACVATICE.....	30
III.1. Poluarea chimică.....	31
III.2. Poluarea fizică	33
III.3. Poluarea biologică	34
III.4. Microorganismele în ecosisteme acvatice poluate	34
SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI	36
IV. MATERIALE ȘI METODE.....	37
IV.1. Zonele de studiu și prelevarea probelor	37
IV.2. Determinarea parametrilor fizico-chimici ai apei	38
IV.3. Analize statistice.....	38
IV.4. Evidențierea microorganismelor implicate în ciclurile biogeochimice.....	39
IV.4.1. Microorganismele implicate în circuitul biogeochimic al carbonului	39
IV.4.2. Microorganismele implicate în circuitul biogeochimic al sulfului	40
IV.4.3. Microorganismele implicate în circuitul biogeochimic al azotului.....	41
IV.5. Evidențierea grupelor de microorganismele indicatoare de poluare.....	42
IV.5.1. Bacterii coliforme totale.....	42
IV.5.2. Bacterii coliforme fecale	43
IV.5.3. Bacterii din grupul streptococilor fecali	43
IV. 6. Colorația Gram	44
IV.7. Determinarea activităților enzimaticice	44
IV.7.1. Catalaza și oxidaza	44
IV.7.2. Activități hidrolazice	45
IV.8. Extracția ADN genomic, amplificarea PCR și secvențierea genei 16S ARNr	47
IV. 9. Analiza secvențelor de ADN și analiza filogenetică.....	47
IV.10. Evaluarea gradului de poluare al apei	47

V. DETERMINAREA VARIAȚIEI SEZONIERE A PARAMETRILOR FIZICO-CHIMICI ȘI A COMPOZIȚIEI CHIMICE A RÂULUI PASĂREA.....	49
V.1. Parametrii fizico-chimici ai râului Pasărea.....	49
V.1.1. Măsurători in situ ale parametrilor fizico-chimici în două sectoare ale râului Pasărea.....	49
V.1.2. Variațiile spațio-temporale ale parametrilor fizico-chimici ai râului Pasărea.....	55
V.2. Compoziția chimică a probelor de apă din râul Pasărea.....	66
V.2.1. Variația sezonieră a compoziției chimice a probelor de apă de la Podul Dimieni	67
V.2.2. Variația sezonieră a compoziției chimice a probelor de apă prelevate de la Barajul Tunari al râului Pasărea	73
V.2.3 Profilul spațio-temporal al compușilor chimici din râul Pasărea.....	77
V. 3. Concluzii.....	84
VI. CARACTERIZAREA SPAȚIO-TEMPORALĂ A COMUNITĂȚILOR MICROBIENE DIN RÂUL PASĂREA	86
VI.1 Microorganisme implicate în ciclurile biogeochimice ale carbonului, sulfului și azotului	86
VI.1.1. Bacterii heterotrofe (ciclul carbonului).....	86
VI.1.2. Bacterii implicate în ciclul biogeochimic al sulfului.....	91
VI.1.3. Bacterii implicate în ciclul biogeochimic al azotului	94
VI. 2. Distribuția anuală a diferitelor grupe de microorganisme implicate în ciclurile biogeochimice C/N/S în râul Pasărea	105
VI.3. Distribuția spațio-temporală a microorganismelor potențial patogene în râul Pasărea.....	107
VI.3.1. Bacterii coliforme totale.....	107
VI.3.2. Bacterii coliforme fecale	109
VI.3.3. Streptococi fecali.....	110
VI.4. Concluzii	112

VII. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA TULPINILOR BACTERIENE DIN RÂUL PASĂREA.....	114
VII.1. Izolarea și caracterizarea morfo-funcțională a microorganismelor din râul Pasărea.....	114
VII.2. Identificarea moleculară a tulpinilor bacteriene pe baza secvenței genei 16S ARNr	121
VII.3. Analiza filogenetică a tulpinilor izolate din râul Pasărea	123
VII.4. Producerea de enzime de către izolatele bacteriene din râul Pasărea	126
VII.4. Concluzii	131
VIII. IMPACTUL POLUĂRII ASUPRA DIVERSITĂȚII MICROBIENE A RÂULUI PASĂREA.....	133
VIII.1. Evaluarea gradului de poluare microbiană pe sectoarele Barajul Tunari și Podul Dimieni ale râului Pasărea.....	133
VIII.2. Influența parametrilor fizico-chimici asupra comunităților microbiene din râul Pasărea.....	136
VIII.3. Impactul poluării chimice asupra comunităților microbiene din râul Pasărea.....	148
VIII.3. Reziliența microorganismelor din râul Pasărea la diverși poluanți chimici	151
VIII.4. Concluzii.....	154
CONCLUZII	157
PERSPECTIVE	161
BIBLIOGRAFIE	162
ANEXA 1	178
DISEMINAREA REZULTATELOR	195

INTRODUCERE

Activitatea biologică a ecosistemelor este determinată de componentele microbiene care stabilesc echilibrul între substanțele organice și anorganice și între materia vie și cea nevie. Apele curgătoare reprezintă un mediu particular din punct de vedere microbiologic, deoarece compoziția lor microbiană suportă modificări majore de la izvoare până la confluența râului cu alte ape curgătoare sau cu sistemul fluviu-mare. Conținutul microbian al apelor este influențat de bazinul hidrografic, aportul afluenților, condițiile fizico-chimice și climatice și, în mod particular, de impactul antropic.

Calitatea apei este esențială pentru toate formele de viață de pe Pământ, având un impact major asupra comunităților umane. De-a lungul istoriei, comunitățile umane s-au dezvoltat în proximitatea rezervelor de apă (ape curgătoare, lacuri, mări, oceane), folosind resursele de apă pentru diverse activități, ceea ce a dus la creșterea impactului antropic asupra calității apei. Poluarea cu reziduuri rezultate din activități industriale, agricole, recreative sau alte activități umane conduce la modificări semnificative în compoziția chimică și caracteristicile fizico-chimice ale apei. Acestea influențează comunitatea microorganismelor din ecosistemul acvatic antropizat, având efecte directe asupra ciclurilor biogeochimice.

În prezent nu există un sistem universal acceptat pentru clasificarea apei ca fiind poluată sau nepoluată. Există sisteme normative care clasifică apa în mai multe clase de calitate, permițând utilizarea apei în anumite tipuri de activități. În acest studiu, probele de apă investigate au fost încadrate în categoriile de apă poluată sau nepoluată, prin raportare la valorile parametrilor fizico-chimici și microbiologici stabiliți pentru calitatea apei potabile furnizate sistemelor socio-economice (standardul APHA, 1998; Lazăr și colab., 2014; Bernasconi și colab., 2003; Janelidze și colab., 2011) din zona investigată.

Diversitatea microbiologică a unui ecosistem acvatic este esențială pentru funcționarea acestuia în ceea ce privește fluxul de materie, energie, informații și cicluri biogeochimice (Azam și colab., 1983). Totodată, modificările fizico-chimice ale ecosistemului se reflectă în activitatea microbiologică a acestuia.

Ținând cont de faptul că rezervele de apă sunt fundamentale pentru activitățile umane zilnice, iar cunoașterea structurii lor (micro)biologice și chimice este de o importanță deosebită pentru evaluarea calității acestuia, studiile coroborate asupra componenței chimice și microbiologice a apelor sunt esențiale pentru caracterizarea calității acestora.

Termenul sau noțiunea de poluare, cu înțeles lingvistic ca transformarea unui mediu normal în unul nociv ca urmare a prezenței unor agenți de natură chimică sau biologică are la bază percepțiile umane arbitrare în funcție de un anumit grad de toleranță al modificării. O definiție sugestivă a acestei noțiuni poate fi considerată cea propusă de Lynn Margulis care arată că „poluarea este un amestec de ignoranță și de aroganță din partea unei ființe care s-a autodefiniț ca fiind *Homo sapiens* și superioară altor ființe, față de mediul înconjurător”. Termenul a pătruns în limbajul curent al factorilor politici decidenți, fapt ce a condus la un interes sporit în ultima perioadă pentru cercetări în acest domeniu.

În această lucrare de doctorat au fost cercetate două sectoare ale râului Pasărea (Podul Dimieni și Barajul Tunari) situate în vecinătatea unor unități economice esențiale pentru desfășurarea activităților cotidiene, dar și a unei comunități umane puternic dezvoltate, cu un impact antropogenic semnificativ. Prezentul studiu a fost orientat în principal spre investigarea sectorului neamenajat al râului Pasărea, cuprins între podul Dimieni și barajul Tunari, zone stabilite și ca puncte de prelevare a probelor pe raza localității Tunari, din județul Ilfov, situate în proximitatea unor agenți economici de importanță națională, dar și a unor complexe rezidențiale construite în ultima perioadă de timp.

Investigațiile derulate pe parcursul a patru sezoane au venit în continuarea unui studiu derulat anterior, la solicitarea Administrației Naționale Apele Române, privind mortalitatea piscicolă ridicată în acest sector și au contribuit la fundamentarea științifică a fenomenului ecologic negativ consemnat. Studiile acestei cercetări au fost orientate spre evidențierea compoziției chimice a sectorului de apă, a parametrilor fizico-chimici care îl pot defini și a comunităților microbiene care se dezvoltă în apa acestui râu, precum și a unor metaboliți extracelulari ai acestora cu potențial în modelarea biologică a calității râului Pasărea, în contextul unor amenajări în aval pentru exploatarea piscicole care livrează produsele în piața de consum.

Această teză de doctorat este structurată în două părți, prima parte cuprinde date geografice și economice despre ecosistemul râului Pasărea și zonele adiacente, apele uzate captate de râul Pasărea. Următorul capitol vizează date cu privire la principalii factori care influențează dinamica ecosistemelor acvatice, în principal râuri/ape curgătoare și rolul microorganismelor în ciclurile biogeochimice ale carbonului, azotului și sulfului și rolul enzimelor extracelulare în cadrul acestora. În al treilea capitol este abordată poluarea ecosistemelor acvatice din punct de vedere microbiologic. Contribuțiile originale sunt descrise în următoarele 5 capitole, începând cu scopul și obiectivele acestei teze, urmată de descrierea materialelor și metodelor și a celor 4 studii ce au fondat prezenta cercetare, în

cadrul căroră au fost vizate caracterizarea parametrilor fizico-chimici, rolul microorganismelor implicate în ciclurile biogeochimice ale râului Pasărea, izolarea și caracterizarea morfofuncțională a microorganismelor din râul Pasărea și impactul poluării asupra unor grupe de microorganisme din râul Pasărea. La final, sunt prezentate concluziile și perspectivele, lucrarea fiind însoțită și de o anexă cu figuri, bibliografia și lista cu lucrările/articolele în cadrul căroră au fost diseminate rezultatele din prezenta lucrare.

I. DATE BIOGEOGRAFICE ȘI BIOECONOMICE ALE ECOSISTEMULUI RÂULUI PASĂREA

I.1. Râul Pasărea și încadrarea sa în bazinul hidrografic de câmpie București – Ilfov

Râul Pasărea, afluent al Dâmboviței, izvorăște din Pădurea Otopeni și traversează localitățile Tunari, Afumați, Găneasa, Brănești și Fundeni, înainte de a se vărsa în Dâmbovița (Cocoș, 2006). Cu un debit mediu anual sub 1 m³/s, a fost amenajat un baraj (Tunari II) pentru a reglementa debitul și a preveni inundațiile. Râul are un afluent, Șindrilița, și drenează o suprafață de 254 km² (Cocoș, 2006).

I.3. Aspecte demografice și economice în bazinul râului Pasărea ca surse potențiale de poluare

Comunele traversate de râul Pasărea au populații variind între 6.300 (Tunari) și 9.400 (Brănești) de locuitori (Planul Județean de Analiză și Acoperire a Riscurilor, Comitetul Județean pentru situații de urgență Ilfov, 2021). Comuna Tunari se află în apropierea Aeroportului Internațional Henri Coandă, iar județul Ilfov este industrializat cu agenți economici activi în diverse domenii (Cepoiu, 2007). Activitățile umane influențează în mod direct sau indirect cursul și calitatea apei, impactând în mod negativ sănătatea ecosistemului acvatic al râului Pasărea, conform Raportului de cercetare nr. 471/27/02.2019 al Institutului de Biologie din București, din cadrul Academiei Române, realizat la solicitarea Administrației Naționale „Apele Române”, Administrația Bazinală de Apă Argeș Vedea și Sistemul de Gospodărire a Apelor Ilfov-București. Râul Pasărea a fost încadrat la clasa a IV-a de calitate pentru ionul amoniu, iar lacul Moara Domnească a arătat valori ridicate de amoniu și azoțiți, indicând o eutrofizare severă și prezența pesticidelor (Raport de cercetare nr. 471/27/02.2019, Institutul de Biologie din București, Academia Română; Sandu și colab., 2023).

II. STRUCTURA ȘI DINAMICA MICROORGANISMELOR ÎN ECOSISTEMELE ACVATICE

II.1. Aspecte generale ale mediilor acvatice

Mediile acvatice, incluzând apele dulci și sărate, sunt ecosisteme complexe și variate, unde apa facilitează circulația substanțelor nutritive și a gazelor esențiale, susținând o diversitate de microorganisme care contribuie la ciclurile biogeochimice. Microorganismele au un rol esențial în producția primară și reciclarea nutrienților, influențate de factori precum temperatura, pH-ul și oxigenul dizolvat, care determină adaptarea și dinamica acestora. Populațiile bacteriene din aceste ecosisteme sunt extrem de dinamice, răspunzând rapid la schimbările sezoniere și la disponibilitatea resurselor esențiale, cum ar fi carbonul, azotul și fosforul (Madigan și colab., 2014). Microorganismele din mediile acvatice joacă un rol crucial în ciclurile biogeochimice, participând activ la procese precum fotosinteza, fixarea azotului, descompunerea materiei organice și reciclarea nutrienților. (Lazăr și colab., 2016).

II.2. Factori ecologici (fizico-chimici) care influențează bacterioplanctonul

II.2.1 Lumina

Intensitatea și durata luminii influențează direct productivitatea acestora, în timp ce lumina UV poate afecta negativ bacteriile prin daune la nivelul ADN-ului. În zonele adânci, unde lumina pătrunde mai puțin, predomină bacteriile heterotrofe, adaptate condițiilor de întuneric (Pommier și colab., 2007).

II.2.2 Temperatura

Temperatura apei influențează rata metabolică și activitatea de descompunere a bacteriilor planctonice, cu temperaturi extreme care pot inhiba activitatea acestora și modifica structura comunităților bacteriene, de la psihrofile la mezofile (Kirchman și colab., 2008).

II.2.3 Turbiditatea

Turbiditatea, influențată de sestonul aflat în suspensie, afectează microorganismele acvatice prin modularea sedimentării, iar în mediile oligotrofe, cum sunt lacurile și râurile, cantitatea de seston este în general scăzută (Rügner, 2013). Turbiditatea influențează pătrunderea luminii în apă, afectând adâncimea fotosintezei pentru microorganisme și, prin

particulele organice în suspensie, oferă suport pentru aderarea microorganismelor, facilitând deplasarea și degradarea materiei organice (Rusănescu, 2011; Ardelean, 2012).

II.2.4 Gazele dizolvate și valoarea pH

Gazele dizolvate, precum CO₂, O₂ și N₂, joacă un rol crucial în ecosistemele acvatice, susținând procese esențiale precum fotosinteza, respirația și ciclurile biochimice (David Sigeo, 2005). CO₂ provine din atmosferă și respirația organismelor, fiind indispensabil fotosintezei, respirației și bacteriilor aerobe.

Un alt factor fizico-chimic crucial este pH-ul care afectează bacterioplanctonul. Majoritatea bacteriilor acvatice preferă un mediu cu pH neutru sau ușor alcalin. Schimbările de pH pot afecta direct structura membranelor celulare bacteriene și funcțiile enzimaticе, influențând astfel creșterea și supraviețuirea bacteriilor (Rappé și Giovannoni, 2003). În mediile acvatice acide, anumite specii bacteriene acidofile pot deveni dominante, în timp ce în mediile alcaline, speciile alcalofile sunt mai bine adaptate (Zwart și colab., 2002).

II.2.5 Compoziția ionică

Salinitatea și compoziția ionică diferențiază mediile acvatice dulci și marine, determinând tipurile de microorganisme care le pot popula, deși puține specii pot supraviețui în ambele (Zarnea și colab., 1994; Enache și colab., 2004). Apele oceanice au o salinitate medie de 3,5%, iar valori extreme, ca în Marea Moartă, pot ajunge la 340 g/l de săruri (Zarnea și colab., 1994). Variabilitatea salinității influențează activitatea și diversitatea bacteriilor, bacteriile halofile preferând salinitatea ridicată, în timp ce bacteriile dulcicole preferă salinitatea scăzută, schimbările rapide pot provoca stres osmotic (Enache și colab., 2007; Logares și colab., 2009) și afectează interacțiunile bacteriene, precum competiția și simbioza (Mou și colab., 2008).

II.2.6 Curenții și viteza de curgere

Curenții din bazinele acvatice influențează semnificativ microbiota, facilitând transportul nutrienților, distribuția uniformă a microorganismelor și oxigenarea straturilor adânci, esențială pentru dezvoltarea ecologică. Aceștia apar atât în ape curgătoare, cât și în ape stătătoare, fiind generați de factori precum gravitația și diferențele de temperatură și nivel (Mihăescu, 2000; Zarnea, 1994).

II.3 Microorganismele din râuri

Microbiota apelor curgătoare include o varietate de bacterii, ciuperci, protozoare și virusuri, esențiale pentru echilibrul ecologic prin ciclul nutrienților, descompunerea materiei organice și eliminarea poluanților. Factori precum temperatura, pH-ul și oxigenul, influențează diversitatea acestora, iar activitățile antropice pot perturba acest echilibru (Ruiz-González și colab., 2015; Hossain și colab., 2021). Genuri de bacterii precum *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Microcystis*, *Clostridium*, *Acinetobacter* și *Vibrio* joacă roluri specifice în procesele de descompunere, bioremediere și menținerea calității apei. Monitorizarea acestor comunități bacteriene este crucială pentru protejarea sănătății publice și gestionarea sustenabilă a apelor (Pepper și Gerba, 2015; Towner, 2009).

II.4 Rolul microorganismelor în funcționarea ecosistemelor

Microorganismele, esențiale pentru echilibrul ecologic, susțin procesele vitale ale ecosistemelor prin ciclul nutrienților și descompunerea materiei organice (Zarnea, 1994; Lazăr și colab., 2016). Apele curgătoare prezintă o diversitate microbiană dinamică, influențată de factorii fizico-chimici, bazinul hidrografic și impactul antropic, cum ar fi deversările industriale și agricole (Kräuse și colab., 2022; Sinton și colab., 1993). Creșterea microorganismelor depinde de nutrienții din apă, iar în condiții de poluare organică, populațiile microbiene pot accelera procesele ecologice, afectând echilibrul biogeochimic (Lazăr și colab., 2017). Bacteriile, adaptabile și versatile metabolic, utilizează diverse substraturi, contribuind la reciclarea nutrienților și menținând stabilitatea ecosistemelor (Coyte și colab., 2015; Omelon, 2016).

II.4.1 Circuitul biogeochimic al carbonului (C)

Carbonul, element esențial al materiei organice și anorganice, este fixat din atmosferă de microorganisme autotrofe prin fotosinteză, transformându-se în compuși organici care susțin biomasa și, prin respirație și descompunere, este eliberat în atmosferă, asigurând echilibrul ciclului carbonului între biosferă, atmosferă, hidrosferă și litosferă (Zarnea, 1984; Ardelean, 2011; Lazăr și colab., 2017).

II.4.2. Circuitul biogeochimic al azotului (N)

Azotul, esențial pentru sinteza proteinelor și acizilor nucleici, este transformat din forma sa atmosferică (N₂) în forme accesibile organismelor prin procese de fixare, realizate de microorganisme simbiotice, precum *Rhizobium*, urmate de amonificare, nitrificare și

denitrificare, care mențin echilibrul azotului în sol și ecosisteme acvatice (Ardelean, 2012; McCabe, 2011; Kräuse și colab., 2022;).

II.4.3. Circuitul biogeochimic al sulfului (S)

Sulful, esențial pentru viață, circulă în natură prin procese microbiene de mineralizare, oxidare și reducere, transformându-se între forme organice și anorganice; bacteriile descompun compuși organici, oxidizează sulful la sulfati și reduc sulfatii la hidrogen sulfurat, menținând echilibrul ecologic și susținând reciclarea nutrienților (Azam și colab., 1983; Lazăr și colab., 2017).

II.5. Enzime microbiene extracelulare

Enzimele extracelulare bacteriene, reglate de condițiile de mediu, joacă un rol esențial în descompunerea materiei organice, mineralizarea nutrienților și detoxifierea poluanților în ecosistemele acvatice, iar activitatea lor este folosită ca indicator al calității apei și al impactului poluării (Ruginescu și colab., 2020; Cojocaru și colab., 2007).

III. ASPECTE MICROBIOLOGICE PRIVIND POLUAREA ECOSISTEMELOR ACVATICE

Monitorizarea calității apei, bazată pe evaluări fizice, chimice, biologice și microbiologice, oferă date esențiale pentru gestionarea resurselor acvatice și evaluarea impactului activităților umane (Fey și colab., 2004; Strâub și Chandler, 2003). Sursele de poluare variază de la scurgeri agricole cu pesticide și îngrășăminte la evacuări industriale și urbane, fiecare contribuind la acumularea de metale grele, poluanți organici și microplastice (Liu și colab., 2024). Aceste procese sunt influențate și de schimbările climatice, care redistribuie poluanții prin inundații și precipitații crescute (Thanigaivel și colab., 2023). În ansamblu, evaluarea și clasificarea tipurilor de poluare acvatică sunt esențiale pentru menținerea calității apei și protecția sănătății publice (Enache și colab., 2017).

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI

Scopul acestei teze de doctorat a constat în evaluarea gradului de poluare al râului Pasărea prin analiza variabilității spațio-temporale a caracteristicilor fizico-chimice, a compoziției chimice și microbiologice monitorizate în două sectoare ale acestui râu, și anume Barajul Tunari și Podul Dimieni, pe parcursul a patru sezoane.

Principalele obiective ale prezentei teze de doctorat au fost:

- Determinarea *in situ* a parametrilor fizico-chimici ai probelor de apă, colectate de la Barajul Tunari și Podul Dimieni, pe parcursul a patru sezoane consecutive
- Identificarea variației sezoniere a compoziției chimice a probelor de apă în cele două puncte de prelevare prin analize XRF (spectrometru cu fluorescență cu raze X)
- Determinarea profilului microbiologic al probelor de apă colectate la Barajul Tunari și Podul Dimieni de-a lungul celor patru sezoane, ale principalelor grupe de microorganisme implicate în circuitele carbonului (microorganisme heterotrofe), sulfului (bacterii sulfat-reducătoare), azotului (bacterii amonificatoare, nitrit-bacterii, nitrat-bacterii, bacterii denitrificatoare) și a grupele indicatoare de poluare (bacterii coliforme totale, bacterii coliforme fecale, streptococi fecali)
- Izolarea și identificarea taxonomică pe baza secvenței genei 16S ARNr a unor tulpini bacteriene din râul Pasărea
- Caracterizarea funcțională a tulpinilor bacteriene izolate în vederea evaluării capacității acestora de a sintetiza enzime cu potențial degradativ al macromoleculelor din compoziția chimică complexă a ecosistemului acvatic poluat
- Evaluarea gradului de poluare chimică și microbiologică al râului Pasărea

IV. MATERIALE ȘI METODE

IV.1 Zonele de studiu și prelevarea probelor

Probele de apă analizate au fost prelevate din râul Pasărea, în zona localității Tunari, județul Ilfov, din două puncte de prelevare, respectiv Podul Dimieni (44055'24.9"N, 27014'34.4"E) și Barajul Tunari (44054'73.7"N, 26016'23.0"E).

Prelevările au fost efectuate sezonier, în perioada de vară (iulie), toamnă (noiembrie), iarnă (februarie) în anul 2020 și de primăvară (aprilie) în anul 2021. Probele de apă au fost colectate în recipiente de sticlă transparentă, sterile, de 500 ml și păstrate la o temperatură de 4°C pe parcursul transportului la laboratorul pentru analize.

IV.2. Determinarea parametrilor fizico-chimici ai apei

Adâncimea și transparența apei, în punctele de prelevare, au fost determinate utilizând discul Secchi (Hach, SUA).

Parametrii fizico-chimici ai apei au fost mășurați *in situ*, în fiecare punct de prelevare de pe râul Pasărea, folosind multiparametrul HI 9828 (Hanna Instruments) pentru determinarea valorilor de turbiditate (NTU), potențialul oxido-reducător - ORP (mV), saturația în oxigen-OD(%), salinitatea apei (PSU), materiile în suspensie/total solide dizolvate – TDS (ppm), conductivitatea ($\mu\text{S}/\text{cm}$), oxigenul total dizolvat ($\text{mg O}_2/\text{L}$), temperatura apei ($^{\circ}\text{C}$) și valoarea pH.

Compoziția chimică a probelor de apă a fost determinată pe baza unei metode semicantitative prin analiza XRF (spectrometrie cu fluorescență cu raze X) utilizând spectrometrul XRF ZSX100e Supermini (Rigaku Corporation, Japonia) (Neagu și colab., 2014; 2021).

IV.3. Analize statistice

Prelucrarea statistică a datelor fizico-chimice a fost realizată cu ajutorul testului t-student. Reprezentarea grafică a fost realizată utilizând programul GraphPad Prism5 (<https://www.graphpad.com/>).

IV.4. Evidențierea microorganismelor implicate în ciclurile biogeochimice

Determinarea bacteriilor implicate în circuitele biogeochimice ale carbonului, sulfului și azotului precum (microorganisme heterotrofe aerobe, bacterii sulfat-reducătoare, bacterii amonificatoare, bacterii nitrificatoare, bacterii nitratoare și bacterii denitrificatoare) precum și a bacteriilor indicatoare de poluare (bacterii coliforme fecale, coliforme totale și

a streptococi fecali) a fost realizată prin cultivarea pe medii selective specifice, solide sau lichide (mediu bulion nutritiv solid, Postgate, WanNiell, Pochon, mediu cu agar nitrat, mediu denitrificatori, Levine agarizat, mediu cu azidă de sodiu) din probe și diluțiile zecimale ale acestora. Substanțele și reactivii utilizați au provenit de la firmele Sigma-Aldrich (Germania) și Merck (Germania). (standardul APHA, 1998; Lucaci și colab., 2019; Neagu și colab., 2021).

IV. 6. Colorația Gram

Colorația Gram (Helebian și colab., 1981; Lucaci și colab., 2019) a tulpinilor obținute a fost realizată asupra culturilor rezultate utilizând kitul de la firmele Sigma-Aldrich și Merck, Germania. Pentru confirmarea rezultatelor colorației Gram, a fost utilizat suplimentar și testul Kovacki care constă în aplicarea unei soluții cu KOH 3%. (Lucaci și colab., 2019; Azhar și colab., 2014).

IV.7. Determinarea activităților enzimaticice

IV.7.1. Catalaza și oxidaza

Producerea de catalază a fost pusă în evidență utilizând kitul *Catalase Assay Kit* de la firma Merck, Germania, pe baza reacției unei culturi bacteriene în mediul lichid la soluția de peroxid de oxigen (H_2O_2) 3%. (Steel, 1961; Azhar și colab., 2014).

Testul oxidazei se bazează pe oxidarea fenilendiamininei la indofenol în prezența citocrom - oxidazei din cultura bacteriană, în mediul lichid, utilizând kitul *Oxidaza Bactident* de la firma Merck, Germania (Steel, 1961; Shields și colab., 2010).

IV.7.2. Activități hidrolazice

Determinările calitative și semi-cantitative ale activităților enzimaticice hidrolazice (amilaze, proteaze, celulaze, esteraze și gelatinaze) pentru tulpinile bacteriene izolate au fost efectuate prin metoda cultivării în placă sau în mediul lichid (pentru evidențierea prezenței gelatinazei) (standardul APHA, 1998; Lazăr și colab., 2014;) utilizând medii de cultură specifice (Tabel IV.2) care conțin substratul corespunzător tipului de hidrolază investigată, incubate ulterior la 28° C , timp de 48 ore (Standardul APHA, 1998; Lazăr și colab., 2014;).

Rezultatele au fost exprimate calitativ (prezența activității) pe baza apariției unui halou de liză a substratului în mediul de cultură solid, și semi-cantitativ ca niveluri de activități enzimaticice (LEA) pe baza diametrului zonei de hidroliză (în milimetri), din care a fost scăzut diametrul spotului de cultură. (Enache și colab., 1999; Ruginescu și colab., 2020).

IV.8. Extracția ADN genomic, amplificarea PCR și secvențierea genei 16S ARNr

Un număr de 20 de tulpini bacteriene au fost selectate în vederea identificării la nivel de gen/specie prin metode moleculare. Acestea au implicat: extracția ADN-ului genomic, amplificarea *in vitro* prin tehnica PCR a genei ce codifică pentru ARNr 16S, secvențializarea ampliconilor, secvențele ADN au fost analizate raportat la cele din bazele de date NCBI folosind algoritmul BLASTN (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool).

Arborii filogenetici au fost construiți utilizând programul MEGA X, aplicat asupra aliniierilor multiple obținute utilizând algoritmul CLUSTALW (<https://www.megasoftware.net>).

IV.10. Evaluarea gradului de poluare al apei

Evaluarea gradului de poluare fizico-chimică a fost realizată pe baza valorilor de pH, a concentrației oxigenului dizolvat (DO) și a conținutului procentual de oxigen (DO%) al apei, în conformitate cu prevederile Ordinului 161/2006 emis de Ministerul Mediului și Gospodării Apelor.

Gradul de **poluare organică** cu microorganisme heterotrofe, bacterii amonificatoare, sulfat-reducătoare, bacterii denitrificatoare și al **poluării fecale** cu coliformi totali și coliformi fecali, determinat în acest studiu, a fost evaluat în funcție de concentrația microbiană a diferitelor tipuri de microorganisme, încadrându-se în 5 clase de poluare conform intervalelor crescătoare ale conținutului acestora în apă (Kohl, 1975; Lazăr și colab., 2015; Ardelean și colab., 2011; UE-Expert 2000/60/CE).

V. DETERMINAREA VARIAȚIEI SEZONIERE A PARAMETRILOR FIZICO-CHIMICI ȘI A COMPOZIȚIEI CHIMICE A RÂULUI PASĂREA

V.1. Parametrii fizico-chimici ai râului Pasărea

Râul Pasărea este un ecosistem dinamic caracterizat prin parametri fizico-chimici care fluctuează sezonier, în funcție de condițiile atmosferice, precum precipitațiile și intensitatea radiației solare, precum și de impactul antropic (Ojovan, Podosu și colab., 2021). Acești parametri au fost monitorizați de-a lungul celor patru sezoane (în două puncte de prelevare, respectiv Podul Dimieni și Barajul Tunari).

Pod Dimieni

Variația sezonieră a parametrilor fizico-chimici ai apei, înregistrați la punctul de prelevare Podul Dimieni al râului Pasărea, în cele patru sezoane (Tabel V.1), a indicat o alternanță a valorilor acestora atât dependente cât și independente de impactul antropic.

Tabel V.1. Variația sezonieră a parametrilor fizico-chimici ai apei înregistrați la punctul de prelevare Podul Dimieni al râului Pasărea în cele patru sezoane (valorile medii).

Parametri fizico-chimici	PODUL DIMIENI				Valoare medie anuală (\pm deviația standard)
	2020		2021		
	Vara (iulie)	Toamna (noiembrie)	Iarna (februarie)	Primăvara (aprilie)	
Temperatura ($^{\circ}$ C)	28,6	11	6,7	10,4	14,2 \pm 9,8
pH	8,4	8,2	6,8	7,4	7,7 \pm 0,7
Solide în suspensie/ TDS (ppm)	345	510	468	396	429,75 \pm 73,5
Conductivitate (μ S/cm)	691	1023	936	792	860,5 \pm 147,7
ORP (mV)	52,8	-293	43,4	-70	-66,7 \pm 160
DO (mg O ₂ /L)	4,7	0	0	13,5	4,54 \pm 6,3
DO (%)	62,2	0	0	83,5	36,42 \pm 42,9
Turbiditate (NTU)	16,7	36,6	29,3	22	26,1 \pm 8,6
Transparență (cm)	30	30	40	40	35 \pm 5
Salinitate (PSU)	0,3	0,51	0,4	0,4	0,4 \pm 0

În zona podului Dimieni, măsurătorile sezoniere ale calității apei au relevat diferențe notabile, valorile de pH au variat de la 6,82 iarna la 8,44 vara, indicând un mediu ușor alcalin. Concentrațiile solidelor dizolvate au fost mai mari decât în alte râuri din România și au prezentat o medie de 429,7 ppm, reflectând aportul de materie organică exogenă. Conductivitatea electrică a apei a înregistrat valori ridicate, sugerând un grad de mineralizare semnificativ, în special toamna (1023 μ S/cm). Valorile oxigenului dizolvat au fost 0 mg/L

toamna și iarna, indicând anoxie și poluare organică, iar transparența a scăzut în sezoanele calde din cauza încărcării cu sedimente și alge. Salinitatea a rămas scăzută, specifică apelor dulci, similar altor râuri din România.

Barajul Tunari

În cazul probelor de apă colectate de la Barajul Tunari, valorile parametrilor fizico-chimici au indicat de asemenea, variații sezoniere (Tabel V.2).

Tabel V.2. Variația sezonieră (valorile medii) a parametrilor fizico-chimici înregistrați la punctul de prelevare Barajul Tunari al râului Pasărea în cele patru sezoane

Parametri fizico-chimici	BARAJUL TUNARI				Valoare medie anuală (± deviația standard)
	2020		2021		
	Vara (iulie)	Toamna (noiembrie)	Iarna (februarie)	Primăvara (aprilie)	
Sezon (luna)					
Temperatura (°C)	28,6	11,6	3,8	12,5	14,1 ± 10,4
pH	8,2	9,1	9,5	8,9	8,9 ± 0,5
Solide în suspensie/ TDS (ppm)	354	385	454	445	409,5 ± 48
Conductivitate (μS/cm)	707	771	909	890	819,2 ± 96,5
ORP (mV)	12,8	-92	-66,7	35	-27,7 ± 61
DO (mg O ₂ /L)	1,8	2,8	1,2	8,6	3,6 ± 3,3
DO (%)	23	25	9,2	70,6	31,9 ± 26,7
Turbiditate (NTU)	6,8	21,5	16	25,5	17,4 ± 8,0
Transparență	90	30	40	40	50±23,45
Salinitate (PSU)	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4 ± 0

La Barajul Tunari, măsurătorile sezoniere ale calității apei au indicat variații semnificative, pH-ul a fost ușor alcalin, depășind ușor limitele admise în sezoanele reci, cu o medie de 8,9.

Concentrația de solide dizolvate a fost constant ridicată (409,5 ppm medie anuală), iar conductivitatea electrică, indicând mineralizarea, a variat între 707 μS/cm vara și 909 μS/cm iarna.

Oxigenul dizolvat a fost scăzut, între 1,2 mg/l (iarna) și 8,6 mg/l (primăvara), iar saturația în oxigen a arătat valori minime în majoritatea sezoanelor, indicând dificultăți de oxigenare.

Valorile turbidității au fost cuprinse între 6,8 NTU vara și 25,5 NTU primăvara, iar transparența ridicată în sezonul de vară a sugerat o apă relativ clară.

Transparența apei la Barajul Tunari variază sezonier, scăzând la 30 cm toamna din cauza precipitațiilor care cresc materiile în suspensie, și ajungând la 40 cm iarna și primăvara, când activitatea biologică scade și sedimentele se stabilizează. Media anuală a

transparenței este de 50 cm, dar cu o deviație mare, reflectând influența factorilor de mediu sezonieri.

Salinitatea apei a rămas relativ constantă între 0,3 și 0,5 PSU pe tot parcursul anului, fiind puțin mai ridicată decât valorile râului Dâmbovița, dar sub cele ale râului Diyala din Irak (Ioniță și colab., 2023; Al-Samawi și colab., 2016).

V 1.2. Variațiile spațio-temporale ale parametrilor fizico-chimici ai râului Pasărea

Reprezentările comparative ale parametrilor fizico-chimici ai apei din râul Pasărea au evidențiat variații semnificative spațio-temporale între ecosistemele specifice fiecărui sector, cât și sezonier. În particular, aceste diferențe au vizat turbiditatea, conductivitatea și concentrația oxigenului dizolvat din apă. Nu au fost observate diferențe semnificative între punctele de prelevare pentru salinitate, temperatură și rezistivitate.

V.2. Compoziția chimică a probelor de apă din râul Pasărea

Analizele XRF ale probelor de apă din cele două sectoare ale râului Pasărea, Podul Dimieni și Barajul Tunari, au evidențiat o compoziție sezonieră variabilă a ionilor metalici și nemetalici, inclusiv a unor elemente care fac parte din grupele de lantanide (Tabel V.4 și Tabel V.5).

Compoziția chimică a râului Pasărea a arătat variații sezoniere și diferențe între sectoarele de prelevare, cu prezența unor oxizi de metale rare precum bariul, ceriul, germaniul și terbiul, sugerând poluare antropică și un aport exogen de poluanți. Cea mai mare concentrație a fost înregistrată pentru BaO (73%-80% masă) iarna la Barajul Tunari, iar oxizii TiO₂ și CeO₂ au avut procente ridicate în vară și primăvară. Elementele toxice Sm₂O₃, Gd₂O₃ și TiO₂ au fost prezente în concentrații ridicate, cu riscuri ecologice și pentru sănătate. La Podul Dimieni, SiO₂ a fost constant ridicat, iar oxizii de Sm și Lu au prezentat variații sezoniere notabile, indicând necesitatea unei monitorizări continue pentru protejarea acestui ecosistem.

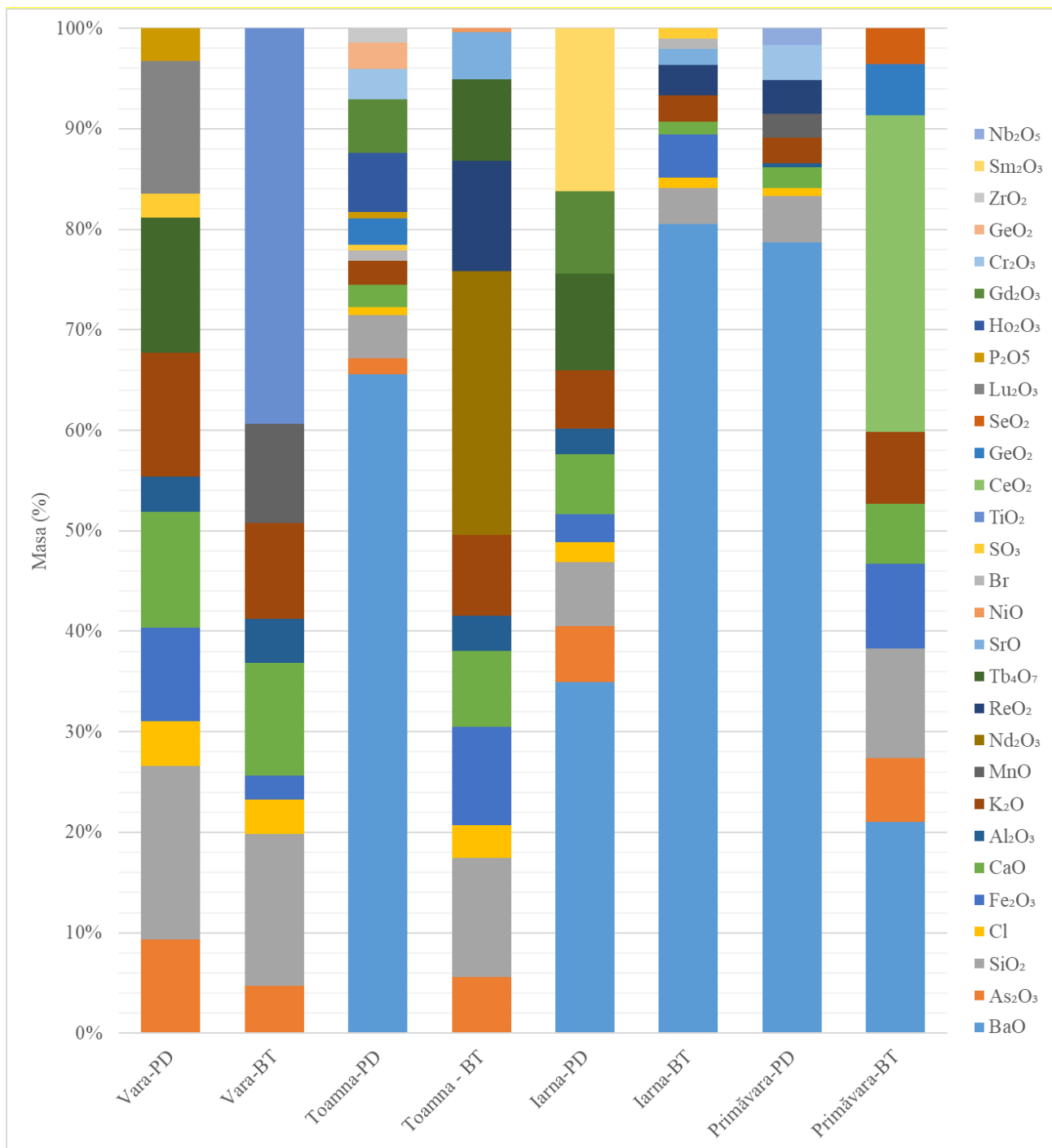


Figura V.21. Distribuția spațio-temporală a compușilor chimici în apa râului Pasărea.

VI. CARACTERIZAREA SPAȚIO-TEMPORALĂ A COMUNITĂȚILOR MICROBIENE DIN RÂUL PASĂREA

VI.1 Microorganisme implicate în ciclurile biogeochimice ale carbonului, sulfului și azotului

VI.1.1. Bacterii heterotrofe (ciclul carbonului)

În acord cu noul sistem de clasificare propus de Uniunea Europeană „Indicatori bacteriologici pentru calitatea apelor de suprafață”, numărul de colonii bacteriene heterotrofe corelat cu cinci clase de calitate, indică poluarea de natură organică (Lazăr și colab., 2015).

Abundența și morfologia coloniilor microbiene corespunzătoare sezoanelor de vară, toamnă și primăvară, la Podul Dimieni și sezonului de iarnă, la Barajul Tunari, ilustrează variații ale comunităților microbiene din râul Pasărea în funcție de anotimp și de punct de prelevare (Figura VI.1).

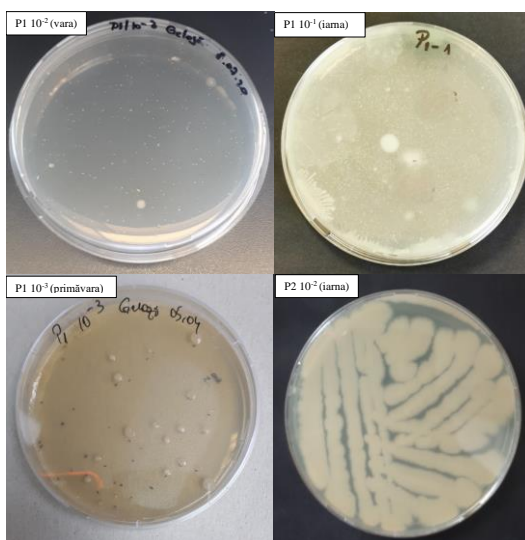


Figura VI.1. Evidențierea microorganismelor heterotrofe izolate din probele de apă, din punctele de prelevare Podul Dimieni (P1) Barajul Tunari (P2) în diferite sezoane.

În cazul Podului Dimieni, densitatea microorganismelor heterotrofe a variat între $3,2 \times 10^5$ (vara) și $4,5 \times 10^4$ (primăvara) (Tabel VI.1). Pentru proba din Barajul Tunari, cel mai mare număr de UFC/ml a fost evidențiat în proba prelevată în sezonul de iarnă, $1,7 \times 10^5$ și a înregistrat o scădere în sezonul de primăvară, respectiv $1,4 \times 10^2$ UFC /ml (Tabel VI.1).

Tabel VI.1. Densitatea sezonieră a microorganismelor heterotrofe aerobe din două puncte de prelevare ale râului Pasărea. Pod Dimieni (PD); Baraj Tunari (BT)

Sezon	Sector de prelevare	Densitate microorganisme heterotrofe Valoare medie (\pm deviația standard) (UFC/ml)
Vara (iulie 2020)	PD	$(3,2 \pm 0,22) \times 10^5$
	BT	$5,0 \pm 0,75 \times 10^4$
Toamna (noiembrie 2020)	PD	$3,8 \pm 0,40 \times 10^5$
	BT	$1,2 \pm 1,0 \times 10^3$
Iarna (februarie 2021)	PD	$9,9 \pm 0,50 \times 10^4$
	BT	$1,7 \pm 0,30 \times 10^5$
Primăvara (aprilie 2021)	PD	$4,5 \pm 0,30 \times 10^4$
	BT	$1,4 \pm 0,10 \times 10^2$

VI.1.2. Bacterii implicate în ciclul biogeochimic al sulfului

Bacterii sulfat-reducătoare

În acest studiu privind râul Pasărea, prezența bacteriilor sulfat-reducătoare a fost evidențiată prin precipitarea fierului în diferite sezoane, în ambele puncte de prelevare (Figura VI.4).



Figura VI.4. Evidențierea bacteriilor sulfat-reducătoare în probele de apă colectate la Podul Dimieni (PD) și Barajul Tunari (BT).

Tabel VI.2. Densitatea bacteriilor sulfat-reducătoare din punctele de prelevare ale râului Pasărea, Pod Dimieni (PD) și Barajul Tunari (BT) în cele patru sezoane

Sezon	Punct de prelevare	Densitate bacterii sulfat-reducătoare (celule/ml)
Vara (iulie 2020)	PD	$22,5 \times 10^5$
	BT	$5,5 \times 10^4$
Toamna (noiembrie 2020)	PD	$4,75 \times 10^5$
	BT	$4,75 \times 10^2$
Iarna (februarie 2021)	PD	$7,5 \times 10^6$
	BT	$5,5 \times 10^7$
Primăvara (aprilie 2021)	PD	$5,75 \times 10^7$
	BT	$4,75 \times 10^2$

Acest grup de microorganisme a fost evidențiat pe parcursul celor patru sezoane în ambele sectoare ale râului Pasărea (Tabel VI.2). Conținutul ridicat de bacterii sulfat-reducătoare, înregistrat în probele de apă din zona Podului Dimieni, cu maxim ($5,75 \times 10^7$ celule/ml) atins în perioada de primăvară (Tabel VI.2, Figura VI.5) sugerează o activitate anaerobă ridicată pentru degradarea materiei organice.

Pentru punctul de prelevare de la Barajul Tunari, numărul cel mai ridicat de bacterii sulfat-reducătoare a fost înregistrat în sezonul de iarnă ($5,5 \times 10^7$ celule/ml), cu o scădere importantă în timpul verii ($5,5 \times 10^4$ celule/ml) și o prezență diminuată primăvara și toamna ($4,75 \times 10^2$ celule/ml) (Figura VI.5, Tabel VI.2).

VI.1.3. Bacterii implicate în ciclul biogeochimic al azotului

Pentru evaluarea comunităților microbiene implicate în ciclul biogeochimic al azotului au fost cuantificate grupele bacteriene amonificatoare, nitrificatoare, nitratoare și denitrificatoare, din cele două puncte de prelevare ale râului Pasărea, pe parcursul a patru sezoane consecutive.

. Tabel VI.3. Densitatea sezonieră a grupelor de bacterii implicate în ciclul biogeochimic al azotului, în punctele de prelevare Pod Dimieni (PD) și Baraj Tunari (BT) ale râului Pasărea

Sezon	Punct de prelevare	Densitate bacterii amonificatoare (celule/ml)	Densitate nitrit-bacterii (celule/ml)	Densitate nitrat-bacterii (celule/ml)	Densitate bacterii denitrificatoare (celule/ml)
Vara (iulie 2020)	PD	0	0	0	3 x 10
	BT	0	0,8	1,18	2,2 x 10 ⁵
Toamna (noiembrie 2020)	PD	0	1,4	0	2,2 x 10 ²
	BT	0	3 x 10 ²	0	0
Iarna (februarie 2021)	PD	2,8 x 10 ⁴	1,8 x 10	0	2,2 x 10 ⁴
	BT	2,8 x 10 ⁴	1,8 x 10	0	2,2 x 10 ⁴
Primăvara (aprilie 2021)	PD	2,8 x 10 ⁵	8x10	0	0
	BT	3,0 x 10 ³	5	0	0

Conținutul relativ al **diferitelor grupe de microorganisme implicate în ciclul biogeochimic al azotului**, prezente în râul Pasărea, în punctele de prelevare Barajul Tunari și Podul Dimieni, evidențiază dominanța bacteriilor denitrificatoare în sezonul de vară, în ambele puncte de prelevare, atât la Podul Dimieni cât și la Barajul Tunari, iar în sezonul următor, toamna, au predominat doar în proba de apă de la Podul Dimieni, în timp ce în proba de la Barajul Tunari au fost majoritare bacteriile nitrificatoare. În sezonul de iarnă, în ambele puncte de prelevare, au predominat (~60%) bacteriile amonificatoare, restul de ~40% fiind reprezentat de bacteriile denitrificatoare. În sezonul de primăvară, bacteriile amonificatoare au fost majoritare în ambele probe din cele două puncte de prelevare, Podul Dimieni și Barajul Tunari.

VI.3. Distribuția spațio-temporală a microorganismelor potențial patogene în râul Pasărea

Poluarea microbiană a râului Pasărea a fost investigată prin determinarea cantitativă a prezenței coliformilor totali, a coliformilor fecali și a streptococilor fecali, specii frecvent asociate cu contaminarea fecal-gospodărească a ecosistemelor (Kolarevic și colab., 2011), în probele de apă colectate din cele două sectoare ale râului. Conținutul acestor grupe microbiene, măsurate de-a lungul celor patru sezoane, în punctele de prelevare investigate, Podul Dimieni și Barajul Tunari, a evidențiat o variație atât spațială cât și temporală a numărului de microorganisme patogene (Tabel VI.5).

Tabel VI.5. Distribuția sezonieră a grupelor de microorganisme indicatoare de poluare în probele de apă de la Podul Dimieni (PD) și Barajul Tunari (BT).

Sezon	Punct de prelevare	Grupe de microorganisme patogene		
		Coliforme totale (UFC/ml)	Coliforme fecale (celule/ml)	Streptococi fecali (celule/ml)
Vara (iulie 2020)	PD	$3,03 \times 10^2$	$2,25 \times 10^1$	$1,4 \times 10^1$
	BT	$4,80 \times 10^1$	$2,00 \times 10^0$	0
Toamna (noiembrie 2020)	PD	$6,20 \times 10^3$	$3,00 \times 10^0$	$5,0 \times 10^3$
	BT	0	0	0
Iarna (februarie 2021)	PD	$1,85 \times 10^3$	0	$5,0 \times 10^3$
	BT	$3,65 \times 10^2$	0	$1,4 \times 10^2$
Primăvara (aprilie 2021)	PD	$1,80 \times 10^3$	$2,5 \times 10^1$	$9,0 \times 10^2$
	BT	0	0	0

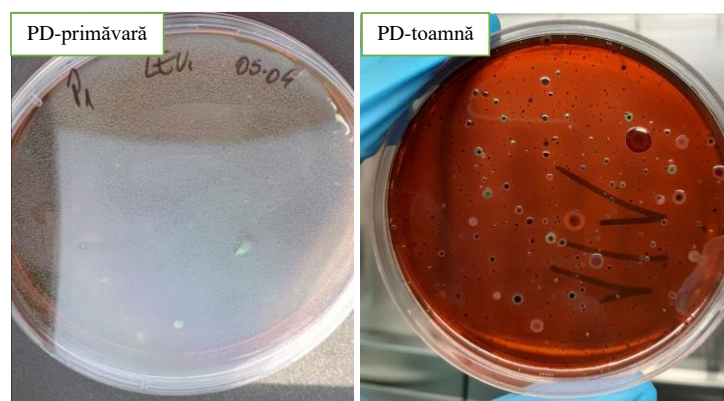


Figura VI.19. Evidențierea bacteriilor coliforme totale în probele de la Podul Dimieni (PD).

Distribuția sezonieră a celor trei categorii de microorganisme, potențial patogene, în râul Pasărea a pus în evidență un profil distinct al prezenței poluanților microbieni, în cele două puncte de prelevare investigate. În acest sens, a fost identificat un conținut relativ important de coliformi totali și streptococi fecali, acumulați în zona Podului Dimieni, în timpul sezoanelor de toamnă și iarnă și cu reziliența coliformilor totali, în timpul primăverii, în timp ce în zona Barajului Tunari, aceste două grupe de microorganisme poluante au prezentat un conținut relativ ridicat, doar în sezonul de iarnă și cu valori substanțial reduse față de zona Barajului Dimieni.

VII. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA TULPINILOR BACTERIENE DIN RÂUL PASĂREA

VII.1. Izolarea și caracterizarea morfo-funcțională a microorganismelor din râul Pasărea

După inocularea probelor de apă din râul Pasărea pe mediu solid, la 37°C timp de 48 h, au fost obținute 11 colonii microbiene de la Podul Dimieni (P1) și 9 de la Barajul Tunari (P2), cu morfologii diverse (alb mat, crem-roz, galben, etc.) și structuri variate (plat, convex, cu margini bine delimitate), sugerând prezența unor capsule exopolizaharidice.

Majoritatea tulpinilor (11) au fost Gram pozitive și catalază pozitive (70%) și doar 40% fiind oxidază pozitive. În sezonul de vară, toate bacteriile izolate au fost Gram pozitive și catalază pozitive, fără activitate oxidazică; iarna au predominat bacteriile Gram negative, cu activitate oxidazică și catalazică; iar primăvara izolatele au fost împărțite egal, între Gram pozitive/negative și catalază pozitive/negative, toate fiind oxidază negative. Variațiile sezoniere indică influența condițiilor de mediu asupra compoziției bacteriene.

VII.2. Identificarea moleculară a tulpinilor bacteriene pe baza secvenței genei 16S ARNr

Afilieră taxonomică a tulpinilor izolate din râul Pasărea a fost determinată pe baza secvenței genei 16S ARNr. În urma analizei BLAST (Liu și colab., 2017; Sudan și colab., 2018) a secvențelor genei 16S ARNr obținute, pentru cele 20 de tulpini, identificarea taxonomică a acestora a indicat apartenența bacteriilor izolate pe baza identității de secvență >97% a majorității acestora, cu specii omoloage din bazele de date (Tabel VII.3). Taxonomia acestor tulpini din râul Pasărea, a fost atribuită unui număr de 3 filumuri (*Bacillota*, *Pseudomonadota*, *Actinomycetota*), 3 clase (*Bacilli*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*), 6 familii (*Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Aeromonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Microbacteriaceae*, *Dermabacteraceae*) și 9 genuri (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Exiguobacterium*, *Yersinia*, *Microbacterium*, *Brachybacterium* și *Lysinibacillus*).

Tabel VII.3. Identificarea moleculară a tulpinilor bacteriene din râul Pasărea pe baza secvenței genei 16S ARNr

Nr.	Codul tulpinii izolate	Sezonul colectării	Specie omoloagă [număr de acces]	Identitate (%)	Originea speciei omoloage
1	P1-2(D3)	Vară	<i>Bacillus sp. [KJ812450]</i>	99,7	Mediul acvatic-sediment Oceanul Pacific
2	P1-5(D3)	Iarnă	<i>Pseudomonas sp. [GCA_002234375]</i>	99,67	Sediment-râul Gange
3	P1a-5(D3)	Iarnă	<i>Pseudomonas sp. [1215092]</i>	99,7	Mediul acvatic-apă potabilă
4	P2-5(D4)	Iarnă	<i>Bacillus sp. [536229]</i>	93,31	Mediul acvatic
5	P2-2(D4)	Iarnă	<i>Aeromonas popoffii [AJ224308]</i>	99,45	Mediul acvatic (apă potabilă)
6	P1-4N(D1)	Iarnă	<i>Exiguobacterium sp.[AY818050]</i>	94,52	Sediment N-E Pacific
7	P1 (D1)	Primăvară	<i>Enterobacter kobei [AJ508301.]</i>	98,22	Sângele unei persoane cu diabet
8	P2-7(D4)	Primăvară	<i>Aeromonas salmonicida [LSGW00000000]</i>	98,44	Acvatic-somon Atlantic
9	P1-1(D3)	Primăvară	<i>Pseudomonas aeruginosa [LN681564]</i>	98,73	Sol
10	P1-1(D4)	Primăvară	<i>Aeromonas hydrophila [CP000462]</i>	97,86	Conservă de lapte cu miros de pește
11	P2-8(D4)	Primăvară	<i>Yersinia intermedia strain [EF179123]</i>	98,07	Urină umană
12	P2-3(D4)	Primăvară	<i>Bacillus sp. [536229]</i>	97,31	Mediul acvatic
13	P2 -1a(D4)	Primăvară	<i>Aeromonas popoffii [AJ224308]</i>	97,28	Mediul acvatic (apă potabilă)
14	P1-5n (D1)	Primăvară	<i>Microbacterium maryticum [AM181506]</i>	98,37	Sediment/nămol marin
15	P1-2(D4)	Primăvară	<i>Aeromonas australiensis [HE611955]</i>	97,04	Sistem de irigații
16	P1-4 (D3)	Primăvară	<i>Brachybacterium muris/zhongshanense [JX68013])</i>	97,93	Mediul acvatic-apă de acvacultură
17	P2-4 (D4)	Primăvară	<i>Bacillus sp. [1178541]</i>	99,65	Mediul acvatic
18	P21b(D4)	Primăvară	<i>Lysinibacillus macroides [AJ628749]</i>	97,73	Excremente de vacă
19	P1-3(D4)	Vară	<i>Pseudomonas psychrophila [AB041885]</i>	95,41	Cameră frigorifică pentru alimente
20	P2-6(D4)	Vară	<i>Bacillus sp. [AJ831843]</i>	97,04	Aer

VII.3 Analiza filogenetică a tulpinilor izolate din râul Pasărea

Arborele filogenetic construit pe baza secvențelor de ADNr 16S a grupat tulpinile investigate în două grupuri majore (*clustere*) raportate la gena corespunzătoare, din *Halorubrum kokurii strain BG-1* utilizată ca *outgroup*. Unul dintre aceste grupuri, conținând

11 tulpini din râul Pasărea, este reprezentat de membrii familiilor *Enterobacteriaceae* și *Pseudomonadaceae* cu tulpini aparținând genurilor *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Yersinia* și *Pseudomonas*.

Al doilea *cluster* este constituit din membrii familiilor *Bacillaceae*, *Dermbacteraceae* și *Microbacteriaceae*, grupate cu specii aparținând genurilor *Microbacterium* (5N), *Brachybacterium* (P1-4), *Exiguobacterium* (4N), *Lysinibacillus* (P2-1b) și *Bacillus* (P2-3, P2-4, P2-5, P2-6).

VII.4. Producerea de enzime de către izolatele bacteriene din râul Pasărea

Tulpinile bacteriene izolate din râul Pasărea au fost testate pentru producerea de enzime hidrolitice extracelulare, prezentând un profil variabil în ce privește tipul și nivelul de activitate enzimatică. Din categoria hidrolazelor au predominat esterazele, majoritatea tulpinilor hidrolizând un singur tip de substrat.

Patru tulpini (P2-8/D4, P21-b/D4, P1-3/D4 și P2-6/D4) nu au înregistrat nici o activitate hidrolitică extracelulară.

Izolatul *Aeromonas sp.* P1-2 (D4) a fost capabil să hidrolizeze toate cele cinci medii suplimentate cu Tween 80, gelatină, CMC, amidon și caseină, indicând un potențial hidrolitic ridicat.

Tulpinile care au prezentat cele mai multe activități enzimatică, cu valorile diametrului de hidroliză cele mai ridicate, sunt *Aeromonas sp.* P1-2 (D4), *Pseudomonas sp.*, P1-1 (D3) și *Aeromonas sp.* P1-1 (D4). Aceste tulpini s-au remarcat prin activitățile lor esterazice și carboximetilcelulazice semnificative, prezentând un potențial aplicativ ridicat pentru obținerea de noi enzime hidrolitice bacteriene.

VIII. IMPACTUL POLUĂRII ASUPRA DIVERSITĂȚII MICROBIENE A RÂULUI PASĂREA

Evaluarea gradului de poluare microbiană a râului Pasărea a fost realizată conform datelor obținute privind variația spațio-temporală a conținutului microbian al râului Pasărea, pe baza încadrării în clasele de calitate a apei, stabilite la nivel european (UE-Expert 2000/60/CE).

Tabel VIII.2. Încadrarea probelor de apă colectate de la Podul Dimieni și Barajul Tunari ale râului Pasărea în clasele de calitate a apei pentru poluarea organică

Sectorul de prelevare	Vară (2020)	Toamnă (2020)	Iarnă (2021)	Primăvară (2021)
Pod Dimieni	IV	IV	III	III
Barajul Tunari	III	I	IV	I

Tabel VIII.3. Clasele de calitate a apei în punctul de prelevare Podul Dimieni al râului Pasărea pentru parametrii indicatori ai poluării fecale

Parametru -poluare fecală	Vară (2020)	Toamnă (2020)	Iarnă (2021)	Primăvară (2021)
Coliformi totali/100ml	III	IV	IV	IV
Coliformi fecali/100ml	III	II	-	III
Streptococi fecali/100ml	IV	V	V	V

Tabel VIII.4. Clasele de calitate a apei în punctul de prelevare Barajul Tunari al râului Pasărea pentru parametrii indicatori ai poluării fecale

Parametru -poluare fecală	Vară (2020)	Toamnă (2020)	Iarnă (2021)	Primăvară (2021)
Coliformi totali/100ml	II	-	III	-
Coliformi fecali/100ml	II	I/0	I/0	I/0
Streptococi fecali/100ml	-	-	V	-

Studiul asupra râului Pasărea a evidențiat contaminare organică și fecală variabilă, cu sectorul de la Podul Dimieni încadrat constant în clasele III-IV de poluare, iar Barajul Tunari prezentând fluctuații, inclusiv un nivel critic de poluare în sezonul de iarnă (clasa a IV-a). Analizele microbiologice au arătat un grad crescut de contaminare cu microorganisme indicatoare ale poluării organice, în special iarna și primăvara, cu o poluare accentuată la Podul Dimieni, unde coliformii totali și streptococii fecali au atins niveluri ridicate. La Barajul Tunari, poluarea fecală a fost mai redusă, dar în iarna 2021 s-au înregistrat nivele critice de poluare cu streptococi fecali și coliformi totali.

Impactul compoziției chimice asupra microbiomului râului a fost observat prin analiza unor oxizi metalici precum As_2O_3 , care a inhibat bacteriile în sezoanele reci, și BaO , unde s-a notat o adaptare a tulpinilor bacteriene aparținând genurilor *Pseudomonas* și *Bacillus*. De asemenea, prezența oxidului de ceriu sugerează influența activităților industriale, iar tulpinile izolate indică dezvoltarea mecanismelor de rezistență la poluanți toxici, inclusiv la metale rare.

CONCLUZII

Studiile realizate în cadrul acestei teze de doctorat au avut ca scop caracterizarea fizico-chimică, chimică și microbiologică a râului Păsărea în două zone (Podul Dimieni și Barajul Tunari) pentru a determina nivelul de poluare al râului.

Originalitatea studiului constă în determinarea variațiilor sezoniere ale profilului fizico-chimic și chimic al sectorului de apă investigat, cauzate de impactul antropic, care se reflectă în dinamica populațiilor microbiene și în spectrul activităților enzimactice ale acestora.

Măsurarea *in situ* a **parametrilor fizico-chimici** ai probelor de apă a pus în evidență variații spațio-temporale de-a lungul celor patru sezoane în cele două puncte de prelevare, reflectând influențe atât naturale cât și o poluare antropică de natură industrială, asupra calității apei. Totodată, concentrațiile ridicate ale unor oxizi metalici și prezența elementelor potențial toxice (PTE) sugerează poluarea semnificativă a râului care afectează calitatea apei în ambele sectoare de apă investigate.

În particular, creșterea turbidității și a concentrației solidelor în suspensie (TDS) observată în sezoanele de toamnă și iarnă la Podul Dimieni, precum și variațiile transparenței apei la Barajul Tunari în sezonul de vară, reflectă schimbările sezoniere în compoziția apei influențate de factori climatici și antropici. Totodată, diferențele înregistrate între cele două sectoare ale râului, pentru măsuratori concomitente, sugerează episoade punctuale de poluare antropică locală.

Variațiile sezoniere semnificative ale pH-ului, potențialului oxidoreducător (ORP), turbidității și implicit transparenței apei împreună cu conductivitatea electrică, au indicat modificări drastice ale habitatului organismelor acvatice pe parcursul celor patru sezoane, cu posibil aport datorat poluării chimice. De asemenea, au fost observate variații majore ale concentrației de oxigen dizolvat (DO) și ale concentrației procentuale a oxigenului (DO%), scăderi îngrijorătoare (0mg/L, respectiv 0%/L) în sezoanele de toamnă și iarnă la Podul Dimieni.

Variațiile notabile ale acestor parametri fizico-chimici afectează calitatea apei și reflectă schimbările climatice și hidrologice sezoniere.

Pentru parametrul salinitate, valorile nu au evidențiat variații majore spațio – temporale, de-a lungul celor patru sezoane, rămânând relativ constant, de asemenea, variațiile temperaturii apei au fost în acord cu influența sezonieră, nefiind identificate diferențe majore între cele două puncte de prelevare.

Analiza chimică realizată prin XRF a evidențiat variații semnificative în **compoziția chimică** a probelor de apă în funcție de sezon și de punctul de prelevare.

A fost identificat un număr total de 22 de elemente/compuși chimici la Podul Dimieni și 20 de elemente/compuși chimici sub formă de oxizi, la Barajul Tunari în cele patru sezoane de prelevare.

Distribuția spațială a oxizilor identificați a variat sezonier, existând o prezență punctuală și, în unele cazuri, în cantități importante (oxidul de titan TiO_2 cu 39% masă în proba din sezonul de vară de la Barajul Tunari, oxidul de ceriu CeO_2 30% masă în sezonul de primăvară, în același sector de apă, împreună cu oxidul de neodim Nd_2O_3 cu 26,18% masă identificat în sezonul de toamnă la Barajul Tunari), peste 10% masă (oxidul de samariu Sm_2O_3 , oxidul de lutețiu Lu_2O_3), peste 5% masă (oxidul de mangan MnO , oxidul de holmiu Ho_2O_3 , oxidul de germaniu GeO_2) astfel încât a fost identificată o influență regională a compușilor apei.

De asemenea, o serie de elemente/compuși chimici sub formă de oxizi au fost identificați fie în minim două sezoane, fie în ambele sectoare ale râului Pasărea, în concentrații importante, oxidul de gadoliniu 5,48% masă până la 8,19% masă la Podul Dimieni, oxidul de terbiu până la 8,12% masă la Barajul Tunari, valoarea fiind cu mult depășită la Podul Dimieni.

Concentrații foarte ridicate (73%- 80%) de oxizi de bariu (BaO) au fost identificate în ambele puncte de prelevare ale râului Pasărea, indicând un aport exogen de poluanți chimici. Variația sezonieră extremă a acestui compus în probele de apă colectate primăvara și vara, între valori maxime și absența sa, confirmă originea antropică a acestui compus în râul Pasărea, sugerând o poluare industrială majoră.

O parte din oxizii identificați precum oxidul de titan (TiO_2), oxidul de niobiu (NbO_2), oxidul de stronțiu (SrO), oxidul de ceriu (CeO_2) oxidul de neodim (Nd_2O_3), oxidul de samariu (Sm_2O_3), oxidul de gadoliniu (Gd_2O_3) oxidul de terbiu (Tb_4O_7), oxidul de lutețiu (Lu_2O_3) și oxidul de holmiu (Ho_2O_3) sunt considerați toxici pentru ecosistemele acvatice și sănătatea umană, regăsindu-se pe Lista Materiilor Prime Critice a Comisiei Europene (<https://rmis.jrc.ec.europa.eu/>), prezența acestora indicând o sursă de poluare industrială sau deversări necontrolate.

Analizele microbiologice ale probelor de apă din râul Pasărea, ce au vizat grupele de bacterii implicate în ciclurile biogeochimice ale carbonului, sulfului și azotului au pus în evidență variații ale compoziției microbiomului acvatic în funcție de sezon și de punctul de prelevare, precum și prezența unor grupe de patogeni.

Microorganismele heterotrofe au înregistrat cel mai mic număr, de ordinul 10^2 , în sezonul de primăvară, la Barajul Tunari, numărul maxim de ordinul 10^5 fiind înregistrat în sezonul de toamnă, la Podul Dimieni și în sezonul de iarnă la Barajul Tunari, având o prezență constantă în ambele puncte de prelevare, în concordanță cu temperatura habitatului.

Cel mai mare număr de **bacterii sulfat-reducătoare**, de ordinul 10^7 , a fost prezent în sezonul de iarnă la Barajul Tunari, respectiv primăvară la Podul Dimieni, numărul acestora păstrându-se ridicat în restul sezoanelor în ambele sectoare ale râului Pasărea, exceptând Barajul Tunari pentru care s-a înregistrat o densitate minimă, de ordinul 10^2 în sezoanele de primăvară și toamnă.

Bacteriile amonificatoare au fost absente în sezoanele de vară și toamnă din ambele puncte de prelevare, atingând densitatea cea mai ridicată la Podul Dimieni, de ordinul 10^5 în sezonul de primăvară.

Atât nitrit-bacteriile cât și nitrat-bacteriile au foarte slab reprezentate în cele două sectoare investigate, cele din urmă fiind prezente într-un număr extrem de redus, de ordinul 10^1 , doar în sezonul de vară la Barajul Tunari.

Bacteriile denitrificatoare au variat atât în funcție de sezon cât și de sectorul de prelevare, fiind absente la Barajul Tunari, în sezoanele de toamnă și primăvară și atingând densități ridicate în sezonul de vară, de ordinul 10^5 , în timp ce la Podul Dimieni au atins un maxim în sezonul de iarnă, de ordinul 10^4 dar au fost absente în sezonul de primăvară.

Aceste variații cantitative ale comunităților bacteriilor amonificatoare, nitrit- și nitrat-bacterii și bacteriilor denitrificatoare înregistrate, sugerează realizarea unui ciclu biogeochimic incomplet al azotului în cele două sectoare ale râului Pasărea.

Parametrii fizico-chimici ai probelor de apă, determinați din aceste amplasamente investigate, au sugerat prezența unor factori poluanți cu efect inhibitor asupra activităților enzimatiche specifice implicate în transformările biogeochimice a azotului.

În proba de apă de la Podul Dimieni, analizele microbiologice au evidențiat prezența **streptococilor fecali**, de ordinul 10^3 în sezoanele reci, de toamnă, iarnă și a **coliformilor totali** cu numărul maxim, de ordinul 10^3 , în sezonul de toamnă, persistând pe parcursul celor patru sezoane și a coliformilor fecali, într-un conținut mai redus, de ordinul 10^1 , în timpul sezonului de vară, toamnă și primăvară. Pentru Barajul Tunari, poluarea microbiană s-a datorat numărului crescut de coliformi totali, de ordinul 10^3 , înregistrat în sezonul de iarnă și coliformilor fecali pe timpul verii și primăverii (10^1) și streptococilor fecali, iarna, de ordinul 10^2 .

Valorile obținute indică o poluare persistentă, atât organică cât și chimică și microbiologică a râului, pe parcursul celor patru sezoane, în cele două sectoare investigate. În majoritatea sezoanelor, apa râului Pasărea a fost încadrată la **clasa a IV- a** de calitate pentru poluarea organică și **clasa a V- a** pentru grupa streptococilor fecali, persistând pe durata a trei sezoane la Podul Dimieni și în sezonul de iarnă, la Barajul Tunari. Apa din sectorul Baraj Tunari nu a fost la fel de afectată de poluarea fecaloid-menajeră, fiind încadrată în majoritatea sezoanelor la clasa I de poluare.

Din probele de apă prelevate din râul Pasărea au fost **izolate 20 de tulpini** și identificate taxonomic prin secvențierea genei 16S ARNr, aparținând la 3 filumuri, 3 clase, 6 familii și 9 genuri, cu o identitate ridicată (>97%) cu omologi din medii acvatice, în majoritatea cazurilor.

Testarea izolatelor pentru producerea de enzime hidrolitice extracelulare a evidențiat o predominanță a tulpinilor producătoare de esteraze, majoritatea acestora hidrolizând un singur tip de substrat.

Patru tulpini (P2-8/D4, P21-b/D4, P1-3/D4 și P2-6/D4) nu au prezentat nici o activitate hidrolitică extracelulară.

Izolatul *Aeromonas sp.* P1-2 (D4) a fost capabil să hidrolizeze toate mediile suplimentate cu substraturile testate (Tween 80, gelatină, CMC, amilază și cazeină), demonstrând un potențial hidrolitic ridicat.

Tulpinile bacteriene *Aeromonas sp.* P1-2 (D4), *Pseudomonas sp.*, P1-1 (D3) și *Aeromonas sp.* P1-1 (D4) au prezentat cele mai multe activități enzimatică cu valori ale diametrului de hidroliză cele mai ridicate. Aceste tulpini s-au remarcat prin activitățile lor esterazice și carboximetilcelulazice semnificative, indicând un potențial aplicativ ridicat pentru obținerea de noi enzime hidrolitice bacteriene.

Analiza coroborată a datelor obținute indică posibile corelații între compoziția chimică și cea microbiologică a râului Pasărea. Dintre acestea, prezența concentrațiilor ridicate de As_2O_3 a avut un potențial efect inhibitor asupra unor grupe de bacterii (bacteriile heterotrofe, sulfat-reducătoare, amonificatoare și coliformi totali), în timp ce concentrațiile foarte ridicate de BaO și conținutul important de lantanide sub formă de oxizi de Tb, Ho, Gd și Nd nu a avut un impact aparent direct asupra densității microbiene a grupelor de bacterii studiate, sugerând deversări poluante, punctuale, al căror efect se poate observa prin monitorizări continue.

PERSPECTIVE

Cercetările acestei lucrări de doctorat au pus în evidență poluarea râului Pasărea, atât la nivel chimic cât și microbiologic. În acest sens, expunerea la diverși compuși chimici prezenți în concentrații ridicate, precum bariul, diferite metale grele și elemente aparținând CRM, a microorganismelor din apa râului, ar putea favoriza dezvoltarea unor mecanisme de rezistență la acești poluanți. O investigație aprofundată a diversității structurale și funcționale a comunităților microbiene din râul Pasărea, utilizând atât metode moleculare (secvențiere Illumina a genei 16S ARNr și metagenomică a microbiomului) cât și de cultivare (izolare de noi tulpini microbiene) și analiza expresiei genice prin RT-PCR în prezența diverșilor agenți poluanți, poate contribui la descifrarea mecanismelor de adaptare ale microorganismelor acvatice la mediile poluate.

Prezența extinsă a diferitelor tipuri de plastice (polietilenă, polipropilenă, polietilentereflalat) în mediul acvatic ridică, de asemenea, o problemă majoră actuală asupra adaptării microbiomului din apa și sedimentele râului la concentrațiile ridicate ale acestor poluanți (Tim și colab., 2022). Studiarea coroborată a gradului de poluare cu plastice al râului Pasărea, precum și a variațiilor sezoniere și spațiale și a impactului asupra microbiomului acvatic, reprezintă o perspectivă importantă a cercetării asupra calității apei acestui râu. În plus, *screeningul* și caracterizarea funcțională a tulpinilor izolate din acest râu pot conduce la identificarea unor noi tulpini microbiene eficiente în biodegradarea macro și microplasticelor.

De asemenea, evidențierea activităților hidrolitice extracelulare ale tulpinilor P1-2, P2-1a, P2-7, P2-2 aparținând genului *Aeromonas*, izolate, în această lucrare de doctorat, constituie date preliminare importante pentru continuarea investigației potențialului aplicativ al acestora în diverse tehnologii. În ce privește tratarea apelor, capacitatea amestecului de hidrolaze extracelulare (Alokpa și colab., 2022) de a transforma cantități mici de CRM în condițiile ecosistemului de mediu ar putea fi exploatată pentru dezvoltarea ulterioară a diferitelor sisteme de monitorizare a zonelor poluate și de tratare și recuperare a unor materiale (Lulea și colab., 2022).

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., & Wassie, M., 2017. The role of microorganisms in bioremediation-A review. *Open Journal of Environmental Biology*, 2(1), 038-046, <https://doi.org/10.17352/ojeb.000007>.
2. Abbott, B. W., Moatar, F., Gauthier, O., Fovet, O., Antoine, V., Ragueneau, O., 2018. Trends and seasonality of river nutrients in agricultural catchments: 18 years of weekly citizen science in France. *The Science of the Total Environment*, 624, 845–858, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.12.176.
3. Abdullah A. U., Faisal, S., Almostafa, M. M., Younis, N. S., & Yahya, G., 2023. Multifunctional *spirogyra-hyalina*-mediated barium oxide nanoparticles (BaONPs): synthesis and applications. *Molecules*, 28(17), 6364, <https://doi.org/10.3390/molecules28176364>.
4. Achahbar, Nouha, 2020. “Physicochemical and bacteriological quality assessment of spring waters in the Tetouan region (Morocco).” <https://doi.org/10.48421/IMIST.PRSM/ewash-ti-v4i3.21459>
5. Alexander, T. C., Gullidge, E., & Han, F., 2016. Arsenic occurrence, ecotoxicity and its potential remediation. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 7, e174 doi:10.4172/2155-6199.1000e174.
6. Alfaro, M. A., Jarvis, S. C., & Gregory, P. J., 2004. Factors affecting potassium leaching in different soils. *Soil use and management*, 20(2), 182-189 <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.2004.tb00355.x>.
7. Almeida R. C., M., Botero, W.G. & de Oliveira, L.C., 2022. Natural and anthropogenic sources of potentially toxic elements to aquatic environment: a systematic literature review. *Environ Sci Pollut Res* 29, 51318–51338. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20980-x>.
8. Alokpa, K., Lafortune, P., Cabana, H., 2022. Application of laccase and hydrolases for trace organic contaminants removal from contaminated water, *Environmental Advances*, 100243, <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100243>.
9. Al-Samawi, A. A. A. and Al-Hussaini, S. N. H., 2016. The oxidation reduction potential distribution along Diyala river within Baghdad city. *Mesop. environ. j.*, Vol. 2, No.4, pp. 54-66 .
10. Alves, P.D.D.; Siqueira, F.d.F.; Facchin, S.; Horta, C.C.R.; Victória, J.M.N.; Kalapothakis, 2014. E. Survey of Microbial Enzymes in Soil, Water, and Plant Microenvironments. *TOMICROJ* 8, 25–31, doi: 10.2174/1874285801408010025.
11. APHA.,1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
12. Ardelean, I.I., 2012. *Microbiologie generală vol. 2*, Bucharest, Ro: Ars Docendi Publishing House.
13. Arnosti C., 2003, *Microbial Extracellular Enzymes and their Role in Dissolved Organic Matter Cycling*, Academic Press, 315-342, <https://doi.org/10.1016/b978-012256371-3/50014-7>.
14. Aronsson, K., & Rönner, U., 2001. Influence of pH, water activity and temperature on the inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(2), 105-112, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2023.103460>.
15. Ashbolt, N. J., Grabow, W. O. K., & Snozzi, M., 2001. Indicators of microbial water quality. In L. Fewtrell & J. Bartram (Eds.), *Water quality: Guidelines, standards and health*, World Health Organization (pp. 289-316)

16. Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A., Thingstad, F., 1983. The ecological role of water - column microbes in the sea. *Marine ecology progress series*, 257-263, <http://dx.doi.org/10.3354/meps010257>.
17. Azhar M., Uniyal V., Chauhan N., Rawat S.D., 2014. Isolation and biochemical characterization of Halophiles from Sahastradhara region, Dehradun, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3, 12, 753-760
18. Azizian, M., Boano, F., Cook, P. L. M., Detwiler, R. L., Rippy, M. A., Grant, S. B., 2017. Ambient groundwater flow diminishes nitrate processing in the hyporheic zone of streams: Ambient groundwater and stream N-cycling. *Water Resources Research*, 53, 3941–3967, <https://doi.org/10.1002/2016WR020048>.
19. Baeum, Kwon., Na, Young, Ha., Joeun, Jung., Pangyi, Kim., Younglim, Kho., Kyungho, Choi., Kyunghee, Ji., 2016. Effects of Barium Chloride Exposure on Hormones and Genes of the Hypothalamic-Pituitary-Gonad Axis, and Reproduction of Zebrafish (*Danio rerio*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 96(3):341-346. doi: 10.1007/S00128-016-1731-9
20. Batrinescu-Moteau, C., Neagu, S., Lucaci, A.I., Ruginescu, R., Maria, G., Cojoc, R., Purcărea, C., Podosu, A., Enache, M., 2022. Preliminary data concerning communities of microorganisms in a volcanic tuff endolytic habitat. *Oltenia. Studii și Comunicări. Științele Naturii*, 38 (1): 168 – 173.
21. Bazeera, A. Z. and M. Irfana Amrin., 2017 “Synthesis and Characterization of Barium Oxide Nanoparticles.” *IOSR Journal of Applied Physics* 01 : 69-72.
22. Benciu, F., Enciu, M., Bujor, L., Bogan, E., Puia, O.-A., & Gabor, S., 2014. Evaluation of the Physico-Chemical Water Quality Parameters of Lake Branesti, România. *International Journal of Academic Research in Environment & Geography*, 4(1), 24-36, DOI: 10.46886/IJAREG/v4-i1/2568.
23. Bolea, V., Gavrilesco, G., Mihalache, L., & Alexandru, C., 2020. Păsările—componentă vitală a ecosistemelor pădurilor urbane. *Revista de Silvicultură și Cinegetică*, 24(46).
24. Bowes, M. J., Neal, C., Jarvie, H. P., Smith, J. T., & Davies, H. N., 2010. Predicting phosphorus concentrations in British rivers resulting from the introduction of improved phosphorus removal from sewage effluent. *Science of the Total Environment*, 408(19), 4239-4250, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.100>.
25. Brăun, A., Spona-Friedl, M., Avramov, M., Elsner, M., Baltar, F., Reinthaler, T., & Griebler, C., 2021. Reviews and syntheses: Heterotrophic fixation of inorganic carbon—significant but invisible flux in environmental carbon cycling. *Biogeosciences*, 18(12), 3689-3700, <https://doi.org/10.5194/bg-18-3689-2021>.
26. Burescu, P., 2003. Studiu fitocenologic cuprinzând vegetația acvatică și palustră din Nord–Vestul României. *Complexul Muzeal de Științele Naturii Ion Borcea, Bacău, Studii și Comunicări*. Edit. Ion Borcea, Bacău, 18, 96-102.
27. Burian, S.J., Nix, S.J., Pitt, R.E., Rocky, D.S., 2000. Urban wastewater management in the United States: past, present, and future. *J Urban Technol.* 7, 33–62, <https://doi.org/10.1080/713684134>.
28. Burns, R.G.; Dick, R.P. 2002.(Eds.) *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications; Books in soils, plants, and the environment; Marcel Dekker: New York, NY, USA,; ISBN 978-0-8247-0614-2.*

29. Cabral, J. P. S., 2010. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10), 3657-3703, <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph7103657>.
30. Carmichael, W. W., 1994. The toxins of *cyanobacteria*. *Scientific American*, 270(1), 78-86.
31. Carpenter, S. R., Caraco, N. F., Correll, D. L., Howarth, R. W., Sharpley, A. N., & Smith, V. H., 1998. "Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen." *Ecological Applications*, 8(3), 559-568, <https://doi.org/10.2307/2641247>.
32. Catana, D.R., Podosu A., Florescu I.L., Mihai, A.A., Enache, M., Cojoc, R., Moldoveanu, M., 2023. Quantitative Analyses of Chemical Elements in *Phragmites australis* as Bioindication of Anthropization in Urban Lakes, *Sustainability*, 15, 553, DOI: 10.3390/su15010553.
33. Chen, Haiyang & Teng, Yanguo & Li, Jiao & Wu, Jin & Wang, J., 2016. Source apportionment of trace metals in river sediments: A comparison of three methods. *Environmental Pollution*. 211. 28-37. [10.1016/j.envpol.2015.12.037](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.037).
34. Chifiriuc M.C., Mihăescu G., Lazăr V., 2011. *Microbiologie și virologie medicală*. Editura Universității din București;
35. Chrost, J. R., Siuda, W. 2002. Ecology of Microbial Enzymes in Lake Ecosystems. In *Enzymes in the environment* p. 52.
36. Cirtina, D., Mihut, M.N., 2020, Study on the Assessment of the Oxygen Regime and the Nutrients Content of Some Water Streams in Gorj County, *Rev. Chim.*, 71(2), , 315-323.
37. Civitello, D. J., Hite, J. L., & Hall, S. R., 2014. Potassium enrichment stimulates the growth and reproduction of a clone of *Daphnia dentifera*. *Oecologia*, 175, 773-780.
38. Cocoș, O., 2006. Managementul apei în municipiul București, Sistemele hidrografice București. Bucharest, Ro: Ars Docendi Publishing House, 68 – 103.
39. Cojocaru D.C., Olteanu Z., Ciornea E., Oprică L., Cojocaru S., 2007. *Enzimologie generală*, Editura Tehnopress, Iași
40. Cole, J., 1999. Aquatic Microbiology for Ecosystem Scientists: New and Recycled Paradigms in *Ecological Microbiology, Ecosystems*, 2, 215–225
41. Colwell, R. R., Kaper, J., & Joseph, S. W., 1981. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and other vibrios: Occurrence and distribution in Chesapeake Bay. *Science*, 212(4492), 984-986.
42. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption.
43. Coyte, KZ, Schluter, J, Foster, KR, 2015. The ecology of the microbiome: networks, competition, and stability, *Science*, 350, pp. 663–666.
44. Da Silva, M. R. F., Souza, K. S., Motteran, F., de Araújo, L. C. A., Singh, R., Bhadouria, R., & de Oliveira, M. B. M. , 2024. Exploring biodegradative efficiency: a systematic review on the main microplastic-degrading bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1360844, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1360844>.
45. David, I., 2022. Analysis of Some Physical-Chemical Indicators in Two Sections of the Cricovul Dulce River. *Annals of "Valahia" University of Târgoviște. Agriculture*, 14(2), 9-13, DOI:<https://doi.org/10.2478/agr-2022-0013>.

46. Dinu, C., Zaharia, S.E., Pietreanu, C.V., 2019. Considerations on Aircraft On-Ground De-Icing and Sustainable Airport Development, *Rev. Chim.*, 70(2), 560-564.
47. Directive 2008/56/EC of the European Parliament and of the Council of 17 June 2008 establishing a framework for community action in the field of marine environmental policy (Marine Strategy Framework Directive). In: Official Journal of the European Union L164: 19-40.
48. Enache, M., Dumitru, L., Faghi, A.M. 1999. Occurrence of halocins in mixed archaeobacteria culture, *Proc. Inst. Biol.*, II, 151-154.
49. Enache, M., Faghi, A.M., Dumitru, L., Teodosiu, G. Zarnea, G., 2004. Halocin Hf1 a bacteriocin produced by *Haloferax sp.* GR1, *Proc. Rom. Acad. Series B*, 6, 27-32.
50. European Commission, 2020. Study on the EU's List of Critical Raw Materials—Final Report; European Commission: Brussels, Belgium,.
51. Fujimura R., 2012. Analysis of Early Bacterial Communities on Volcanic Deposits on the Island of Miyake (Miyake-jima), Japan: a 6-year Study at a Fixed Site doi: 10.1264/jsme2.ME11207;
52. Henriksen, S. D., & Hansen, F., 2001. *Acinetobacter*. In M. Dworkin (Ed.), *The Prokaryotes*, pp. 363-379.
53. Huys G, 1997. *Aeromonas popoffii sp. nov.*, a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 1165-1171. PubMed: 9336924.
54. Ibekwe, A.M., et al., 2016. Bacterial community composition and structure in an Urban River impacted by different pollutant sources, *Sci Total Environ*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.168>.
55. Javor B. J., 1989. Hypersaline environments. *Microbiology and Biogeochemistry*, Springer-Verlag KG, Berlin, Germany, 77-97.
56. Jin, Y., & Gao, X., 2019. "Review of pollution and risk of plastics in marine environment." *Science of the Total Environment*, 676, 742-754.
57. Jones, S. E., Chiu, C. Y., Kratz, T. K., Wu, J. T., Shade, A., și McMahon, K. D. 2020. Typhoons reshape bacterial communities in large subtropical reservoirs. *Environmental Microbiology*, 22(3), 967-979.
58. Joshi, D.M. & Kumar, A. & Agrawal, N., 2009. Assessment of the irrigation water quality of river Ganga in Haridwar district. 2. 285-292.
59. Kaper, J. B., Morris, J. G., & Levine, M. M., 1995. Cholera. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(1), 48-86.
60. Kazamia, E., Czesnick, H., Nguyen, T. T. V., Croft, M. T., Sherwood, E., Sasso, S., Hodson, S. J., Warren, M. J. and Smith, A. G., 2012. Mutualistic interactions between vitamin B12-dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation. *Environmental Microbiology*, 14: 1466– 1476;
61. Khorshid, M.S.H.; Thiele-Bruhn, S. 2016. Contamination status and assessment of urban and non-urban soils in the region of Sulaimani City, Kurdistan, Iraq. *Environ Earth Sci* 75.16, 1-15.
62. Kunz, J. M., 2024. Surveillance of Waterborne Disease Outbreaks Associated with Drinking Water—United States, 2015–2020. *MMWR. Surveillance Summaries*, 73.

63. Kuzníková, L.; Dědková, K.; Kupková, J.; Váňa, R.; Kukutschová, J. Synthesis, characterization and acute aquatic toxicity of samarium oxide nanoparticles to freshwater green algae. NANOCON 2017, Oct 18th - 20th 2017, Brno, Czech Republic, EU.
64. Laist, D. W., 1997. "Impacts of marine debris: Entanglement of marine life in marine debris including a comprehensive list of species with entanglement and ingestion records." *Marine Pollution Bulletin*, 32(3), 201-212.
65. Lazăr, V., Măruțescu, L.G., Chifiriuc, M.C., 2016. *Microbiologie generală și aplicată*. Bucharest, Ro: Bucharest University Press.
66. Lucaci, A. I., Moldoveanu, M., Florescu, L., Cojoc, R., Neagu S., Ruginescu, R., Enache, M., 2019. The seasonal dynamics of the cultivable microbial communities in Letea saline lake. *AgroliLife Scientific Journal*, 8 (1): 160-166.
67. Lulea A.C., Ruginescu R., Banciu R.M., Pantazi C., Brinduse E., Ion M., Quintela S., Elejalde E., Fernandez-de-Castro L., Villaran M.C., Ruiz-de-Vergara Z., Ruiz C., Epure P., Purcărea C., Vasilescu A., 2022. Fast Electrochemical Measurement of Laccase Activity for Monitoring Grapes' Infection with *Botrytis cinerea*. *Processes*, 10. 3.
68. Madigan M., Martinko J.M., Bender S., Buckley D., Stahl D., Brock T., 2015, *Brock Biology of Microorganisms*, 14th Edition;
69. McCabe, D. J., 2011. Rivers and Streams: Life in Flowing Water. *Nature Education Knowledge* 3(10) 19.
70. Mihaela, T.; Popa, P.; Murariu, G.; Georgescu, L.; Iticescu, C.; Barbu, M., 2016. Complementary approach for numerical modelling of physicochemical parameters of the Prut river aquatic system. *J. Environ. Prot. Ecol.*, 17, 53–63.
71. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 73963, 2021. Cerium Dioxide; National Center for Biotechnology Information: Bethesda, MD, USA,.
72. Neagu, S., Enache, M., Cojoc, R., Ruginescu, R., Moldoveanu, M., Florescu, L., Lucaci, I., 2021. Seasonal variation of the water color from the IOR lake – Bucharest. *Oltenia. Studii și comunicări. Științele Naturii Tom.*, 37(1), 205 – 210.
73. Ojovan, B., Catana, R., Neagu, S., Cojoc, R., Lucaci, A.I., Marutescu, L., Florescu, L., Ruginescu, R., Enache, M., Moldoveanu, M., 2021. Metabolic Potențial of Some Functional Groups of Bacteria in Aquatic Urban Systems. *Fermentation*, 7, 242, <https://doi.org/10.3390/fermentation7040242>.
74. Podosu (Vlad) A., Neagu S., Lucaci I., Ruginescu R., Cojoc R., Bătrînescu-Moteau C. și Enache M., 2023. Anthropogenic impact on the chemical and microbiological profile of Pasarea river, România. *Oltenia. Studii si Comunicari, Seria Stiintele Naturii, Tom. 39, 2, 176 – 184.*
75. Podosu (Vlad) A., Neagu S., Lucaci I., Ruginescu R., Cojoc R., Bătrînescu-Moteau, Purcărea C., Enache M., Ruginescu R., 2023. Extracellular hydrolases produced by microorganisms isolated from the polluted river Pasarea, România. *Romanian Journal of Biology, Plant Biology*, 68, 1-2, 29-40.
76. <https://isubif.ro/local/wp-content/uploads/2015/06/Planul-de-Analiz/> (accesat în ianuarie 2020)
77. <https://www.google.com/maps/place/> (accesat în ianuarie 2020)
78. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accesat în iunie 2022)
79. <https://www.graphpad.com/> (accesat în aprilie 2021)

DISEMINAREA REZULTATELOR

Articole publicate din subiectul tezei de doctorat în reviste cotate ISI (Web of Science cu factor de impact)

1. **Catană R.D[#]**, **Podosu A[#]**, Florescu L.I., Mihai R.A., Enache M., Cojoc R., Moldoveanu M., 2023. Quantitative Analyses of Chemical Elements in *Phragmites australis* as Bioindication of Anthropization in Urban Lakes. *Sustainability*, **15**(1): Art.No. 553. DOI: 10.3390/su15010553 (# = autori cu contribuție egală). IF = 3,3 (Web of Science).

Articole publicate din subiectul tezei de doctorat în reviste indexate ISI (web of Science)

1. **Aurelia Podosu (Vlad)**, Simona Neagu, Anca Ioana Lucaci, Robert Ruginescu, Roxana Cojoc, Costin Bătrînescu-Moteau, Cristina Purcărea, Mădălin Enache, 2023, Anthropogenic impact on the chemical and microbiological profile of Pasărea river, România. *Oltenia. Studii și Comunicări, Seria Științele Naturii*, Tom. 39, 2, 176 – 184.

Articole publicate din subiectul tezei de doctorat în reviste indexate BDI

1. **Aurelia Podosu (Vlad)**, Simona Neagu, Anca Ioana Lucaci, Roxana Cojoc, Costin Bătrînescu-Moteau, Cristina Purcărea, Mădălin Enache, Robert Ruginescu, 2023, Extracellular hydrolases produced by microorganisms isolated from the polluted river Pasărea, România. *Romanian Journal of Biology, Plant Biology*, 68, 1-2, 29-40.

Articole publicate din subiecte conexe cu cel al lucrării de doctorat în reviste indexate ISI (web of Science)

1. Bătrînescu-Moteau Costin, Neagu Simona, Lucaci Anca-Ioana, Ruginescu Robert, Maria Gabriel, Cojoc Roxana, Purcărea Cristina, **Podosu Aurelia**, Enache Mădălin, 2022, Preliminary data concerning communities of microorganisms in a volcanic tuff endolytic habitat. *Oltenia. Studii și Comunicări. Științele Naturii*. Tom. 38, No. 1, 168 – 173.
2. Bătrînescu-Moteau Costin, Neagu Simona, Lucaci Anca-Ioana, Ruginescu Robert, Cojoc Roxana, **Podosu (Vlad) Aurelia**, Purcărea Cristina, Negru Mircea, Enache Mădălin, 2022, New data on microorganisms isolated from ceramic materials of the Romula archaeological site, România. *Oltenia. Studii și Comunicări. Științele Naturii*. Tom. 38, No. 2, 147 – 153.

3. Bătrînescu-Moteau Costin, Lucaci Anca Ioana, Neagu Simona, Cojoc Roxana, Purcărea Cristina, **Podosu (Vlad) Aurelia**, Enache Mădălin, Ruginescu Robert, 2023, Superoxide dismutase activity in microorganisms inhabiting volcanic tuff rock. *Oltenia. Studii și Comunicări, Seria Științele Naturii*, Tom 39, 1, 201-209.

**Articole publicate din subiecte conexe cu cel al lucrării de doctorat în reviste indexate
BDI**

1. Costin Bătrînescu-Moteau, Simona Neagu, Oana Cătălina Mocioiu, Anca Ioana Lucaci, Roxana Cojoc, Cristina Purcărea, **Aurelia Podosu (Vlad)**, Maria Zaharescu, Mădălin Enache, Robert Ruginescu, 2023, Evidence of microbial antagonism in volcanic tuff rock. *Romanian Journal of Biology, Plant Biology*, 68, 1-2, 9 – 20.

80.