

FACULTATEA DE BIOLOGIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE

**CERCETĂRI PRIVIND EFECTELE TOXICITĂȚII
SOLURILOR CONTAMINATE CU METALE GRELE
ASUPRA UNOR SPECII DE PLANTE SUPERIOARE.
STUDIU DE CAZ *TRITICUM AESTIVUM* L.**

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

Conducător științific:

Profesor universitar. dr.

MARIA-MAGDALENA ZAMFIRACHE

Doctorand:

SCUREI (CĂS. BUTNARIU) ALINA-ELENA

Iași

2022

MULȚUMIRI

Acum, la finalul acestei etape din viața mea, doresc profund să adresez câteva cuvinte de mulțumire tuturor acelor oameni minunați, care m-au îndrumat sau mi-au acordat suportul pe tot parcursul studiilor doctorale și care și-au rupt din timpul lor liber pentru a-mi oferi sprijin și ajutor.

În primul rând doresc să adresez sincere mulțumiri conducătorului de doctorat, doamnei Profesor univ. dr. Maria-Magdalena Zamfirache, pentru permanenta și riguroasa sa îndrumare acordată, pentru sprijinirea și încurajarea continuă de-a lungul perioadei de pregătire a doctoratului și de elaborare a tezei.

Cu aleasă considerație, doresc să adresez mulțumirile mele membrilor Comisiei de Referenți pentru timpul prețios acordat, pentru amabilitatea de a analiza această lucrare, pentru sfaturile științifice valoroase, cât și pentru îndrumarea competentă și permanentă pe parcursul elaborării și realizării acestei teze de doctorat.

Această teză de doctorat nu ar fi fost completă fără ajutorul esențial al domnului Profesor universitar dr. Gabi Drochioiu, care mi-a îndreptat pașii spre domeniul cercetării științifice, prin propunerea temei de cercetare a lucrării și doresc să îi mulțumesc pentru tot sprijinul moral și științific acordat pe parcursul acestor ani de studiu.

Doamnei Profesor universitar dr. Zenovia Olteanu și doamnei Șef Lucrări dr. Anișoara Stratu doresc să le mulțumesc în egală măsură, pentru toate sugestiile utile și observațiile valoroase oferite pe parcursul referatelor științifice, observații care au contribuit la finalizarea prezentei lucrări.

Pe această cale doresc să adresez mulțumiri și colegilor dr. Olga Pintilie și Conferențiar dr. Andrei Lobiuc, pentru ajutorul și sfaturile utile acordate, în ceea ce privește analiza statistică a datelor, precum și în cadrul efectuării unora dintre experimentele de laborator.

Mulțumesc familiei mele pentru toată înțelegerea și răbdarea manifestată în perioadele cele mai dificile, în decursul acestor ani și pentru sprijinul necondiționat pe parcursul elaborării tezei de doctorat.

Mulțumesc tuturor celor menționați, care m-au ajutat în anii elaborării acestei teze și vreau să subliniez că fără ajutorul primit de la dumneavoastră, finalizarea acestei lucrări nu ar fi putut fi posibilă.

CUPRINSUL TEZEI

ABREVIERI	
INTRODUCERE	
PARTEA I – STUDIU DE LITERATURĂ	
Capitolul 1. Stadiul actual al cercetărilor	
1.1. Considerații generale	
1.1.1. Poluarea mediului cu metale grele și metaloizi	
1.1.2. Metalele grele și metaloizii în viața plantelor.....	
1.1.3. Influența fierului asupra unor specii de plante.....	
1.1.4. Influența cuprului asupra unor specii de plante	
1.1.5. Influența arsenului și ionilor săi asupra unor specii de plante	
1.2. Efectul metalelor grele asupra speciei test <i>Triticum aestivum</i> L.	
1.3. Metode de decontaminare și de remediere a toxicității solurilor și reziduurilor miniere din zona minieră Tarnița	
1.3.1. Metode fizico-chimice de decontaminare a solurilor poluate cu metale grele	
1.3.2. Remedierea microbiologică a reziduurilor miniere cu culturi de drojdie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Meyen ex E.C. Hansen activă și inactivată.....	
1.3.3. Metode chimice de remediere a toxicității reziduurilor miniere.....	
1.3.3.1. <i>Determinarea rolului protector al glutathionului în timpul creșterii plantelor expuse la niveluri excesive de metale grele și arsen</i>	
1.3.3.2. <i>Remedierea toxicității metalelor grele din reziduurile miniere prin precipitare cu hidroxizi</i>	
PARTEA A II-A – CERCETĂRI PROPRII	
CAPITOLUL 2. Materiale și metode de cercetare	
2.1. Materiale	
2.1.1. Specii biologice test.....	
2.1.2. Reactivi și aparatură	
2.1.2.1. <i>Reactivi folosiți pentru determinarea metalelor grele prin spectroscopie de emisie optică cu plasmă cuplată inductiv (ICP-OES)</i>	
2.1.2.2. <i>Reactivi folosiți pentru determinarea metalelor grele prin spectrometrie de</i>	

absorbție atomică (AAS).....	
2.1.2.3. Reactivi folosiți pentru realizarea soluțiilor de tratament.....	
utilizate în testele germinative	
2.1.2.4. Aparatură.....	
2.2. Prelevarea probelor	
2.2.1. Aria de prelevare și pregătirea probelor de deșeu minier și sol	
2.2.2. Teste de germinare la plante test <i>Triticum aestivum</i> L., soiul Putna	
2.2.2.1. Dezinfectarea cariopselor.....	
2.2.2.2. Metoda de germinare a cariopselor	
2.2.3. Prepararea soluțiilor de tratament pentru testele de germinare	
2.2.3.1. Prepararea supernatantului toxic (ST).....	
2.2.3.2. Metoda de decontaminare a deșeurii minier metalifer (DMM) prin extracție cu apă	
2.2.3.3. Metoda de îndepărtare a compușilor toxici din supernatant prin precipitare cu hidroxizi.....	
2.2.3.4. Metoda de reducere a toxicității supernatantului cu culturi de drojdie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Meyen ex E.C. Hansen.....	
2.3. Metode de cercetare.....	
2.3.1. Metode de analiză prin spectroscopie de emisie optică cu plasmă cuplată inductiv (ICP-OES) a probelor de deșeu minier și de sol prelevate din arealul Tarnița.....	
2.3.2. Metode de analiză prin spectrometrie de absorbție atomică (AAS) a probelor de deșeu minier și de sol prelevate din arealul Tarnița.....	
2.3.3. Analiza parametrilor de germinare	
2.3.4. Prelucrarea statistică a datelor	
Capitolul 3. Poluarea cu metale grele și arsen din exploatările de cupru și baritină Tarnița și metode de decontaminare	
3.1. Metale grele și arsen în probele de deșeu minier și sol provenite din exploatările de cupru și baritină Tarnița	
3.1.1. Obiectivul cercetărilor	
3.1.2. Determinarea concentrației unor metale grele și metaloizi prin spectroscopie de emisie optică cu plasmă cuplată inductiv (ICP – OES)	
3.1.3. Determinarea concentrației unor metale grele prin spectrometrie de absorbție atomică (AAS).....	
3.1.4. Rezultate obținute	
3.1.5. Concluzii preliminare	

3.2. Evaluarea efectului toxic al reziduurilor miniere din exploatările de cupru și baritină Tarnița prin teste de germinație a cariopselor și de creștere a plantulelor rezultate la grâul comun, *Triticum aestivum* L., soiul Putna

- 3.2.1. Teste de germinație a cariopselor de grâu și de creștere a plantulelor rezultate pe solurile din vecinătatea haldei de deșeu minier
- 3.2.1.1. *Obiectivul cercetărilor*.....
- 3.2.1.2. *Modul de lucru*.....
- 3.2.1.3. *Rezultate obținute*
- 3.2.1.4. *Concluzii preliminare*
- 3.2.2. Teste de germinație a cariopselor de grâu și de creștere a plantulelor rezultate pentru evidențierea toxicității deșeurilor minier metalifer
- 3.2.2.1. *Obiectivul cercetărilor*.....
- 3.2.2.2. *Modul de lucru*.....
- 3.2.2.3. *Rezultate obținute*
- 3.2.2.4. *Concluzii preliminare*
- 3.2.3. Evidențierea toxicității unor extracte ale reziduurilor miniere prin teste de germinație a cariopselor de grâu și de creștere a plantulelor rezultate
- 3.2.3.1. *Obiectivul cercetărilor*.....
- 3.2.3.2. *Modul de lucru*.....
- 3.2.3.3. *Rezultate obținute*
- 3.2.3.4. *Concluzii preliminare*

3.3. Decontaminarea reziduurilor miniere din exploatările de cupru și baritină Tarnița.....

- 3.3.1. Efectul decontaminant al supernatantului unei culturi de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen asupra supernatanților toxici din reziduurile miniere
- 3.3.1.1. *Obiectivul cercetărilor*.....
- 3.3.1.2. *Modul de lucru*.....
- 3.3.1.3. *Rezultate obținute*
- 3.3.1.4. *Concluzii preliminare*
- 3.3.2. Efectul protector al glutatationului și reziduurile miniere toxice
- 3.3.2.1. *Obiectivul cercetărilor*.....
- 3.3.2.2. *Modul de lucru*.....
- 3.3.2.3. *Rezultate obținute*
- 3.3.2.4. *Concluzii preliminare*

3.3.3. Decontaminarea reziduurilor miniere prin precipitare cu hidroxizi	
3.3.3.1. Obiectivul cercetărilor.....	
3.3.3.2. Modul de lucru.....	
3.3.3.3. Rezultate obținute	
3.3.3.4. Concluzii preliminare	

Capitolul 4. Relația ionilor de Fier, Cupru, Arsen din exploatările de cupru și baritină

Tarnița cu plantulele test de grâu comun, *Triticum aestivum* L., soiul Putna.....

4.1. Efectul ionilor de fier și cupru asupra procesului de germinație la grâu.....

4.1.1. Obiectivul cercetărilor.....	
4.1.2. Modul de lucru.....	
4.1.3. Rezultate obținute	
4.1.4. Concluzii preliminare	

4.2. Evidențierea toxicității arsenitului prin teste de germinație a cariopselor de grâu.....

4.2.1. Obiectivul cercetărilor.....	
4.2.2. Modul de lucru.....	
4.2.3. Rezultate obținute	
4.2.4. Concluzii preliminare	

4.3. Efectul protector al glutatationului asupra grâului supus intoxicării cu ioni de arsenit

4.3.1. Obiectivul cercetărilor.....	
4.3.2. Modul de lucru.....	
4.3.3. Rezultate obținute	
4.3.4. Concluzii preliminare	

CONCLUZII GENERALE.....

DISEMINAREA REZULTATELOR OBȚINUTE

BIBLIOGRAFIE

ANEXA 1 – Lista lucrărilor științifice realizate din tematica tezei.....

ANEXA 2 – Participări la manifestări științifice și Lucrări științifice publicate din tematica tezei.....

INTRODUCERE

Existența metalelor grele și a unor metaloizi precum arsenul în sol și apă, apărute ca urmare a exploatărilor minere în România este o problemă majoră atât pentru sănătatea omului, cât și a întregului lanț trofic forestier. Datorită toxicității lor ridicate, a capacității de acumulare și contaminare, aceste elemente cu potențial dăunător pentru toate ecosistemele, reprezintă un adevărat pericol pentru oamenii și animalele din arealul contaminat

Poluarea determinată de activitatea minieră și prezența unor cantități mari de metale grele și arsen în mediu indusă de activitatea umană este una dintre cele mai importante sarcini ale problemelor actuale de mediu. În România contaminarea cu aceste elemente, în special în zonele forestiere [79], unde au fost exploatații minere, reprezintă o adevărată provocare pentru cercetare, cum este și arealul Tarnița, din comuna Ostra, județul Suceava. În arealul minier forestier Tarnița-Ostra supus studiului în cadrul tezei de doctorat au rămas haldele de deșeuri și iazurile de decantare, care reprezintă un adevărat pericol pentru sănătatea lanțului trofic. Au fost detectate atât în halde, cât și în împrejurimile acestora cantități excesive de metale grele, precum fier, cupru, zinc, plumb, cadmiu și metaloizi precum arsenul. Creșterea excesivă a cantităților acestor elemente în sol, în principal din cauza poluării, conduce la tulburări metabolice la plante afectând și calitatea produselor alimentare, care ar putea fi dăunătoare sănătății omului [14].

Motivația cercetărilor realizate în cadrul tezei de doctorat este reprezentată de faptul că solul contaminat, apele de suprafață și cele freactice, dar și aerul din arealul Tarnița pot fi surse majore semnificative pentru sorbția metalelor grele de către plante, putându-se acumula prin rădăcini și frunze. Metalele grele precum Cd, Hg, Pb, Fe și Cu în exces sunt foarte toxice pentru om și mediul înconjurător, plantele fiind considerate ca potențiali biosorbenți pentru îndepărtarea urmelor de metale din sol. De aceea, cercetările efectuate au avut ca scop decontaminarea solurilor afectate de poluarea cu metale [88], dar și a apelor de extracție, adică a supernatanților obținuți din materialele miniere, înainte de a realiza teste de germinație pe specia *Triticum aestivum* L. .

Teza de doctorat intitulată "Cercetări privind efectele toxicității solurilor contaminate cu metale grele asupra unor specii de plante superioare. Studiu de caz *Triticum aestivum* L." a avut ca obiectiv principal evaluarea efectelor nefavorabile induse speciei de grâu comun de prezența metalelor grele și arsenului în haldele și solurile provenite din arealul minier

Tarnița. Astfel s-au realizat, într-o primă fază a cercetărilor doctorale, determinări ale concentrației metalelor grele prezente în probele de deșeu minier și de sol colectate din arealul Tarnița și în probele cu reziduuri miniere (supernatanți toxici), utilizând tehnicile spectrofotometrice ICP-OES și AAS. Similar unor cercetări realizate în anii anteriori în zona fostei mine de baritină de către Ștumbea în anul 2013 și apoi de către Chicoș și colaboratorii în anul 2016, au fost identificate în arealul forestier Tarnița atât în haldele de deșeu, în solurile din împrejurimile acestora, cât și în iazurile de decantare rămase în urma exploatărilor miniere concentrații însemnate de metale grele precum fier, cupru, bariu, zinc, plumb și altele [77, 11]. De asemeni, s-a realizat o corelație între concentrațiile principalilor contaminanți (fier, cupru, arsen) identificați în probe și valorile parametrilor de germinație obținute pentru specia *Triticum aestivum* L. după 3 și, respectiv, 7 zile de tratament. Primele simptome vizibile legate de toxicitatea metalelor grele au inclus o încetinire a procesului de germinare a cariopselor, o diminuare a creșterii plantulelor, o creștere redusă a rădăcinii, dar și schimbări în morfologia rădăcinii, rădăcinile fiind mai afectate decât frunzele, deoarece acestea au fost organele care au intrat în contact direct cu elementul toxic. De aceea, utilizarea culturilor de cereale pentru gestionarea solului poluat cu metale grele a devenit un mod ecologic de strategie de remediere.

De asemenea, s-au studiat și aplicat în laborator metodele de decontaminare și de remediere a solurilor contaminate și a supernatanților toxici obținuți prin extracție, ce conțin metale grele și arsen, în vederea reducerii toxicității acestora asupra cariopselor și plantulelor din specia *Triticum aestivum* L.. Folosirea speciei test *Triticum aestivum* L. poate oferi o eficiență tehnică, întâi pentru măsurarea parametrilor de germinație în prezența agenților contaminanți, iar apoi pentru îndepărtarea metalelor grele din solurile poluate [66, 71, 85]. Rezultatele obținute *in vitro*, în condiții experimentale de laborator, vor furniza informații cu privire la riscurile potențiale ale metalelor grele și arsenului din zonele contaminate pentru grâu, adică modificările apărute în procesele de germinare a cariopselor și de creștere a plantelor, efectul asupra macromoleculilor sau activității enzimelor antioxidante la culturile de monocotiledonate. Acestea vor ajuta la identificarea problemelor ce pot apărea în cazul cultivării plantelor în zonele contaminate, precizând dacă soiul Putna este potrivit și rezistent pentru a putea fi cultivat în zona Tarnița.

Astfel, un obiectiv important al cercetărilor doctorale a constat în investigarea unor metode de decontaminare a deșeurilor din haldă, soluri și ape și de remediere a compușilor toxici, metode care pot fi aplicate în arealul minier Tarnița: decontaminarea fizico-chimică prin extracția contaminanților cu apă; bioremedierea supernatanților toxici/reziduurilor

miniere utilizând culturi de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen activă și inactivată; decontaminarea chimică a supernatanților toxici/reziduurilor miniere cu glutatation, precum și prin precipitare cu hidroxizi, precipitarea chimică fiind una dintre cele mai frecvente și mai extinse tehnici de remediere pentru îndepărtarea metalelor grele din efluenții industriali ce conțin aceste metale toxice [6].

Datorită conținutului ridicat de contaminanți din deșeurile miniere metalifere din zona minieră Tarnița, un alt obiectiv din cadrul cercetărilor doctorale a urmărit investigarea relației individuale a ionilor de fier, cupru și, respectiv, de arsen (sub formă de ioni de arsenit și arsenat) cu specia *Triticum aestivum* L. în experimentele de germinație realizate *in vitro*, în condiții de laborator. În acest sens, a fost determinată germinația cariopselor și creșterea plantulelor de grâu în prezența ionilor menționați, la concentrații reduse [63, 72]. Absorbția și distribuția microelementelor și a metalelor în plantele de cultură au fost studiate cu mare atenție, datorită importanței lor [81].

Cercetările realizate în cadrul aceleiași capitol al tezei de doctorat s-au orientat și asupra toxicității formelor arsenului (arsenit și arsenat), care se găsesc în arealul minier Tarnița. Studiile s-au realizat pe specia *Triticum aestivum* L. soiul Putna în prezența unor soluții de arsenit și arsenat, în vederea evidențierii toxicității acestora prin teste de germinație realizate în condiții de laborator și a evaluării posibilității de protecție a plantelor în intoxicația cu ioni de arsenit, folosind glutatation.

Specia test, grâul comun (*Triticum aestivum* L.) este o plantă cu importanță nutrițională, ce poate fi un mijloc important de transmitere a metalelor grele spre nivelurile trofice superioare. În același timp reziduurile vegetale obținute din plantele grâu după decontaminarea solului ar putea fi utilizate ca biomasă lignocelulozică pentru producerea de energie prin degradare biochimică sau termochimică, mai exact pentru producerea de bioetanol, ca înlocuitor parțial al combustibililor fosili [32], cunoscut fiind faptul că cerealele reprezintă o biomasă regenerabilă bogată în zaharuri precum amidon și lignoceluloze, constituind principala materie primă de producere a bioetanolului [38].

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI

Scopul cercetărilor efectuate a constat în identificarea și cercetarea efectelor toxicității solurilor contaminate cu metale grele și arsen din arealul minier Tarnița, comuna Ostra, județul Suceava (mină de baritină dezafectată), asupra plantelor test de grâu comun - *Triticum aestivum* L., soiul Putna - prin teste experimentale realizate *in vitro*, în condiții de laborator, privind procesul de germinație a cariopselor și procesul de creștere a plantulelor

astfel rezultate, exprimat prin parametri morfologici specifici (masa medie, înălțimea medie).

Pentru îndeplinirea Scopului astfel enunțat s-au formulat următoarele **obiective specifice**:

- identificarea zonelor contaminate cu metale grele în arealul de cercetare, determinarea compoziției deșeurilor minier metalifer colectat din haldă și a solurilor din împrejurimi și corelarea caracteristicilor probelor prelevate din zona de lucru (conținut de metale grele, cu accent pe concentrațiile în exces de fier, cupru și arsen) cu anumite procese funcționale ale plantulelor test rezultate din cariopse de grâu germinate în condiții experimentale de laborator, pe medii contaminate cu metale grele, exprimate prin intensitatea procesului de germinare determinat (energie și facultate germinativă), precum și prin valoarea unor parametri morfologici specifici (masa medie, înălțimea medie);
- identificarea unor metode de decontaminare a solurilor și apelor contaminate cu metale grele și arsen provenite din arealul minier avut în atenție în condiții experimentale de laborator, în vederea reducerii toxicității acestora înainte de a realiza testele de germinație și de creștere a plantulelor test de grâu comun - *Triticum aestivum* L., soiul Putna, metode ce pot fi aplicate în cadrul arealului Tarnița:
 - metode fizico-chimice, precum extracția solurilor cu apă;
 - metode microbiologice de bioremediere a supernatanților toxici/reziduurilor miniere, utilizând culturi de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen, activă și inactivată;
 - metode chimice de decontaminarea chimică a supernatanților toxici/reziduurilor miniere cu glutatation, precum și prin precipitare cu hidroxizi.
- investigarea efectelor ionilor de fier, de cupru și, respectiv de arsen (sub formă de arsenit și arsenat), la concentrații mai mici, comparativ cu cele din deșeurile miniere metalifere din zona Tarnița, aplicând tehnica specifică de germinație a cariopselor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna în condiții experimentale *in vitro*.
- diseminarea rezultatelor la manifestări științifice și publicarea lor în reviste naționale și/sau internaționale.

În acord cu obiectivele urmărite, au fost efectuate, *in vitro*, experimente de germinare a cariopselor de grâu și de creștere a plantulelor test în condițiile prezenței toxicității solurilor contaminate provenite din haldele de deșeu minier metalifer și experimente de remediere a

cantităților de metale grele conținute de acestea, în vederea inhibării toxicității reziduurilor miniere/supernatanților toxici înainte de a realiza testele de germinație.

Teza de doctorat este structurată în două părți:

Partea I – STUDIU DE LITERATURĂ – cuprinde un singur capitol, în care sunt prezentate: considerații generale despre metale grele și metaloizi ca arsenul, precum și poluarea solului cu aceste elemente chimice, influența metalelor grele și metaloizilor asupra plantelor, cu accent pe fier, cupru și arsen, efectul metalelor grele asupra unor specii de plante test, precum *Triticum aestivum* L.; metode fizico-chimice de decontaminare a solurilor poluate cu metale grele prin extracție cu apă a contaminanților, metode de remediere microbiologică a reziduurilor miniere cu culturi de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen și metode chimice de remediere a toxicității reziduurilor miniere cu glutatation și, ulterior, prin precipitare cu hidroxizi.

Partea a II-a – CERCETĂRI PROPRII – alcătuită din patru capitole: un capitol cuprinzând *Materiale și metode de cercetare* și două capitole de rezultate personale, fiecare incluzând *Obiectivul cercetărilor, Modul de lucru, Rezultate obținute și Concluzii preliminare*.

Lucrarea se încheie cu câteva *Concluzii generale, Diseminarea rezultatelor obținute și Bibliografie*.

PARTEA I – STUDIU DE LITERATURĂ

Capitolul 1. Stadiul actual al cercetărilor

1.1. Considerații generale

Metalele grele au fost identificate ca prioritate majoră de cercetare, în vederea remedierii zonelor forestiere poluate din România. Poluarea solului cu metale grele și metaloizi este un mare pericol pentru mediul înconjurător, de aceea o preocupare importantă o reprezintă protejarea acestuia împotriva efectelor toxice ale elementelor menționate, precum și a acumulării lor de-a lungul lanțului trofic, ceea ce duce la probleme ecologice și de sănătate grave. Unele metale grele, în concentrații mici sunt esențiale pentru plante, dar în concentrații mari pot provoca tulburări metabolice și inhiba creșterea majorității speciilor de plante. Metalele grele se pot acumula în lanțul trofic, prezentând un pericol semnificativ pentru mediul înconjurător și sănătatea umană [29].

Comparativ cu fierul și cuprul, arsenul nu este esențial pentru plante și alte organisme. Plantele acumulează arsen în rădăcină și îl transportă în tulpină, prin mecanisme active sau pasive. Expunerea plantelor, chiar și la concentrații reduse în arsen, poate provoca modificări în morfologia, fiziologia, dar și biochimia acestora [49].

1.2. Efectul metalelor grele asupra speciei test *Triticum aestivum* L.

Gang și colaboratorii au studiat în anul 2013 efectul diferitelor concentrații de metale grele, precum cuprul, cobaltul și cromul asupra germinării cariopselor și creșterii plantulelor de grâu comun (*Triticum aestivum* L.) [25]. Rezultatele obținute de aceștia au arătat că, la concentrații crescute de metale grele s-a înregistrat o scădere a procentului de cariopse germinate față de control, dar diferențele nu au fost semnificative până la concentrații de metale grele de 100 ppm (Cu, Co și Cr). Cu toate acestea, toate cele trei metale grele au redus semnificativ capacitatea de germinare a semințelor, în comparație cu martorul, la 200-500 ppm concentrații ($P \leq 0,01$).

Mahmood și colaboratorii au studiat în anul 2007 efectul cuprului la concentrații de 1-10 ppm asupra speciei de grâu comun (*Triticum aestivum* L.) și au constatat că la 10 ppm cupru (10 μ M) există o reducere mai mare de 35% în germinarea cariopselor [45].

Singh și colaboratorii (2007) au studiat efectul cuprului la concentrații de 5- 100 ppm (mg/L), asupra cariopselor de grâu comun (*Triticum aestivum* L.) și au constatat că la 100 ppm cupru, facultatea germinativă a semințelor este de aproximativ 65% [72].

O serie de studii au raportat că plantulele de grâu au răspuns rapid la o concentrație mai mare de metale în ecosistemele terestre, prin schimbarea parametrilor de germinare și perturbarea creșterii rădăcinilor, în comparație cu cea a tulpinii [30]. Schimbarea înregistrată în creșterea rădăcinii apare, probabil, din cauza consecințelor expunerii directe la toxicitatea metalelor grele și acumularea preferențială a acestor elemente în radiculă, urmată de mobilitatea lentă către celelalte organe vegetative ale plantei [27]. Un astfel de efect poate fi explicat prin faptul că rădăcinile afectate pot provoca o mișcare mai lentă a metalelor către celelalte organe vegetative ale plantei [21].

La concentrații de 10-100 μM , fierul afectează creșterea plantulelor și dezvoltarea frunzelor [42], prin producerea în exces de specii reactive de oxigen [53]. S-a observat că toxicitatea fierului poate determina scăderea activității superoxid dismutazei la plantele de grâu și orez [76].

Fierul, în stare feroasă și mai rar ferică, se leagă de inelul tetrapirolic, formând citocromii existenți în cloroplaste, ce catalizează diferite reacții care stau la baza fotosintezei. În același timp, fierul joacă un rol important în procesul de respirație [27].

Pentru grâul comun, accesibilitatea metalelor este puternic influențată de umiditatea și reacția solului. Astfel, odată cu creșterea umidității la aproximativ 60% din capacitatea pentru apă a solului, solubilitatea cuprului are o tendință de sporire, iar după această valoare începe să se reducă substanțial. În ceea ce privește fierul, pe măsură ce umiditatea solului se apropie de 100% din capacitatea pentru apă, solubilitatea crește de 20 de ori. În ceea ce privește reacția solului, cu cât pH-ul este mai acid, solubilitatea metalelor grele crește, în special a fierului.

1.3. Metode de decontaminare și de remediere a toxicității solurilor și reziduurilor miniere din zona minieră Tarnița

1.3.1. Metode fizico-chimice de decontaminare a solurilor poluate cu metale grele

Metodele de remediere și de depoluare a unor areale miniere sunt dependente de tipurile de sol, de proprietățile substanțelor chimice găsite în zonele respective, de adâncimea de contaminare, precum și de procesele naturale care se pot manifesta la locul contaminat [51].

Extracția unor metale grele din sol și reziduurile metalifere reprezintă un proces practic de spălare cu apă sau diverse soluții, în vederea purificării solurilor ex-situ, pentru a îndepărta impuritățile. Prin acest procedeu contaminanții din sol pot fi eliminați prin două moduri: fie prin dizolvarea sau reținerea acestora în soluția de spălare, care este ulterior

tratată prin metode convenționale de tratare a apelor reziduale, fie prin concentrarea acestora într-un volum mai mic de sol și apoi separarea gravitațională a particulelor prin spălare, metodă similară tehnicilor utilizate pentru nisip și pietriș [62].

1.3.2. Remedierea microbiologică a reziduurilor miniere cu culturi de drojdie

Saccharomyces cerevisiae Meyen ex E.C. Hansen activă și inactivată

Dintre drojdiile din genul *Saccharomyces*, *S. cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen prezintă un interes special ca biosorbent [22, 82]. Este o drojdie inofensivă, utilizată pe scară largă în industria alimentară. *S. cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen are capacitatea de a elimina metalele grele din soluții apoase la concentrații scăzute, precum și de a tolera modificările pH-ului și temperaturii în timpul diferitelor procese [44, 84]. Biomasa de *S. cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen poate elimina metalele grele, indiferent dacă este activă din punct de vedere metabolic (în viață) sau inactivată (moartă) [23]. Avantajele utilizării microorganismelor inactivate includ eliminarea mediilor de cultură și a nutrienților speciali, reducând astfel costul decontaminărilor. În plus, este posibilă regenerarea și reutilizarea biomasei, cu opțiunea de a o imobiliza și de a facilita modelarea matematică a fenomenelor implicate în uniunea drojdie-metal [15].

1.3.3. Metode chimice de remediere a toxicității reziduurilor miniere

1.3.3.1. Determinarea rolului protector al glutatationului în timpul creșterii plantelor expuse la niveluri excesive de metale grele și arsen

Glutacionul este considerat cel mai puternic antioxidant natural, cel mai bun instrument de protecție celulară, garantul sănătății organismului [73].

În anul 2006, Ciobanu și colaboratorii au demonstrat că parametrii de germinare au scăzut semnificativ când cariPOSELE din specia *Triticum aestivum* L. au fost tratate cu ioni de Cu^{2+} la concentrația 10^{-2} M, iar acești parametri au fost recuperați la adăugarea în soluția de tratament a glutatationului [13].

GSH acționează ca precursor al sintezei de fitochelatine, peptide sintetizate posttranslațional, ce joacă un rol important în reglarea concentrațiilor intracelulare ale metalelor grele și nu numai [31, 61, 68]. Fitochelatinele rețin metalul și formează un complex care este apoi transportat în vacuole [26, 65].

S-a constatat că în timpul germinării cariopselor de grâu comun, glutacionul la concentrația de 10 mM manifestă un rol protector împotriva toxicității arsenitului de sodiu, protejând procesul de germinare și stimulând creșterea plantulelor [8].

1.3.3.2. Remedierea toxicității metalelor grele din reziduurile miniere prin precipitare cu hidroxizi

Cea mai utilizată tehnică de precipitare chimică este precipitarea cu hidroxizi datorită simplității sale relative, costului redus și controlului pH-ului [34]. Solubilitățile diferiților hidroxizi metalici sunt reduse la minimum, în domeniul de pH 8,0 – 11,0. Hidroxizii metalici pot fi eliminați prin floclurare și sedimentare.

Procesul de precipitare a hidroxidului utilizând hidroxizii de calciu și sodiu pentru eliminarea ionilor de cupru din apele uzate, a fost evaluat de Mirbagheri și Hosseini în anul 2005 [50]. pH-ul optim pentru precipitarea maximă a ionilor de cupru a fost de aproximativ 12,0, atât pentru hidroxidul de calciu cât și pentru hidroxidul de sodiu, iar concentrația cuprului a fost redusă de la 48,51 mg / L la 0,694 mg / L.

Tratamentul cu hidroxizi a crescut dimensiunea particulelor precipitatului și a îmbunătățit semnificativ eficiența îndepărtării metalelor grele. Concentrațiile de crom, cupru, plumb și zinc din efluenți pot fi reduse de la concentrația inițială de 100,0 mg/L la 0,08; 0,14; 0,03 și, respectiv, 0,45 mg/L [10, 41].

Precipitarea este un proces care aduce o substanță dintr-o soluție la o formă insolubilă. Acest proces alterează solubilitatea unor ioni metalici prin reacția cu substanțe chimice specifice, determinându-le să precipite în soluție. Această abordare poate fi adoptată în cazul solurilor contaminate cu metale grele, pentru a converti metalele aflate în exces la forme insolubile, a reduce mobilitatea acestora în plante și efectele negative ale toxicității acestora asupra mediului înconjurător.

PARTEA A II-A – CERCETĂRI PROPRII

CAPITOLUL 2. Materiale și metode de cercetare

În efortul de rezolvare a scopului cercetărilor prezentei teze, prezentat la începutul acesteia, prin cercetările realizate am urmărit practic să investigăm răspunsurile fiziologice ale plantelor test (grâul comun - *Triticum aestivum* L., soiul Putna) atât la excesul de metale grele din deșeurile miniere colectate din halda și din solurile situate în împrejurimile fostei mine de baritină Tarnița, comuna Ostra, județul Suceava, cât și la supernatnații obișnuiți din substartul din zona respectivă și decontaminați prin metode microbiologice și, respectiv, chimice.

În acord cu obiectivele urmărite, în prezenta lucrare de doctorat au fost determinate concentrațiile metalelor grele și a arsenului din probele colectate din perimetrul de experiență prin metoda ICP-OES (spectroscopie de emisie optică cu plasmă cuplată inductiv) și metoda AAS (spectrometrie de absorbție atomică), apoi au efectuate experimente de germinare a cariopselor de grâu comun și de creștere a plantulelor test sub influența toxicității deșeurilor miniere provenite din haldă, a solurilor contaminate și a supernatanților toxici, precum și experimente de remediere a cantităților de metale grele existente în acestea prin decontaminare biologică (tratamente cu drojdia *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen) și chimică (tratamente cu glutatation și precipitare cu hidroxizi), în vederea inhibării toxicității reziduurilor miniere înainte de a realiza testele de germinație pe speciile de plante test. În același timp s-a urmărit și efectul ionilor de fier, cupru și arsen asupra soiului test de grâu comun, precum și efectul protector pe care îl poate avea glutatationul asupra acestui soi în cazul unei toxicități determinate de ionii de cupru în concentrații excesive și, respectiv, de prezența ionilor arsenat/arsenit. Testele de germinație și de cultivare a plantulelor au fost realizate prin experimente *in vitro*, în spațiile de cercetare ale Laboratorului de cercetare CERNESIM - Facultatea de Biologie și ale Laboratorului de Biochimie - Facultatea de Chimie, din cadrul Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași.

2.1. Materiale

2.1.1. Specii biologice test

Cariopsele de grâu de primăvară (*Triticum aestivum* L.), soiul Putna omologat la Stațiunea de Cercetare Dezvoltare Agricolă Suceava, România, de către Gașpar și colaboratorii au fost selectate în funcție de mărimea lor pentru uniformitate și folosite în experimentele de germinare în prezența deșeurilor miniere metalifere și a unor probe de sol

recoltate din perimetrul exploatării miniere de la Tarnița, județul Suceava. Aceste cariopse de grâu comun au fost tratate cu extracte apoase obținute din deșeu minier metalifer, precum și din probele de sol colectate din jurul zonei miniere avute în atenție. De asemenea, au fost utilizate și unele extracte apoase ale acestor materiale după decontaminarea lor microbiologică cu drojdii sau pe cale chimică cu glutatone și, respectiv, prin precipitare cu hidroxizi. Separat, au fost aplicate unele soluții chimice ale unor săruri de metale grele (FeSO_4 , CuSO_4 și CuCl_2) și ioni ai arsenului sub formă de NaH_2AsO_3 și NaH_2AsO_4 , pentru evidențierea acțiunii fiecărui tip de ion în parte.

Masa de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen biologic activă a fost procurată de la o firmă comercială, S.C. ROMPAK S.R.L., Pașcani, România și menținută la 4 °C înainte de utilizare, fiind utilizată în experimentele de decontaminare ca urmare a faptului că literatura de specialitate evidențiază, prin numeroase cercetări, eficacitatea drojdiei în decontaminarea solului și apelor de metale grele [33, 43, 83].

2.2. Prelevarea probelor

2.2.1. Aria de prelevare și pregătirea probelor de deșeu minier și sol

Mina de cupru și baritină de la Tarnița, închisă și dezafectată din anul 2006, reprezintă un mare pericol pentru mediul înconjurător. Zona contaminată cu săruri de metale grele și metaloizi, cum ar fi compușii arsenului, precum și cu alte elemente, cum ar fi compușii aluminiului și ai metalelor grele se află în comuna Ostra, pe malurile râurilor Brăteasa și Tărnicioara, ultimul fiind afluent de dreapta al râului Moldova.

Depozitele uriașe de deșeu minier metalifer rămase după închiderea minei de cupru și baritină din zona Ostra-Tarnița prezintă efecte negative severe pentru mediul înconjurător, acestea fiind depozitate în patru iazuri de decantare: Poarta Veche, Ostra, Tărnicioara și Valea Străjii, dintre toate, iazul Tărnicioara conținând cea mai mare cantitate de deșeu minier.

Pentru a investiga starea actuală a mediului din zona Tarnița au fost prelevate probe de deșeu minier metalifer (DMM) din halda de steril și probe de sol colectate din vecinătatea haldei de steril (aproximativ la 30 m depărtare de aceasta). Deoarece în urma exploatărilor miniere de baritină au fost create mai multe halde de steril, în Figura 2.1 sunt prezentate punctele de prelevare a probelor.



Fig. 2.1. Complexul minier Tarnița, Suceava, România:

(a) Poziționarea haldelor de steril în complexul minier Tarnița (A – Tărnicioara; B – Valea Straja; foto din sursa Google Earth); (b) Haldă de steril din arealul Valea Straja; (c) Ape contaminate în jurul haldelor de steril; (d) Râu contaminat Tărnicioara, situat la aprox. 30 m depărtare de depozitul de deșeu minier.

Probele colectate din halda de deșeu minier metalifer și din vecinătatea acesteia (Figura 2.1, b) au fost prelevate din orizonturile de suprafață (20 – 30 cm adâncime), de jos în sus, în săculeți de polietilenă. Acestea au fost condiționate prin uscare în etuvă, la temperatura de 40 °C, așezate pe o hârtie de filtru într-un strat subțire de circa 2 cm, apoi au fost cernute printr-o sită cu fracțiunea de 2 mm și, în final, omogenizate. Toate probele au fost depozitate în vase de polietilenă închise, păstrate la + 4 °C și analizate prin spectrometrie ICP-OES și AAS.

În vederea atingerii obiectivelor din teza de doctorat, probele colectate au fost folosite pentru a testa toxicitatea ionilor metalelor grele și ai arsenului existenți în aceste eșantioane utilizând cariopse de grâu comun - *Triticum aestivum* L., soiul Putna, iar pentru a identifica metode de decontaminare a solurilor poluate cu însemnate cantități de metale grele, soluri prelevate din arealul minier de cupru și baritină Tarnița.

2.2.2. Teste de germinare la plante test *Triticum aestivum* L., soiul Putna

2.2.2.1. Dezinfectarea cariopselor

Dezinfectarea cariopselor s-a realizat cu hipoclorit de sodiu 5%, timp de 5 minute. Ulterior, cariopsele au fost spălate de mai multe ori cu apă ultrapură MilliQ, până la dispariția mirosului caracteristic [4, 55].

2.2.2.2. Metoda de germinare a cariopselor

Experimentele s-au realizat în trei repetiții, cu loturi de câte 50 de cariopse, care au fost introduse în eprubete suficient de largi (180 x 18 mm) pentru a permite amestecarea lor

cu soluțiile de tratament, după care a fost adăugată soluția de tratament corespunzătoare fiecărei probe. Amestecurile aflate în eprubete au fost supuse incubării timp de o oră, cu agitare intermitentă, timp suficient pentru îmbibarea semințelor cu soluțiile de tratament, conform recomandărilor ISTA (Seed Science and Technology, 1993) [48].

După o oră cariopsele, împreună cu soluția cu care s-a realizat tratamentul, au fost distribuite uniform în plăci Petri cu diametrul de 9 cm, fiecare dispunând de câte două runde de hârtie de filtru suprapuse, conform recomandărilor ISTA (Seed Science and Technology, 1993) [48]. Pentru păstrarea mediului de lucru steril s-a lucrat sub hota de protecție microbiologică și PCR cu flux de aer vertical. Plăcile Petri au fost menținute pe toată perioada de germinație în camera de creștere, prevăzută cu sistem de programare a temperaturii, umidității și luminii. Parametrii de lucru experimentali din camera de creștere (Snijders Scientific, Netherlands) temperatură, umiditate și lumină au fost selectați astfel încât să corespundă condițiilor de viață specifice speciei *Triticum aestivum* L. [58]. Pentru germinație s-au asigurat în camera de creștere următoarele condiții: temperatură de 24 °C (± 1) și un regim de iluminare de 16 ore lumină/8 ore întuneric. Întregul procesul de germinare astfel organizat a durat timp de 7 zile [20, 67].

Experimentele s-au realizat în Laboratorul de cercetare CERNESIM al Facultății de Biologie și în Laboratorul de Biochimie din cadrul Facultatea de Chimie, Universitatea "Alexandru Ioan Cuza" din Iași.

2.2.3. Prepararea soluțiilor de tratament pentru testele de germinație

2.2.3.1. Prepararea supernatantului toxic (ST)

Pentru determinarea efectului reziduurilor miniere de la Târnița asupra speciilor vegetale supuse germinării și creșterii plantulelor în testele biologice au fost introduse, în trei repetiții, probe de câte 1 g de material omogenizat, colectat din depozitul de steril în tuburi de centrifugare și supuse extracției cu câte 10 mL de apă ultrapură Mili-Q pe baia cu ultrasunete timp de 15 minute. Pentru extragerea metalelor grele, au fost adaptate metodele aplicate de către Rauret și colaboratorii în anul 1989 și, respectiv, de către Döelsch și colaboratorii în anul 2006, astfel suspensiile rezultate au fost supuse ultracentrifugării timp de 5 minute la 5000 rpm [64, 16]. Solul și materialul metalifer original, precum și probe de câte 1 g din aceleași materiale solide din care au fost îndepărtate reziduurile solubile în apă au fost depuse uniform pe hârtia de filtru din respectivele cutii Petri. Supernatantul toxic a fost astfel îndepărtat, însă a fost folosit în experimente de germinație, pentru a verifica efectul metalelor grele extrase asupra unor specii de plante test.

2.2.3.2. Metoda de decontaminare a deșeurilor minier metalifer (DMM)

prin extracție cu apă

S-a luat în lucru o cantitate de 1 g de DMM care a fost extrasă cu câte 10 mL de apă ultrapură Mili-Q pe baia cu ultrasunete timp de 15 minute. Supernatantul toxic obținut în urma ultracentrifugării timp de 5 minute la 5000 rpm a fost îndepărtat, iar materialul solid provenit de la DMM a fost amestecat cu 5 mL de apă ultrapură milli-Q și s-a utilizat în testele de germinație.

Pentru proba cu DMM extras de două ori, după îndepărtarea supernatantului obținut după prima extracție, peste extractul cu DMM s-au mai adăugat 10 mL de apă ultrapură Mili-Q. Supernatantul toxic obținut în urma ultracentrifugării timp de 5 minute la 5000 rpm, a fost îndepărtat, iar solidul extras a doua oară, a fost amestecat cu 5 mL de apă ultrapură milli-Q și s-a utilizat de asemenea în testele de germinație.

Pentru proba cu DMM extras de trei ori, după îndepărtarea supernatantului obținut după a doua extracție, peste extractul cu DMM s-au mai adăugat 10 mL apă ultrapură Mili-Q. Supernatantul toxic obținut în urma ultracentrifugării timp de 5 minute la 5000 rpm a fost îndepărtat, iar extractul cu DMM extras a treia oară, a fost amestecat cu 5 mL de apă ultrapură milli-Q și s-a utilizat în testele de germinație.

2.2.3.3. Metoda de îndepărtare a compușilor toxici din supernatant

prin precipitare cu hidroxizi

Pentru remedierea solului și a zonei puternic contaminate s-a propus îndepărtarea conținutului de metale grele și arsen din apele de spălare prin metoda precipitării cu soluții de hidroxizi (sodiu, calciu etc.), după metoda adaptată și utilizată de Jang și colaboratorii în anul 2007 [37]. Astfel, peste supernatantul toxic s-a adăugat o soluție de NaOH 4% până la pH 5,0, iar amestecul astfel obținut a fost supus ultracentrifugării timp de 5 minute la 5000 rpm. Separat s-a realizat alcalinizarea cu aceeași soluție alcalină până la un pH 12,0. Supernatantul obținut a fost în final neutralizat cu o soluție de HCl 4% și NaOH 4% până la pH 6,9-7,0 pentru a nu afecta germinația plantelor de testare. După centrifugare, pentru îndepărtarea precipitatelor obținute, toate aceste soluții decontaminate prin precipitare cu hidroxizi au fost utilizate, de asemenea, în cercetările biologice. Conținutul de metale grele al tuturor soluțiilor a fost măsurat prin spectrometria de absorbție atomică (AAS).

2.2.3.4. Metoda de reducere a toxicității supernatantului cu culturi de drojdie

Saccharomyces cerevisiae Meyen ex E.C. Hansen

Proba de drojdie activă folosită pentru prepararea unei suspensii a fost obținută prin amestecarea a 5 g de drojdie cu 10 mL apă ultrapură milli-Q timp de o oră la temperatura camerei, agitându-se intermitent.

Pentru proba de drojdie inactivată 5 g de drojdie au fost tratate cu 10 mL apă ultrapură milli-Q aflată la temperatura de fierbere, procedură ce a fost realizată prin agitare intermitentă, timp de o oră, pe o baie de apă la 100 °C, metodă adaptată după Göksungur și colaboratorii, care au inactivat culturile de drojdie prin menținerea lor la temperatura de 121°C timp de 15 minute [28].

Pentru bioremedierea supernatantului s-a utilizat drojdie activă, și anume 5 g de drojdie au fost incubate timp de o oră cu 10 mL soluție toxică (6 mL supernatant toxic și 4 mL apă ultrapură milli-Q).

Pentru reducerea toxicității supernatantului care conține ioni de metale grele s-a utilizat drojdie inactivată, obținută din 5 g de drojdie tratate cu 10 mL soluție supernatant diluat (6 mL supernatant toxic și 4 mL apă ultrapură milli-Q), care se afla la temperatura de fierbere; amestecul rezultat a fost menținut în continuare, timp de o oră, cu agitare intermitentă, pe baia de apă la 100 °C.

Toate amestecurile obținute ca mai sus, au fost supuse centrifugării timp de 5 minute la 5000 rpm, iar 5 mL din supernatantul obținut a constituit proba de drojdie activă/inactivată și, respectiv, drojdie activă/inactivată și supernatant toxic (ST). Pentru comparația probelor cu drojdie activă cu cele cu drojdie inactivată, au fost realizate probe de control în trei repetiții, cu câte 5 mL de apă ultrapură milli-Q și 50 de cariopse de grâu comun.

2.3. Metode de cercetare

2.3.1. Metode de analiză prin spectroscopie de emisie optică cu plasmă cuplată inductiv (ICP-OES) a probelor de deșeu minier și de sol prelevate din arealul Tarnița

Analizele au fost realizate în cadrul laboratorului de Biochimie de la Facultatea de Chimie, UAIC Iași și al laboratorului de Chimie Analitică, Universitatea de Tehnologie Chimică și Metalurgică, Sofia, Bulgaria.

2.3.2. Metode de analiză prin spectrometrie de absorbție atomică (AAS) a probelor de deșeu minier și de sol prelevate din arealul Tarnița

Analizele au fost realizate în cadrul laboratorului de Biochimie de la Facultatea de Chimie, UAIC Iași și al Laboratorului Stațiunii de cercetare I.C.A.S. Marian Dracea, Câmpulung Moldovenesc, Suceava.

2.3.3. Analiza parametrilor de germinație

Procesul prin care embrionul unei cariopse trece din starea de dormanță la cea activă, în urma căreia apare o plantulă, se numește germinație. La specia *Triticum aestivum* L. germinarea este unipolară, adică rădăcina și tulpina ies din cariopsă prin același loc [3].

În vederea evaluării parametrilor de germinație a cariopselor, a dimensiunilor și, respectiv, a masei plantulelor rezultate s-au efectuat experimentele de germinație în prezența soluțiilor de tratament, teste ce au avut o durată de 3 până la 7 zile [20, 67].

După 3 zile de tratament s-a determinat numărul de semințe germinate (energia germinativă, E_g , exprimată procentual).

Energia germinativă (E_g , %), reprezintă capacitatea semințelor de a germina (pentru *Triticum aestivum* L. – la 3 zile).

Se determină ca raport între numărul de cariopse germinate în prima treime a perioadei (a) și numărul total de cariopse analizate (n):

$$E_g = \frac{a}{n} \cdot 100 \quad (1)$$

Facultatea germinativă (F_g , %), reprezintă capacitatea semințelor de a germina până la sfârșitul perioadei de germinație (*Triticum aestivum* L. – 7 zile).

Se determină ca raport între numărul de cariopse germinate la sfârșitul perioadei luată în calcul ca zile de germinare (b) și numărul total de cariopse analizat (n):

$$F_g = \frac{b}{n} \cdot 100 \quad (2)$$

După 7 zile de tratament, în fiecare cutie Petri s-a determinat numărul de plantule formate, de cariopse germinate dar din care nu s-au format plantule (facultatea germinativă, F_g , exprimată procentual) și de cariopse negerminate/moarte [70]. După Evers și Bechtel (1988) și, respectiv, Niță și colaboratorii (2004), plantula reprezintă stadiul de dezvoltare ontogenetică a plantei în care aceasta prezintă rădăcina principală cu rădăcini secundare de prim ordin, hipocotilul, cotiledonul, prima frunză și a doua, iar cea de a treia abia se desface [19, 54]. După Andrei și colaboratorii (2008) la 2-3 zile de la germinare, plantulele de grâu

comun prezintă radica sau rădăcina primară scurtă, care prin creștere străpunge coleoriza [3].

Pentru fiecare plantulă rezultată din cariopse de grâu germinate au fost recoltate după 7 zile de tratament coleoptilul, împreună cu prima frunză, determinându-se masa medie (m_p , mg) și înălțimea medie a tuturor plantulelor formate (cm) în fiecare placă Petri.

Pentru determinarea facultății germinative s-au numărat cariopsele normal germinate din fiecare repetiție. S-a considerat că o cariopsă a germinat atunci când radica a avut o lungime de aproximativ 2 mm [1, 55]. Cariopsele găsite umflate, putrezite, mucegăite la sfârșitul perioadei de germinație au fost considerate negerminate.

2.3.4. Prelucrarea statistică a datelor

Pentru prelucrarea datelor din cadrul experimentelor de germinație a plantelor test crescute pe medii cu reziduuri miniere bogate în metale grele, s-a utilizat testul Tukey [74]. Ca marjă de eroare s-a utilizat un interval de încredere de 95%. Pentru fiecare tratament realizat în trei repetiții s-au calculat parametrii de germinare, după care s-a calculat deviația standard a valorilor obținute. Media celor trei repetiții s-a comparat cu o valoare D calculată, pentru a vedea dacă diferența este semnificativă. Pentru ca diferența să fie semnificativă trebuie ca media a trei repetiții să fie mai mare decât valoarea calculată D.

Capitolul 3. Poluarea cu metale grele și arsen din exploatările de cupru și baritină Tarnița și metode de decontaminare

3.1. Metale grele și arsen în probele de deșeu minier și sol provenite din exploatările de cupru și baritină Tarnița

3.1.1. Obiectivul cercetărilor

Exploatările de cupru și baritină din zona minieră Tarnița sunt la ora actuală închise, dar depozitele de minereuri metalifere aflate în aer liber, ca deșeuri poluante, conțin încă, în cantități însemnate, elemente chimice toxice. Depozitele și imediata lor vecinătate reprezintă prima zonă de contaminare, deoarece aceasta conține cantități mari de elemente precum fier, plumb, bariu, aluminiu, arsen, cupru, etc. Aceste elemente se află sub formă de minerale precum sulfuri de fier și cupru insolubile, care eliberează continuu, prin oxidare și hidroliză, cantități însemnate de ioni metalici în mediul înconjurător.

În acest context, cercetările realizate în cadrul tezei de doctorat au arătat că arealul Tarnița situat în comuna Ostra, județul Suceava este extrem de poluat. Rezultatele analizei probelor de deșeu minier prelevate din halda de steril, a probelor de sol și de ape reziduale au demonstrat că acestea sunt puternic contaminate cu metale grele ca fier, cupru plumb, cadmiu, dar și cu metaloizi de tipul arsenului, iar analiza probelor de sol colectate din zonele contaminate a evidențiat aciditatea lor, pH-ul acestora fiind cuprins între 2,04 și 7,5. Aciditatea mare a deșeurilor metalifere înregistrată în aceste tipuri de substrat ar putea fi corelată cu disponibilitatea metalelor grele și cu contaminarea apelor și solurilor din vecinătatea haldelor de deșeuri prin levigare.

3.1.2. Determinarea concentrației unor metale grele și metaloizi prin spectroscopie de emisie optică cu plasmă cuplată inductiv (ICP – OES)

Probele de deșeu minier metalifer (DMM) și de sol de la Tarnița prelevate de la o adâncime de 20 – 30 cm au fost uscate la aer și ulterior în etuvă, la temperatura de 40 °C. Până la analiza prin spectrometrie ICP-OES și AAS, toate probele au fost depozitate la o temperatură de 4 °C.

Pentru analiza ICP-OES probele de deșeu minier metalifer (DMM) și de sol (0,2-0,3 g) au fost supuse extracției cu 15 mL amestec de acizi HNO₃ : HCl, în raport 1 : 3, amestec menținut la temperatura de fierbere timp de 25 de minute, iar soluția obținută a fost filtrată și diluată ulterior până la 50 mL cu apă ultrapură Milli-Q.

În paralel probe de deșeu minier metalifer (DMM) și de sol (1 g) au fost supuse extracției pe baia cu ultrasunete timp de 15 minute la 5.000 rpm, o dată, de două și, respectiv, de trei ori cu câte 10 mL de apă ultrapură Milli-Q. Supernatantul toxic obținut după prima extracție a fost utilizat pentru a determina concentrațiile contaminanților din deșeurile miniere metalifere sau din sol prin măsurători ICP-OES sau AAS.

3.1.3. Determinarea concentrației unor metale grele prin spectrometrie de absorbție atomică (AAS)

Pentru determinarea concentrației unor metale grele prin metoda AAS, probe cu supernatant toxic (ST) obținut după prima extracție a DMM, au fost tratate cu HCl 4%, în raport 1:8 (v/v), HCl : ST. Probele cu supernatant toxic decontaminat (DMMD) au fost precipitate prin adăugare de NaOH 4% până la pH 5,0 și, după filtrarea prin hârtia de filtru a rezidului cu metale grele, soluția limpede a fost neutralizată cu HCl, în raport 1:8 (v/v), HCl : probă. Supernatanții obținuți au fost neutralizați cu HCl 4% și NaOH 4% până la pH 6,9-7,0.

În paralel probe cu supernatant obținut după prima extracție a solului colectat din vecinătatea haldei de deșeu minier (aprox. 30 m) au fost filtrate prin hârtie de filtru (SF), iar soluția obținută a fost acidulată cu HCl 4%, în raport 1:8 (v/v), HCl : probă.

După o ultracentrifugare timp de 5 minute la 5000 rpm, pentru îndepărtarea precipitatelor obținute, toate aceste soluții au reprezentat probe pentru măsurarea conținutului de metale grele prin spectrometria de absorbție atomică (AAS).

3.1.4. Rezultate obținute

Prin analiza ICP-OES au fost detectate, în zona forestieră Tarnița, cantități însemnate de metalele grele ca Fe, Cu, Pb și Zn atât în depozitul de deșuri miniere metalifere, cât și în jurul acestuia (Tabelul 3.1). Dintre toate elementele găsite în haldele de deșuri fierul a prezentat cea mai mare concentrație și, în plus, acest element a fost găsit și la distanțe mari de depozitul de deșeu, cantitatea sa devenind chiar mai mare decât în *site*-ul inițial de colectare. Cu toate acestea, elementele cele mai toxice găsite în depozitul de steril au fost cuprul (3,119 mg/kg), arsenul (676 mg/kg) și plumbul (2,672 mg/kg) [17]. Celelalte elemente, precum Ba (14 mg/kg) și Zn (432 mg/kg) sunt fie mai puțin toxice, fie au fost prezente ca oligoelemente. În probele de deșeu minier colectate din haldă elementele Cr și Mn au fost prezente sub formă de urme, în cantități mai mici de 0,7 mg/kg.

Tabel 3.1. Concentrația unor metale grele și metaloizi din DMM și sol (mg/kg) determinată prin ICP-OES: (DMM) probă deșeu minier metalifer colectat din halda de steril; (S) probă de sol colectată de la 30m depărtare de halda de deșeu minier metalifer.

Concentrație totală metale grele (mg/kg)		
Element	Probă	
	DMM	S
(Fe)	357.869 ± 280	493.500 ± 405
(Cu)	3,119 ± 65	334 ± 8
(Pb)	2,672 ± 58	137 ± 12
(Zn)	432 ± 73	420 ± 17
(Ba)	14 ± 58	537 ± 5
(Cr)	urme	20 ± 7
(Mn)	urme	661 ± 10
(Ni)	0	29 ± 8
(As)	676 ± 13	96 ± 5

Rezultatele obținute au fost comparate cu valorile standard normale pentru metalele grele și arsen din soluri, date prezentate în tabelul 3.2. .

Tabel 3.2. Valori standard normale pentru metale grele și arsen din soluri [57].

Concentrație metale grele (mg/kg substanță uscată)								
(Fe)	(Cu)	(Pb)	(Zn)	(Ba)	(Mn)	(Ni)	(Cr)	(As)
-	20	20	100	200	900	20	30	5

Concentrațiile metalelor grele din extractele apoase cu reziduuri miniere sunt prezentate în tabelul 3.3. Eroarea standard a fost mai mică de 5%. Rezultatele obținute prin spectrometrie de absorbție atomică (AAS) pentru extractele apoase ce conțin reziduuri miniere cu metale grele au fost comparate cu valorile admisibile pentru probele de apă de suprafață din România. Valorile standard ale apelor de suprafață pentru clasele 1, 2 și 3 sunt prezentate în Tabelul 3.4 [56, 75].

Tabel 3.3. Concentrația unor metale grele din reziduuri miniere (mg/L) determinată prin AAS: DMM – probă deșeu minier metalifer (1g DMM colectat din haldă, în 10 mL H₂O și tratat cu HCl); DMMD – probă deșeu minier metalifer decontaminat (DMM colectat din haldă, în 10 mL H₂O, precipitat cu NaOH și neutralizat cu HCl); SF – probă sol filtrat (1 g sol colectat de la 30 m depărtare de haldă, în 10 mL H₂O, filtrat și tratat cu HCl).

Probă	Concentrație totală metale grele (mg/L)			
	(Fe)	(Cu)	(Zn)	(Mn)
DMM	675,63	32,14	7,07	0,38
DMMD	238,58	0,266	4,28	0,4
SF (30m)	5,86	0,276	3,35	0,009

Tabel 3.4. Valori standard pentru apele de suprafață Clasa 1, 2 și 3 [75].

Clasa	Concentrație metale grele (mg/L)					
	(Fe)	(Cu)	(Zn)	(Mn)	(Ni)	(Cr)
1	0,3	0,05	0,03	0,5	0,1	0,5
2	1	0,05	0,03	0,3	0,1	0,5
3	1	0,05	0,03	0,4	0,1	0,5

Problemele calității apelor naturale sunt cauzate în principal de metalele grele precum Fe, Cu, Mn și Zn [40].

După cum se poate observa din Tabelul 3.3, există creșteri excesive ale concentrațiilor de Fe (675,63 mg/L) și Cu (32,14 mg/L) în supernatantul toxic obținut prin spălarea probelor de DMM colectate din depozitul de steril, în timp ce Zn (7,07 mg/L) a fost mai puțin prezent. Mn (0,38 mg/L), care este mai puțin toxic, având și activitate biologică, a fost prezent în urme ca oligoelement. În prezent limitele de concentrație admise în apele naturale pentru Fe, Cu și Zn sunt 0,3-1 mg/L, 0,05 mg/L și 0,03 mg/L (Tabelul 3.4), valori ce au fost cu mult depășite în cazul cercetărilor efectuate, realitate care demonstrează faptul că probele colectate din halda de deșeu de minereu sunt extrem de toxice și prezintă un adevărat pericol pentru calitatea mediului înconjurător.

În ceea ce privește concentrația fierului din extractele apoase cu steril decontaminat prin precipitare cu hidroxizi (238,58 mg/L), dar și din extractele apoase obținute din solul colectat de la 30 m depărtare de halda de steril (5,86 mg/L), valorile acestui metal sunt cu mult peste limita admisă de 0,3-1,0 mg/L, întâlnită la apele de suprafață. Deci concentrația Fe continuă să fie extrem de toxică, datorită valorilor sale extrem de ridicate.

Concentrația zincului atât în extractele apoase de deșeu minier (4,28 mg/L), care au fost parțial decontaminate, cât și din extractele de sol (3,35 mg/L), sunt în continuare ridicate, cu mult peste valorile de 0,03 mg/L, standard admise.

Concentrația cuprului a depășit valorile standard admise pentru apele de suprafață (0,05 mg/L), în schimb creșterile față de valorile standard au fost mult mai mici (steril decontaminat – 0,266 mg/L și sol – 0,276 mg/L). Totuși, ionii de cupru prezenți în mediu au fost considerați în continuare toxici pentru sănătatea umană.

Concentrațiile ridicate de Fe, Cu și Zn din extractele apoase obținute din probele de DMM și sol colectate de la Tarnița determină o toxicitate sporită asupra lanțului trofic. Astfel, un alt contaminant, extrem de toxic, detectat în halda de deșeu minier și în împrejurimi a fost arsenul. Concentrațiile determinate prin metoda ICP-OES au fost de 676 mg/kg în halda de deșeu minier și de 96 mg/kg în probele de sol colectate de la 30 m distanță de haldă [78]. Niveluri scăzute de arsen sunt prezente în mod natural în sol [46]. Concentrația de arsen din sol admisă la nivel mondial este în jur de 5 mg/kg, cu variații substanțiale în funcție de originea solului [47]. În determinările efectuate în arealul Tarnița valorile înregistrate pentru acest metaloid au fost cu mult peste limita admisă, date ce indică faptul că respectivele concentrații reprezintă un real pericol pentru sănătatea omului și a mediului înconjurător.

3.1.5. Concluzii preliminare

Măsurătorile ICP-OES, au arătat că depozitele de deșeu minier metalifer conțin cantități mari de Fe (358 g/kg), Cu (3,119 mg/kg), As(676 mg/kg), Pb(2,672 mg/kg) și Zn (432 mg/kg). În depozitul Tarnița supus analizei spectrofotometrice, cantitățile de metal greu și arsen determinate au variat astfel: Fe > Cu > Pb > As > Zn > Ba > Cr > Mn > Ni, elementele cele mai toxice găsite în haldă fiind Fe (datorită cantității foarte ridicate), apoi Cu, Pb și respectiv un metaloid extrem de periculos, As. Cu toate că Fe a fost determinat cantitativ la cea mai mare valoare, acest metal a fost găsit și la distanță de haldă (493,5 g/kg), cantitatea sa depășind în mod evident cantitatea din depozitul de deșeu minier metalifer, de 358 g/kg.

În cazul solurilor situate la distanță de halde, valorile acestor elemente, cu excepția Cr și Mn, sunt cu mult peste limita valorilor normale admise pentru soluri. Aceste elemente au înregistrat următoarele valori peste limita admisă: Ba (337 mg/kg), Zn (320 mg/kg), Cu (314 mg/kg), As (91 mg/kg), Pb (117 mg/kg), Ni (9 mg/kg). În acest context considerăm că anumite elemente determinate cantitativ (Fe, Cu, As, Pb și Zn) în exploatările miniere Tarnița (haldă, cât și sol prelevat de la 30 m depărtare) continuă să fie, prin valorilor ridicate ale concentrației lor extrem de toxice pentru om și mediul înconjurător.

Cu toate că metalele grele în concentrații extrem de toxice formează agregate în depozitele de deșeu minier metalifer, acestea au putut fi ușor îndepărtate prin extracție cu

apă în proporție de 1:10, sub acțiunea ultrasunetelor. Ca urmare, în urma primei extracții cu apă distilată, metalele toxice au trecut în supernatantul rezultat.

Măsurătorile AAS realizate pe eșantioane de extracte apoase obținute din probele colectate din depozitul de deșeu minier și, respectiv din solul din jurul acestuia (1g DMM/sol la 10 mL H₂O), au arătat că unele metale grele precum Fe (DMM – 675,63 mg/L, SF(30m) – 5,86 mg/L), Cu (DMM – 32,14 mg/L, SF(30m) – 0,276 mg/L), Zn (DMM – 7,07 mg/L, SF(30m) – 3,35 mg/L) și Mn (DMM – 0,38 mg/L, SF(30m) – 0,009 mg/L) sunt prezente în concentrații mari, extrem de toxice pentru mediul înconjurător. Concentrațiile acestor metale grele din DMM și sol, determinate prin AAS, au înregistrat scăderi valorice după prima extracție cu apă, însă aceste valori au rămas excesiv de mari în probe, în comparație cu valorile standard admise la nivel național pentru apele de suprafață din România. Aceasta a dovedit că numeroase cantități de metale grele sunt insolubile și nu pot fi extrase cu apă sub formă de ioni metalici.

Deoarece supernatantul obținut prin extracție cu apă este toxic pentru mediul înconjurător, s-a recurs în continuare la decontaminarea acestuia prin precipitare cu hidroxizi. În cazul extractelor cu deșeu minier decontaminat prin precipitare cu hidroxid de sodiu (DMMD), concentrațiile metalelor grele au continuat a fi foarte mari, în comparație cu valorile standard admise: Fe (238,58 mg/L), Cu (0,266 mg/L), Zn (4,28 mg/L) și Mn (0,4 mg/L).

Prin măsurătorile AAS s-a constatat că diferența dintre concentrațiile determinate pentru aceste metale grele și valorile standard admise a ordonat elementele contaminante, în ordine descrescătoare, astfel: Fe > Cu > Zn > Mn pentru extractul obținut din DMM; Fe > Zn > Cu > Mn – pentru extractul obținut din DMMD; Fe > Zn > Cu – pentru extractul obținut din SF (30 m). Concentrația manganului din extractul apos al solului colectat de la 30 m depărtare de halda de deșeu minier metalifer nu a depășit valorile standard admise, de 0,3 – 0,5 mg/L.

Concentrațiile ridicate de Fe, Cu și Zn determinate în extractele apoase obținute din probele de deșeu minier metalifer și sol colectate din exploatările miniere Tarnița demonstrează toxicitatea sporită și pericolul continuu pe care îl prezintă acești contaminanți pentru lanțul trofic din arealul forestier căruia aparține respectiva exploatare minieră.

3.2. Evaluarea efectului toxic al reziduurilor miniere din exploatările de cupru și baritină Tarnița prin teste de germinație a cariopselor și de creștere a plantulelor rezultate la grâul comun, *Triticum aestivum* L., soiul Putna

3.2.1. Teste de germinație a cariopselor de grâu și de creștere a plantulelor rezultate pe solurile din vecinătatea haldei de deșeu minier

3.2.1.1. Obiectivul cercetărilor

Unul dintre obiectivele de cercetare propus în cadrul prezentei teze de doctorat a vizat studiul toxicității solurilor provenite din arealul minier Tarnița [52], prin realizarea unor experimente de germinație pe cariopse de plante test precum *Triticum aestivum* L. (grâu comun, de primăvară), experimente realizate în condiții de laborator în acest scop.

Într-un prim experiment au fost monitorizate procesul de germinare și de creștere a plantulelor de grâu comun rezultate pe solurile colectate din vecinătatea haldei de deșeu minier metalifer, comparativ cu solul de grădină (colectat din zona Iași). Pentru aceasta, a fost determinat numărul de cariopse germinate, numărul de plantule rezultate, precum și masa și talia acestora la 7 zile de la debutul experimentelor realizate în condiții de laborator.

3.2.1.2. Modul de lucru

Pentru determinarea efectului toxicității solurilor situate la 30 m depărtare de halda de deșeu minier metalifer asupra germinării cariopselor și a dezvoltării plantulelor de grâu comun s-au realizat loturi de câte 50 de cariopse în trei repetiții, care s-au introdus în eprubete suficient de largi (180 x 18 mm), pentru a permite amestecarea lor cu 5 mL de apă ultrapură (milli-Q), iar după o oră s-au plasat în cutii Petri cu diametrul de 9 cm, pe hârtie dublă de filtru peste 0 g (martor), 5 g, 10 g și, respectiv, 20 g de sol. Pentru comparație, au fost realizate probe triple control, cu câte 5 g de sol de grădină și 50 de cariopse test.

3.2.1.3. Rezultate obținute

Efectul solului colectat din vecinătatea depozitului de deșeu minier metalifer asupra germinării și creșterii plantulelor de grâu este evidențiat în Figura 3.1.

Facultatea germinativă a cariopselor crescute pe solul provenind din exploatarea Tarnița a fost de 92%, respectiv 82%, comparativ cu loturile test crescute pe solul de grădină, ce au înregistrat o facultate germinativă de 98% (Tabelul 3.5). Descreșterea facultății germinative poate sugera că plantele nu s-ar putea dezvolta pe solul aflat în preajma haldelor de material minier.

Tabel 3.5. Germinarea cariopselor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna și creșterea plantulelor test în condiții de laborator, pe sol provenit din vecinătatea haldei de deșeu minier metalifer din exploatarea minieră Tarnița (7 zile de germinare)

Tratament ^{*)}	F _g ^{**)} (%)	Masa medie a plantulelor (m _p , mg)	Înălțimea medie a plantulelor (cm)
Martor, 5 mL H ₂ O	96 ± 1,2	79,25 ± 1,8	12,11 ± 0,6
5 g sol de grădină	98 ± 2,0	83,47 ± 1,0	12,53 ± 1,2
5 g sol Tarnița	92 ± 1,3	78,91 ± 0,5	11,98 ± 0,8
10 g sol Tarnița	82 ± 2,2	77,57 ± 1,2	11,86 ± 1,2

^{*)} Valorile sunt medii aritmetice a trei valori ± eroarea standard (50 cariopse/probă);
conform testului Tukey ($p \leq 0,05$).

^{**)} F_g = procentajul de cariopse germinate după 7 zile.

Acest rezultat indică faptul că substanțele toxice din solul colectat din vecinătatea haldei de deșeu minier influențează negativ atât germinarea cariopselor, cât și creșterea plantulelor test de grâu comun: F_g (%): sol grădină (98) > control (96) > 5g sol Tarnița (92) > 10g sol Tarnița (82).



Fig. 3.1. Creșterea plantulelor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna pe sol colectat de la 30 m distanță de halda de deșeu provenit din exploatarea minieră Tarnița la 7 zile de germinare, în condiții de laborator. Tratamente: a) 5 g sol de grădină, b) 5 g sol Tarnița.

Atât masa medie a plantulelor din variantele cu 5 g și, respectiv 10 g de sol colectat de la Tarnița, cât și înălțimea medie a acestora au scăzut, comparativ cu cele înregistrate la varianta de lucru folosind solul de grădină.

Tabel 3.6. Germinarea cariopselor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna și creșterea plantulelor test pe sol provenit din exploatarea minieră Tarnița în condiții de laborator, la 7 zile de germinare.

Tratament ^{*)}	F _g ^{**)} (%)	Masa medie a plantulelor (m _p , mg)	Înălțimea medie a plantulelor (cm)
Martor, 5 mL H ₂ O	96 ± 1,2	78,23 ± 1,9	12,13 ± 0,3
5 g sol Tarnița	93 ± 0,7	75,47 ± 0,5	11,22 ± 0,1
10 g sol Tarnița	83 ± 1,3	63,36 ± 0,9	10,84 ± 0,1
20 g sol Tarnița	76 ± 3,1	59,60 ± 0,6	9,47 ± 0,5

^{*)} Valorile sunt medii aritmetice a trei valori ± eroarea standard (50 cariopse/probă);
conform testului Tukey ($p \leq 0,05$).

^{**)} F_g = procentajul de cariopse germinate după 7 zile.

Din analiza parametrilor germinativi a plantulelor test crescute pe aceste soluri provenind din exploatarea Tarnița s-a constatat că procesul de creștere și dezvoltare a plantulelor este afectată, comparativ cu loturile de plantule control (m_p = 79,25 mg, înălțimea cu 12,11 cm) și, respectiv, cu cele crescute pe sol de grădină (m_p = 83,47 mg, înălțimea cu 12,53 cm), la loturile test crescute pe solul cu metale grele, masa și, respectiv, înălțimea medie a plantulelor având valori mai mici: 5 g sol Tarnița: m_p = 78,91 mg, înălțimea cu 11,98 cm; 10 g sol Tarnița: m_p = 77,57 mg, înălțimea = 11,86 cm.

Din tabelul 3.6 și din figura 3.2. se poate observa că probele de sol colectate din exploatarea minieră Tarnița utilizate în experiment prezintă o ușoară toxicitate, deoarece au inhibat procesul de germinare, mai ales în cazul probei cu 20 g de sol, variantă în care germinarea cariopselor de grâu a scăzut cu 20%.



Fig. 3.2. Creșterea plantulelor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna pe sol provenit din exploatarea minieră Tarnița în condiții de laborator, la 7 zile de germinare. Tratamente: a) 5 g sol, b) 20 g sol.

Atât masa medie, cât și înălțimea medie a plantulelor au scăzut odată cu creșterea cantității de sol poluat folosit ca substrat, comparativ cu loturile control astfel: m_p (mg): control (78,23) > 5g sol Tarnița (75,47) > 10g sol Tarnița (63,36) > 20g sol Tarnița (59,60); înălțimea (cm): control (12,13) > 5g sol Tarnița (11,22) > 10g sol Tarnița (10,84) > 20g sol Tarnița (9,47).

Deci cantitățile mai mari de sol suport pentru creșterea plantulelor test au avut o tendință netă de reducere a acestor parametri.

3.2.1.4. Concluzii preliminare

Solurile colectate de pe malul stâng al râului Tărnicioara, de la aproximativ 30 m de depozitul de material metalifer, au determinat scăderea parametrilor de germinare, procesul de creștere a plantulelor test fiind influențat în mod negativ de excesul de metale grele din aceste soluri, comparativ cu loturile control, tratate cu apă distilată și, respectiv cu cele crescute pe sol de grădină.

Rezultatele obținute au arătat că biologia plantelor de *Triticum aestivum* L. (grâu comun) cultivate pe eșantioanele de sol colectate din jurul haldei de deșeu minier metalifer din exploatarea minieră Tarnița este semnificativ influențată de calitatea și cantitatea solului poluat cu metale grele utilizat ca substrat, creșterea cantităților de sol și excesul de metale grele din componența acestuia influențând în sens negativ procesul de germinare și de creștere a tinerelor plantule astfel rezultate.

3.2.2. Teste de germinație a cariopselor de grâu și de creștere a plantulelor rezultate pentru evidențierea toxicității deșeurilor minerale metalifere

3.2.2.1. Obiectivul cercetărilor

Un alt obiectiv de cercetare a vizat testarea toxicității deșeurilor miniere metalifere (DMM) prelevate din arealul minier Tarnița asupra procesului de germinare a cariopselor de grâu comun și a procesului de creștere a plantulelor astfel rezultate, în scopul evaluării posibilităților reducerii acestei toxicități prin extracția/spălarea contaminanților solubili din respectivele substraturi cu apă distilată.

Testele de germinare a cariopselor și de creșterea a plantulelor s-au realizat pe probe de deșeu minier colectat din halda de steril (fără extracție), precum și pe probe de deșeu minier supuse unei duble și, respectiv, triple extracții.

Experimentele realizate în condiții de laborator au avut ca scop analiza parametrilor germinativi ai cariopselor speiei test și analiza parametrilor de creștere a plantulelor astfel

rezultate pentru variante crescute atât în condiții de stres cauzate de toxicitatea ridicată a probelor colectate din haldă, cât și în condiții de reducere a toxicității, prin extracția contaminanților.

3.2.2.2. Modul de lucru

Pentru determinarea efectului toxicității deșeurilor miniere metalifere (DMM) colectate din halda de steril asupra germinării cariopselor și a dezvoltării plantulelor de grâu s-au realizat probe triple cu câte 1 g de deșeu minier fără extracție, 1 g de deșeu minier dublu extras, respectiv 1 g de deșeu minier triplu extras.

O etapă de extracție a solului a constat în adăugarea a 10 mL de apă ultrapură (milli-Q) la 1 g de deșeu minier și menținerea amestecului pe baie cu ultrasunete timp de 15 minute, urmată de centrifugarea la 5000 rpm timp de 5 minute. Supernatantul toxic obținut în urma centrifugării a fost îndepărtat, iar deșeu minier rămas după extracție a fost utilizat în testele de germinație, în condiții de laborator, ca substrat de germinare, în cutii Petri.

Toate probele cu deșeu minier extras (câte 1 g în fiecare eprubetă) au fost amestecate cu câte 5 ml de apă ultrapură milli-Q, după care s-au adăugat câte 50 de cariopse test. Pentru comparație, au fost realizate probe triple control cu câte 5 mL de apă ultrapură milli-Q și 50 de cariopse test.

3.2.2.3. Rezultate obținute

În timpul tratamentului, cu o durată de o săptămână, proba cu deșeu minier, nesupusă extracției, a inhibat complet germinarea cariopselor de grâu (Figura 3.3, tratamentul b).

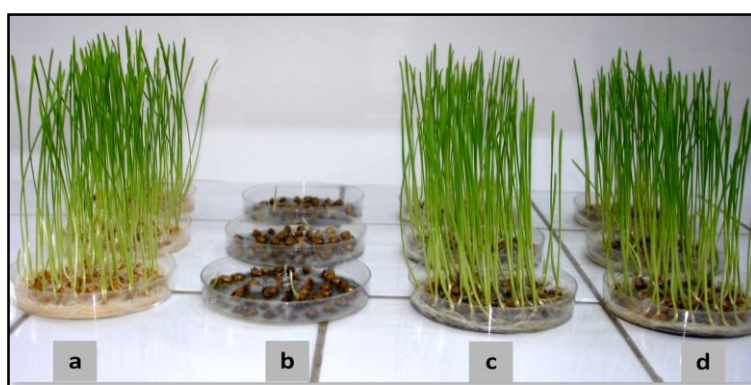


Fig. 3.3. Germinarea cariopselor și creșterea plantulelor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna în condiții de laborator, utilizând ca substrat deșeu minier metalifer (DMM) provenit din exploatarea minieră Târnița, la 7 zile de germinare. Tratamente: a) Martor, 5 mL apă distilată, b) 1 g DMM fără extracție, c) 1 g DMM dublu extras, d) 1 g DMM triplu extras.

Germinarea cariopselor de grâu a recuperat diferența valorică față de varianta de lucru fără proces de extracție, după extracția deșeurii minier de două sau de trei ori succesiv (Figura 3.3, tratamentul c și d), situații în care solul folosit ca substrat de experiență devine, prin spălare repetată, mai puțin toxic.

Facultatea germinativă a cariopselor de grâu cultivate în varianta martor a fost de 95%; acest parametru a descrescut la 3% în cazul variantei cultivate pe substrat reprezentat de deșeu minier colectat din halda din exploatarea minieră Tarnița, iar prin extracția de 2 și, respectiv, de 3 ori a deșeurii minierului cu câte 10 mL de apă ultrapură (milli-Q) facultatea germinativă a cariopselor de grâu a revenit la 94% și, respectiv, 97% (Tabelul 3.7). Aceste rezultate indică faptul că substanțele toxice existente inițial în proba de deșeu minier au fost extrase în timpul extracției, trecând în supernatantul rezultat prin spălare.

Tabel 3.7. Germinarea cariopselor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna și creșterea plantulelor test pe deșeuri miniere metalifere (DMM) colectate din halda provenită din exploatarea minieră Tarnița în condiții de laborator, la 7 zile de germinare

Tratament ^{*)}	F _g ^{**)} (%)	Masa medie a plantulelor (m _p , mg)	Înălțimea medie a plantulelor (cm)
Martor, H ₂ O	95 ± 1,2	63,5 ± 2,3	11,3 ± 0,4
DMM fără extracție	3 ± 1,2	10,3 ± 5,6	1,6 ± 0,5
DMM extras de 2 ori	94 ± 2,0	58,6 ± 5,7	10,4 ± 0,7
DMM extras de 3 ori	97 ± 2,3	65,5 ± 5,1	10,9 ± 0,5

^{*)} Valorile sunt medii aritmetice a trei valori ± eroarea standard (50 cariopse/probă);
conform testului Tukey (p ≤ 0, 05).

^{**)} F_g = procentajul de cariopse germinate după 7 zile.

Atât masa medie a plantulelor, cât și înălțimea medie a acestora au scăzut drastic la probele de grâu germinate pe proba de deșeu minier și au revenit la valori aproape normale (comparativ cu varianta martor – germinare a cariopselor în apă ultrapură Milli-Q) după ce s-a realizat extracția contaminanților acestuia prin spălare cu apă de 2 și, respectiv, de 3 ori.

Acest experiment a evidențiat faptul că metalele toxice rămase în deșeuri după extracția părții lor solubile cu apă nu sunt toxice pentru plante, în condițiile experimentale date. Cu toate acestea, în timp, sulfurile metalice ar putea deveni solubile și ar putea afecta germinarea plantelor. Spre deosebire de analizele chimice care au indicat acumularea unei mari cantități de metale grele toxice în deșeurile miniere analizate, testele biologice au arătat că toxicitatea acestora este mult mai evidentă, fiind determinată numai de speciile solubile.

3.2.2.4. Concluzii preliminare

Procesul de germinare în condiții de laborator a cariopselor de grâu comun în variantele conținând substrat colectat din halda de deșeu minier a fost semnificativ influențat de prezența excesului de metale grele, fenomen evidențiat și prin analizele chimice efectuate asupra acestui substrat de lucru, rezultatele astfel obținute susținând practic afirmația potrivit căreia probele de deșeu minier metalifer, prin componentele chimice specifice conținute, pot inhiba complet germinarea cariopselor soiul de grâu test.

Decontaminarea prin extracții succesive cu apă distilată a redus nivelul de contaminanți din substratul de analiză, aceștia fiind îndepărtați prin extracție cu apă și centrifugare, procese urmate de concentrarea lor în supernatantul de extracție. Ca urmare, parametrii de germinare a cariopselor și creșterea plantulelor test au revenit ulterior dublei extracții a probelor de deșeu minier (DMM x 2) și, respectiv, triplei extracții (DMM x 3) cu apă la valori apropiate de cele obținute la varianta martor, încadrate în normele considerate fiziologic normale pentru materialul biologic analizat.

3.2.3. Evidențierea toxicității unor extracte ale reziduurilor miniere prin teste de germinație a cariopselor de grâu și de creștere a plantulelor rezultate

3.2.3.1. Obiectivul cercetărilor

Probele de DMM colectate din exploatarea Tarnița au indicat, prin determinări realizate prin spectrometrie de absorbție atomică (AAS), creșteri excesive ale concentrațiilor de fier (675,63 mg/L) și cupru (32,14 mg/L) în soluțiile de supernatant obținute prin extracții (Tabel 3.3). Depășind cu mult valorile de toxicitate admise de standardele în vigoare, respectivele supernatante reprezintă practic un pericol real pentru calitatea mediului înconjurător în zona explorată.

În acest context, un obiectiv de cercetare al tezei de doctorat a vizat studiul toxicității extractelor sub formă de supernatant, obținute din deșeurilor miniere metalifere (DMM) prelevate din arealul minier Tarnița, asupra germinării cariopselor de grâu comun, utilizat ca material biologic test.

Testele de germinare și de creștere a plantulelor rezultate în condiții de laborator au utilizat supernatant toxic (ST) rezultat din prima extracție cu apă a DMM colectat din haldă și supernatant toxic decontaminat prin diluție (0 la 5 mL) și au urmărit atât rata de germinare a cariopselor, cât și nivelul de creștere a dimensiunilor (lungime, masă proaspătă) a plantulelor astfel rezultate în toate variantele de analiză: stres cauzat de toxicitatea ridicată a

supernantului obținut din DMM, cât și în condiții de scădere a concentrației contaminanților prin diluare cu apă.

3.2.3.2. Modul de lucru

Probe triple de 1 g de DMM colectat din depozitul de steril din exploatarea minieră Tarnița au fost introduse în tuburi de centrifugare și supuse extracției cu 10 mL de apă ultrapură (milli-Q) pe baia cu ultrasunete timp de 15 minute. Pentru extragerea metalelor grele, suspensiile rezultate au fost supuse ultracentrifugării timp de 5 minute la 5000 rpm. Supernatantul toxic a fost separat și s-a folosit în experimente de germinație, pentru studiul efectului metalelor grele asupra plantei test, grâu comun - *Triticum aestivum* L., soiul Putna.

Pentru determinarea efectului reziduurilor miniere din exploatarea minieră Tarnița asupra germinării cariopselor și creșterii plantulelor test s-au realizat probe triple cu câte 1, 2, 3, 4 și, respectiv, 5 mL de supernatant toxic, amestecat corespunzător cu câte 4, 3, 2, 1 și, respectiv, 0 mL apă ultrapură milli-Q, astfel încât să se obțină câte 5 mL de soluție toxică pentru fiecare variantă de tratament. Toate probele s-au introdus în eprubete cu câte 50 de cariopse de grâu test. Pentru comparație, au fost realizate probe triple control, cu câte 5 mL apă ultrapură milli-Q și câte 50 cariopse test.

3.2.3.3. Rezultate obținute

Rezultatele prezentate în figura 3.4 și în tabelul 3.8, arată că facultatea germinativă descrește de la 97% în cazul loturilor de plantule martor, la 67% la utilizarea a 3 mL de supernatant toxic și continuă să descrească până la 48% în cazul în care se adaugă peste cariopse 5 mL de supernatant toxic.

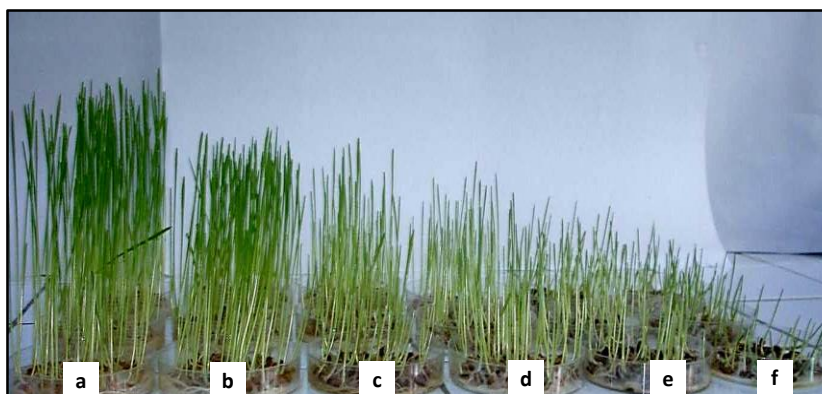


Fig. 3.4. Germinarea cariopselor și creșterea plantulelor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna în condiții de laborator, utilizând ca substrat reziduuri miniere din exploatarea minieră Tarnița, la 7 de germinare.

Tratamente: a) Martor, 5 mL H₂O, b) 1 mL ST + 4 mL H₂O,

c) 2 mL ST + 3 mL H₂O, d) 3 mL ST + 2 mL H₂O,

e) 4 mL ST + 1 mL H₂O, f) 5 mL ST. ST = supernatant toxic.

Masa medie a plantulelor de grâu comun a descrescut progresiv, odată cu creșterea volumului de supernatant toxic adăugat în soluțiile de tratament. În urma acestui set de experimente am selectat soluția conținând 3 mL supernatant toxic și 2 mL apă distilată pentru a realiza experimente de decontaminare pe cale microbiologică a substratului rezidual, utilizând ca material de decontaminare specia de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen.

În procesul de germinare a cariopselor de grâu la unele din plantulele astfel rezultate s-a observat absența sau dezvoltarea slabă a radiclei (rădăcinii inițiale) și creșterea normală rădăcinilor adventive [2, 3, 39, 87], atunci când cariopsele de grâu comun au fost tratate cu 5 mL ST (Figura 3.5). Acest fapt s-a corelat cu tendința plantelor de a acumula metalele grele în special în rădăcini [35].

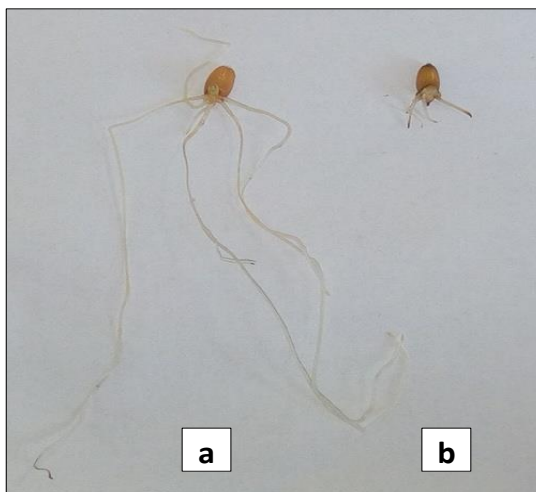


Fig. 3.5. Efectul reziduurilor miniere din zona minieră Tarnița asupra formării și creșterii radiclei și a rădăcinilor adventive (secundare) la plantulele de *Triticum aestivum* L., soiul Putna cultivat în condiții experimentale de laborator la 7 zile după tratament. Tratamente: a) Martor, 5 mL H₂O, b) 5 mL ST.

ST = supernatant toxic.

O parte din rezultatele obținute și publicate [78] au arătat că specia de grâu comun este sensibilă la reziduurile miniere din zona minieră Tarnița. Astfel, după cum arată Tabelul 3.8 și figura 3.6, facultatea germinativă a scăzut continuu și constant de la 97% (martorul cu apă ultrapură Milli-Q) la numai 48% (în cazul utilizării a 5 mL de supernatant toxic). Totodată, masa plantulelor rezultate la 7 zile de tratament a scăzut de la 62,1 mg/lot la numai 18,9 mg/lot, adică de 3,3 ori: m_p (mg): M (62,1) > 1 ST (41,3) > 2 ST (37,2) > 3 ST (28,8) > 4 ST (21,2) > 5 ST (18,9).

Tabel 3.8. Facultatea germinativă a cariopselor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna germinat în condiții de laborator și masa medie a plantulelor astfel rezultate, ca urmare a aplicării de tratamente cu volume în creștere de supernatant toxic (ST), la 7 zile de germinare.

Tratament ^{*)}	F _g ^{**)} (%)	Masa medie a plantulelor (m _p , mg)
Martor, H ₂ O	97 ± 4,6	62,1 ± 0,4
1 mL ST + 4 mL H ₂ O	91 ± 2,3	41,3 ± 2,0
2 mL ST + 3 mL H ₂ O	95 ± 3,1	37,2 ± 3,8
3 mL ST + 2 mL H ₂ O	67 ± 12,2	28,8 ± 2,1
4 mL ST + 1 mL H ₂ O	51 ± 7,9	21,2 ± 5,6
5 mL ST	48 ± 7,7	18,9 ± 2,1

^{*)} Valorile sunt medii aritmetice a trei valori ± eroarea standard (50 cariopse/probă);
conform testului Tukey ($p \leq 0,05$).

^{**)} F_g = procentajul de cariopse germinate după 7 zile.



Fig. 3.6. Plantule de *Triticum aestivum* L., soiul Putna la 7 de germinare, crescute în condiții de laborator, pe substrat cu reziduuri miniere din exploatarea minieră Tarnița. Tratamente: a) Martor, 5 mL H₂O, b) 1 mL ST + 4 mL H₂O, c) 2 mL ST + 3 mL H₂O, d) 3 mL ST + 2 mL H₂O, e) 4 mL ST + 1 mL H₂O, f) 5 mL ST.

ST = supernatant toxic.

3.2.3.4. Concluzii preliminare

Rezultatele obținute în testele de germinație au demonstrat că facultatea germinativă a cariopselor de grâu descrește de la 97% în cazul lotului martor, la 67% la utilizarea a 3 mL de supernatant toxic și continuă să descrească până la 48%, în cazul în care s-au adăugat, peste cariopsele de grâu comun, doar de supernatant toxic (5 mL). În același timp, plantulele de grâu comun au înregistrat o reducere progresivă a masei medii, odată cu creșterea volumului de supernatant toxic adăugat în variantele de tratament.

În experimentele realizate efectul toxicității supernatantului obținut din deșeurile minier metalifere a fost redus prin diluție succesivă, înainte de realizarea testelor de germinație, fapt ce a condus la creșterea parametrilor de germinare analizați.

3.3. Decontaminarea reziduurilor miniere din exploatarea de cupru și baritină Tarnița

3.3.1. Efectul decontaminant al supernatantului unei culturi de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen asupra supernatanților toxici din reziduurile miniere

Efectul decontaminant al suspensiei de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen în forma sa naturală, activă, precum și inactivată prin fierbere a fost testat asupra unor extracte toxice de reziduuri miniere colectate din zona minieră Tarnița. Testele de germinație a cariopselor de grâu și de creștere a plantulelor rezultate au evidențiat eficacitatea sa în îndepărtarea elementelor toxice din soluțiile de supernatant sau de sol colectate din această zonă contaminată cu diverse reziduuri miniere.

3.3.1.1. Obiectivul cercetărilor

Ca urmare a faptului că literatura de specialitate prezintă diferite metode chimice, biologice și microbiologice de decontaminare a solurilor și apelor de metale grele și metaloizi, un alt obiectiv de cercetare propus în cadrul tezei de doctorat a urmărit studiul reducerii toxicității supernatanților obținuți din deșeurilor miniere metalifere (DMM) prelevate din arealul minier Tarnița prin decontaminare cu material biologic activ (viu) și inactivat prin aplicare de temperaturi ridicate, material reprezentat de supernatant obținut din culturi de drojdie (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen). În acest scop s-au realizat teste de germinație folosind cariopsele de grâu comun, pentru a evidenția gradul de decontaminare a substratului de cultivare prin utilizarea supernatantului cu drojdie, precum și efectul acestuia asupra procesului de germinație a cariopselor de grâu, în condiții experimentale de laborator, experimente care au urmărit parametrii de germinare a cariopselor și modificarea indicilor morfometrici ai plantulelor astfel rezultate (lungime, masa proaspătă) după decontaminarea biologică.

3.3.1.2. Modul de lucru

Pentru determinarea efectului de decontaminare de metale grele realizat de drojdia *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen a supernatanților toxici/reziduurilor

miniere din zona minei de baritină avută în atenție a fost testat modul de realizare a procesului de germinare a cariopselor de grâu și de creștere a plantulelor nou formate pe medii poluate, provenite din zona minieră amintită, supuse inițial procesului de decontaminare biologică cu drojdie.

Experimentele de decontaminare cu drojdie activă și respectiv inactivată, au utilizat ca substrat experimental varianta cu supernatanți toxici diluați (0 la 5 mL), anume amestecul format din 3 mL ST și 2 mL de H₂O. Astfel s-a determinat efectul extractului de drojdie activă și respectiv, inactivată asupra germinării cariopselor în prezența reziduurilor miniere, reprezentate de supernatant toxic (1 g DMM Tarnița : 10 mL H₂O).

3.3.1.3. Rezultate obținute

Primele două experimente au urmărit efectul supernatantului obținut din suspensia de drojdie activă și, respectiv, inactivată, asupra germinăției cariopselor de grâu comun.

Rezultatele obținute (figura 3.7 și tabelul 3.9) au indicat faptul că, în comparație cu varianta martor, s-a înregistrat o scădere a facultății germinative, a masei și, respectiv, a înălțimii medii a plantulelor test, în condițiile de cultivare în care cariopsele au fost tratate cu supernatant provenit din incubarea drojdiei cu apă ultrapură aflată la temperatura camerei sau la fierbere, urmată de centrifugare, fapt datorat, probabil, substanțelor organice eliberate de cultura de drojdie activă/inactivată în supernatant. Astfel, masa medie a plantulelor a scăzut la 55,6% în cazul cariopselor germinate pe mediu reprezentat de supernatant obținut din cultura de drojdie activă și, respectiv, la 40,3% în cazul cariopselor germinate pe mediu reprezentat de supernatant obținut din cultura de drojdie inactivată, față de loturile de plantule din varianta control, germinate în apă ultrapură.

La rândul său, supernatantul din cultura de drojdia inactivată, comparativ cu cel obținut din cultura activă a ajutat mai puțin creșterea plantulelor test de grâu comun, în prezența toxicității metalelor grele din reziduurile miniere provenite de la Tarnița.

Conform rezultatelor obținute și publicate deja [78] putem afirma și noi că tratarea cariopselor de grâu comun cu supernatantul obținut din suspensia de drojdie activă (drojdie incubată cu apă la temperatura camerei - DA) și, respectiv, inactivată (drojdie incubată cu apă la temperatura de fierbere - DI) a determinat scăderea facultății germinative, a masei și, respectiv, a înălțimii medii a plantulelor test rezultate, comparativ cu loturile de control, tratate numai cu apă (C): Fg (%): C (97) > DA (94) > DI (85); m_p (g): C (61,3) > DA (55,6) > DI (40,3); înălțimea (cm): C (10,4) > DA (8,1) > DI (4,9).

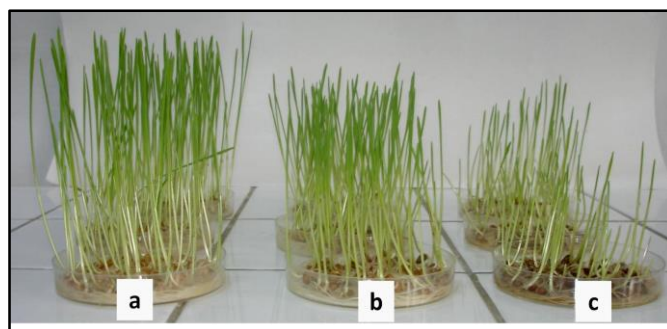


Fig. 3.7. Efectul supernatantului obținut din cultura de drojdie activă asupra germinării cariopselor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna și a creșterii plantulelor astfel rezultate în condiții de cultivare în laborator, la 7 zile de germinare: a) Control, H₂O; b) Supernatant cu drojdie activă; c) Supernatant cu drojdie inactivată.

Tabel 3.9. Efectul supernatantului obținut din cultura de drojdie activă și inactivată asupra germinării cariopselor de *Triticum aestivum* L. și a creșterii plantulelor astfel rezultate în condiții de cultivare în laborator, la 7 zile de germinare.

Tratament ^{*)}	F _g ^{**)} (%)	Masa medie a plantulelor (m _p , g)	Înălțimea medie a plantulelor (cm)
Control, H ₂ O (C)	97 ± 1,2	61,3 ± 3,8	10,4 ± 0,3
Supernatant drojdie activă (DA)	94 ± 3,4	55,6 ± 1,7	8,1 ± 0,2
Supernatant drojdie inactivată (DI)	85 ± 9,9	40,3 ± 8,2	4,9 ± 1,5

^{*)} Valorile sunt medii aritmetice a trei valori ± eroarea standard (50 cariopse/probă);
conform testului Tukey ($p \leq 0,05$).

^{**)} F_g = procentajul de cariopse germinate după 7 zile.

În același timp soluția toxică obținută din deșeurile miniere metalifere din exploatarea minieră Tarnița, a determinat scăderea facultății germinative și a afectat creșterea și dezvoltarea plantulelor rezultate (Figura 3.8).

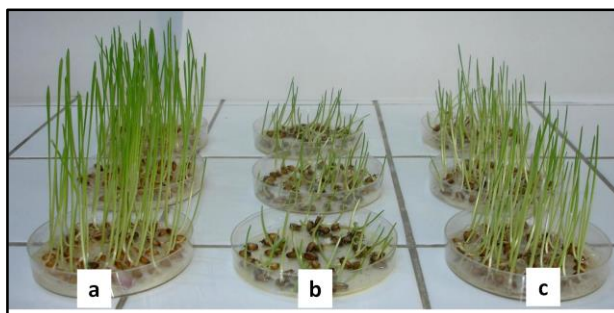


Fig. 3.8. Efectul inhibitor al supernatantului obținut din cultura de drojdie activă asupra toxicității metalelor grele din reziduurile miniere din zona minieră Tarnița utilizate ca substrat de germinare a cariopselor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna cultivate în condiții de laborator, la 7 zile de germinare: a) Supernatant cu drojdie activă; b) Soluție toxică; c) Supernatant cu drojdie activă și soluție toxică.

La rândul lor atât parametrii de germinare, cât și dezvoltarea plantulelor rezultate au crescut în cazul inhibării toxicității metalelor grele, probabil, datorită prezenței drojdiei active în compoziția supernatantului a (Figura 3.8, Tabelul 3.10): F_g (%): Sol. T (71) < DA+ST (93) < DA (94); m_p (g): Sol. T (29) < DA + Sol. T (42,5) < DA (55,6); înălțimea (cm): Sol. T (2,9) < DA + Sol. T (4,9) < DA (8,1).

Tabel 3.10. Efectul supernatantului cu drojdie activă și a soluției toxice asupra procesului de germinare a cariopselor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna și a creșterii plantulelor rezultate, în condiții experimentale de cultivare în laborator la 7 zile de germinare

Tratament ^{*)}	F_g ^{**)} (%)	Masa medie a plantulelor (m_p , g)	Înălțimea medie a plantulelor (cm)
Supernatant cu drojdie activă (DA)	94 ± 3,5	55,6 ± 1,7	8,1 ± 0,2
Soluție toxică (Sol. T)	71 ± 13,3	29,0 ± 2,4	2,9 ± 0,4
Supernatant cu drojdie activă și soluție toxică (DA + Sol. T)	93 ± 4,2	42,5 ± 1,3	4,9 ± 0,3

^{*)} Valorile sunt medii aritmetice a trei valori ± eroarea standard (50 cariopse/probă);
conform testului Tukey ($p \leq 0,05$).

^{**)} F_g = procentajul de cariopse germinate după 7 zile.

În același timp, prin incubarea soluției toxice cu supernatant de drojdie inactivată prin fierbere s-a obținut o creștere atât a facultății germinative, cât și a masei vegetale și, respectiv, a înălțimii medii a plantulelor de grâu comun (Figura 3.9 și Tabelul 3.11): F_g (%): Sol. T (71,3) < DI (84,7) < DI + Sol. T (92); m_p (g): Sol. T (29) < DI + Sol. T (33,3) < DI (40,3); înălțimea (cm): Sol. T (2,9) < DI + Sol. T (3,6) < DI (4,9).

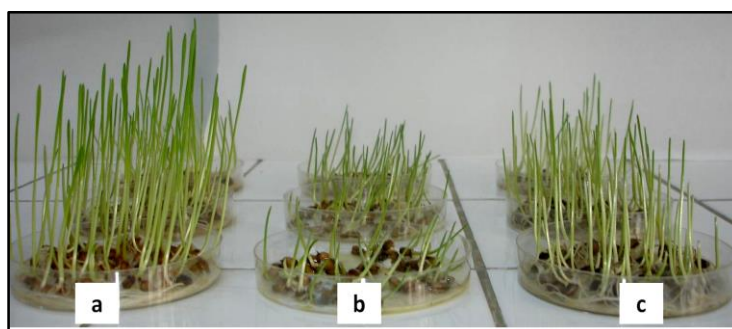


Fig. 3.9. Efectul inhibitor al supernatantului obținut din cultura de drojdie inactivată asupra toxicității metalelor grele din reziduurile miniere din zona minieră Tarnița utilizate ca substrat de germinare a cariopselor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna cultivate în condiții de laborator, la 7 zile de germinare: a) Supernatant cu drojdie inactivată; b) Soluție toxică; c) Supernatant cu drojdie inactivată și soluție toxică.

Tabel 3.11. Efectul supernatantului cu drojdie inactivată și a soluției toxice asupra procesului de germinare a cariopselor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna și a creșterii plantulelor rezultate, în condiții experimentale de cultivare în laborator la 7 zile de germinare.

Tratament ^{*)}	F _g ^{**)} (%)	Masa medie a plantulelor (m _p , g)	Înălțimea medie a plantulelor (cm)
Drojdie inactivată (DI)	84,7 ± 9,9	40,3 ± 8,2	4,9 ± 1,6
Soluție toxică (Sol. T)	71,3 ± 13,3	29,0 ± 2,4	2,9 ± 0,4
Drojdie inactivată și soluție toxică (DI + Sol. T)	92,0 ± 1,9	33,3 ± 1,8	3,6 ± 0,2

^{*)} Valorile sunt medii aritmetice a trei valori ± eroarea standard (50 cariopse/probă);
conform testului Tukey ($p \leq 0,05$).

^{**)} F_g = procentajul de cariopse germinate după 7 zile.

În conformitate cu datele prezentate de literatura de specialitate [24], se cunoaște faptul că drojdiile pot absorbi din mediu microelemente, inclusiv fier. Cu toate acestea, sunt necesare condiții fizico-chimice speciale pentru a realiza un mediu care promovează atât dezvoltarea drojdiei, cât și absorbția fierului. Diferite surse de fier nu afectează biomasa drojdiei dar, având în vedere eficacitatea, costul, stabilitatea și compatibilitatea cu metabolismul speciei *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen, s-a utilizat această specie de drojdie în experimente de decontaminare biologică a supernatanților toxici obținuți din deșeu minier metalifer, înainte de a realiza testele de germinație pe speciile de grâu comun.

Drojdia *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen se poate dezvolta cu ușurință în diferite medii atunci când fierul este abundent, deoarece aceasta are capacitatea de a consuma acest element chimic și de a-l păstra în căile sale metabolice esențiale [5, 59].

Prin urmare, decontaminarea solurilor contaminate cu metale grele din jurul vechilor exploatări miniere a reprezentat și va reprezenta în continuare o provocare a lumii științifice pentru o lungă perioadă de timp.

În experimentele desfășurate, drojdiile s-au dovedit a fi un microorganism eficient în decontaminarea supernatantului toxic bogat în metale grele, favorizând germinarea cariopselor de grâu și dezvoltarea plantulelor test rezultate în procesul de germinare.

3.3.1.4. Concluzii preliminare

În timpul tratamentului cu supernatanți toxici/reziduuri miniere din zona minieră Tarnița soluția toxică (3 mL supernatant toxic și 2 mL apă ultrapură Milli-Q, Sol.T) a determinat scăderea parametrilor de germinare și a afectat creșterea și dezvoltarea loturilor de plantule test, comparativ cu loturile tratate cu supernatantul cu drojdie activă (DA). În acest sens putem considera că atât parametrii de germinare, cât și dezvoltarea plantulelor au crescut în cazul inhibării toxicității metalelor grele, probabil, datorită compoziției specifice a supernatantului cu drojdie activă (DA + Sol.T).

De asemenea, prin incubarea soluției toxice cu supernatant cu drojdie inactivată prin fierbere (DI + Sol. T) s-a obținut o creștere atât a facultății germinative, cât și a greutateii și, respectiv, înălțimii medii a plantulelor test de grâu comun.

În experimentele realizate supernatantul cu drojdia activă a fost mai eficient, comparativ cu cel preparat din drojdia inactivată, privind decontaminarea și utilizarea ulterioară a soluțiilor rezultate din extracția deșeurii miniere metalifer (DMM) în testele de germinație a cariopselor de grâu și de creștere a plantulelor nou formate, probabil pentru că acesta din urmă eliberează mari cantități de substanțe organice, ce pot deranja procesul de germinare a cariopselor de grâu. Considerăm, totuși, că această soluție tehnică poate fi folosită în cazul decontaminării microbiologice și a cultivării solurilor în următorii ani, până când se va produce degradarea totală (mineralizarea) respectivilor compuși eliberați, probabil, de drojdia.

3.3.2. Efectul protector al glutatationului și reziduurile miniere toxice

3.3.2.1. Obiectivul cercetărilor

Glutationul, tripeptidă derivată de la cisteină, este un aminoacid cu gruparea –SH în moleculă prezent în toate celulele vii, cu rol protecție a acestora împotriva ionilor de metale grele, a compușilor organoclorurați, a oxidanților etc. Ca urmare a cunoașterii proprietăților sale, obiectivul experimentelor realizate în condiții de laborator în prezenta teză îl constituie evidențierea rolului glutatationului în protecția organismelor vegetale împotriva agresiunii contaminanților din zona minieră Tarnița. În acest sens am utilizat ca model de organisme vii cariopsele de grâu comun, *Triticum aestivum* L., soiul Putna, urmărind parametrii de germinație a acestora , percum și toleranța plantulelor astfel rezultate la stresul abiotic indus de prezența metalelor grele din apele reziduale.

3.3.2.2. Modul de lucru

Pentru determinarea efectului protector al glutatationului în procesul de germinare a cariopselor de grâu în prezența reziduurilor miniere provenite din exploatarea Tarnița și a dezvoltării în primele zile a plantulelor rezultate, s-au realizat tratamente pe loturi de câte 50 cariopse, în trei repetiții (Tabelul 3.12).

Tabel 3.12. Modelul de lucru în evaluarea rolului protector al glutatationului asupra procesului de germinare și de creștere a plantulelor de grâu, *Triticum aestivum* L., soiul Putna

Tratamente și condiții de lucru	Reactivi (mL)	Timp de agitare (min.)	Reactivi (mL)	Timp de agitare ^{*)} (min.)
Control, H ₂ O	5	60	-	-
H ₂ O + ST	2,5 (H ₂ O)	30	2,5 (ST)	30
GSH 10 ⁻² M + H ₂ O	2,5 (GSH)	30	2,5 (H ₂ O)	30
GSH 5·10 ⁻³ M + ST	2,5 (GSH)	30	2,5 (ST)	30
GSH 10 ⁻² M + ST	2,5 (GSH)	30	2,5 (ST)	30

^{*)} Din timp în timp; GSH = glutation; ST = supernatant toxic;

GSH 10⁻² M + H₂O = Martor GSH.

3.3.2.3. Rezultate obținute

Pe parcursul perioadei de 7 zile de tratament, proba cu soluție toxică (apă și supernatant toxic) a redus capacitatea de germinare a cariopselor, comparativ cu loturile de control tratate cu apă ultrapură Milli-Q (Martor: Eg = 95%, Fg = 96%; Supernatant toxic: (Eg = 88%, Fg = 90%) și, respectiv, cu loturile de tratate cu GSH 10⁻² M (Eg = 97%, Fg = 97%). De asemenea, creșterea plantulelor de grâu sub acțiunea soluției toxice a fost afectată, astfel încât masa totală și înălțimea medie a plantulelor, respectiv masa totală a rădăcinilor au înregistrat scăderi ($m_p = 1,41$ g, înălțimea = 3,375 cm, $m_r = 0,57$ g), comparativ cu loturile tratate cu apă ultrapură Milli-Q ($m_p = 2,28$ g, înălțimea = 8,916 cm, $m_r = 1,873$ g), și, respectiv, cu loturile tratate cu GSH 10⁻² M ($m_p = 1,92$ g, înălțimea = 6,974 cm, $m_r = 0,664$ g). Aceste reduceri ale valorilor parametrilor germinativi ar putea fi determinate de nivelul ridicat de cupru, fier și arsen în supernatantul testat, după cum au indicat și măsurătorile ICP-OES (tabel 3.1) și AAS (tabel 3.3).

Este de remarcat faptul că parametrii germinativi ai cariopselor au prezentat o tendință de creștere, ca urmare a tratamentului cariopselor de grâu comun cu GSH de

concentrație $5 \cdot 10^{-3}$ M ($E_g = 96\%$, $F_g = 97\%$) și, respectiv, 10^{-2} M ($E_g = 95\%$, $F_g = 95\%$). Creșterea plantulelor a fost astfel afectată, masa totală și înălțimea medie a plantulelor înregistrând unele reduceri, care pot fi explicate ținând cont de biologia plantelor de grâu, precum și de rolul substanțelor organice în dezvoltarea plantelor în general, observații care pot fi corelate și cu rezultatele și afirmațiile din literatura de specialitate [69].

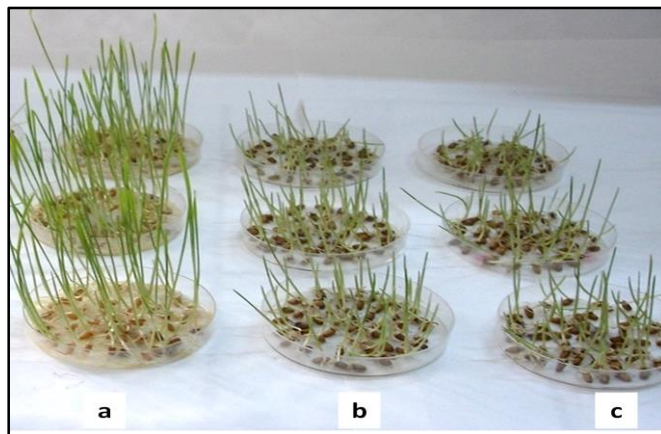


Fig. 3.10. Efectul glutationului asupra creșterii plantulelor test de *Triticum aestivum* L., soiul Putna rezultate din cariopsele germinate în prezența reziduurilor miniere din zona Tarnița, în condiții experimentale de laborator (7 zile de germinare). Tratamente plantule test:

a) Martor GSH, 2,5 mL sol. GSH 10^{-2} M, 30 min. + 2,5 mL H₂O, 30 min.;

b) 2,5 mL sol. GSH $5 \cdot 10^{-3}$ M, 30 min. + 2,5 mL ST, 30 min.;

c) 2,5 mL sol. GSH 10^{-2} M, 30 min. + 2,5 mL ST, 30 min. .

GSH = glutation; ST = supernatant toxic.

Tabel 3.13. Efectul protector al glutationului în intoxicațiile cu reziduurile miniere asupra plantulelor test de *Triticum aestivum* L., soiul Putna, determinat la 7 zile de germinare, în condiții experimentale de laborator

Tratament ^{*)}	E_g^{**} (%)	F_g^{***} (%)	Masa totală a plantulelor (m_p , g)	Înălțimea medie a plantulelor (cm)	Masa totală a rădăcinilor (m_r , g)
Martor, H ₂ O	$95 \pm 0,6$	$96 \pm 2,0$	$2,28 \pm 0,12$	$8,916 \pm 2,5$	$1,873 \pm 0,09$
H ₂ O + ST	$88 \pm 2,0$	$90 \pm 2,1$	$1,41 \pm 0,02$	$3,375 \pm 2,1$	$0,570 \pm 0,06$
Martor GSH	$97 \pm 1,3$	$97 \pm 2,4$	$1,92 \pm 0,09$	$6,974 \pm 1,6$	$0,664 \pm 0,1$
GSH $5 \cdot 10^{-3}$ M + ST	$96 \pm 2,0$	$97 \pm 1,3$	$1,12 \pm 0,03$	$2,795 \pm 2,0$	$0,697 \pm 0,01$
GSH 10^{-2} M + ST	$95 \pm 1,7$	$95 \pm 0,6$	$1,29 \pm 0,05$	$3,158 \pm 2,0$	$0,813 \pm 0,03$

^{*)} Valorile sunt medii aritmetice a trei valori \pm eroarea standard (50 cariopse/probă);

conform testului Tukey ($p \leq 0,05$).

^{**}) E_g = procentajul de cariopse germinate după 3 zile.

^{***}) F_g = procentajul de cariopse germinate după 7 zile.

GSH = glutation; ST = supernatant toxic.

Comparativ cu loturile de plantule martor tratate cu GSH 10^{-2} M, la loturile tratate cu GSH $5 \cdot 10^{-3}$ M, respectiv 10^{-2} M și supernatant toxic atât parametrii de germinare, cât și dezvoltarea plantulelor test au înregistrat scăderi valorice (Figura 3.10 și Tabel 3.13), doar masa totală a radiclei înregistrând creșteri.

A fost utilizată această tehnică de decontaminare chimică a reziduurilor miniere cu GSH, deoarece s-a constatat că, după prima extracție cu apă a deșeurilor metalifer colectat din halda de la Tarnița în supernatantul toxic obținut (apa reziduală) rămân cantități mari de metale grele.

3.3.2.4. Concluzii preliminare

Rezultatele obținute au arătat rolul glutathionului în procesele de germinație a cariopselor de grâu, soiul Putna și au permis o evaluare a toleranței acestuia la stresul abiotic indus de metalele grele (Cu, Fe, Pb și Zn) prezente în reziduurile miniere provenite din arealul Tarnița.

Comparativ cu loturile control tratate cu apă ultrapură Mili-Q (C) și, respectiv, cu loturile martor tratate cu GSH 10^{-2} M, cariopsele speciei test tratate cu soluție toxică (supernatant toxic și apă ultrapură Mili-Q, ST) au înregistrat o scădere a parametrilor de germinare: E_g (%): GSH 10^{-2} M (97) > C (95) > ST (88); F_g (%): GSH 10^{-2} M (97) > C (96) > ST (90).

De asemeni, creșterea și dezvoltarea plantulelor de grâu tratate cu soluție toxică a fost afectată, masa totală și înălțimea medie a plantulelor, respectiv masa totală a rădăcinilor înregistrând scăderi: m_p (g): C (2,28) > GSH 10^{-2} M (1,92) > ST (1,41); înălțimea (cm): C (8,916) > GSH 10^{-2} M (6,974) > ST (3,375); m_r (g): C (1,873) > GSH 10^{-2} M (0,664) > ST (0,57).

Cu toate acestea, puterea de germinare a cariopselor a crescut după tratarea acestora cu GSH de concentrație $5 \cdot 10^{-3}$ M și, respectiv, 10^{-2} M, cu 30 de minute înainte de tratarea acestora cu supernatant toxic: E_g (%): ST (88) < GSH 10^{-2} M+ST (95) < GSH $5 \cdot 10^{-3}$ M +ST (96); F_g (%): ST (90) < GSH 10^{-2} M+ST (95) < GSH $5 \cdot 10^{-3}$ M +ST (97).

Creșterea plantulelor în prezența supernatantului toxic a fost afectată, masa totală și înălțimea medie a plantulelor înregistrând scăderi. În schimb, creșterea radiclei în prezența contaminanților din supernatantul toxic, comparativ cu lotul de plantule crescute cu GSH ca martor, nu a fost afectată: m_p (g): ST (1,41) > GSH 10^{-2} M+ST (1,12) > GSH $5 \cdot 10^{-3}$ M +ST (1,12); înălțimea (cm): ST (3,375) > GSH 10^{-2} M+ST (3,158) > GSH $5 \cdot 10^{-3}$ M +ST (2,795); m_r (g): GSH 10^{-2} M+ST (0,813) > GSH $5 \cdot 10^{-3}$ M +ST (0,697) > ST (0,57).

Rezultatele înregistrate în cadrul experimentului desfășurat au evidențiat faptul că germinarea și dezvoltarea plantulelor au fost puternic inhibitate atunci când cariopsele de grâu au fost tratate cu supernatant toxic obținut prin extracția cu apă ultrapură Mili-Q a probelor de deșeu minier prelevate din zona contaminată (1g DMM la 10 mL apă), procedeu urmat de ultrasonicare și centrifugare. Tratarea cariopselor de grâu cu diferite concentrații de glutatation înainte de tratamentul cu supernatant toxic a condus la creșterea plantulelor și la reducerea stresului abiotic indus de prezența metalelor grele.

3.3.3. Decontaminarea reziduurilor miniere prin precipitare cu hidroxizi

3.3.3.1. Obiectivul cercetărilor

Obiectivul acestor cercetări a fost evidențierea rolului decontaminant al hidroxidului de sodiu asupra supernatanților toxici obținuți prin extracție din probele colectate din zone contaminate cu metale grele. Testele de germinație utilizând grâu comun realizate *in vitro*, în condiții de laborator, au fost recomandate anterior pentru evidențierea gradului de decontaminare a soluțiilor cu conținut de metale grele [12, 18].

3.3.3.2. Modul de lucru

Pentru remedierea conținutului de metale grele în apele reziduale obținute prin extracție din DMM colectat din haldele din zona minieră Tarnița s-a folosit metoda precipitării pe bază de hidroxizi [9, 80]. Astfel, 1 g de material solid contaminat a fost sonicat cu 10 ml de apă ultrapură Mili-Q, iar suspensia a fost centrifugată, pentru a se obține supernatantul toxic (ST). Acesta a fost decontaminat (STD) prin precipitarea ionilor metalelor grele cu o soluție de hidroxid de sodiu (NaOH 4%) până la pH 5, respectiv pH 12,0, apoi a fost ultracentrifugat la 5000 rpm timp de 5 minute și a fost tratat ulterior cu NaOH 4% sau HCl 4%, pentru neutralizare la pH 7,0.

Tabelul 3.14 sumează condițiile experimentale asigurate pentru determinarea efectului reziduurilor miniere provenite din zona minieră Tarnița decontaminate prin precipitare cu NaOH asupra proceselor de germinare a cariopselor de grâu și a procesului de creștere a plantulelor astfel rezultate.

Tabel 3.14. Condiții experimentale asigurate pentru determinarea efectului decontaminant, prin precipitare cu NaOH, a reziduurilor miniere din zona minieră Târnița (3 repetiții).

Tratamente (cariopse de grâu)	Reactiv 1 (mL)	Reactiv 2 (mL)	Timp de agitare (min.)
Control, H ₂ O	5	-	60
ST	5	-	60
ST + H ₂ O	3	2	60
STD	5	-	60
STD + H ₂ O	3	2	60

ST = supernatant toxic; STD = supernatant toxic decontaminat.

3.3.3.3. Rezultate obținute

Experimentele de germinație realizate au demonstrat că probele de sol/material metalifer colectate din halda de deșeu minier metalifer sunt foarte toxice pentru plante, inhibând aproape complet germinarea cariopselor de grâu și creșterea plantulelor (Figura 3.11, a-2 și b-2).

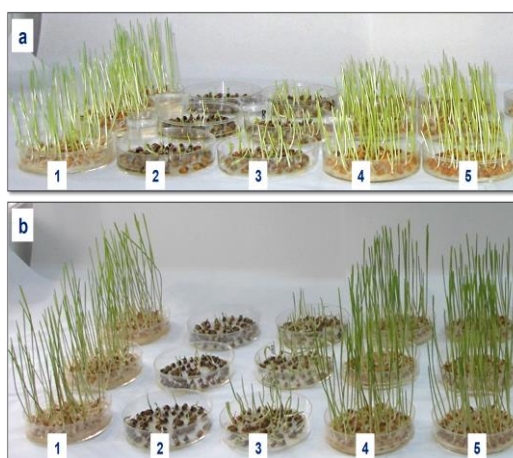


Fig. 3.11. Efectul decontaminării supernatantului obținut din reziduuri miniere provenite din zona minieră Târnița prin precipitare cu NaOH și neutralizare asupra procesului de germinare a cariopselor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna și a creșterii plantulelor astfel rezultate, în condiții experimentale de laborator:

(a) Plantule test la trei zile de tratament; (b) Plantule test la șapte zile de tratament.

Tratamente aplicate: 1) Martor, 5 mL H₂O; 2) 5 mL ST;

c) 3 mL ST + 2 mL H₂O; 4) 5 mL STD; 5) 3 mL STD + 2 mL H₂O.

ST = supernatant toxic; STD = supernatant toxic decontaminat.

Tabel 3.15. Reducerea toxicității supernatantului prin precipitare cu NaOH și efectul indus asupra procesului de germinare a cariopselor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna și a creșterii plantulelor astfel rezultate, în condiții experimentale de laborator

Tratament*)	E _g **) (%)	F _g ***) (%)	Masa medie a plantulelor (m _p , mg)	Înălțimea medie a plantulelor (cm)
Martor, H ₂ O	97 ± 2,1	97 ± 1,2	48,7 ± 3,6	7,4 ± 1,6
ST	25 ± 1,6	28 ± 3,6	11,1 ± 1,6	1,2 ± 2,3
ST + H ₂ O	56 ± 1,3	75 ± 1,1	22,9 ± 1,0	2,3 ± 1,2
STD	91 ± 2,6	91 ± 2,0	57,1 ± 2,2	6,8 ± 2,0
STD + H ₂ O	88 ± 2,0	95 ± 1,0	58,4 ± 1,2	7,2 ± 2,1

*) Valorile sunt medii aritmetice a trei valori ± eroarea standard (50 cariopse/probă);

conform testului Tukey ($p \leq 0,05$).

**) E_g = procentajul de cariopse germinate după 3 zile.

***) F_g = procentajul de cariopse germinate după 7 zile.

ST = supernatant toxic; STD = supernatant toxic decontaminat.

În experimentele realizate facultatea germinativă a cariopselor de grâu a crescut valoric după diluarea supernatantului toxic cu apă ultrapură Mili-Q (Figura 3.11, a-3 și b-3), respectiv după precipitarea acestuia cu NaOH și neutralizarea cu HCl (Figura 3.11, a-4,5 și b-4,5).

Soluția obținută după reacția supernatantului toxic cu hidroxidul de sodiu, și respectiv îndepărtarea precipitatului, s-a utilizat ca substrat de germinare și a dus la o creștere semnificativă a parametrilor de germinare, precum și a masei medii, respectiv a înălțimii medii a plantulelor de grâu comun rezultate (Figura 3.11 și Tabelul 3.15).

3.3.3.4. Concluzii preliminare

Precipitarea cu hidroxid a supernatantului obținut din deșeurile minier colectate de la Tarnița, urmată de neutralizare, a condus la o creștere semnificativă a parametrilor de germinare (facultate germinativă), precum și a masei și, respectiv, înălțimii medii a plantulelor de grâu comun rezultate; deci efectul negativ al supernatantului toxic asupra germinării și creșterii plantulelor a fost inhibat prin precipitarea unei părți a contaminanților cu hidroxid de sodiu.

Capitolul 4. Relația ionilor de Fier, Cupru, Arsen din exploatările de cupru și baritină Tarnița cu plantulele test de grâu comun, *Triticum aestivum* L., soiul Putna

4.1. Efectul ionilor de fier și cupru asupra procesului de germinație la grâu

4.1.1. Obiectivul cercetărilor

Obiectivul experimentelor realizate practic, pe parcursul prezentei teze în condiții de laborator, îl constituie investigarea efectului ionilor de Fe^{2+} și Cu^{2+} identificați în cantități excesive în arealul Tarnița asupra proceselor de germinație la grâul comun, ales ca specie test și interpretarea toleranței plantulelor astfel rezultate la stresul chimic indus de respectivii ioni în mediul de cultură.

4.1.2. Modul de lucru

Pentru determinarea efectului ionilor de Fe^{2+} și Cu^{2+} în concentrații mici prin teste de germinație s-a utilizat metoda de lucru prezentată la capitolul 2.2.2., utilizând cariopse de grâu comun (*Triticum aestivum* L., soiul Putna). În primul experiment s-au utilizat ca soluții de tratament, aplicate pe 50 cariopse de grâu comun, câte 5 mL soluție de CuSO_4 și, respectiv FeSO_4 , de concentrație $5 \cdot 10^{-3}$ M. În al doilea experiment de germinație s-au aplicat pe 50 de cariopse test câte 5 mL soluție din săruri diferite (CuCl_2 și FeSO_4) de concentrație $5 \cdot 10^{-4}$ M. Pentru comparație, au fost realizate probe triple control cu câte 5 mL apă ultrapură milli-Q aplicată pe câte 50 de cariopse test.

4.1.3. Rezultate obținute

Rezultatele obținute în primul experiment de germinație realizat cu soluții de metale grele cu concentrația de $5 \cdot 10^{-3}$ M (Tabel 4.1), au arătat că pe parcursul perioadei de 7 zile de tratament proba cu ioni de Cu^{2+} a redus puternic germinația cariopselor ($F_g = 31\%$), comparativ cu loturile de cariopse tratate cu ioni de Fe^{2+} ($F_g = 84\%$) și, respectiv, cu loturile de cariopse martor, tratate numai cu apă ultrapură Mili-Q ($F_g = 97\%$).

De asemeni, a fost afectată și creșterea plantulelor de grâu provenite din cariopsele tratate cu ioni de Cu^{2+} cu concentrația de $5 \cdot 10^{-3}$, masa și înălțimea medie a plantulelor fiind mai reduse ($m_p = 53,71$ mg, înălțimea = 7,84 cm), comparativ cu loturile de plantule tratate cu ioni de Fe^{2+} ($m_p = 66,33$ mg, înălțimea = 10,74 cm) și, respectiv, cu loturile de control din tratamentele cu apă ultrapură Mili-Q ($m_p = 77,31$ mg, înălțimea = 11,97 cm).

Tabel 4.1. Efectul ionilor de Cu^{2+} și Fe^{2+} în experimente de germinație la specia test *Triticum aestivum* L., soiul Putna (măsurători efectuate în a 7-a zi de tratament).

Tratament ^{*)}	F_g ^{**)} (%)	Masa medie a plantulelor (m_p , mg)	Înălțimea medie a plantulelor (cm)
Control, H_2O	$97 \pm 0,7$	$77,31 \pm 1,3$	$11,97 \pm 1,3$
CuSO_4 , $5 \cdot 10^{-3}$ M	$31 \pm 1,3$	$53,71 \pm 1,6$	$7,84 \pm 1,6$
FeSO_4 , $5 \cdot 10^{-3}$ M	$84 \pm 2,3$	$66,33 \pm 0,5$	$10,74 \pm 0,5$

^{*)} Valorile sunt medii aritmetice a trei valori \pm eroarea standard (50 cariopse/probă);
conform testului Tukey ($p \leq 0,05$).

^{**)} F_g = procentajul de cariopse germinate după 7 zile.

Rezultatele obținute în cel de al doilea experiment de germinație, realizat cu săruri diferite ale ionilor de cupru și fier la concentrația de $5 \cdot 10^{-4}$ M, au arătat că, pe parcursul perioadei de 7 zile de tratament, proba cu FeSO_4 a redus ușor germinația cariopselor ($F_g = 95\%$), comparativ cu loturile de plantule tratate cu CuCl_2 ($F_g = 97\%$) și, respectiv, cu loturile de plantule control tratate cu apă ultrapură Mili-Q ($F_g = 99\%$). Astfel, această concentrație poate fi considerată o limită de toxicitate asupra grâului. În același timp, ionii solubili ai acestor metale în zona minieră Tarnița au prezentat valori ale concentrațiilor net superioare.

Tabel 4.2. Efectul concentrațiilor reduse de săruri de cupru și fier asupra procesului de germinație a cariopselor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna în condiții experimentale de cultivare în laborator (măsurători efectuate în a 7-a zi de tratament)

Tratament ^{*)}	F_g ^{**)} (%)	Masa medie a plantulelor (m_p , mg)	Înălțimea medie a plantulelor (cm)
Control, H_2O	$99 \pm 0,7$	$55,86 \pm 0,2$	$10,37 \pm 0,7$
CuCl_2 , $5 \cdot 10^{-4}$ M	$97 \pm 1,3$	$53,29 \pm 0,9$	$9,73 \pm 0,3$
FeSO_4 , $5 \cdot 10^{-4}$ M	$95 \pm 2,4$	$48,08 \pm 1,4$	$9,01 \pm 0,4$

^{*)} Valorile sunt medii aritmetice a trei valori \pm eroarea standard (50 cariopse/probă);
conform testului Tukey ($p \leq 0,05$).

^{**)} F_g = procentajul de cariopse germinate după 7 zile.

Analizând datele prezentate în tabelul 4.2 se poate observa, de asemenea, că procesul de creștere a plantulelor de grâu tratate cu soluție de CuCl_2 la concentrația de $5 \cdot 10^{-4}$ M nu a fost profund afectat, masa și înălțimea medie a plantulelor formate fiind cu puțin mai scăzute ($m_p = 53,29$ mg, înălțimea = $9,73$ cm), comparativ cu cea înregistrată în loturile de plantule

martor, tratate cu apă ultrapură Mili-Q ($m_p = 55,86$ mg, $H = 10,37$ cm). În schimb, loturile de plantule tratate cu soluție de $FeSO_4$ la aceeași concentrație de $5 \cdot 10^{-4}$ M au înregistrat scăderi mai mari decât în cazul ionilor de cupru ($m_p = 48,08$ mg, înălțimea = $9,01$ cm). La rândul său, deși ionul de clor prezent în compoziția clorurii de cupru utilizată experimental este nociv la concentrații înalte, la concentrația de $5 \cdot 10^{-4}$ M nu poate fi incriminat pentru o eventuală toxicitate.

4.1.4. Concluzii preliminare

Toxicitatea ionilor de cupru s-a manifestat prin scăderea semnificativă a parametrilor de germinație a cariopselor de grâu, precum și prin afectarea creșterii plantulelor astfel rezultate, la concentrația de $5 \cdot 10^{-3}$ M

Testele de germinație realizate cu cloruri și sulfați de metal greu la concentrații mici $5 \cdot 10^{-4}$ M au demonstrat că soluția de clorură de cupru inhibă mai puțin germinarea cariopselor de grâu comun și dezvoltarea plantulelor, comparativ cu loturile test tratate cu sulfat feros. Fenomenul astfel constatat poate fi explicat prin rolul fiziologic al ionilor metalici investigați în corpul plantelor, ionul de cupru fiind considerat un microelement indispensabil în dezvoltarea plantelor [60, 86].

Rezultatele practic obținute au arătat că ionii de Fe^{2+} și Cu^{2+} la concentrații mici de $5 \cdot 10^{-4}$ M au un efect ușor inhibitor asupra germinației cariopselor de grâu comun, valorile respectivilor parametri obținuți în cazul aplicării acestor metale grele prezentând diferențe foarte mici, indiferent de tipul de sare utilizată în realizarea testelor de germinație. Însă, la concentrații mai mari de $5 \cdot 10^{-3}$ M, ionii de Cu^{2+} prezintă un efect inhibitor mai pronunțat asupra germinației cariopselor de grâu, precum și asupra creșterii plantulelor astfel rezultate, comparativ cu ionii de Fe^{2+} , dovedind toxicitatea ridicată a acestora. Aceste rezultate obținute în cadrul cercetărilor întreprinse au demonstrat că se poate evidenția, prin teste de germinație, efectul toxicității ionilor de fier și cupru. Astfel, cercetările noastre sugerează o corelație între procesul de germinație a cariopselor de grâu comun, creșterea și dezvoltarea plantulelor rezultate și existența unor metale grele în zonele poluate din arealul minier Tarnița, și anume: procesul de germinație poate înregistra valori scăzute odată cu creșterea concentrațiilor ionilor metalici investigați, dar și a volumului de supernatant toxic aplicat (rezultatele experimentelor precedente cu supernatant).

4.2. Evidențierea toxicității arsenitului prin teste de germinație a cariopselor de grâu

4.2.1. Obiectivul cercetărilor

În acest subcapitol s-a pus accent pe investigarea impactului negativ al arsenului (sub formă de ioni de arsenit și arsenat) asupra parametrilor de germinare a cariopselor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna și de creștere a plantulelor de grâu rezultate prin proces de germinație în condiții experimentale de laborator, cu scopul de a determina toxicitatea ionilor de arsenit la concentrații comparabile cu cele ale acestor ioni în haldele de deșeu minier din arealul minier Tarnița.

4.2.2. Modul de lucru

Pentru a determina efectul arsenicului din deșeurile miniere metalifere provenite din arealul Tarnița asupra germinării cariopselor de grâu și a dezvoltării plantulelor nou formate, soluțiile de arsenit de sodiu au fost preparate în patru replici, după cum urmează: 1) 0,25 mM NaH₂AsO₃; 2) 0,826 mM NaH₂AsO₃; 3) 1,8 mM NaH₂AsO₃; 4) 5 mM NaH₂AsO₃. Probe de câte 5 mL din fiecare soluție de arsenit de sodiu au fost utilizate ca soluție de tratament pentru loturi de câte 50 cariopse test de grâu comun montate în trei repetiții, cariopsele fiind imersate total în soluțiile respective. Pentru comparație, au fost realizate trei probe martor cu câte 5 mL apă ultrapură milli-Q și, respectiv, câte 50 de cariopse test.

4.2.3. Rezultate obținute

Procentajul de cariopse germinate după 7 zile a scăzut de la 100% (martor, H₂O) la 96% (AsO₃³⁻, 0,25 mM), reducându-se continuu până la 12%, odată cu creșterea concentrației ionilor de arsenit de la 0,25 mM la 5 mM (Figura 4.3).

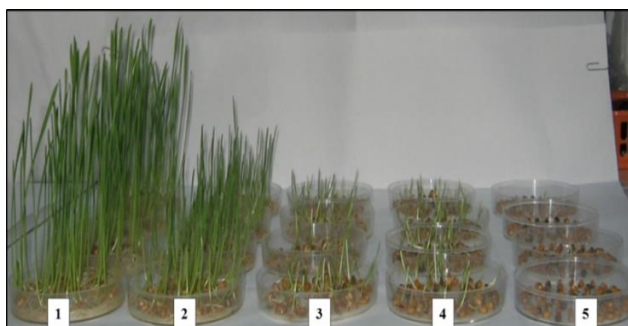


Fig. 4.3. Efectul ionilor arsenit (AsO₃³⁻) asupra germinației cariopselor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna și asupra creșterii plantulelor rezultate după 7 zile de germinație.

Tratamente cariopse test: 1) control (5 mL H₂O); 2) 5 mL 0,25 mM AsO₃³⁻; 3) 5 mL 0,826 mM AsO₃³⁻; 4) 5 mL 1,8 mM AsO₃³⁻; 5) 5 mL 5mM AsO₃³⁻.

Tabel 4.3. Efectul ionilor de arsenit asupra germinației cariopselor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna și a creșterii plantulelor rezultate în condiții experimentale de laborator după 7 zile de germinație

Tratament ^{*)}	F _g ^{**)} (%)	Masa medie a plantulelor (m _p , mg)	Înălțimea medie a plantulelor (cm)
Control, H ₂ O	100 ± 0,5	46,8 ± 0,1	9,3 ± 0,1
AsO ₃ ³⁻ , 0,25 mM	96 ± 1,3	26,8 ± 0,1	4,6 ± 0,3
AsO ₃ ³⁻ , 0,826 mM	90 ± 1,9	7,1 ± 0,0	1,5 ± 0,1
AsO ₃ ³⁻ , 1,8 mM	64 ± 3,0	6,9 ± 0,0	1,4 ± 0,1
AsO ₃ ³⁻ , 5 mM	12 ± 1,0	1,6 ± 0,0	0,6 ± 0,2

^{*)} Valorile sunt medii aritmetice a trei valori ± eroarea standard (50 cariopse/probă);
conform testului Tukey ($p \leq 0,05$).

^{**)} F_g = procentajul de cariopse germinate după 7 zile.

În mod asemănător atât înălțimea, cât și masa plantulelor s-a redus, odată cu creșterea concentrației de arsenit (Tabel 4.3) sugerând că, după procesul de germinare, plantulele nou formate sunt în continuare afectate de concentrațiile sporite ale agentului poluant, fenomen previzibil, deoarece cariopsele au fost menținute în cutiile Petri împreună cu soluțiile de arsenit pe întreaga perioadă de desfășurare a experimentului.

4.2.4. Concluzii preliminare

Din analiza rezultatelor obținute s-a constatat că stresul determinat de arsenitul de sodiu a condus la inhibarea germinației plantelor prin reducerea facultății germinative, a scăzut numărul plantulelor rezultate și a perturbat creșterea acestora, rezultatele reducându-se valoric direct proporțional cu mărirea concentrației arsenitului de sodiu din soluțiile de tratament (Tabel 4.3).

Rezultatele obținute au demonstrat că se poate evidenția, prin teste de germinație, toxicitatea ionilor arsenului, ioni aflați în deșeurile metalifere și în solurile din jurul haldelor miniere existente în arealul minier cercetat.

4.3. Efectul protector al glutatationului asupra grâului supus intoxicării cu ioni de arsenit

4.3.1. Obiectivul cercetărilor

În cercetările prezentate în acest subcapitol s-a pus accent pe investigarea efectului protector al glutatationului în intoxicația plantelor cu compuși ai arsenului, utilizând testele de

germinație a cariopselor de gâu comun, *Triticum aestivum* L., soiul Putna și de creștere a plantulelor rezultate în condiții experimentale de laborator.

4.3.2. Modul de lucru

Pentru a determina efectul protector al glutatationului în intoxicația cu arsenit de sodiu, în *primul experiment* testele de germinație s-au realizat pe cariopse de grâu, soluțiile de arsenit de sodiu și de glutatation fiind preparate în patru repetiții, conform variantelor înscrise în Tabelul 4.4.

În cel de *al doilea experiment* soluțiile de arsenit de sodiu și de glutatation necesare pentru tratamentul cariopselor test de grâu comun s-au preparat în patru replici, astfel: 1) 5 mL GSH 10 mM (considerată drept probă Control); 2) 5 mL soluție formată din 2,5 mL NaH₂AsO₃ 0,25 mM și 2,5 mL GSH 10 mM; 3) 5 mL soluție formată din 2,5 mL NaH₂AsO₃ 0,826 mM și 2,5 mL GSH 10 mM; 4) 5 mL soluție formată din 2,5 mL NaH₂AsO₃ 1,8 mM și 2,5 mL GSH 10 mM. În schemele de tratament (2), (3) și (4) s-au pipetat eprubete câte 2,5 mL de NaH₂AsO₃ 0,5 mM, 2,5 mL de NaH₂AsO₃ 1,652 mM și, respectiv, 2,5 mL NaH₂AsO₃ 3,6 mM, agitându-se conținutul fiecărei eprubete timp de 30 de minute, iar apoi s-au adăugat 2,5 mL de GSH 20 mM, amestecând din când în când timp de încă 30 minute.

Tabel 4.4. Modul de preparare a reactivilor utilizați în cadrul experimentului privind evaluarea rolului protector al glutatationului în intoxicația cu ioni de arsenit de sodiu a cariopselor și plantulelor de grâu comun, *Triticum aestivum* L., soiul Putna.

Tratamente și condiții de lucru	Reactivi (mL)	Timp de agitare (min)	Reactivi (mL)	Timp de agitare ^{*)} (min.)
Control, H ₂ O	5	60	-	-
NaH ₂ AsO ₃ 1 mM	5	60	-	-
GSH 2 mM + NaH ₂ AsO ₃ 2 mM	2,5 (GSH)	30	2,5 (NaH ₂ AsO ₃)	30
GSH 4 mM + NaH ₂ AsO ₃ 2 mM	2,5 (GSH)	30	2,5 (NaH ₂ AsO ₃)	30
GSH 10 mM + NaH ₂ AsO ₃ 2 mM	2,5 (GSH)	30	2,5 (NaH ₂ AsO ₃)	30
GSH 20 mM + NaH ₂ AsO ₃ 2 mM	2,5 (GSH)	30	2,5 (NaH ₂ AsO ₃)	30

^{*)} Din timp în timp; GSH = glutatation; NaH₂AsO₃ = arsenit de sodiu

În cel de *al treilea experiment* s-a urmărit efectul comparativ al ionilor de arsenit și arsenat, precum și efectul protector al glutatationului în intoxicația cu ioni de arsenit în teste

de germinație realizate pe cariopse de grâu comun. În acest experiment au fost preparate și utilizate probe cu soluție de arsenat de sodiu, arsenit de sodiu și glutatoin în trei repetiții, după cum urmează: 1) 5 mL H₂O (control); 2) 5 mL NaH₂AsO₄ 1 mM; 3) 5 mL soluție formată din 2,5 mL NaH₂AsO₃ 2 mM și 2,5 mL GSH 20 mM (adică 5 mL NaH₂AsO₃ 1 mM + GSH 10 mM); 4) 5 mL of 1 mM NaH₂AsO₃. În soluția de tratament (3) s-au pipetat 2,5 mL soluție de NaH₂AsO₃ 2 mM, agitându-se conținutul eprubetei timp de 30 de minute, iar apoi s-au adăugat 2,5 mL de GSH 20 mM, amestecând din când în când, timp de încă 30 minute.

Probele de câte 5 mL s-au utilizat ca soluție de tratament pentru loturi de 50 cariopse test de grâu comun, experimentul fiind realizat în trei repetiții. Pentru comparație, au fost realizate și trei probe de control cu câte 5 mL de apă ultrapură milli-Q și câte 50 cariopse test.

4.3.3. Rezultate obținute

Experimentul 1. Rezultatele obținute în primul experiment de germinație, realizat cu o soluție 1 mM de arsenit de sodiu, au arătat că pe parcursul perioadei de 7 zile de tratament, în care cariopsele au fost în contact cu ionii de arsenit, tratamentul cu acest tip de ioni a redus puternic germinația cariopselor ($F_g = 19\%$), comparativ cu loturile de cariopse martor, tratate numai cu apă ultrapură Mili-Q ($F_g = 97\%$).

Tabel 4.5. Efectul tratamentului cu glutatoin și arsenit de sodiu asupra germinației cariopselor și a creșterii plantulelor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna în condiții experimentale de laborator, după 7 zile de germinație

Tratament ^{*)}	F_g ^{**)} (%)	Masa medie a plantulelor (m_p , mg)	Înălțimea medie a plantulelor (cm)
Control, 5 mL H ₂ O	97 ± 1,8	53,3 ± 0,2	9,3 ± 0,1
5 mL NaH ₂ AsO ₃ 1 mM	19 ± 1,3	15,7 ± 2,9	1,7 ± 0,2
2,5 mL GSH 2mM + 2,5 mL NaH ₂ AsO ₃ 2 mM	21 ± 2,4	16,5 ± 0,4	1,8 ± 0,1
2,5 mL GSH 4mM + 2,5 mL NaH ₂ AsO ₃ 2 mM	31 ± 3,7	18,6 ± 1,7	1,9 ± 0,1
2,5 mL GSH 10mM + 2,5 mL NaH ₂ AsO ₃ 2 mM	42 ± 2,0	19,5 ± 0,7	2,1 ± 0,1
2,5 mL GSH 20mM + 2,5 mL NaH ₂ AsO ₃ 2 mM	87 ± 1,7	20,7 ± 0,4	2,3 ± 0,1

^{*)} Valorile sunt medii aritmetice a trei valori ± eroarea standard (50 cariopse/probă);
conform testului Tukey ($p \leq 0,05$).

^{**)} F_g = procentajul de cariopse germinate după 7 zile.

După aplicarea unor soluții de GSH (2,5mL) de concentrație între 2 și 20mM timp de 30 minute pe materialul de analiză, operațiune ce a permis absorbția sa parțială de către cariopsele luate în lucru, tratamentul ulterior, timp de încă 30 minute, cu soluția de arsenit de sodiu (2,5mL) de concentrație 2 mM a determinat o creștere ușoară a procentajului facultății germinative (Tabel 4.5). Această tendință de creștere a facultății germinative a continuat odată cu creșterea concentrației de glutatation. Este de remarcat faptul că atât parametrii de germinație ai cariopselor, cât și masa medie a plantulelor rezultate și înălțimea acestora au prezentat o evoluție valorică ascendentă, ca urmare a tratamentului cariopselor de grâu comun cu GSH de concentrație 2 – 20 mM (Tabel 4.5).

Experimentul 2. În acest experiment s-au ales astfel concentrațiile de arsenit încât să surprindem mai bine efectul inhibitor al arsenitului și rolul glutatationului în modificarea efectului inhibitor al acetuia asupra unor parametri de germinare ai cariopselor de grâu.

Dacă se compară datele practic obținute (Tabel 4.6) pentru tratamentul cu 0,25 mM arsenit de sodiu cu cele din tabelul 4.3, se poate considera că glutatationul anulează practic efectul toxic al arsenitului.

În timp ce ionii de arsenit cu concentrație de 1,8 mM reduc facultatea germinativă a semințelor de grâu la 64%, în absența glutatationului (Tabelul 4.3), la adăugarea acestuia în concentrație de 10 mM, acest parametru fiziologic a înregistrat o creștere valorică cu 24% (Tabel 4.6).

Tabel 4.6. Efectul protector al glutatationului împotriva toxicității arsenitului de sodiu pe parcursul procesului de germinație a cariopselor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna și a creșterii plantulelor rezultate în condiții experimentale de laborator (după 7 zile de tratament).

Tratament*)	F _g **) (%)	Masa medie a plantulelor (m _p , mg)	Înălțimea medie a plantulelor (cm)
5 mL GSH 10 mM (Control)	99 ± 0,5	36,7 ± 1,2	7,7 ± 0,0
2,5 mL NaH ₂ AsO ₃ 0,25 mM + 2,5 mL GSH 10 mM	98 ± 1,4	38,0 ± 0,4	7,8 ± 0,1
2,5 mL NaH ₂ AsO ₃ 0,826 mM + 2,5 mL GSH 10 mM	97 ± 0,6	17,3 ± 0,4	2,4 ± 0,1
2,5 mL NaH ₂ AsO ₃ 1,8 mM + 2,5 mL GSH 10 mM	88 ± 0,9	12,5 ± 0,5	1,7 ± 0,1

*) Valorile sunt medii aritmetice a trei valori ± eroarea standard (50 cariopse/probă);

conform testului Tukey (p ≤ 0, 05).

**) F_g = procentajul de cariopse germinate după 7 zile.

De asemenea, au fost observate efecte importante în ceea ce privește masa totală și înălțimea medie a plantulelor rezultate. Astfel, înălțimea lor medie a crescut cu 0,3 unități (cm) la aceeași concentrație de 1,8 mM arsenit de sodiu, înălțimea fiind de 1,4 cm (vezi Tabelul 4.3), iar prin inhibarea toxicității ionilor de arsenit de către soluția 10 mM de glutatation înălțimea a avut valoarea de 1,7 cm (vezi Tabelul 4.6). La rândul ei, masa medie a plantulelor crescute în prezența ionilor de arsenit la concentrația de 1,8 mM a crescut, de asemenea, cu 5,6 unități (mg).

Rezultatele obținute în experimentul al doilea au sugerat că glutatationul, la concentrația de 10 mM, reduce mult toxicitatea arsenitului de sodiu cu concentrația de 1,8 mM. Pentru validarea acestor rezultate a fost inițiat încă un experiment, în care s-a folosit un martor cu apă ultrapură Mili-Q, tratamentul cu arsenit și cel cu arsenit plus glutatation.

Experimentul 3. În cadrul acestui experiment a fost inclus și un tratament cu arsenat de sodiu, pentru a compara activitatea toxică a ionului arsenit cu aceea a ionului arsenat și s-a observat o toxicitate mai înaltă a celui de-al doilea (Figura 4.5), contrar datelor precizate de literatura de specialitate [36]. Astfel, față de martor, numărul de plantule nou formate a scăzut, în cazul tratamentului cu ionul arsenat, de la o medie de 48 pe lot, la una de numai 40 plantule.

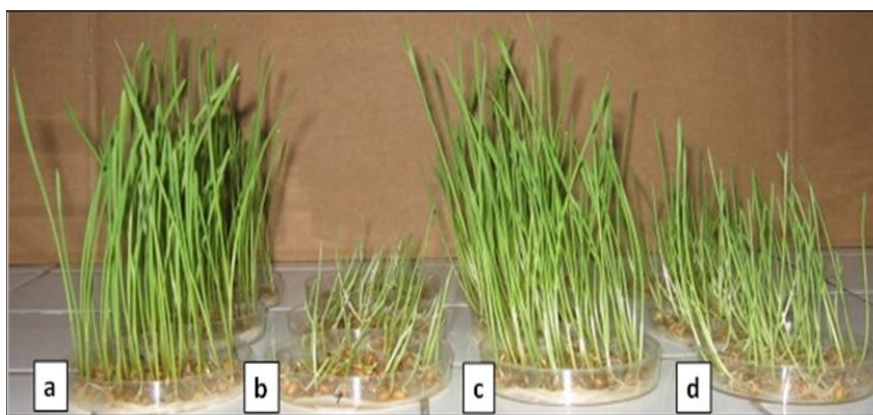


Fig. 4.5. Efectul ionilor de arsenat și de arsenit de sodiu aplicați în prezența glutatationului asupra procesului de germinație a cariopselor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna și a creșterii plantulelor nou formate după 7 zile de germinație. Tratamente aplicate: a) Control, H₂O; b) NaH₂AsO₄, 1 mM; c) NaH₂AsO₃, 1 mM + GSH, 10 mM; d) NaH₂AsO₃, 1 mM.

Comparativ cu loturile de plantule control, tratate cu apă ultrapură Mili-Q, înălțimea medie a plantulelor tratate cu ioni arsenat a scăzut de la 11,6 cm la 2,5 cm (Figura 4.5 și Tabel 4.7). În același timp, comparativ cu acțiunea ionilor de arsenat, arsenitul de sodiu nu a afectat numărul de plantule formate, iar înălțimea medie a acestora a scăzut cu 46% și nu cu 78,4% (de la 11,6 cm la 6,2 cm).

La rândul său, glutationul a manifestat un rol protector în intoxicația materialului vegetal cu ioni de arsenit, scăderea înălțimii plantulelor nefiind semnificativă (9,9 cm față de 11,6 cm). Înălțimea medie a plantulelor rezultate a fost recuperată cu un procentaj de 37% atunci când, după tratamentul cu arsenit de sodiu a urmat unul cu glutation, valorile astfel înregistrate ale acestui parametru variind de la 6,2 cm (varianta fără GSH) până la 9,9 cm (varianta cu GSH). În același timp, masa medie a plantulelor nou formate prin procesul de germinație au crescut, de asemenea, cu 32% în în prezența ionilor de arsenit și glutation: 37,0 mg (varianta fără GSH) până la 54,5 cm (varianta cu GSH).

Tabel 4.7. Efectul ionilor de arsenat și de arsenit de sodiu aplicați în prezența glutationului asupra procesului de germinație a cariopselor de *Triticum aestivum* L., soiul Putna și a creșterii plantulelor nou formate după 7 zile de germinație.

Tratament ^{*)}	F _g ^{**)} (%)	Masa medie a plantulelor (m _p , mg)	Înălțimea medie a plantulelor (cm)
H ₂ O (Control)	97 ± 1,8	58,0 ± 1,3	11,6 ± 0,1
NaH ₂ AsO ₄ 1 mM	90 ± 0,6	19,0 ± 0,9	2,5 ± 0,1
NaH ₂ AsO ₃ 1 mM + GSH 10 mM	100 ± 0,0	54,5 ± 0,8	9,9 ± 0,1
NaH ₂ AsO ₃ 1 mM	97 ± 1,3	37,0 ± 1,8	6,2 ± 0,2

^{*)} Valorile sunt medii aritmetice a trei valori ± eroarea standard (50 cariopse/probă); conform testului Tukey (p ≤ 0, 05).

^{**)} F_g = procentajul de cariopse germinate după 7 zile.

4.3.4. Concluzii preliminare

Primul experiment de germinație a cariopselor de grâu realizat prin aplicarea de ioni de arsenit de sodiu a demonstrat că pe parcursul perioadei de 7 zile de germinație concentrația de 1 mM arsenit aplicată a determinat o toxicitate manifestată prin scăderea semnificativă a parametrilor de germinație și prin afectarea creșterii plantulelor de grâu nou formate. Dacă acest tratament al cariopselor a condus la afectarea parametrilor de germinație, precum și a parametrilor morfologici ai plantulelor, tratamentul aplicat suplimentar cariopselor astfel intoxicate cu glutation de concentrații 2 – 20 mM a îmbunătățit semnificativ procesul de germinație.

Cel de *al doilea experiment* de germinație, realizat prin aplicare de arsenit de sodiu de concentrații 0,25 – 1,8 mM, a determinat o scădere a valorilor parametrilor de germinație analizați, iar aplicarea concomitentă a glutationului 10 mM cu ionii de arsenit a avut rol

protector asupra cariopselor de grâu, ce au parcurs astfel cu succes intervalul de germinație, în condiții de toxicitate a arsenitului în mediu de cultură.

Rezultatele obținute în cel de *al treilea experiment* au demonstrat că ionul de arsenat a prezentat o toxicitate mai ridicată, comparativ cu ionul de arsenit, la aceeași concentrație de 1 mM. Și în acest experiment glutatioul 10 mM și-a pus în evidență rolul său protector în intoxicația cu arsenit.

Concentrațiile utilizate în cele trei experimente au fost cu mult sub concentrațiile speciilor de arsen din zona Tarnița și, în condițiile experimentale de laborator organizate, aceste concentrații au manifestat o înaltă toxicitate asupra materialului biologic supus testării (plantule nou formate din cariopsele germinate, care și-au redus semnificativ dimensiunile radiculelor, uneori până la dispariție).

La rândul său, glutatioul s-a dovedit a avea un rol protector față de concentrațiile reduse ale ionilor de arsenit aplicate concomitent în mediul de cultivare, în experimentele organizate în condiții de laborator.

CONCLUZII GENERALE

Cercetările care au făcut obiectul prezentei teze au urmărit răspunsul fiziologic al plantelor de grâu comun, *Triticum aestivum* L., soiul Putna, reprezentate de intensitatea procesului de germinare a cariopselor și de creștere a plantulelor rezultate, precum și de nivelul de activitate a unor compuși enzimatici specifici cu rol antioxidant, implicați în metabolismul tinerelor plantule nou formate atât la excesul de metale grele și arsen din materialul minier metalifer (soluri) și din reziduurile miniere (supernatant toxic) provenite din arealul minei de baritină Tarnița, comuna Ostra, județul Suceava, cât și la reziduurile rezultate din decontaminarea experimentală, prin metode microbiologice și, respectiv, chimice, a substratelor de cultivare prelevate din respectiva zonă minieră.

Analiza datelor practic obținute ne permit să enunțăm câteva concluzii, care urmăresc să răspundă obiectivelor de cercetare propuse, după cum urmează:

I. Concentrațiile de metale grele și arsen detectate în probele de deșeu minier și de sol din exploatarea de cupru și baritină Tarnița

- Măsurătorile de spectroscopie de emisie optică cu plasmă cuplată inductiv (ICP-OES) au demonstrat că depozitele de deșeu minier metalifer din zona minieră Tarnița conțin cantități mari de metale grele precum fierul, cuprul, plumbul și zincul, dar și metaloizi, precum arsenul. Între metalele grele astfel identificate fierul a înregistrat concentrațiile cele mai ridicate în halda de deșeu și în jurul acesteia, fiind urmat de cupru și plumb, aceste valori fiind determinate, probabil, de condițiile climatice specifice din zona minieră avută în atenție. La rândul lor, solurile colectate de la o distanță de aproximativ 30 m depărtare de halda de deșeu minier metalifer s-au dovedit a prezenta și ele cantități mari de cupru, plumb și arsen.
- Măsurătorile de spectroscopie de absorbție atomică (AAS) au evidențiat faptul că în extractele apoase obținute din deșeurile miniere metalifere și din solurile prelevate de la aproximativ 30m distanță de halda de deșeu sunt prezente, în concentrații mari, metale grele precum fierul, cuprul, zincul și manganul. Valorile concentrațiilor astfel determinate au depășit cu mult valorile admise de standardele naționale pentru apele de suprafață din România, dovedind că în arealul Tarnița numeroase metale grele au fost insolubile și nu au putut fi extrase cu apă sub formă de ioni metalici, afectând profund vegetația forestieră din zona de investigație. Decontaminarea experimentală a extractelor cu deșeu minier metalifer prin precipitare cu hidroxid de sodiu nu a redus semnificativ concentrațiile fierului, cuprului, zincului și manganului, acestea păstrându-se, în continuare, la valori foarte mari, în comparație cu limitele standard admise.
- Metodele de analiză ICP-OES și AAS au permis determinarea concentrațiilor metalelor grele și a arsenului din eșantioanele de sol și din reziduurile miniere (extracte apoase) cu o mare sensibilitate. Rezultatele obținute astfel au evidențiat existența, în zona de lucru, a unor concentrații ridicate de fier, cupru, zinc, mangan și arsen, unele dintre aceste componente fiind extrem de toxice, chiar la valori reduse, pentru mediul înconjurător, realitate ce sugerează că depozitele de deșeu metalifer

din arealul minier și forestier Tarnița reprezintă, încă, o sursă puternică de contaminare și un pericol continuu pentru lanțul trofic la nivel local.

II. Evaluarea efectului toxic al reziduurilor miniere din exploatările de cupru și baritină Tarnița prin teste de germinație a cariopselor de grâu comun, *Triticum aestivum* L., soiul Putna

- Excesul de metale grele și de arsen determinat în probele colectate din halda de deșeu minier și din solurile situate la aproximativ 30 m de depozit au redus semnificativ parametrii de germinare a cariopselor de grâu comun (până la o inhibare completă a acesteia), reducând totodată și procesul de creștere a plantulelor nou formate, comparativ cu loturile control, tratate cu apă distilată și, respectiv, cu cele crescute pe sol de grădină.
- Diluția succesivă a supernatantului obținut din deșeul minier metalifer prin extracția acestuia de două ori și, respectiv, de trei ori cu apă, reducând nivelul de contaminanți toxici conținuți în extractele astfel preparate a îmbunătățit, progresiv, parametrii de germinare a cariopselor de grâu și dezvoltarea plantulelor nou formate.

III. Decontaminarea reziduurilor miniere din exploatările de cupru și baritină Tarnița

- Experimentele de germinație a cariopselor de grâu comun folosind un mediu cu supernatanți toxici/reziduuri miniere din zona minieră Tarnița (3 mL supernatant toxic și 2 mL apă) au condus la scăderea parametrilor de germinare și au afectat creșterea și dezvoltarea plantulelor de grâu astfel rezultate, comparativ cu loturile tratate cu drojdia *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen activă și, respectiv, inactivată prin tratament termic, microorganismul activ dovedindu-se a fi capabil să inhibe, într-o proporție mai mare, comparativ cu varianta inactivată, toxicitatea metalelor grele existente în supernatanții toxici/reziduurile miniere de analiză. Conform datelor precizate de literatura de specialitate, acest microorganism poate fi folosit în cazul decontaminării microbiologice a solurilor contaminate cu metale grele în două etape: o primă extragere a acestora cu apă, urmată de trecerea apelor cu conținut de metale grele peste masa de drojdie care le reține, drojdia rezultată din procesul de decontaminare fiind ulterior uscată și incinerată, iar metalele grele recuperate prin metode chimice de electroliză sau de precipitare.
- Experimentele de germinație a cariopselor de grâu în prezență de glutatation pe mediu cu supernatanți toxici proveniți din arealul Tarnița au demonstrat rolul său de a diminua stresul abiotic indus de metalele grele prezente în respectivele deșeuri miniere metalifere: supernatantul toxic obținut prin extracția cu apă a probelor de deșeu minier prelevate din zona contaminată a inhibat puternic germinarea și dezvoltarea plantulelor de grâu comun, însă tratarea cariopselor de grâu cu diferite concentrații de glutatation înainte de utilizarea supernatantului toxic, reducând stresul abiotic indus de prezența metalelor grele în mediul de cultivare, a condus la creșterea parametrilor de germinație și de creștere a plantulelor nou formate, sugerând rolul antitoxic al acestei tripeptide tiolice.

- Procedul de precipitare cu hidroxid de sodiu a supernatanților toxici obținuți prin extracție cu apă a probelor colectate din zonele contaminate cu metale grele din arealul de studiu, urmat de neutralizare, a condus la o creștere semnificativă a parametrilor germinativi ai cariopselor test, precum și a masei și, respectiv, înălțimii medii a plantulelor nou formate, soluția de hidroxid de sodiu putând fi astfel recomandată drept un bun agent de decontaminare a unor substraturi aflate în condiții similare de poluare cu cele existente în zona minieră Târnița.

IV. Relația ionilor de Fier, Cupru și Arsen din exploatările de cupru și baritină Târnița cu plantulele de grâu comun, *Triticum aestivum* L., soiul Putna

Relația ionilor de fier și cupru cu plantulele de grâu comun:

- Soluțiile de tratament conținând sulfazi de Fe^{2+} și Cu^{2+} la concentrația $5 \cdot 10^{-3}$ M utilizată în experimentele de germinare a cariopselor de grâu comun au demonstrat faptul că ionii de cupru au scăzut semnificativ valorile parametrilor germinativi, comparativ cu ionii de fier și au afectat mai puternic creșterea și dezvoltarea plantulelor de grâu astfel rezultate, susținând toxicitatea ridicată a acestui tip de ioni din deșeurile miniere metalifere existente în zona minei de baritină Târnița.
- Testele de germinație realizate în prezență de săruri diferite, sub formă de clorură cuprică și sulfat feros în concentrații mici, de $5 \cdot 10^{-4}$ M, au demonstrat că ionii de Cu^{2+} inhibă mai puțin germinarea cariopselor de grâu comun și dezvoltarea plantulelor, comparativ cu ionii de Fe^{2+} .
- Procesul de germinație a cariopselor de grâu și creșterea tinerelor plantule nou formate în condiții experimentale, de laborator, prin culturi *in vitro*, pe soluții conținând ioni de fier și cupru existenți, practic, în probele de deșeu minier metalifer și de sol colectate din arealul minier Târnița în concentrații mult mai mari, comparativ cu cele testate în lucrarea de față, demonstrează efectele lor deosebit de toxice asupra mediului și trag un semnal de alarmă referitor la riscurile pe care le reprezintă prezența acestora pentru sănătatea populației din zonă.

Relația ionilor de arsen cu plantulele de grâu comun:

- Ionii de arsenit, identificați, la rândul lor, în deșeurile metalifere și în solurile din arealul minier Târnița, aplicați experimental sub formă de arsenit de sodiu în concentrații mai mari de 5 mM au indus un pronunțat efect inhibitor germinației cariopselor de grâu, precum și creșterii și dezvoltării tinerelor plantule, acestora din urmă inhibându-le prioritar creșterea și dezvoltarea rădăcinilor.
- Testele de germinație și de creștere a plantulelor test realizate în prezența ionilor arsenit și arsenat au demonstrat că, la aceeași concentrație de 1 mM, ionul arsenat a prezentat o toxicitate mai ridicată, comparativ cu ionul arsenit. Presupunând, în continuare, că arsenatul prezent în deșeurile miniere metalifere din zona minieră Târnița poate crește toxicitatea împreună cu celelalte elemente toxice precum cuprul, plumbul, fierul, aluminiul ș.a., prezente, la rândul lor, în aceste deșeuri și din dorința de a cunoaște contribuția arsenului la toxicitatea globală a materialului metalifer, a fost testat efectul toxic al unor probe de arsenit sau arsenat de diferite concentrații cu mult mai reduse, comparativ cu concentrațiile speciilor de arsen identificate în zona

Tarnița; rezultatele practice obținute au evidențiat și de această dată efecte înalt toxice ale respectivelor soluții, preparate experimental, asupra plantelor test.

- Experimentele care au urmărit interacțiunea dintre glutatation și arsenitul de sodiu pe parcursul procesului de germinare a cariopselor și de creștere a plantulelor de grâu comun au demonstrat faptul că glutatationul a oferit, la concentrația de 10 mM, protecție împotriva toxicității arsenitului de sodiu și a avut un rol protector asupra creșterii plantulelor.

DISEMINAREA REZULTATELOR OBȚINUTE

PUBLICAȚII

I.1. Lucrări științifice in extenso în jurnale ISI cu factor de impact:

1. Necula, R., Zaharia, M., **Butnariu, A.**, Zamfirache, M.-M., Surleva, A., Ciobanu, C. I., Pintilie O., Iacoban C., Drochioiu G. – Heavy metals and arsenic in an abandoned barite mining area: ecological risk assessment using biomarkers, *Environmental forensics*, 1 – 13, DOI: 10.1080/15275922.2021.1976315, **2021**. (Factor de impact **1,328**).
2. Ștefănescu R., **Butnariu A.-E.**, Zamfirache M.-M., Surleva A., Ciobanu C. I., Pintilie O., Drochioiu G. – Yeast-based microbiological decontamination of heavy metal contaminated soils of Tarnița, *Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences*, 12(1), 153 – 159, **2017**. (Factor de impact **1,347**).

I.2. Articole științifice publicate in extenso, în volumele conferințelor, cotate ISI:

1. Zaharia M., Drochioiu G., **Butnariu A. E.**, Ilieva D., Surleva A. – Heavy metal toxicity and decontamination. Tarnita closed mine pollution case, 17th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2017, Energy and Clean Technology, Section Air Pollution and Climate Change, vol. 17(43), pp. 397-404, **2017**.
2. Drochioiu G., **Butnariu A. E.**, Ștefănescu R., Necula R. and Iacoban C. – Possible heavy metal bioremediation of Tarnita forestry area, 16th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2016, Water Resources. Forest, Marine and Ocean Ecosystems, vol. 3(II), pp. 609 -616, **2016**.
3. Murariu M., Ciobanu C. I., Bunia I., Surleva A., **Butnariu A. E.** – Wheat seeds as environmental markers in heavy metal and arsenic pollution of Tarnita mining area, 16th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2016, Water Resources. Forest, Marine and Ocean Ecosystems, vol. 3(II), pp. 685 -692, **2016**.

I.3. Lucrări științifice în jurnale incluse în Baze de date internaționale (BDI):

1. **Butnariu, A.**, Zamfirache, M.-M., Drochioiu, G. Toxicity assessment of arsenite and its relationship with arsenic polluted area of Tarnița: the protective effect of glutathione, *Acta Chemica Iași*, vol. 28(1), pp. 95 – 112, **2020**.
2. Pintilie, O., Zaharia, M., Cosma, A., **Butnariu, A.**, Murariu, M., Drochioiu, G., Sandu, I., Effect of heavy metals on the germination of wheat seeds: enzymatic assay, *The annals of “Dunarea de Jos” University of Galati. Fascicle IX. Metallurgy and Materials Science*, B category, 215 code (http://www.cncsis.ro/2006_evaluate_rev.php), ISSN 1453–083x, **2016**.

PARTICIPĂRI LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE

I.4. Conferințe internaționale:

1. **Butnariu A. E.**, Ștefănescu R., Pintilie O., Murariu M., Bunia I., Surleva A., Ciobanu C. I., Iacoban C. and Zamfirache M. M. – Wheat seeds as markers of heavy metal pollution and decontamination of Tarnita mining area, 12th International Conference on Colloid and Surface Chemistry, Iași, Mai, **2016**.
2. Pintilie O., Zaharia M., Cosma A., **Butnariu A. E.**, Murariu M., Drochioiu G. and Sandu I. – Studiul efectului metalelor grele asupra germinației semințelor de grâu prin măsurători enzimactice, *Scientific, Technological and Innovative Research in Current European Context* (International Workshop EUROINVENT), Alexandru Ioan Cuza University Publishing House, (ISBN: 978-973-703-891-3), 643-653, **2016**.

I.5. Conferințe naționale:

1. O. Pintilie, M. Zaharia, A. Cosma, **A. Butnariu**, M. Murariu, G. Drochioiu, I. Sandu. Effect of heavy metals on the germination of wheat seeds: enzymatic assay, The 7th Conference on Material Science & Engineering, UgalMat, Galați, Mai, **2016**.
2. **A. E. Butnariu**, M. M. Zamfirache, A. Lobiuc, G. Drochioiu, O. Pintilie, M. Murariu, C.I. Ciobanu, C. Iacoban, Z. Olteanu. Efectul glutationului asupra speciei test *Triticum aestivum* L. în prezența metalelor grele din reziduurile miniere provenite de la Tarnița-Ostra, Sesiunea de Comunicări Științifice “D. Brânză”, București, Noiembrie, **2016**.
3. **Butnariu A. E.**, Ștefănescu R., Pintilie O., Zamfirache M. M., Surleva A., Ciobanu C. I. And Drochioiu G. – Yeast-based microbiological decontamination of heavy metal contaminated soils: Tarnita area case, Zilele Universității "Alexandru Ioan Cuza", Iași, Octombrie, **2015**.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ:

1. Adjel F., Bouzerzour H., Benmahammed A. (2013). Salt Stress Effects on Seed Germination and Seedling Growth of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Genotypes. *Journal of Agriculture and sustainability*, 3(2): 223-23.
2. Anderson P. M., Oelke, E. A., Simmons, S. R. (1985) – Growth and development guide for spring wheat. University of Minnesota Agricultural Extension Folder AG-FO-2547, p. 1-8.
3. Andrei M., Predan G. M. I. (2008) – Practicum de morfologia și anatomia plantelor, Editura Științelor Agricole, Iași, p. 54-57, 205-206.
4. Askari H., Kazemitabar S. K., Zarrini H. N., Saberi M. H. (2017) – Different statistical procedures for selection of salt tolerant barley genotypes at germination stage. *Indian Journal of Agricultural Research*, 51(5): 453-457
5. Askwith C. C., De Silva D., Kaplan J. (1996) – Molecular biology of iron acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiology*, 20: 27-34.
6. Aziz H. A., Adlan M. N., Ariffin K.S. (2008) – Heavy metals (Cd, Pb, Zn, Ni, Cu and Cr (III)) removal from water in Malaysia: Post treatment by high quality limestone. *Bioresource Technology*, 99(6): 1578-1583.
7. Baltpurvins K. A., Burns R. C., Lawrance G. A., Stuart A. D. (1995) – The Use of the Solubility Domain Approach for the Modeling of the Hydroxide Precipitation of Lead from Wastewater, 50th Purdue Industrial Waste Conference Proceedings. *Environmental Science & Technology*, 30(5): 1493-1499.
8. **Butnariu A.**, Zamfirache M. M., Drochioiu G. (2020) – Toxicity assessment of arsenite and its relationship with arsenic polluted area of Tarnița: the protective effect of glutathione, *Acta Chemica Iași*, 28(1): 95-112.
9. Charerntanyarak L. (1999) – Heavy metals removal by chemical coagulation and precipitation, *Water Science Technology*, 39: 135-138.
10. Chen Q. Y., Luo Z., Hills C., Xue G., Tyrer M. (2009) – Precipitation of heavy metals from wastewater using simulated flue gas: sequent additions of fly ash, lime and carbon dioxide, *Water Research*, 43: 2605-2614.
11. Chicos M. M., Damian G., Stumbea D., Buzgar N., Ungureanu T., Nica V., Iepure G. (2016) – Mineralogy and geochemistry of the tailing ponds from Straja Valley (Suceava County, Romania). Factors affecting the mobility of the elements on the surface of the waste deposit. *Carpathian Journal of Earth and Environmental Science*, 11(1): 265-280.
12. Ciobanu C., Molnar R., Murariu M., Ruscanu R., Butnariu R., Mangalagiu G., Drochioiu G. (2006) – Mercury toxicity and its relationship with selenite salts and glutathione, *Ann. Univ. Agron. Iasi, seria Agronomie*, 49: 332-337.
13. Ciobanu C., Molnar R., Murariu M., Ruscanu R., Drochioiu G. (2006) – Protective effect of glutathione against copper ions within a wheat germination experiment, *Ann. Univ. Agron. Iasi, seria Agronomie*, 49: 346-351.
14. Cojocaru C., Diaconu M., Cretescu I., Savic J., Vasic V. (2009) – Biosorption of copper(II) ions from aqua solutions using dried yeast biomass, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 335(1): 181-188.

15. Dhankhar R., Hooda A. (2011) – Fungal biosorption - an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions, *Environmental Technology*, 32(5): 467-491.
16. Døelsch E., Deroche B., Van de Kerchove V. (2006) – Impact of sewage sludge spreading on heavy metal speciation in tropical soils (Réunion, Indian Ocean). *Chemosphere*, 65(2): 286-293.
17. Drochioiu G., **Butnariu A. E.**, Ștefănescu R., Necula R., Iacoban C. (2016) – Possible heavy metal bioremediation of Tarnita forestry area, 16th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2016, Water Resources. Forest, Marine and Ocean Ecosystems, 2(3): 609 -616.
18. Drochioiu G., Surleva A., Ilieva D., Tudorachi L., Necula R. (2016) – Heavy metal toxicity around a closed barite mine in Tarnita-Romania, 16th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2016, Water Resources. Forest, Marine and Ocean Ecosystems, 2(3): 525 -532.
19. Evers A. D., Bechtel D. B. (1988) – Microscopic structure of the wheat grain. *Wheat: chemistry and technology*, I (3): 47-95.
20. Faltermaier A., Zarnkow M., Becker T., Gastl M., Arendt E. K. (2015) – Common wheat (*Triticum aestivum* L.): Evaluating microstructural changes using the malting process by using confocal laser scanning microscopy and scanning electron microscopy. *European Food Research and Technology*, 241: 239-252.
21. Fargasova A. (1994) – Effect of Pb, Cd, Hg, As and Cr on germination and root growth of *Sinapsis alba* seeds. *Environmental Contamination and Toxicology*, 52(3): 452-456.
22. Farhan S. N., Khadom A. A. (2015) – Biosorption of heavy metals from aqueous solutions by *Saccharomyces cerevisiae*, *International Journal of Industrial Chemistry*, 6(2): 119-130.
23. Fomina M., Gadd G. M. (2014) – Biosorption: current perspectives on concept, definition and application, *Bioresource Technology*, 160: 3-14.
24. Gaensly F., Picheth G., Brand D., Bonfim T. (2014) – The uptake of different iron salts by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2): 491-494.
25. Gang A., Vyas A., Vyas H. (2013) – Toxic effect of heavy metals on germination and seedling growth of wheat, *Environmental Research and Development*, vol. 8(2): 206.
26. Gekeler W., Grill E., Winnacker E. L., Zenk M. H. (1989) – Survey of the plant kingdom for the ability to bind heavy metals through phytochelatin, *Zeitschrift für Naturforschung*, 44: 361-369.
27. Godzik B. (1993) – Heavy metals content in plants from zinc dumps and reference area. *Polish Botanical Studies*, 5: 113-132.
28. Göksungur Y., Üren S., Güvenç U. (2003) – Biosorption of copper ions by caustic treated waste baker's yeast biomass. *Turkish Journal of Biology*, 27(1): 23-29.
29. Gorur K. F., Keser R., Akcay N., Dizman S., (2012) – Radioactivity and heavy metal concentrations of some commercial fish species consumed in the Black Sea region of Turkey. *Chemosphere*, 87: 356-361.

30. Hasnian S., Yasmin S., Yasmin A. (1993) – The effect of lead resistant *Pseudomonas* on the growth of *Triticum aestivum* seedlings under lead stress. *Environmental Pollution*, 81(2): 179-184.
31. Hirata K., Tsuji N., Miymamoto K. (2005) – Biosynthetic regulation of phytochelatins. *Heavy Metal-Binding Peptides*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(6): 593-599.
32. Hönig V., Miler P., Hromadko J. (2008) – Bioethanol as a future inspiration. *Listy Cukrovarnické a Řepářské*, 124(7/8): 203-206.
33. Horikoshi T., Nakajima A., Sakaguchi T. (1981) – Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 12(2): 90-96.
34. Huisman J. L., Schouten G., Schultz C. (2006) – Biologically produced sulphide for purification of process streams, effluent treatment and recovery of metals in the metal and mining industry, *Hydrometallurgy*, 83: 106-113.
35. Ilieva D., Angelova L., Drochioiu G., Murariu M., Surleva A. (2019) – Estimation of soil and tailing dump toxicity: development and validation of a protocol based on bioindicators and ICP-OES. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 572 (1): 012110.
36. Jain C. K., Ali, I. (2000) – Arsenic: occurrence, toxicity and speciation techniques. *Water Research*, 34(17): 4304-4312.
37. Jang M., Hwang J. S., Choi S. I. (2007) – Sequential soil washing techniques using hydrochloric acid and sodium hydroxide for remediating arsenic-contaminated soils in abandoned iron-ore mines. *Chemosphere*, 66(1): 8-17.
38. Jansone I., Gaile Z. (2013) – Production of bioethanol from starch based agriculture raw material. *Research for Rural Development*, 1: 35.
39. Klepper, B., Rickman, R. W., Peterson, C. M. (1982) – Quantitative Characterization of Vegetative Development in Small Cereal Grains 1. *Agronomy Journal*, 74(5): 789-792.
40. Koski-Vähälä J., Hartikainen H., Tallberg P. (2001) – Phosphorus mobilization from various sediment pools in response to increased pH and silicate concentration, *Journal of Environmental Quality*, 30(2): 546-552.
41. Ku Y. , Jung I. L. (2001) – Photocatalytic reduction of Cr (VI) in aqueous solutions by UV irradiation with the presence of titanium dioxide. *Water Research*, 35(1): 135-142.
42. Laxmi V., Nalini P. (2016) – Effect of iron stress on oxidative metabolism in wheat plants (*Triticum aestivum* L.) iron stress in wheat. *International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture*, 2(12): 24-32.
43. Lesmana S. O., Febriana N., Soetaredjo F. E., Sunarso J., Ismadji, S. (2009) – Studies on potential applications of biomass for the separation of heavy metals from water and wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1): 19-41.
44. Madrid Y., Cabrera C., Perez-Corona T., Camara C. (1995) – Speciation of methyl mercury and Hg(II) using baker's yeast biomass (*Saccharomyces cerevisiae*). Determination by continuous flow mercury cold vapor generation atomic absorption spectrometry, *Analytical Chemistry*, 67: 750-754.

45. Mahmood T., Islam K. R., Muhammad S. (2007) – Toxic effects of heavy metals on early growth and tolerance of cereal crops, *Pakistan Journal of Botany*, vol. 39 (2): 451-462.
46. Mandal B. K., Suzuki K. T.(2002) – Arsenic round the world: a review, *Talanta*, 58(1): 201-235.
47. Matschullat J. (2000) – Arsenic in the geosphere-a review, *Science of the Total Environment*, 249(1-3): 297-312.
48. Mcdonald M. B., (1993) – The history of seed vigor testing, *Journal of Seed Technology*, 17 (2): 93-100.
49. Mehmood T., Bibi I., Shahid M., Niazi N. K., Murtaza B., Wang H., Ok Y. S., Sarkar B., Javed M. T., Murtaza G. (2017) – Effect of compost addition on arsenic uptake, morphological and physiological attributes of maize plants grown in contrasting soils, *Journal of Geochemical Exploration*, 178: 83-91.
50. Mirbagheri S. A., Hosseini S. N. (2005) – Pilot plant investigation on petrochemical waste water treatment for the removal of copper and chromium with the objective of reuse, *Desalination*, 171: 85-93.
51. Mirsal I. A. (2008) – *Soil Pollution. Origins, Monitoring & Remediation*, Springer, p. 117-136.
52. Murariu M., Ciobanu C. I., Bunia I., Surleva A., **Butnariu A. E.** (2016) – Wheat seeds as environmental markers in heavy metal and arsenic pollution of Tarnita mining area. *International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM*, 3 (II): 685-692.
53. Mylona P. V., Polidoros A. N., Scandalios J. G. (1998) – Modulation of antioxidant responses by arsenic in maize, *Free Radical Biology and Medicine*, 25(4-5): 576-585.
54. Niță M., Rugină R., Ivănescu L., Costică N., Toma C. (2004) – *Morfologia și anatomia plantelor. Manual de lucrări practice*, Ed. Univ. “Al. I. Cuza” Iași, p.10.
55. Norouzi, Y., Mohammadi, G., Nosratti, I. (2017) – Seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum*) as influenced by safed behman (*Centaurea behen*) water extract. *Biharean Biologist*, 11(2): 98-101.
56. Ordinul Ministrului Mediului și Gospodăririi Apelor nr. 161/2006 pentru aprobarea Normativului privind clasificarea calității apelor de suprafață în vederea stabilirii stării ecologice a corpurilor de apă, publicat în *Monitorul Oficial al României, Partea I*, nr. 511 din 13.06.2006.
57. Ordinul nr. 756/1997, Reglementari privind evaluarea poluării mediului.
58. Pflugmacher S., Hofmann J., Hübner B. (2007) – Effects on growth and physiological parameters in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in soil and irrigated with cyanobacterial toxin contaminated water. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 26(12): 2710-2716.
59. Philpott C. C., Protchenko O. (2008) – Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 7(1): 20-27.
60. Pokorska-Niewiada K., Rajkowska-Myśliwiec M., Protasowicki M. (2018) – Acute lethal toxicity of heavy metals to the seeds of plants of high importance to humans. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 101(2): 222-228.

61. Potters G., De Gara L., Asard H., Horemans N. (2002) – Ascorbate and glutathione: Guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol. Biochem.*, 40: 537-548.
62. Raghavan R., Dietz D.H., Coles E. (1989) – Cleaning Excavated Soil Using Extraction Agents: A Review State-of-the-Art, *Journal of Hazardous Materials*, 26(1): 81-87.
63. Rasafi El, Nouri T., Bouda M., Haddioui A. (2016) – The effect of Cd, Zn and Fe on seed germination and early seedling growth of wheat and bean. *Ekológia*, 35(3): 213.
64. Rauret G., Rubio R., Lopez-Sanchez J. F. (1989) – Optimization of Tessier procedure for metal solid speciation in river sediments. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 36(2): 69-83.
65. Rea P. A., Vatamaniuk O. K., Rigden D. J. (2004) – Weeds, worms, and more. Papain's long-lost cousin, phytochelatin synthase. *Plant Physiology*, 136: 2463-2474.
66. Saifullah B., Ghafoor, A., Zia M. H., Murtaza G., Waraich E. A., Bibi S., Srivastava, P. (2010) – Comparison of organic and inorganic amendments for enhancing soil lead phytoextraction by wheat (*Triticum aestivum* L.). *International journal of phytoremediation*, 12(7): 633-649.
67. Seguchi M., Uozu M., Oneda H., Murayama R., Okusu H. (2010) – Effect of outer bran layers from germinated wheat grains on breadmaking properties. *Cereal Chemistry*, 87: 231-236.
68. Shafeeq A., Ali Butt Z., Muhammad S. (2012) – Response of nickel pollution on physiological and biochemical attributes of wheat (*Triticum aestivum* L.) var. bhakar-02, *Pakistan Journal of Botany*, 44: 111-116.
69. Shao H. B., Liang Z. S., Shao M. A., Sun Q. (2005) – Dynamic changes of anti-oxidative enzymes of 10 wheat genotypes at soil water deficits. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 42(3-4): 187-195.
70. Shiferaw B., Baker D. A. (1996) – An Evaluation of Drought Screening Techniques for *Eragrostis tef*. *Tropical Science (United Kingdom)*, 36: 74-80.
71. Shumaker K. L., Begonia G. (2005) – Heavy metal uptake, translocation, and bioaccumulation studies of *Triticum aestivum* cultivated in contaminated dredged materials. *International journal of environmental research and public health*, 2(2): 293-298.
72. Singh D., Nath K., Sharma Y. K. (2007) – Response of wheat seed germination and seedling growth under copper stress. *Journal of Environmental Biology*, 28(2): 409-414.
73. Smirnova G. V., Oktyabrsky O. N. (2005) – Glutathione in bacteria, *Biochemistry*, 70: 1199-1211.
74. Snedecor G. V. (1994) – Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology. The Iowa Stat Univ. Press, U.S.A., p. 255-274.
75. STAS 4706 (1988) – Ape de suprafață. Categori și condiții de calitate.
76. Stein R. R. J., Duarte G. L., Spohr M. G., Lopes S. I. G., Fett J. P. (2008) – Distinct physiological responses subjected to iron toxicity under field conditions. *Annals of Applied Biology*, 154(2): 269-277.

77. Stumbea D. (2013) – Preliminaries on pollution risk factors related to mining and ore processing in the Cu-rich polymetallic belt of Eastern Carpathians, Romania. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(11): 7643-7655.
78. Ștefănescu R., **Butnariu A. E.**, Zamfirache M. M., Surleva A., Ciobanu C. I., Pintilie O., Drochioiu G. (2017) – Yeast-based microbiological decontamination of heavy metal contaminated soils of Tarnita, *Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences*, 12(1):153-159.
79. Tanase C., Pui A., Oprea A., Popa K. (2009) – Translocation of radioactivity from substrate to macromycetes in the Crucea (Romania) uranium mining area. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*, 281(3): 563-567.
80. Tünay O., Kabdaşlı, N. I. (1994) – Hydroxide precipitation of complexed metals. *Water Research*, 28(10): 2117-2124.
81. Țiț D. M., Pallag A., Bungău S., Fodor I. (2012) – The Influence of Microelements on Germination and Chlorophyll Quantity in *Sinapis alba* L. seeds, *Analele Universității din Oradea. Fascicula Ecotoxicologie, Zootehnie și Tehnologii de Industrie Alimentară*, 11/B (11): 188-195.
82. Wang J., Chen C. (2006) – Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review, *Biotechnology Advances*, 24: 427-451.
83. Wu M., Liang J., Tang J., Li G., Shan S., Guo Z., Deng, L. (2017) – Decontamination of multiple heavy metals-containing effluents through microbial biotechnology. *Journal of hazardous materials*, 337: 189-197.
84. Wysocki R., Chéry C. C., Wawrzycka D., Van Hulle M., Cornelis R., Thevelein J. M., Tamás M. J. (2001) – The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular Microbiology*, 40(6): 1391-1401.
85. Yasin M., El-Mehdawi A. F., Anwar A., Pilon-Smits E. A., Faisal, M. (2015) – Microbial-enhanced selenium and iron biofortification of wheat (*Triticum aestivum* L.)-applications in phytoremediation and biofortification. *International journal of phytoremediation*, 17(4): 341-347.
86. Yasmeen F., Razzaq A., Iqbal M. N., Jhanzab H. M. (2015) – Effect of silver, copper and iron nanoparticles on wheat germination. *International journal of biosciences*, 6(4): 112-117.
87. Zadoks J. C., Chang T. T., Konzak C. F. (1974) – A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed research*, 14(6): 415-421.
88. Zaharia M., Drochioiu G., Ilieva D., **Butnariu A. E.**, Surleva A. (2017) – Heavy metal toxicity and decontamination: Tarnita closed mine pollution case. 17th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2017, Vienna GREEN Conference Proceedings, 17(43):397-404.