

**UNIVERSITATEA PENTRU ȘTIINȚELE VIETII
„ION IONESCU DE LA BRAD” DIN IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: BOLI PARAZITARE**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat,
Prof. dr. Liviu Dan MIRON**

**Doctorand,
Ionela Valerica PINDELI (VOLOȘENIUC)**

2022

**„ION IONESCU DE LA BRAD”
UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES OF IAȘI
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOMAIN: VETERINARY MEDICINE
SPECIALIZATION: PARASITIC DISEASES**

PHD THESIS

**PhD Coordinator,
Prof. Liviu Dan MIRON, PhD**

**PhD Student,
Ionela Valerica PINDELI (VOLOȘENIUC)**

2022

**UNIVERSITATEA PENTRU ȘTIINȚELE VIETII
„ION IONESCU DE LA BRAD” DIN IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: BOLI PARAZITARE**

**CERCETĂRI ASUPRA ÎNCĂRCĂTURII
PARAZITARE A UNOR EMISARI DIN
BAZINUL DORNELOR ȘI CORELAȚIILE
SAPROBIOLOGICE**

**Conducător de doctorat,
Prof. dr. Liviu Dan MIRON**

**Doctorand,
Ionela Valerica PINDELI (VOLOȘENIUC)**

2022

**„ION IONESCU DE LA BRAD”
UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES OF IAȘI
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOMAIN: VETERINARY MEDICINE
SPECIALIZATION: PARASITIC DISEASES**

**RESEARCHES ON THE PARASITE LOAD
OF CERTAIN EMISSARIES IN THE
DORNELOR BASIN AND
SAPROBIOLOGICAL CORRELATIONS**

**PhD Coordinator,
Prof. Liviu Dan MIRON, PhD**

**PhD Student,
Ionela Valerica PINDELI (VOLOȘENIUC)**

2022

CUPRINS

INTRODUCERE	x
REZUMAT	xii

PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	xx
--	-----------

CAPITOLUL 1. CARACTERIZAREA DEPRESIUNII DORNELOR, A FACTORILOR CARE INFLUENȚEAZĂ PARAZITISMUL ÎN MEDIUL ACVATIC SI DESCRIEREA BAZINULUI HIDROGRAFIC STUDIAT

1

1.1. Relieful, rețeaua hidrografică, impactul creșterii animalelor asupra mediului	1
1.2. Stații destinate prelevării probelor de apă	3
1.2.1. Pârâul Bancu.....	4
1.2.2. Pârâul Secu	5
1.2.3. Pârâul Arinul.....	5
1.2.4. Pârâul Călimănel.....	6

CAPITOLUL 2. STUDIU PRIVIND UNII AGENȚI PARAZITARI CARE POT CONTAMINA SURSELE DE APĂ.....

7

2.1. Surse de apă de suprafață și subterane.....	7
2.2. Studii referitoare la <i>Cryptosporidium spp.</i> și <i>Giardia spp.</i>	8
2.2.1. Izolarea și identificarea oocisturilor de <i>Cryptosporidium spp.</i> și a chisturilor de <i>Giardia spp.</i>	13
2.3. Studii referitoare la <i>Entamoeba spp.</i>	13
2.4. Studii referitoare la <i>Fasciola spp.</i> și <i>Dictyocaulus spp.</i>	14
2.4.1. Studii referitoare la <i>Fasciola spp.</i>	14
2.4.2. Studii referitoare la <i>Dictyocaulus spp.</i>	16
2.4.3. Studiu referitor la Familia Simuliidae	17

CAPITOLUL 3. APA: STRUCTURĂ, PROPRIETĂȚI

19

CAPITOLUL 4. MACRONEVERTEBRATELE BENTICE..... 22**PARTEA A II-A – CONTRIBUȚII PERSONALE 24****CAPITOLUL 5. LOCUL DESFĂȘURĂRII EXPERIMENTELOR, SCOPUL ȘI
OBIECTIVELE CERCETĂRIILOR..... 25****CAPITOLUL 6. METODE DE DEPISTARE CANTITATIVĂ ȘI CALITATIVĂ
A OOCISTURILOR DE *CRYPTOSPORIDIUM* ȘI A CHISTURILOR DE
GIARDIA DIN APELE DE SUPRAFAȚĂ 28**

6.1. Izolarea și identificarea oocisturilor de <i>Cryptosporidium spp.</i> și a chisturilor de <i>Giardia spp.</i>	28
6.1.1. Prelevarea probelor de apă	28
6.1.2. Filtrarea probelor de apă.....	29
6.1.3. Spălarea filtrului, centrifugarea concentratului inițial, obținerea concentratului final	31
6.1.4. Separarea imunomagnetică.....	32
6.1.5. Colorarea prin tehnica imunofluorescenței.....	33
6.1.6. Examinarea la microscop a preparatului colorat și fixat.....	34

**CAPITOLUL 7. CARACTERIZAREA PRIN INDICATORI FIZICO-CHIMICI
AI EMISARIILOR CERCETAȚI ÎN BAZINUL DORNELOR 42**

7.1. Indicatori fizici ai apei.....	43
7.2. Determinarea unor indicatori chimici ai apei	45
7.2.1. Determinarea pH-ului	45
7.2.2. Determinarea substanțelor organice	47
7.2.3. Determinarea conductivității	50
7.2.4. Determinarea oxigenului dizolvat.....	52
7.2.5. Determinarea alcalinității exprimată în hidrogen carbonat (bicarbonat)	54
7.2.6. Determinarea durității apei	56
7.3. Determinarea nitraților și a nitriților.....	59
7.3.1. Determinarea nitraților	59
7.3.2. Determinarea nitriților	60

7.4. Determinarea anionilor și a cationilor dizolvați prin cromatografie ionică	61
7.4.1. Determinarea cromatografică a anionilor dizolvați în apă.....	61
7.4.2. Determinarea cromatografică a cationilor dizolvați în apă.....	64
 CAPITOLUL 8. MONITORIZAREA UNOR PARAMETRI MICROBIOLOGICI AI APEI ȘI A BIOMASEI ALGALE.....	69
8.1. Monitorizarea unor parametri microbiologici ai apei.....	69
8.1.1. Determinarea numărului total de germeni (NTG)	69
8.1.2. Determinarea numărului total de germeni (NTG) la 37 grade C	71
8.2. Determinarea bacteriilor coliforme și izolarea speciei <i>Escherichia coli</i>	72
8.3. Determinarea Enterococilor (Streptococilor) intestinali.....	77
8.4. Determinarea speciei <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	78
8.5. Determinarea sporilor de bacterii anaerobe sulfito-reducatoare (<i>Clostridium</i>)	80
8.6 Urmărirea evoluției biomasei algale în corelație cu sursele de poluare.....	82
8.6.1. Determinarea algelor verzi	83
8.6.2. Determinarea algelor diatomee	84
8.6.3. Determinarea algelor criptofite.....	85
8.6.4. Determinarea algelor albastre - verzi.....	86
8.6.5. Determinarea concentrației algale totală.....	87
8.6.6 . Determinarea substanței galbene	88
 CAPITOLUL 9. MACRONEVERTEBRATELE BENTICE.....	90
 CAPITOLUL 10. CONCLUZII FINALE	104
 BIBLIOGRAFIE.....	109
 ANEXA 1 – LISTA ABREVIERILOR.....	117
ANEXA 2 – LISTA FIGURILOR.....	118
ANEXA 3 – LISTA TABELELOR	120
ANEXA 4 – LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE.....	121

CONTENTS

INTRODUCTION.....	x
--------------------------	----------

ABSTRACT.....	xii
----------------------	------------

PART I – CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	xx
--	-----------

CHAPTER 1. CHARACTERIZATION OF DORNELOR DEPRESSION, THE FACTORS THAT INFLUENCE PARASITISM IN THE AQUATIC ENVIRONMENT AND DESCRIPTION OF THE HYDROGRAPHIC BASIN STUDIED 1

1.1. Relief, hydrographic network, impact of animal husbandry on the environment.....	1
1.2. Water sampling stations.....	3
1.2.1. Bancu Creek	4
1.2.2. Secu Creek.....	5
1.2.3. Arinul Creek	5
1.2.4. Călimănel Creek	6

CHAPTER 2. STUDY ON CERTAIN PARASITIC AGENTS THAT CAN CONTAMINATE WATER SOURCES..... 7

2.1. Surface and underground water sources	7
2.2. Studies on <i>Cryptosporidium spp.</i> and <i>Giardia spp.</i>	8
2.2.1. Isolation and identification of <i>Cryptosporidium spp.</i> oocysts and <i>Giardia spp.</i> cysts.	13
2.3. Studies on <i>Entamoeba spp.</i>	13
2.4. Studies on <i>Fasciola spp.</i> and <i>Dictyocaulus spp.</i>	14
2.4.1. Studies on <i>Fasciola spp.</i>	14
2.4.2. Studies on <i>Dictyocaulus spp.</i>	16
2.4.3. Study on the family Simuliidae	17

CHAPTER 3. WATER: STRUCTURE, PROPERTIES	19
CHAPTER 4. BENTHIC MACROINVERTEBRATES.....	22
PART II – PERSONAL CONTRIBUTIONS	24
CHAPTER 5. PLACE OF EXPERIMENTS, AIM AND OBJECTIVES OF THE RESEARCH	25
CHAPTER 6. METHODS OF QUANTITATIVE AND QUALITATIVE DETECTION OF <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> OOCYSTS AND <i>GIARDIA</i> CYSTS IN SURFACE WATERS	28
6.1. Isolation and identification of <i>Cryptosporidium spp.</i> oocysts and <i>Giardia spp.</i> cysts	28
6.1.1. Water sampling.....	28
6.1.2. Water sample filtering	29
6.1.3. Filter washing, centrifugation of initial concentrate, obtaining the final concentrate	31
6.1.4. Immunomagnetic separation.....	32
6.1.5. Immunofluorescence technique	33
6.1.6. Examining fixed stained specimens under the microscope	34
CHAPTER 7. CHARACTERIZATION THROUGH PHYSICAL-CHEMICAL INDICATORS OF THE EMISSAIRES RESEARCHED IN THE DORNELOR BASIN	43
7.1. Physical indicators of water	43
7.2. Determining certain chemical indicators of water	45
7.2.1. Determining the pH value	45
7.2.2. Determining organic matter	47
7.2.3. Determining conductivity	50
7.2.4. Determining dissolved oxygen	52
7.2.5. Determining alkalinity expressed as carbonated hydrogen (bicarbonate)	54
7.2.6. Determining water hardness	56

7.3. Determining nitrates and nitrites.....	59
7.3.1. Determining nitrates	59
7.3.2. Determining nitrites.....	60
7.4. Determining anions and cations using ion chromatography	61
7.4.1. Chromatographic determination of anions dissolved in water	61
7.4.2. Chromatographic determination of cations dissolved in water	64
 CHAPTER 8. MONITORING CERTAIN MICROBIOLOGICAL PARAMETERS OF WATER AND ALGAE BIOMASS	69
8.1. Monitoring certain microbiological parameters of water	69
8.1.1. Determining the total number of germs (TNG)	69
8.1.2. Determining the total number of germs (TNG) at 37° C	71
8.2. Determining coliform bacteria and isolating the <i>Escherichia coli</i> species	72
8.3. Determining intestinal Enterococci (Streptococci)	76
8.4. Determining the <i>Pseudomonas aeruginosa</i> species.....	78
8.5. Determining sulfite-reducing anaerobic bacteria spores (<i>Clostridium</i>)	80
8.6. Monitoring the algae biomass evolution in relation to the pollution sources	82
8.6.1. Determining green algae.....	83
8.6.2. Determining diatoms	84
8.6.3. Determining cryptophyte algae	85
8.6.4. Determining blue-green algae	86
8.6.5. Determining the total algae concentration	87
8.6.6. Determining the yellow substance.....	88
 CHAPTER 9. BENTHIC MACROINVERTEBRATES	90
 CHAPTER 10. FINAL CONCLUSIONS	104
 REFERENCES.....	109

ANNEX 1 – LIST OF ABBREVIATIONS.....	117
ANNEX 2 – LIST OF FIGURES.....	118
ANNEX 3 – LIST OF TABLES.....	120
ANNEX 4 – LIST OF PUBLISHED PAPERS.....	121

MULȚUMIRI

Doresc să adresez sincere mulțumiri **D-lui prof. Dr. Dr. H.C. Liviu-Dan MIRON**, conducătorul științific, pentru sprijinul și îndrumarea oferită pe întreaga durată a studiilor doctorale și în realizarea acestei teze de doctorat.

Sincere mulțumiri doresc să adresez și distinșilor membri ai comisiei de doctorat pentru efortul depus în analizarea și evaluarea tezei de doctorat.

Adresez mulțumiri și sunt recunoscătoare pentru îndrumarea și sfaturile primite în decursul celor patru ani, din partea membrilor comisiei de îndrumare: D-lui prof. dr. Mihai MAREȘ, D-nei Prof. dr. Olimpia IACOB și D-lui șef lucr. dr. Dumitru ACATRINEI.

Întregului colectiv al disciplinei de Boli Parazitare, din cadrul Facultății de Medicină Veterinară a USV Iași și colegilor doctoranzi le mulțumesc pentru suport și participarea la unele etape desfășurate în cadrul tezei.

De asemenea doresc să îi mulțumesc D-lui Conf. dr. Kalman IMRE de la Facultatea de Medicina veterinară din Timisoara pentru colaborarea colegială acordată, prin care am perfecționat unele tehnici de laborator care mi-au folosit la elaborarea tezei de doctorat.

Mulțumiri respectuoase se îndreaptă și către grupul de firme unde îmi desfășor activitatea, în mod special conducerii, dar și colegelor din cadrul laboratoarelor, cărora le datorez susținerea materială și tehnică necesară desfășurării în condiții optime a activității de cercetare din cadrul lucrării.

Reușita acestei lucrări o datorez și sprijinului necondiționat acordat de domnul vicepreședinte Stelian CHIFORESCU care, deși plecat prea devreme dintre noi, rămâne persoana care a fost totdeauna deschisă inovării și cercetării, intuind întodeauna aplicabilitatea practică a ideilor noi.

Nu în ultimul rând, doresc să mulțumesc familiei și prietenilor pentru suportul moral și susținerea continuă pe parcursul acestor ani de studii.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere thanks to **Prof. Dr. Dr. H.C. Liviu-Dan MIRON**, the scientific supervisor, for the support and guidance provided throughout the duration of the doctoral studies and in the completion of this doctoral thesis.

I would also like to express my sincere thanks to the distinguished members of the doctoral committee for the effort put into analyzing and evaluating the doctoral thesis.

I thank and am grateful for the guidance and advice received during the four years, from the members of the guidance committee: Prof. Dr. Mihai MAREȘ, Prof. Dr. Olimpia IACOB and Mr. Assist. prof. Dr. Dumitru ACATRINEI.

To the entire team of the Parasitic Diseases discipline, within the Faculty of Veterinary Medicine of USV Iași, and to fellow doctoral students, thank you for your support and participation in some stages of the thesis.

I also want to thank Mr. Assist. prof. Dr. Kalman IMRE from the Faculty of Veterinary Medicine from Timisoara for the collegial collaboration granted, through which I perfected some laboratory techniques that were used in the elaboration of my doctoral thesis.

Respectful thanks are also directed to the commercial company where I am working, especially to the management, but also to my colleagues from the laboratories, to whom I owe the material and technical support necessary to carry out the research activity within the work in optimal conditions.

I also owe the success of this work to the unconditional support given by the vice-president Stelian CHIFORESCU who, although he left us too soon, remains the person who was always open to innovation and research, always sensing the practical applicability of new ideas.

Last but not least, I want to thank my family and friends for their moral, financial and continuous support during these years of study.

INTRODUCERE

În Depresiunea Dornelor din Carpații Orientali, situată la 800-900 m altitudine, străbătută de râurile Bistrița, Dorna și Neagra, există o biodiversitate floristică și faunistică complexă, cu arii și rezervații naturale protejate, situsuri de importanță comunitară, care în ansamblu oferă unicitate zonei. Aici se găsesc cele mai importante surse de apă minerală naturală din țară, un motiv în plus pentru o dezvoltare armonioasă a regiunii.

Agricultura, orientată în mare parte spre sectorul zootehnic, se îndreaptă din ce în ce mai mult spre exploatarea în sistem ecologic, lucru care impune o exploatare în sistem liber a animalelor pe pășuni. Exisă pajiști montane cu fânețe poliflore și pășuni naturale valorificate prin creșterea animalelor. Acest sistem de creștere prietenos cu mediul are însă multe restricții în ceea ce privește tratamentele profilactice la animale (antiparazitare, antimicrobiene, etc.). Agroturismul montan, cu o dezvoltare exponențială, are ca efect secundar creșterea gradului de poluare a mediului, impunând o gestiune corectă a apelor reziduale și a deșeurilor rezultate din activitățile curente.

Ținând cont de activitățile economice desfășurate în zonă, de exploatarea în sistem ecologic a efectivelor de animale, de creșterea numărului de animale sălbatice prin restricționarea vânătorii, considerăm că menținerea unui mediu curat, precum și a unui nivel de puritate al apelor, impune o monitorizare atentă a factorilor care au potențial de poluare a apei.

Având în vedere importanța conservării mediului acvatic și a resurselor naturale din zona amintită, ne-am propus să realizăm o monitorizare integrată a unor emisari din bazinul Dornelor asupra încărcăturii parazitare corelată cu parametrii fizico-chimici ai apei precum și stabilirea efectelor poluării organice pe unii afluenți ai râurilor Bistrița și Dorna, în amonte și în aval de localități urbane în zece stații de lucru, printr-un control calitativ al macronevertebratelor benthice, care constituie bioindicatori de calitate a apei și adaugă la sistemul de monitorizare informații importante privind calitatea apei.

Dacă din punct de vedere fizico-chimic și microbiologic există unele programe de monitorizare, o evaluare a încărcării parazitare lipsește, din acest motiv tema tezei de doctorat poate adăuga elemente de real interes pentru zonă, întrucât monitorizarea concomitentă a mai multor parametri de calitate a apei oferă un tablou complex iar rezultatele obținute vor putea furniza o imagine și asupra calității și asupra biodiversității macronevertebratelor benthice, dar și a eventualelor riscuri posibile, caz în care găsirea unor soluții reale de control saprobiologic al apelor din bazinul Dornelor s-ar impune pentru menținerea biocenozelor acvatice la o calitate înaltă.

INTRODUCTION

In the Dornelor Depression in the Eastern Carpathians, located at 800-900 m altitude, crossed by the Bistrița, Dorna and Neagra rivers, there is a complex floristic and faunal biodiversity, with protected natural areas and reserves, sites of community importance, which as a whole provide uniqueness to the area. Here are found the most important sources of natural mineral water in the country, an additional reason for the harmonious development of the region.

Agriculture, mostly oriented towards the zootechnical sector, is moving more and more towards exploitation in an ecological system, which requires a free system exploitation of animals on pastures. There are mountain meadows with polyfloral hay and natural pastures exploited by animal husbandry. This environmentally friendly growing system, however, has many restrictions in terms of prophylactic animal treatments (antiparasitic, antimicrobial, etc.). Mountain agrotourism, with an exponential development, has as a secondary effect the increase in the degree of environmental pollution, requiring a correct management of waste water and waste resulting from current activities.

Taking into account the economic activities carried out in the area, the exploitation of livestock in an ecological system, the increase in the number of wild animals by restricting hunting, we believe that maintaining a clean environment, as well as a level of water purity, requires careful monitoring of factors that have potential for water pollution.

Considering the importance of preserving the aquatic environment and natural resources in the mentioned area, we proposed to carry out an integrated monitoring of some discharges from the Dornelor basin on the parasitic load correlated with the physico-chemical parameters of the water as well as the establishment of the effects of organic pollution on some tributaries of the Bistrița and Dorna rivers, upstream and downstream of urban localities in ten work stations, through a qualitative control of benthic macroinvertebrates, which constitute bioindicators of water quality and add important information regarding water quality to the monitoring system.

If from a physico-chemical and microbiological point of view there are some monitoring programs, an evaluation of the parasitic load is missing, for this reason the topic of the doctoral thesis can add elements of real interest for the area, since the simultaneous monitoring of several water quality parameters offers a complex picture and the obtained results will be able to provide an image on the quality and on the benthic macroinvertebrate biodiversity, but also on the possible risks, in which case finding real solutions for saprobiological control of the waters of the Dornelor basin would be necessary to maintain the aquatic biocenoses to a high quality.

REZUMAT

În teza de doctorat intitulată “Cercetări asupra încărcăturii parazitare a unor emisari din bazinul Dornelor și corelațiile saprobiologice”, ne-am propus monitorizarea calității apei prin concentrarea unor elemente parazitare ale unor protozoare care pot genera boli zoonotice, ca efect al deversării de materii organice provenite în urma creșterii animalelor în microferme sau în gospodării ale populației din zona montană a bazinului Dornelor. Acest studiu a fost corelat concomitent cu analiza calității apei prin măsurători multianuale fizico-chimice, microbiologice sau ale conținutului algal, precum și cu un studiu privind prezența macronevertebratelor bentice existente în aceleași 10 stații de lucru de pe cursurile de apă studiate, în amonte și aval de unele microferme sau aglomerări de comunități umane care ar putea influența calitatea apei prin diferite deversări. Pârâurile de unde au fost prelevate probe în anii 2017-2018, au fost Arinu, Bancu, Călimănel și Secu.

În prima parte a tezei, “Stadiul actual al cunoașterii” este caracterizată depresiunea Dornelor, cu factorii care influențează parazitismul în mediul acvatic și este descris bazinul hidrografic pentru a surprinde coralațiile legate de creșterea animalelor în zona montană și impactul asupra mediului acvatic. Sunt descrise în acest subcapitol stațiile de lucru, respectiv pârâurile din care au fost prelevate probe pentru tot spectrul de analize în perioada de studiu. **Un al doilea capitol** din prima parte, este dedicat unui studiu bibliografic privind unii agenți parazitari care pot contamina sursele de apă, metodele de izolare și identificare a acestora. **În capitolul al treilea**, este caracterizată apa, din punct de vedere structural și al proprietăților fizico-chimice ale acesteia. Urmează **capitolul al patrulea**, în care se realizează un studiu asupra macronevertebratelor bentice, întrucât o caracterizare completă a rețelelor trofice din apele curgătoare trebuie să fie realizată și prin prisma cunoașterii acestor macronevertebrate deoarece ele reprezintă o verigă importantă a unor rețele trofice -pornind de la materia organică existentă într-un curs de apă- care vor diferi de la izvor către confluența râului.

Partea a doua a tezei cuprinde cercetările proprii și este extinsă pe cinci capitole. În **capitolul cinci**, sunt descrise locul desfășurării experimentelor, scopul și obiectivele cercetărilor. Dacă despre scopul de abordare holistă a caracterizării unui curs de apă am făcut referire anterior, obiectivele acestui studiu sunt verigile prin care se ajunge la acest rezultat și anume:

- o analiză a încărcăturii parazitare cu specii de protozoare zoonotice
- o analiză a indicatorilor fizico-chimici ai apei
- o analiză a parametrilor microbiologici și urmărirea biomasei algale
- o analiză a macrozoobentosului care este expresia sintetică a calității generale a apelor curgătoare.

Fiecare dintre aceste obiective constituie un capitol separat al părții de cercetări proprii iar rezultatele cercetărilor au publicate în 3 lucrări științifice în reviste de specialitate. Teza este încheiată cu un capitol de concluzii finale, bibliografie și anexe.

Capitolul șase este dedicat studiului privind metodele de depistare cantitativă și calitativă a oochisturilor de *Cryptosporidium spp.* și a chisturilor de *Giardia spp.* din apele de suprafață, precum și identificarea și caracterizarea moleculară a acestora. Dintre cele 10 stații de prelevare, încărcătura cea mai mare cu chisturi de *Giardia spp.* s-a înregistrat la Călimănel jos (Panaci), cu un total de 33 chisturi identificate pe tot intervalul 2017 - 2018, cu o medie de 2.8 chisturi / lună, urmată de stația Secu (jos) cu un total de 23 chisturi vizualizate în 2017 - 2018 și ci o medie de 1.9 chisturi / lună. La extrema cealaltă, cea mai redusă încărcătură s-a înregistrat la Călimănel sus (pârâu), unde totalul chisturilor vizualizate a fost de 3, cu o medie de 0.25 chisturi / lună, urmată de stația Bancu sus cu un total de 5 chisturi identificate și o medie de 0.4 chisturi / lună. Pentru *Cryptosporidium spp.* în intervalul mai - octombrie 2018, dintre cele 10 stații de prelevare, încărcătura cea mai mare s-a înregistrat la Bancu sus, cu un total de 4 oochisturi identificate pe tot intervalul 2017 - 2018, cu o medie de 0.33 oochisturi / lună, urmată de stațiile Secu cu un total de cate 3 oochisturi vizualizate în 2017 - 2018 și cu o medie de 0.25 oochisturi / lună. La polul opus se află stația Călimănel sus(pârâu) unde nu s-a identificat nici un oochist.

Rezultatele obținute au scos la iveală faptul că apele emisarilor luați în studiu au o încărcătură parazităredusă și că în amonte așezărilor umane apa are un grad de puritate ridicat.

Încărcătura mai mare cu *Giardia spp.* și *Cryptosporidium spp.* a corespuns unei activități zootehnice existente în zonă, precum și fondului cinetic. Încărcătura parazităredusă în amonte față de aval dovedește influența comunităților umane, iar identificarea exclusivă prin PCR a speciei zoonotice *Cryptosporidium parvum* poate fi un indicator al efectului pe care îl exercită fermele de bovine din zona rurală, precum și al fondului cinegetic, asupra pâraielor din zona de munte.

Studiul realizat pentru caracterizarea prin parametrii fizico-chimici a emisarilor din bazinul Dornelor este realizat în **capitolul șapte**, fiecare într-un subcapitol separat: temperatură, pH, substanțe organice, conductivitate, oxigen dizolvat, alcalinitate, nitrați, nitriți, conținutul de cationi, concluzionând următoarele aspecte:

-temperatura apei a variat în funcție de sezon și locul prelevării

- valorile pH-ul sunt în ușor alcaline, peste 7.00, cu o singură excepție (Călimănel jos, septembrie 2017) pe care o considerăm o posibilă contaminare accidentală. Variațiile acestui parametru sunt corelate cu substratul geologic, dar și cu activitățile economice diferite. Astfel, valorile cele mai mici ale pH-ului sunt înregistrate la stațiile de pe pârâul Călimănel, unde activitățile antropice sunt mai intense.

- substanțele organice sunt un indicator strâns legat de încărcătura microbiologică și este direct influențat de ploile torențiale de vară, care spală materiile organice de pe versanți. Deasemenea și o activitate economică mai intensă din aval determină o creștere a valorilor pentru acest

parametru. Valorile cele mai mari au fost obținute la probe prelevate din ambele stații de pe pârâul Arinu după o furtună puternică.

- oxigenul dizolvat este direct influențat de viteza de curgere a apei și de activitatea microorganismelor din apă, dar toate sursele urmărite, fiind ape repezi de munte, au valori crescute la acest parametru, cu observația că daterminarea a fost făcută în maxim o oră de la prelevare. Valorile cele mai mari au fost obținute la probe prelevate din stația Călimănel jos, unde viteza de curgere a apei este foarte mare, chiar dacă influența factorului uman este una însemnată.

- conductivitatea, bicarbonatul și duritatea sunt parametri strâns legați de structura geo - morfologică specifică locului de izvorâre a fiecărui pârâu, fiind indicatori ai mineralizării totale a apei, cu valorile cele mai mici la pârâul Călimănel, care are mineralizarea cea mai scăzută și cele mai mari la pârâul Secu, mineralizare, susținută și de conținutul cel mai ridicat de calciu.

- conținutul de anioni (floruri, bromuri, cloruri, sulfati, fosfati, nitrati, nitriti) este foarte scăzut, valorile obținute încadrându-se în normele impuse pentru apele minerale naturale.

Pentru nitriti, valoarea maxim admisă este 0,1 mg / L, iar valoarea maximă citită pe ioncromatograf a fost 0.08 mg / L, iulie 2017 în proba prelevată de la stația Călimănel jos (în Panaci). Pentru nitrati, valoarea maxim admisă este 50 mg / L, iar valoarea maximă citită pe ioncromatograf a fost 2.98 mg / L, mai 2017 în proba prelevată de la stația Secu sus.

- conținutul de cationi (amoniu, litiu, sodiu, potasiu, magneziu, calciu) este în limitele normale.

Capitolul opt, intitulat: Monitorizarea unor parametri microbiologici ai apei și a biomasei algale are ca subcapitole determinarea NTG, coliformilor, enterococilor, *Pseudomonas*, *Clostridium*, biomasa algelor verzi și albastre, diatomee, criptofite și cianoficee. Analizând rezultatele pentru toți parametrii studiați, concluziile specifice sunt următoarele:

- toți indicatorii microbiologici au prezentat variații semnificative între stațiile de prelevare de pe cursul aceluiași pârâu, astfel în amonte valorile sunt mult mai mici decât în aval. Pentru toți parametrii, probele cele mai puțin contaminate au fost cele din amonte ale pârâului Călimănel.

- Indicatorul *Pseudomonas aeruginosa*, apare la două dintre stații, Călimănel sus (pârâu) și Secu sus, iar sporii de bacterii anaerobe sulfito-reducătoare (*Clostridium*) la stația Călimănel sus (pârâu) au fost absenți în toate probele prelevate în timpul studiului.

Probele cu contaminarea cea mai mare au fost cele prelevate din stația Arinu jos și cele din Călimănel jos, fiind evidentă influența antropică prin activitățile economice desfășurate.

- toate tipurile de alge analizate au avut valori apropiate între ele, valori mai mari la toți parametrii fiind înregistrate la probele prelevate de la stația Arinu jos.

-valorile maxime au fost înregistrate la probele prelevate de la stațiile de pe pârâul Arinu în august 2018, după o ploaie torențială, cand au fost antrenate cantități mari de substanțe organice.

În **capitolul nouă** este studiată fauna macronevertebratelor benthice.

Calitatea tributurilor bazinului Dornelor este reflectată și de prezența unor macronevertebrate aparținând unor grupe taxonomice variate. Astfel, am încercat să facem această evaluare biologică calitativă, fără a recurge la stabilirea IBGN (a indicelui biologic

general normalizat), metodă ce presupune o analiză mult mai complexă a taxonilor.

Au fost respectate condițiile optime de prelevare în perioadele de vară și toamnă, datorită poluării maxime, temperaturilor ridicate și a perturbațiilor relativ mici din apă. În alegerea perioadelor de prelevare, se ține cont de faptul că anumiți taxoni pot fi în faza aeriană, de aceea am ales minimum 2 perioade de prelevare, în două stații comparabile ca dimensiuni, viteză de curgere a apei, natura substratului. Prelevarea probelor s-a realizat folosind prelevatorul tip Surber pe cursurile mai iuți de apă sau ciorpacul limnologic pentru cursurile mai lente de apă.

Analizând taxonii identificați în perioadele de colectare a macronevertebratelor bentonice constatăm o abundență crescută în amonte față de aval la toate stațiile, cu o detașare clară a taxonilor de pe pârâul Arinu, cu un număr de taxoni remarcabil, dintre care majoritatea fiind trichoptere (64) și plecoptere (40), aparținând la 8 grupe faunistice. Chiar și în stația Arinu-jos (aval), cei 74 de taxoni identificați, majoritatea fiind plecoptere, ne arată relevanța ecologică a acestor biotopuri. Din punctul de vedere al abundenței taxonilor, urmează Bancu –sus (amonte) cu 45 taxoni și respectiv 96 taxoni în stația din aval, dominante fiind în ordine, trichopterele (65), urmate de plecoptere (22) și efemeroptere (7). Pe pârâul Călimănel, semnalăm o abundență a taxonilor din grupul Baetidelor (35amonte-23 aval). Pârâul Călimănel în zona de amonte este bogat în taxoni, cu reprezentanți din efemeroptere, (*Heptageniidae* 2, *Baetidae* 35), plecoptere (*Perlidae* 1, *Perlodidae* 10, *Capniidae* 7), trichoptere (*Rhyacophilidae* 1, trichoptere cu căsuță 3), diptere (*Simuliidae* 1), amfipode (*Gammarus* 3). În aval lipsesc atât taxoni cât și familii din zoobentosul colectat, observându-se o tendință clară de diminuare a numărului de specii sensibile la presiunea antropică (se reduc plecopterele, dar și trichopterele, nu mai sunt amfipode -*Gammarus*). Grupul cel mai numeros de taxoni ai pârâului Secu a fost reprezentat de *Gamaridae*.

Capitolul zece sintetizează în 4 pagini concluziile parțiale elaborate la fiecare studiu din cercetările proprii.

Teza este finalizată cu bibliografie, și trei anexe: lista figurilor, lista tabelelor, lista lucrărilor științifice publicate.

ABSTRACT

In the doctoral thesis entitled "Research on the parasite load of certain tributaries in the Dornelor basin and saprobiological correlations", we aimed to monitor water quality by concentrating parasitic elements of certain protozoa that can generate zoonotic diseases, as an effect of the discharge of organic matter originating from the animals raised in the micro farms or households in the mountain area of the Dornelor basin. This study was simultaneously correlated with the water quality analysis through multi-year physical-chemical, microbiological or algal content measurements, as well as with a study on the presence of benthic macroinvertebrates in the same 10 work stations on the studied watercourses, upstream and downstream from some micro farms or agglomerations of human communities that could influence water quality through different discharges. The streams from where samples were collected between 2017 and 2018 were Arinu, Bancu, Călimănel and Secu.

In the first part of the thesis, "Current state of knowledge", the Dornelor depression is characterized, taking into consideration the factors that influence parasitism in the water environment, and the hydrographic basin is described so as to highlight the correlations between animal breeding in the mountain area and its impact on the water environment. The workstations and the streams from which samples were taken for the entire spectrum of analyses during the study period are described in this subchapter.

The second chapter in the first part is dedicated to a bibliographic study on some parasitic agents that can contaminate water sources, as well as methods of isolation and identification of the same. **In the third chapter** water is characterized from a structural point of view and concerning its physical-chemical properties. **In the fourth chapter** a study is carried out on benthic macroinvertebrates, since a complete characterization of the trophic networks in running waters must also be achieved based on the information on these macroinvertebrates, because they represent an important link of certain trophic networks - starting from the organic matter existing in a watercourse - which are different at the source and at the river confluence.

The second part of the thesis includes my own research and is divided into five chapters. In the **fifth chapter**, the location of the experiments as well as the purpose and objectives of the research are described. While we previously referred to the aim of a holistic approach to the characterization of a water course, the objectives of this study are the phases through which this result is reached, namely:

- an analysis of the parasite load with species of zoonotic protozoa
 - an analysis of the water physical-chemical indicators
 - an analysis of microbiological parameters and the tracking of algal biomass
 - an analysis of the macrozoobenthos, which is the synthetic expression of the general quality of running waters.
-

Each of these objectives constitutes a separate chapter of the own research part of the thesis, and the research results have been published in 3 scientific works in specialized journals. The thesis ends with a chapter on final conclusions, bibliography and appendices.

Chapter six is dedicated to the study of methods for the quantitative and qualitative detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in surface waters, as well as their identification and molecular characterization. Among the 10 sampling stations, for *Giardia* cysts the highest load was recorded in Călimănel jos (Panaci), with a total of 33 cysts identified throughout 2017 - 2018, with an average of 2.8 cysts / month, followed by the Secu station (bottom) with a total of 23 cysts visualized in 2017-2018 and an average of 1.9 cysts / month. At the opposite end, the lowest load was recorded in Călimănel sus (stream), where the total number of cysts visualized was 3, with an average of 0.25 cysts / month, followed by the Bancu sus station with a total of 5 identified cysts and an average of 0.4 cysts / month. For *Cryptosporidium* oocysts, among the 10 sampling stations, the highest load was recorded in Bancu sus, with a total of 4 oocysts identified throughout 2017 - 2018, with an average of 0.33 oocysts / month, followed by the Secu stations with a total of 3 oocysts visualized in 2017-2018 and an average of 0.25 cysts / month. At the opposite end, is Călimănel sus (pârâru), where was not identified any oocyst.

The outcomes revealed the fact that the emissaries under study have a low parasite load and that upstream of the human settlements the water has a high degree of purity.

The higher load of *Giardia* spp and *Cryptosporidium* spp. corresponded to an existing animal husbandry activity in the area. The lower parasite load upstream compared to downstream proves the influence of human communities, and the exclusive PCR identification of the zoonotic species *Cryptosporidium parvum* may be an indicator of the effect that rural cattle farms as well as hunting stock have on mountain streams.

The study carried out for the characterization based on the physical-chemical parameters of the emissaries in the Dornelor basin is described in **chapter seven**, each in a separate sub-chapter: temperature, pH, organic substances, conductivity, dissolved oxygen, alkalinity, nitrates, nitrites, the content of cations, concluding the following aspects:

- water temperature varied depending on the season and the place of sampling
- the pH values are slightly alkaline, above 7.00, with only one exception (Călimănel jos, September 2017) which we consider a potential accidental contamination. The variations of this parameter are correlated with the geological substrate, but also with different economic activities. Thus, the lowest pH values are recorded by the stations on the Călimănel stream, where human activities are more intense.

- organic substances are an indicator closely related to the microbiological load and it is directly influenced by heavy summer rains, which wash organic matter off the slopes. moreover, a more intense downstream economic activity causes an increase in the values for this parameter. The highest values were obtained in samples taken from both stations on the Arinu stream after a heavy storm.

- dissolved oxygen is directly influenced by the speed of water flow and the activity of microorganisms in the water; nevertheless, all the monitored sources, being quick mountain water streams, have increased values for this parameter, and the determination was made within a maximum of one hour from sampling. The highest values were obtained from samples taken from the Călimănel jos station, where the water flow speed is very high, even if the influence of the human factor is significant.

- conductivity, bicarbonate and hardness are parameters closely related to the geomorphological structure specific to the source of each stream, being indicators of the total mineralization of the water, with the lowest values in the Călimănel stream - which has the lowest mineralization rate - and the highest values in the Secu stream, taking into account that mineralization is also supported by the highest calcium content.

- the content of anions (fluorides, bromides, chlorides, sulphates, phosphates, nitrates, nitrites) is very low, the values obtained falling within the norms imposed for natural mineral waters.

For nitrites, the maximum allowed value is 0.1 mg / L, and the maximum value read on the ion chromatograph was 0.08 mg / L, in July 2017 in the sample taken from the Călimănel jos station (in Panaci). For nitrates, the maximum allowed value is 50 mg / L, and the maximum value read on the ion chromatograph was 2.98 mg / L, in May 2017 in the sample taken from the Secu sus station.

- the content of cations (ammonium, lithium, sodium, potassium, magnesium, calcium) is within normal limits.

Chapter eight, entitled “Monitoring of certain microbiological parameters of water and algal biomass” is divided into subchapters regarding the determination of NTG, coliforms, enterococci, *Pseudomonas*, *Clostridium*, the algal biomass for green and blue algae, diatoms, cryptophytes and cyanophytes. Following an analysis of the results for all the studied parameters, the specific conclusions are the following:

- all microbiological indicators showed significant variations between the sampling stations on the course of the same stream, thus upstream values are much lower than downstream values. For all parameters, the least contaminated samples were those upstream of the Călimănel stream. - The *Pseudomonas aeruginosa* indicator appears in two of the stations, Călimănel sus (stream) and Secu sus, and spores of anaerobic sulphite-reducing bacteria (*Clostridium*) were absent in all the samples taken during the study in the Călimănel sus (stream) station.

The samples with the highest contamination were those taken from the station Arinu jos and those from Călimănel jos, the anthropic influence being obvious due to the economic activities carried out.

- every type of algae analysed had similar values, higher values for all parameters being recorded in the samples taken from the lower Arini station.

- the maximum values were recorded in the samples taken from the stations on the Arinu stream in August 2018, after a heavy rain, when large amounts of organic substances were washed off.

In the **ninth chapter** includes a study on the benthic macroinvertebrate fauna.

The quality of the tributaries of the Dornelor basin is also rendered by the presence of some macroinvertebrates belonging to various taxonomic groups. Thus, we tried to make this qualitative biological assessment, without resorting to establishing the NGBI (normalized global biological index), a method that requires a much more complex analysis of the taxa.

The optimal sampling conditions were observed in the summer and autumn periods, due to maximum pollution, high temperatures and relatively small disturbances in the water. In choosing the sampling periods, it is taken into account that certain taxa may be in the aerial phase, that is why we chose at least 2 sampling periods, in two stations comparable in terms of size, water flow speed, nature of the substrate. Sampling was done using the Surber type sampler on the faster watercourses or the limnological net for the slower watercourses.

Analysing the taxa identified during the periods when benthic macroinvertebrates were collected, we found increased abundance upstream compared to downstream, in all stations, with a clear detachment of taxa from the Arinu stream, with a remarkable number of taxa, most of which are Trichoptera (64) and Plecoptera (40), belonging to 8 faunal groups. Even in the Arinu-jos station (downstream), the 74 identified taxa, most of them Plecoptera, show us the ecological relevance of these biotopes. The following stream most abundant in taxa is Bancus (upstream) with 45 taxa and respectively 96 taxa in the downstream station, with a predominance of Trichoptera (65), followed by Plecoptera (22) and Ephemeroptera (7). On the Călimănel stream, we report an abundance of taxa from the *Baetidae* group (35 upstream-23 downstream). The Călimănel stream in the upstream area is rich in taxa, with representatives of Ephemeroptera, (*Heptageniidae* 2, *Baetidae* 35), Plecoptera (*Perlidae* 1, *Perlodidae* 10, *Capniidae* 7), Trichoptera (*Rhyacophilidae* 1, Trichoptera with small house 3), Diptera (*Simuliidae* 1), Amphipods (*Gammarus* 3). Downstream, both taxa and families are missing from the collected zoobenthos, with a clear tendency to decrease the number of species sensitive to anthropogenic pressure (Plecopters are reduced, but also Trichoptera, there are no more amphipods - *Gammarus*). The most numerous group of taxa of the Secu stream was represented by *Gamaridae*.

Chapter ten summarizes in 4 pages the partial conclusions drawn for each study in my own research.

The thesis is completed with a bibliography and three appendices: list of figures, list of tables, list of published scientific works.

PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

PART I – CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

CAPITOLUL 1. CARACTERIZAREA DEPRESIUNII DORNELOR, A FACTORILOR CARE INFLUENȚEAZĂ PARAZITISMUL ÎN MEDIUL ACVATIC SI DESCRIEREA BAZINULUI HIDROGRAFIC STUDIAT

CHAPTER 1. THE CHARACTERIZATION OF DORNELOR DEPRESSION, THE FACTORS THAT INFLUENCE THE PARASITISM IN THE AQUATIC ENVIRONMENT AND THE DESCRIPTION OF THE HYDROGRAPHIC BASIN STUDIED

1.1. Relieful, rețeaua hidrografică, impactul creșterii animalelor asupra mediului

Depresiunea Dornelor este situată în nord - estul României, în partea de sud - vest a județului Suceava cuprinzând municipiul Vatra Dornei și nouă comune limitrofe: Cârlibaba, Ciocănești, Iacobeni, Dorna Arini, Panaci, Șaru Dornei, Dorna Candrenilor, Coșna și Poiana Stampei, fiecare cu satele aferente, aproximativ 49 sate. Zona Dornelor este o depresiune intramontană situată la o altitudine de 800 - 900 m și cuprinde două compartimente: Depresiunea Șar și Depresiunea Poiana, legate prin ulucul depresionar Dorna Candrenilor - Vatra Dornei.

Depresiunea, de origine tectonică și de baraj vulcanic, este încadrată în grupa Carpaților Orientali, închisă la nord de Obcina Suhardului, la est de Munții Bistriței, la vest de Munții Bârgăului și la sud de Munții Călimani. Zona Dornelor se află în etajul pădurilor de molid și a celor de amestec, aproximativ 60 % din teritoriul depresiunii fiind acoperit cu păduri. Pajiștile montane sunt alcătuite din fânețe și pășuni naturale, care ocupă suprafețe întinse și care sunt valorificate prin zootehnie, practic și unica ramură a agriculturii cu potențial de dezvoltare în zonă. Astfel, în zonă s-au dezvoltat micro-ferme zootehnice de bovine, pentru lapte și carne, de ovine, de caprine, la care se adaugă micile gospodării, împreună reprezentând principalii factori de poluare parazitară pentru bazinul hidrografic din zonă. Gospodăriile individuale și micro - fermele sunt bine delimitate ca și proprietăți, în medie între 2 și 10 hectare de pășuni, între 1 și 8 hectare de fânețe și cu suprafețe mult mai mici, în medie între 0.04 - 0.5 hectare suprafață arabilă. Pășunile sau imașurile sunt divizate în parcele mai mici, pe care se practică un pășunat rațional, între 1 iunie și 15 septembrie, utilizând inclusiv luminișurile din pădurile aparținând gospodăriilor respective.

Utilizarea pășunilor și fânețelor sunt specifice zonei montane, răspândite în etajul molidului, pe versanții având diferite expoziții, pe soluri brun - roșcate de pădure sau podzoluri

sărace, dar bine aprovizionate cu apă. Animalele pășunează pe terenuri bine delimitate, între 700 și 1500 m altitudine specia bovine, iar la altitudini peste 1500 m specia ovine. Pășunatul este organizat pe tabere de vară, văcării sau stâni, amplasate în locuri ferite de vânturi și cu o sursă de apă în apropiere.

Creșterea animalelor în zona se referă în principal la specia bovine, destinată producției de lapte și carne și doar în mică măsură la specia ovine și caprine. Adăposturile pentru animale sunt construite în general din lemn, având în mijlocul podelei un canal construit din beton prin care se scurge purinul către o groapă de colectare sau un bazin. Gunoii sunt colectați și eliminați manual, iar pentru absorbția purinului și gunoierului de grajd, în această zonă se folosește rumegușul de rășinoase. Animalele fiind crescute în sistem gospodăresc, cele adulte sunt legate în timpul stabulației în grajd, iar pentru viței sunt construite boxe individuale, având stabulație liberă. Stabulația în grajd durează în perioada iernii, din octombrie până în mai. Adăparea se face la pâraiele sau izvoarele din apropierea gospodăriei, puține gospodării având instalate adăpători automate în grajduri. Gunoii de grajd și purinul sunt folosiți ca fertilizanți pentru îngrășarea terenurilor agricole din zonă. Terenurile nu sunt totuși excesiv fertilizate, deoarece gospodării cunosc faptul că utilizarea în cantități mari a rumegușului ce intră în amestecul dejecțiilor, reduce activitatea microbiană din sol prin conținutul mare de acid tanic și substanțe rășinoase. Puține gospodării dețin platforme betonate pentru depozitarea gunoierului și bazine de colectare a purinului. Această gospodărire vicioasă a dejecțiilor animale poluează mediul atât cu nitrați și nitriți, dar mai ales cu elementele parazitare existente în materiile fecale.

Micro-fermele construite în ultima perioadă depășesc cea mai mare parte a neajunsurilor întâlnite în micile gospodării, respectând astfel legislația în vigoare, mai precis având în mod obligatoriu platformă betonată pentru gunoi și bazin betonat pentru colectarea purinului, fiind alimentate la rețeaua de apă și astfel adăparea realizându-se cu ajutorul adăpătorilor automate, pentru fiecare animal în parte. Prin respectarea acestor prevederi se limitează deversările masive de dejecții care poluează cursurile de apă. O parte dintre micro-fermele construite în ultimii ani au contract pentru furnizarea laptelui cu procesatorii din zonă, existând o structură bine organizată cu centre de colectare a laptelui ca materie primă.

Condițiile favorabile oferite de formele de relief, de întinsele păduri de conifere și de factorii climatici, satisfac cele mai diverse cerințe ecologice pentru o faună bogată și bine reprezentată în arealul depresiunii dornene. Spre înălțimi se întâlnește ursul brun (*Ursus arctos*), cerbul carpatin (*Cervus elaphus*), căpriorul (*Capreolus capreolus*), râsul (*Lynx lynx*), cocoșul de munte (*Tetrao urogallus*), cocoșul de mesteacăn (*Lyrurus tetrix*). Fondul cinegetic bogat din întregul bazin al Dornelor reprezintă de asemenea o sursă permanentă și necontrolată de poluare parazitară a surselor de apă.

Apele râurilor sunt bogate în pești, mai ales salmonide, cum ar fi : lostrița (*Hucho hucho*), păstrăvul de munte (*Salmo trutta fario*), păstrăvul curcubeu (*Salmo gairdneri*), mreana (*Barbus barbus*), zvârluc (*Cottus gobio*), scoabarul (*Chondostoma nasus*) etc.

1.2. Stații destinate prelevării probelor de apă

Activitatea de cercetare se va baza pe probele de apă prelevate din stațiile stabilite pe cursul a patru emisari din Depresiunea Dornelor, în fig. 1.1 fiind prezentată imaginea de ansamblu a întregii zone, inclusiv rețeaua hidrografică.



Fig.1.1 Harta depresiunii Dornelor
(sursa: Primăria Vatra Dornei, Proiect POR 2007-2013)

Fig.1. Map of the Dornel depression
(source: Vatra Dornei City Hall, 2007-2013- POR Project).

Prelevarea probelor de apă este prima etapă pentru orice tip de determinare (parazitară, fizico - chimică, microbiologică). O probă de apă trebuie să fie reprezentativă pentru obiectivul luat în studiu, iar în acest sens trebuie respectate cerințele standardelor în vigoare referitoare la prelevare (SR EN ISO 5667 - 1 / 2008 : Calitatea apei. Prelevare. Partea 1 : Ghid general pentru stabilirea programelor și a tehnicilor de prelevare; SR EN ISO 5667 - 3 / 2008 : Calitatea apei. Prelevare. Partea 3 : Ghid pentru conservarea și manipularea probelor de apă; SR EN ISO 5667 - 16 / 2006 : Calitatea apei. Prelevare. Partea 16 : Ghid general pentru testări biologice ale probelor; SR EN ISO 19458 / 2007 : Calitatea apei. Prelevarea pentru analiza microbiologică; SR EN ISO 5667 - 6 / 2009 : Calitatea apei. Prelevare. Partea 6 : Ghid pentru prelevări efectuate în râuri și alte cursuri de apă; SR EN ISO 5667 - 23 / 2011 : Calitatea apei. Prelevare. Partea 23 : Ghid pentru prelevarea pasivă în apele de suprafață; SR EN ISO 10870 / 2012 : Calitatea apei. Linii directoare pentru selecția metodelor și dispozitivelor de eșantionare pentru macro - nevertebratele bentice din apele dulci).

Având în vedere tema cercetării noastre, stațiile de prelevare a probelor de apă s-au stabilit ținând cont de caracteristicile proprii fiecărui pârâu, caracteristici morfologice și hidrologice, pantă, viteză de curgere și mai ales în funcție de dispoziția surselor de poluare pe traseul amonte-aval de comunitățile umane cursurilor de apă.

Pentru a urmări variațiile pe parcursul unui an, probele s-au prelevat conform unui program bine stabilit, cu prelevări lunare și/sau sezoniere, ținând cont de fiecare indicator urmărit, în corelație cu variațiile de temperatură, precipitații și dinamica rezultatelor.

Compoziția floristică și faunistică a unui curs de apă depinde de climatul general, de viteza de curgere a apei și de substratul pe care curge. Biocenoza cursurilor de apă cu substrat pietros, cum este cel din zona de munte, este variată și bogată, alcătuită din spongieri, viermi, larve ale unor insecte, precum și numeroși pești (Mohan, 1993).

A fost analizat întreg bazinul hidrografic al Dornelor, stabilind pentru această cercetare afluenți ai râului Bistrița, Dorna sau Neagra care străbat așezări umane, care au o calitate a apei bună sau foarte bună și de unde pot fi prelevate probe pentru analize. În continuare sunt descrise câteva cursuri de apă alese pentru acest studiu.

1.2.1. Pârâul Bancu

Afluent de dreapta al râului Teșna (afluent al râului Dorna), pârâul Bancu străbate satul Valea Bancului din comuna Coșna, având o lungime de 12 km, cu o suprafață a bazinului hidrografic de 101 km² și colectează mai multe pâraie din zonă, iar în tab. 1.1. este prezentată evoluția mediilor debitelor lunare multianuale.

Tab.1. 1. Debite lunare multianuale 1950-2015 pentru pârâul Bancu
(Sursă : Apele Române, A.B.A.Siret, punct de lucru VD, 2016)
Tab.1.1. Multiannual monthly flows 1950-2015 for Bancu stream
(Source: Romanian Waters, A.B.A. Siret, VD work point, 2016)

IAN	FEB	MAR	APR	MAI	IUN	IUL	AUG	SEP	OCT	NOV	DEC	MEDIE
0.452	0.498	1.135	3.066	2.776	1.884	1.593	1.156	0.927	0.800	0.834	0.659	1.311

S-au fixat două stații de prelevare, una în sat aproape de vărsarea în râul Teșna și una la ~10 km în amonte, într-o zonă în care influența factorului antropic este redusă. Valea Bancului este caracterizată printr-o faună bogată, reprezentată prin rumegătoare, în special cervide, monogastrice reprezentate mai ales de mistreți și carnivore mari, reprezentate în principal de urs și lup. Pe tot parcursul pârâului Bancu se găsesc mai multe păstrăvării, aflate pe ambele părți ale albiei. Valea Bancului abundă în pășuni și fânețe naturale, unde există aproximativ 150 gospodării individuale și un număr de 5 micro - ferme zootehnice, care pășunează liber ~ 6 luni pe an. Majoritatea pășunilor și fânețelor din această zonă sunt certificate ca și ecologice, singurul îngrășământ permis fiind gunoiul de grajd. Valea Bancului este recunoscută pentru calitatea apelor subterane, în zona existând mai multe foraje de ape minerale naturale, în exploatare, ale unei firme privatecu vechime pe piața apelor minerale naturale.

1.2.2. Pârâul Secu

Afluent de dreapta care se varsă în râul Dorna la intrarea în localitatea Dorna Candrenilor dinspre Vatra Dornei, are o lungime de 7 km și o suprafață a bazinului hidrografic de 21 km², iar în tab.1. 2. sunt redată debitele minime și maxime, între anii 2013 - 2015.

Tab.1. 2. Debite minime și maxime, 2013 - 2015, pentru pârâul Secu
(Sursă : Apele Române, A.B.A.Siret, punct de lucru VD, 2016)

Tab.1.2. Minimum and maximum flows, 2013 - 2015, for the Secu stream
(Source: Romanian Waters, A.B.A. Siret, VD work point, 2016)

Anul	2013	2014	2015
Qmin (mc/s)	0,055	0,030	0,054
Qmax (mc/s)	0,245	0,254	0,524

S-au fixat 2 stații de prelevare, una în sat, la vărsarea în râul Dorna și una la ~ 5 km în amonte, într-o zonă în care factorul antropic intervine în mică măsură. Valea Secului este caracterizată printr-o vegetație forestieră importantă, asociată cu o faună abundentă în cervide, mistreți și carnivore mari. Suprafețele de pășuni și fânețe sunt mici, există amenajamente pastorale (stâni) în perioada estivală, precum și circa 20 gospodării individuale și 1 micro - fermă zootehnică, concentrate aproape de vărsarea pârâului în râul Dorna. Valea Secului este un bazin hidrografic important, cu ape de calitate, deserving întreaga alimentare a comunei Dorna Candrenilor și parțial orașul Vatra Dornei, dar mare parte este în exploatare de către o altă firmă importantă de pe piața națională a apelor minerale. În zonă se desfășoară și activități de prospecțiuni prin mai multe foraje în vederea unei potențiale exploatare.

1.2.3. Pârâul Arinul

Afluent de dreapta al râului Bistrița, pârâul Arinul străbate satul Dorna Arini din comuna cu același nume, având o lungime de 7 km și un bazin hidrografic de 22 km², iar în tab.1.3. sunt redată debitele minime și maxime, între anii 2013 - 2015.

Tab. 1.3. Debite minime și maxime, 2013 - 2015, pentru pârâul Arinul
(Sursă : Apele Române , A.B.A.Siret, punct de lucru VD, 2016)

Tab. 1.3. Minimum and maximum flows, 2013 - 2015, for the Arinul stream
(Source: Romanian Waters, A.B.A. Siret, VD work point, 2016)

Anul	2013	2014	2015
Qmin (mc/s)	0,100	0,049	0,128
Qmax (mc/s)	0,502	0,507	0,356

S-au fixat două stații de prelevare, una în sat, la vărsarea în Bistrița și una ~ 7 km în amonte, într-o zonă în care apele au un grad redus de poluare umană, datorită lipsei factorului antropic. Valea Arinului este un mixt de vegetație forestieră, pășuni și fânețe, de-a lungul pârâului există aproximativ 100 gospodării individuale, 3 micro - ferme zootehnice, care pășunează liber ~ 6 luni pe an, precum și mai multe exploatații piscicole. În zonă există de asemenea mai multe izvoare de ape minerale naturale în prospecțiuni ale altei firme private.

1.2.4. Pârâul Călimănel

Afluent de dreapta al râului Neagra, formează un culoar depresionar între ramura muntoasă formată de Munții Bistriței și munții Călimani, culoar de-a lungul căruia este situată comună Panaci. Are o lungime de 12 km și o suprafață a bazinului hidrografic de 73 km². Pe traseul său, pârâul Călimănel colectează apa numeroaselor pâraie care împânzesc zona, iar în tab.1.4 sunt redate debitele minime și maxime, 2013 - 2015.

Tab. 1.4. Debite minime și maxime, 2013 - 2015, pârâu Călimănel
(Sursă : Apele Române A.B.A.Siret, punct de lucru VD, 2016)

Tab. 1.4. Minimum and maximum flows, 2013 - 2015, Călimănel stream
(Source: Romanian Waters A.B.A.Siret, VD work point, 2016)

Anul	2013	2014	2015
Qmin (mc/s)	0,163	1,84	0,154
Qmax (mc/s)	1,84	0,32	1,30

S-au fixat 4 stații de colectare, una în satul Coverca și 3 în amonte la ~ 3 / 5 / 7 km, din 3 pâraie de alimentare, în zone cu influență antropică diferită.

Valea Călimănelului este caracterizată printr-o influență antropică ridicată, cursul pârâului fiind urmat de drumul județean care face legătura între județele Suceava și Harghita. Aici există o concentrare mare de gospodării individuale și micro - ferme zootehnice, toate certificate ca și ecologice. Zona este de asemenea recunoscută pentru puritatea apei, în zonă existând mai multe foraje și captări de ape minerale naturale în exploatare și în prospecțiuni, ale altei firme private importante pe piața de profil.

CAPITOLUL 2. STUDIU PRIVIND UNII AGENȚI PARAZITARI CARE POT CONTAMINA SURSELE DE APĂ

CHAPTER 2. STUDY ON SOME PARASITIC AGENTS THAT CAN CONTAMINATE WATER SOURCES

2.1. Surse de apă de suprafață și subterane

Agenții parazitari care pot contamina sursele de apă de suprafață (protozoare, trematode, cestode, insecte, etc.) au fost subiect de studiu pentru mulți cercetători din întreaga lume, rezultatele acestor cercetări fiind publicate în diverse reviste științifice de specialitate, marea majoritate accesibile și online, pe site - urile de profil. Din lucrările științifice disponibile, a fost realizată o sinteză din care reiese faptul că dintre agenții parazitari cu caracter zoonotic care formează obiectul studiului tezei de față, au fost identificați în apele de suprafață de pe întreg mapamondul, iar studierea lor reprezintă o preocupare reală, ținând cont de necesitățile crescânde de surse de apă potabilă dar și de posibila lor contaminare, fie că sunt surse potabile sau ape recreative.

Sursele de apă de suprafață deși nu sunt indicate pentru consum, sunt utilizate intens mai ales în sezonul cald, iar pentru zona montană este o obișnuință zootehnică vitală. Adăpatul direct din pâraie sau râuri, poate avea riscuri, apa fiind adesea impurificată biologic de dejecții, excreții, suspensii, sau de diferite substanțe apărute accidental care pot genera o poluare chimică.

Spre deosebire de apa de suprafață, apele subterane corespund în general calității impuse pentru consum, dar și acestea pot fi contaminate prin exploatarea neigienică a fântânilor sau a izvoarelor, cu diferite infiltrații, care pot avea consecințe asupra sănătății omului și animalelor, fiind responsabile de o gamă largă de boli infecțioase sau diferite intocicații care pot genera boli cronice (COMAN, I.1988).

Apele subterane se clasifică în ape freatice și ape de adâncime. Apele freatice sunt utilizate intens în consum de către colectivități în special în mediul rural, pe care o exploatează prin fântâni, adâncimea apelor freatice fiind cuprinsă între 1- 25 metri, în funcție și de regimul hidrografic al zonei. Ele se infiltrează prin straturile de sol și astfel se purifică proporțional cu adâncimea (BLITZ, 1967). Dacă în apropierea apelor freatice sunt surse care pot impurifica aceste ape, (gropi de gunoi, grajduri sau dejecții colectare de la acestea, closete), utilizarea lor se va realiza cu precauție. CORLEȚIANU (1975), arată că termica acestor ape este cuprinsă între 13-17⁰ C vara și 5-8⁰ C iarna. Turbiditatea acestor ape este crescută datorită particulelor fine de argilă și a precipitatelor de magneziu sau fier din suspensie, a substanțelor organice sau microorganismelor.

Poluarea acviferelor poate fi realizată cu ape reziduale industriale, cu reziduri solide și/sau semisolid, cu resuri menajere. Dacă solurile sunt permeabile, pot apărea surse de poluare accidentale, cu caracter temporar, dar care pot provoca epidemii. (MITRĂNESCU, 1988).

2.2. Studii referitoare la *Cryptosporidium* spp. și *Giardia* spp.

Apa utilizată în scopul preparării furajelor ca și apa de consum, pot vehicula elemente parazitare. Deasemeni, apele stagnante, cele provenite din viituri sau cele care spală terenuri parazitare au un grad de contaminare evident.

Un studiu asupra speciilor de *Cryptosporidium* și a subtipurilor sale a fost efectuat în regiunea centrală a Spaniei, de către A.L. Galvan și colaboratorii săi în apa de băut, apa din stațiile de epurare, precum și apa din bazinele de agrement, utilizând ca metodă de prelevare a probelor USEPA Method 1623 și ca metodă de concentrare IDEXX Filta-Max System, punându-se în evidență prezența diferitelor genuri de *Cryptosporidium* (*C. parvum*, *C. hominis*) prin metoda PCR, identificându-se speciile la nivel molecular. Din aproximativ 150 de probe, 15.3 % au fost pozitive la testul IF, iar 26.7 % au fost pozitive la testul PCR. O frecvență mai mare a fost evidențiată în apa din stațiile de epurare. În ceea ce privește dispunerea lor în funcție de anotimp, cea mai mare prezență a fost observată iarna și primăvara. Datele obținute în urma studiului au pus în evidență diversitatea genurilor de *Cryptosporidium* spp. prezente în apele de băut, dar și în apele reziduale: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. muris*, *C. andersoni*, *C. ubiquitum* (Galvan, 2013).

Un alt studiu efectuat în regiunea Galiția, tot din Spania a urmărit evidențierea speciilor de *Cryptosporidium* și *Giardia* în influenții și efluenții proveniți din 12 stații de epurare, calculându-se potențialul de infestare pe care acești efluenți îl au în contaminarea apelor curgătoare, precum și din zonele de agrement. În acest sens au fost prelevate probe de 25 - 30 L apă, în toate sezoanele, primăvara, vara, toamna și iarna anului 2007, analizându-se un număr de 96 de probe, utilizând tehnica de prelevare USEPA Method 1623. Pentru identificarea genotipică s-a folosit metoda de identificare moleculară. Ambii paraziți au fost identificați în toți efluenții și în toate anotimpurile. Concentrația chisturilor de *Giardia duodenalis* a fost mai mare decât a cea a oocisturilor de *Cryptosporidium* spp., variind de la o stație la alta, iar distribuția sezonieră a arătat o concentrație mai mare primăvara și vara. Ca specii identificate au fost *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium andersoni*, *Cryptosporidium hominis*, precum și *Giardia duodenalis*. Concluziile acestui studiu au relevat un potențial ridicat de contaminare cu speciile de paraziți mai sus menționate a efluenților proveniți de la cele 12 stații de epurare, obligând la măsuri suplimentare de tratare a apei împotriva paraziților, astfel încât concentrația în apele tratate să fie redusă la minimum (Castro-Helmida, 2008).

În Ungaria, au fost efectuate studii de detectare și caracterizare a speciilor de *Giardia* și *Cryptosporidium* din apele de suprafață din efluenții stațiilor de tratare, precum și din lacul Balaton (Plutzer J. et.al, 2008). Au fost prelevate 36 de probe din diferite surse de apă, de pe tot arealul Ungariei. Metoda de concentrare a chisturilor și oocisturilor a fost USEPA Method

1623, iar pentru detecție s-au utilizat teste IFT și PCR. Tipizarea s-a realizat prin metoda moleculară. După analiza tuturor probelor prin IFT, 67% au fost pozitive pentru *Giardia spp.*, respectiv 42 % pentru *Cryptosporidium spp.* Rezultatele la PCR au confirmat prezență în 36% din probe pentru *Giardia spp.* și 28% pentru *Cryptosporidium spp.* Studiile efectuate au evidențiat prezența unui nou subtip de *Giardia duodenalis*, și au condus la o cartografiere a prezenței paraziților în apele de pe teritoriul Ungariei (Plutzer, 2008).

Cercetări pentru evaluarea prevalenței speciilor de paraziți *Cryptosporidium* și *Giardia* au fost efectuate și în provincia Alava din nordul Spaniei, unde în principal au fost studiate posibilele asociații dintre prezența celor 2 protozoare și flora microbiologică a apei, cu analizele fizico - chimice, precum și cu condițiile atmosferice. În acest scop au fost prelevate 284 de probe din diferite surse de apă (apă de băut, apă din râuri etc). Oochisturile de *Cryptosporidium spp.* au fost detectate în 63 % din probele prelevate direct din râuri, 33.3 % din bazinele de captare, iar 22% din stațiile de tratare ale apei. *Giardia spp.* a fost identificată în 92% din probele prelevate din râuri, 55% din bazinele de captare și 26 - 40 % din diferite stații de tratare. Prezența *Cryptosporidium spp.* și *Giardia spp.* are o corelație directă cu nivelul de turbiditate al apei, din probele analizate și în marea majoritate a probelor au fost găsite asocieri între nivelul total al coliformilor și *Escherichia coli*. În ceea ce privește sezonalitatea, *Cryptosporidium spp.* a fost identificat cu preponderență în perioada toamnei, pentru *Giardia spp.* neexistând o sezonalitate. Concluzia principală a fost că cele 2 protozoare se găsesc în apele de suprafață într-un procent destul de ridicat în această regiune. Impactul studiului a fost faptul că tratamentele de bază utilizate în stațiile de epurare, respectiv filtrarea și clorinarea, nu sunt suficiente pentru a furniza o apă de calitate, respectându-se cerințele de biosecuritate (Carmena, 2007).

În Rusia și Bulgaria au fost efectuate studii cu privire la identificarea oochisturilor de *Cryptosporidium spp.* și chisturilor de *Giardia spp.*, în apa îmbuteliată a principalilor furnizori de pe piața celor două țări. Astfel au fost colectate 166 probe din regiunea Rostov din sudul Rusiei, precum și din Sofia și Varna, din Bulgaria. Metoda utilizată pentru concentrare a fost filtrarea și flocularea, urmată de purificarea cu sucroza, detecția și identificarea făcându-se prin imunofluorescență. Chisturile de *Giardia spp.* au fost identificate în câteva probe provenite din apa îmbuteliată (Karanis, 2006).

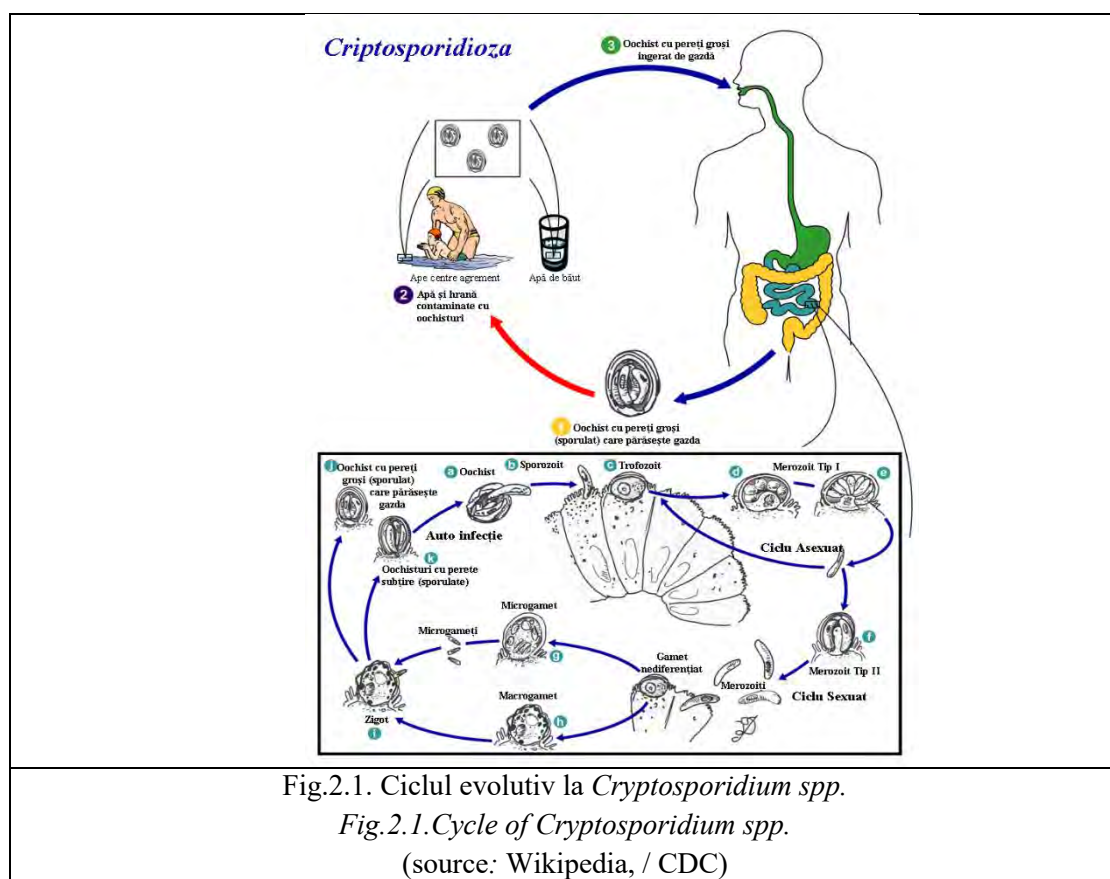
Un studiu privind prevalența speciilor de *Cryptosporidium* și *Giardia* a fost efectuat și pe principalele râuri din vestul României, de către echipa condusă de Dr. Kalman Imre de la Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Timișoara. Ținând cont de schimbările climatice, preocupările pentru calitatea surselor de apă de băut se îndreaptă spre cercetări care să pună în evidență nivelul de contaminare al apelor atât din punct de vedere microbiologic, cât și parazitare. Studiul de față a fost efectuat pe 8 râuri din jurul a 15 orașe mari din vestul României. Au fost analizate 21 de probe, iar prelevarea probelor s-a efectuat prin filtrarea a minim 2.5 litri de apă până la maxim 45 litrii. Oochisturile de *Cryptosporidium spp.* și chisturile de *Giardia spp.* au fost izolate utilizând separația imunomagnetică și cuantificați la microscop, prin fluorescență. Chisturile și respectiv oochisturile celor 2 paraziți au fost identificate în 76%

din probe, iar în 14.3 % dintre acestea, încărcătura a fost foarte mare, până la 300 chisturi / litru la *Giardia spp.* și 48 oochisturi / litru la *Cryptosporidium spp.* În ceea ce privește speciile, la *Cryptosporidium* a fost identificat *Cryptosporidium parvum*, iar la *Giardia* au fost identificate *Giardia duodenalis* de tip uman și de tip provenit de la rumegătoare. Rezultatele obținute au arătat faptul că apa poate fi un potențial vector pentru agenții patogeni verificați, în zona studiată (Imre, K., 2016).

Cryptosporidium spp.

Considerat poate cel mai important agent patogen din apă, genul *Cryptosporidium* are o taxonomie încă neclară, fiind acceptat însă de majoritatea specialiștilor că doar două dintre specii parazitează mamiferele: *Cryptosporidium parvum* și *Cryptosporidium muris*. Ciclul biologic este detaliat în fig. 2.1.

Cryptosporidium parvum provoacă criptosporidioza, boală care afectează indivizii tineri din specii de mamifere (viței, mânji, miei, iezi, porci, iepuri), păsări (pui de găină, curcă, gâscă), dar și la om, putând da forme grave la imunosupresivi.



Caracterul specific acestui protozoar este oochistul sferic, care măsoară 4 - 6 μm și

conține 4 sporozoiți liberi, neincluși în sporochist. Criptosporidiile sunt paraziți extracelulari, cu ciclul de viață scurt și rapid, în interiorul aceleiași gazde trecând prin toate fazele de dezvoltare. Acest sporozoar parazitează marginea în perie a enterocitelor din intestinul subțire, intestinul gros și stomac, dar poate fi găsit și pe alte segmente ale tubului digestiv. După fixare, parazitul formează un "organit de hrănire" din pliurile membranei plasmatică, venind în contact cu citoplasma celulei gazdă (Dulceanu, 2009).

Oochisturile sunt eliminate prin fecale, timp de 9 - 10 zile, începând după 3 - 4 zile de la infestare și se caracterizează prin rezistență foarte mare la condițiile de mediu, dar și la substanțele de dezinfecție uzuale. Transmiterea la om se realizează pe calea fecal - orală, prin apă și hrană infestată, cu preponderență în sezonul cald. Boala se manifestă prin vomă, diaree, frisoane, transpirație, cefalee, scaune apoase, crampe, balonare și deshidratare.

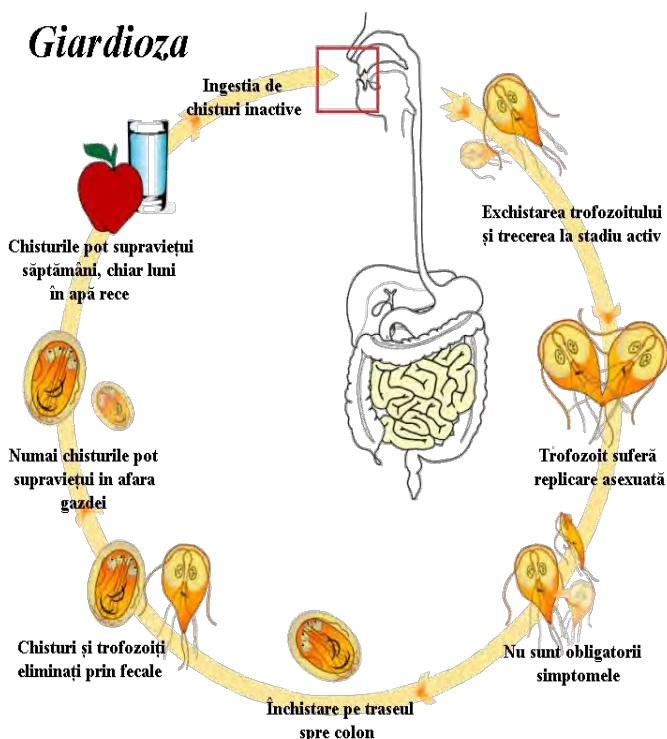
Diagnosticarea clinică este una dificilă, deși simptomele permit suspiciunea criptosporidiozei. Pentru un diagnostic sigur se execută frotiuri din scaunele diareice și colorare Giemsa sau Zeihl-Nielsen, în urma căreia oochisturile apar roșii pe un fundal albastru (Miron, 2002).

De asemenea se poate realiza identificarea imunologică sau genetică prin PCR. Grupele de populație cu risc crescut sunt crescătorii și iubitorii de animale, bolnavii imunodeficitari, copiii, personalul didactic și medical.

Profilaxia indicată include măsuri de igienă alimentară în ferme de animale, precum și controlul apei potabile, iar dacă este cazul tratarea acesteia prin filtrare folosind filtre cu ochiurile mai mici de 4 μ m, ozonarea, deși este foarte scumpă sau simpla fierbere a apei.

Giardia spp.

Genul *Giardia* cuprinde peste 40 de specii, specia cea mai frecventă fiind *Giardia intestinalis* (*G. lamblia*, *G. duodenalis*), care parazitează omul și alte mamifere. Se prezintă ca și trofozoit piriform, cu 2 ventuze, 4 perechi de flageli și 2 nuclei, precum și chist oval, cu 4 nuclei (Miron, 2002). Ciclul biologic este prezentat în fig.2.2.

Fig. 2.2. Ciclul evolutiv la *Giardia* spp.Fig.2.2. Cycle of *Giardia* spp.

(source: Wikipedia, / CDC)

Rezervorul de infestare este format de tineretul bolnav, dar și de adulții purtători, asimptomatici. Contaminarea se realizează pe calea fecal - orală, prin apă sau alimente infestate cu chisturi, forme care prezintă rezistență mare la condițiile de mediu, sau prin muște, ca și gazde de transport. Chisturile ingerate eliberează trofozoizii, care aderă la mucoasa intestinală, se multiplică exagerat și se hrănesc cu conținutul intestinal. Ciclul se încheie cu formarea chisturilor (Dulceanu, 2009).

Boala evoluează asimptomatic la adulți și prin scaune diareice, deshidratare, pierderi în greutate la tineret. Diagnosticarea se realizează prin evidențierea morfologică a chisturilor sau trofozoizilor în proba de fecale sau imunologic prin test ELISA.

Parazitul fiind cosmopolit, poate produce epidemii la copii mai mici de 3 ani, forma chistică fiind rezistentă la tratamentele cu clor ale apei de rețea. Profilactic, se recomandă respectarea regulilor de igienă, tratarea purtătorilor, precum și filtrarea, ozonarea sau tratarea apei potabile.

2.2.1. Izolarea și identificarea oocisturilor de *Cryptosporidium spp.* și a chisturilor de *Giardia spp.*

Pentru izolarea și identificarea oocisturilor de *Cryptosporidium spp.* și a chisturilor de *Giardia spp.* s-a folosit protocolul de lucru adaptat de colegii de la Facultatea de Medicină Veterinară din Timișoara, care include următoarele etape :

a. Filtrarea probei de apă, utilizând un dispozitiv bicameral, cu pereți din plastic transparent. În camera superioară este situat cartușul filtrant (caseta de filtrare), iar camera inferioară servește pentru colectarea apei filtrate prin filtre de unică folosință, cu dimensiunea ochiurilor de 2, 3, 7, 10 și 20 microni.

Cantitatea filtrată, dacă vorbim de apă netratată (crudă), variază de la câțiva la 50 de litri. La sfârșitul filtrării caseta de filtrare se îndepărtează din camera de filtrare și se așează într-un recipient steril, cu un volum de 800 de ml, peste care se adaugă ~ 300 de ml din apa recuperată din camera de filtrare, pentru a evita deshidratarea. Probele se transportă în laborator.

b. Spălarea atentă a filtrului în laborator, cu o periuță de dinți dezinfectată în prealabil, rezultând o cantitate de aproximativ 300 - 400 de ml de concentrat inițial (apă tulbure).

c. Centrifugarea succesivă a concentratului, în mai multe etape, în tuburi de 50 ml (~ 8 tuburi) până se ajunge la un volum final de 8 - 10 ml concentrat final.

d. Separarea imunomagnetică a oocisturilor de *Cryptosporidium spp.* și a chisturilor de *Giardia spp.* prin utilizarea kitului comercial Dynabeads™ GC-Combo'.

e. Colorarea prin tehnica imunofluorescenței a unui volum de 50 μl de concentrat rezultat în urma separării imunomagnetice, cu ajutorul kitului Merifluor Combo C&G 50 Tests.

f. Examinarea la microscopul cu lumină fluorescentă a preparatului colorat și fixat.

g. Cuantificarea prezenței sau absenței (oo)chisturilor de *Cryptosporidium spp.* și *Giardia spp.*

h. Caracterizarea moleculară a speciilor, în cazul unui rezultat pozitiv : extracție ADN, PCR - RFLP și secvențare, pornind de la un volum de 50 μl de concentrat (a doua jumătate rezultată din cei 100 μl de produs Dynabeads).

2.3. Studii referitoare la *Entamoeba spp.*

Un studiu referitor la prevalența speciilor de *Entamoeba* în apele uzate tratate pentru a fi utilizate în agricultură, a fost realizat în Columbia, pe probe prelevate din stațiile de tratare a apelor uzate ce urmau a fi folosite după tratare, pentru irigații. Probele s-au prelevat săptămânal, timp de 10 săptămâni în perioade diferite de contaminare. Protozoarele au fost identificate la microscop și prin cultivare pe medii de cultură specifice. Prin microscopie, s-au dovedit pozitive pentru *Entamoeba spp.*, 70% (14 / 20) dintre probele de apă netratată și 80% (8 / 10) dintre probele de apă tratată. Prin PCR, după multiplicare prin cultivare la 37°C timp de 24 H, s-au dovedit pozitive pentru *Entamoeba moshkovskii*, 100% (29 / 29) pentru apele netratate și 78.6% (11 / 14) pentru apele tratate. Astfel, a fost prima izolare a speciei *Entamoeba moshkovskii* în Columbia, confirmată prin metoda PCR. Rapoartele recente cu privire la posibila patogenitate

a speciei *Entamoeba moshkovskii* sugerează un risc pentru sănătatea populației expusă la sursele de apă contaminate cu acest protozoar (Jairo Andres Fonseca, 2016).

Izolarea și identificarea elementelor parazitare de *Entamoeba spp.* se realizează prin examen copro-parazitologic, cu vizualizare la microscop, în preparat proaspăt simplu sau colorat Gram (Luca, 1981).

2.4. Studii referitoare la *Fasciola spp.* și *Dictyocaulus spp.*

Agenții parazitari din grupa viermilor cu tropism în tubul digestiv: *Fasciola spp.* și respectiv aparatul respirator: *Dictyocaulus spp.*, includ în ciclul lor de dezvoltare o fază larvară obligatorie în afara organismului parazitat, care infestază accidental apele de suprafață, pășunile și fânețele din zonele frecventate de animale. La *Fasciola* există două faze exogene și două faze endogene astfel încât contaminarea gazdelor definitive este mai complexă, necesită pentru primele stadii larvare prezența gasteropodelor ca și gazde intermediare, stadiile endogene de metacercar și adult fiind cele care tunelizează ficatul gazdelor definitive.

Ținând cont de specificul zonei în care se vor desfășura cercetările, cursuri de apă din Depresiunea Dornelor, la care animalele au acces direct sau indirect, probabilitatea infestării este foarte ridicată. REY(1985), arată “că umiditatea ridicată determină “menținerea unui pat parazitologic” foarte bogat, infestările cu *Fasciola hepatica*, diverse nematode ș.a. fiind deosebit de accentuate. Necesitatea asigurării unei paze severe și permanente pe lângă stâni și văcării, gospodării a unui număr important de câini care trebuie hrăniți, constituie un rezervor important pentru unele boli ale ovinelor și bovinelor”.

2.4.1. Studii referitoare la *Fasciola spp.*

Ținând cont că această grupă de paraziți aduce pierderi economice importante în sectorul zootehnic, *Fasciola hepatica* la oaie, *Fasciola gigantica* și *Fascioloides magna* la rumegătoare, există o preocupare intensă pentru studierea metodelor de prevenire și combatere pentru efectivele de animale din ferme (Rojo-Vazquez, 2012). Cercetările pe acest subiect sunt multiple, focusate în principal pe combaterea acestor parazitoze printr-o gamă variată de substanțe antipazitare. Prevenirea contaminării efectivelor sănătoase reprezintă de asemenea o preocupare intensă, cunoscut fiind faptul că drenarea excesului de apă de pe pășuni, precum și asigurarea locurilor de adăpare corect amenajate cu apă provenită din surse sigure, limitează infestarea animalelor și bineînțeles are ca efect final evitarea poluării cursurilor de apă cu paraziți, în diferite stadii de dezvoltare. De asemenea, o importanță deosebită a fost acordată de cercetători asupra impactului acestor viermi asupra sănătății umane. Astfel, un studiu publicat în 2005 evidențiază că speciile *Fasciola hepatica* și *Fasciola gigantica*, ca și paraziți hepatici, alături de alte 4 specii de paraziți intestinali, provoacă importante zoonoze în multe țări ale lumii. Schimbările permanente climatice par a afecta speciile de melci implicate în ciclul helmintozelor, gasteropodul fiind dependent de condițiile de mediu. Fascioloza este, în multe țări, un bun exemplu de boală parazitară ca și consecință a modificărilor făcute de om în mediu.

De exemplu, *Fasciola hepatica* este astfel capabilă să se adapteze la noi gazde și condiții de mediu extreme, de exemplu la altitudini foarte mari (Mas-Coma, 2005).

Ciclul biologic se desfășoară în trei medii diferite: organismul gazdei, mediul exterior acvatic (fază obligatorie) și gazda intermediară, reprezentată de melcul de apă dulce. Fazele ciclului de dezvoltare includ : oul neinfestant, miracidiul care intră în contact cu gazda intermediară, sporocistul, care produce mai multe redii, cercarul care părăsește gazda intermediară, metacercarul ca și formă de rezistență. Gazda finală se infestază ingerând metacercarii, care în duoden exchistează și migrează spre ficat (Dulceanu, 2009). Ciclul biologic este sistematizat în fig. 2.3.

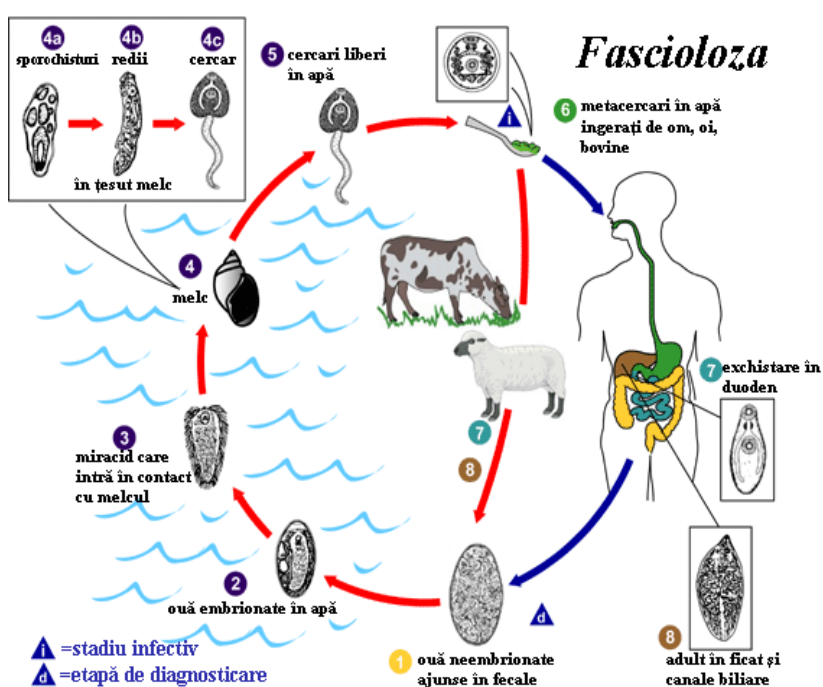


Fig. 2.3. Ciclul evolutiv la *Fasciola hepatica*

Fig.2.3. Cycle of *Fasciola hepatica*

(sursă : Wikipedia, după: CDC)

Izolarea și identificarea ouălor de Fasciola hepatica

Pentru a identifica parazitul în diferite stadii ale ciclului de dezvoltare, se execută examen copro - parazitologic pe probe recoltate de pe pășunile din apropierea cursurilor de apă, care pot fi astfel infestate.

O metodă folosită în special pentru *Fasciola hepatica* este metoda Van Sommeren - Gregoire, care se bazează pe sedimentarea ouălor acestui parazit, a căror densitate este mult mai mare decât a altor ouă de helmiți prezenți în lichidul folosit pentru determinare.

Pentru a grăbi sedimentarea ouălor și evitarea aderării la pereții tubului aparatului

Gregoire se folosesc soluții apoase de detergent . Pentru analiza probelor de fecale sunt necesare site metalice cu diametrul de 1 mm și 350 μ m, aparat Gregoire, lame de sticlă, pahare, spatulă, soluție teepol 1% și microscop.

Modul de lucru include :

a. Etapa de pregătire a aparatului Gregoire, a cărui tub de sticlă se umple încet cu soluția de detergent, astfel încât să se evite formarea spumei.

b. Etapa de preparare a probei include diluarea a 4 grame de materii fecale cu 36 ml de soluție apoasă de detergent și omogenizarea cu ajutorul unei spatule; urmează filtrarea suspensiei de 2 - 3 ori printr-o sită cu ochiuri de 1 mm și apoi filtrarea prin sită cu ochiuri de 350 μ m. Lichidul filtrat este turnat în aparatul Gregoire, unde în 20 de minute are loc sedimentarea elementelor parazitare. Se colectează sedimentul sub forma primelor 15 picături, câte 3 picături pe 5 lame, care se examinează la microscop folosind obiectivul de 10X, 20X, 40X (Cosoroabă, 2002).

2.4.2. Studii referitoare la *Dictyocaulus spp.*

Specia *Dictyocaulus viviparus* a fost obiect de studiu pentru cercetătorii de la Universitatea Iowa din SUA. Acest parazit nu este în mod curent diagnosticat în patologia clinică a bovinelor din nordul Statelor Unite, având o distribuție sporadică, dar în zona central - vestică, ocazional apar cazuri cu consecințe grave, produse de formele larvare. Infecția cu acest nematod poate fi considerată ca și diagnostic posibil în cazurile unor boli respiratorii cronice, care nu răspund la alte tipuri de terapie. Boala poate fi diagnosticată prin identificarea formelor larvare din materiile fecale folosind metoda Baermann sau prin izolarea formelor adulte din sistemul respirator al animalelor în timpul necropsiei (Khaled Al-Qudah, 1995).

Izolarea și identificarea larvelor de Dictyocaulus spp.

Pentru a identifica parazitul în diferite stadii ale ciclului de dezvoltare se execută un examen copro - parazitologic pe probe recoltate de pe pășunile din apropierea surselor de apă, care pot fi astfel infestate.

O modalitate folosită pentru depistarea larvelor este metoda Baermann modificată de Pouplard. Materialele necesare prelucrării probelor de fecale sunt aparatul Baermann, hârtie de litru, tifon, pipete, centrifugă cu tuburi specifice, sticlă de ceas, apă încălzită la 30°C.

Mod de lucru :

a. Etapa de pregătire a probei care implică etalarea materiilor fecale pe hârtia de filtru, urmată de așezarea pe un tifon, căruia i se înnoadă colțurile și fixarea pe sita aparatului Baermann, umplut în prealabil cu apă caldă.

b. Etapa de sedimentare și centrifugare care include un timp de repaus de 12 - 24 de ore, după care se prelevează primii 10 ml direct în eprubeta de centrifugă și se centrifugează 3 minute la 1500 rotații / minut. Cu ajutorul unei pipete se extrag ~ 9 ml de supernatant, iar sedimentul se toarnă pe o sticlă de ceas și se examinează la lupa binoculară.

2.4.3. Studiu referitor la Familia Simuliidae

Dintre insectele care au dezvoltare larvară în mediul acvatic, musculițele din familia *Simuliidae* sunt bine cunoscute ca și vector pentru unii agenți patogeni ai diferitelor boli, provocând pagube importante la gazdele lor. Simulidiotoxicoza este boala provocată de femelele fecundate ale acestor insecte, care atacă animalele de pe pășuni producând îmbolnăviri grave, ce se manifestă prin febră, edeme, toxiemie, chiar moarte. De asemenea, simuliidele sunt gazde intermediare pentru specii de *Onchocerca* și vectori ai leucocitozoozei la unele păsări.

Un studiu din Rusia central europeană, incluzând și zona cu silvostepă, este dedicat compoziției speciilor, duratei ciclurilor, structurii și biodiversității la acestor insecte. Simuliidele formează o componentă semnificativă a zooperifitonului acvatic în zonele centrale ale Rusiei, dominând ca și număr și biomasă. În silvostepa din Rusia centrală, Fam. *Simuliidae* a fost studiată mai ales în ceea ce privește ecologia adulților care provoacă îmbolnăviri la animale și om. Larvele și pupele în curs de dezvoltare nu au fost examinate, datorită densității scăzute a populației și pentru că nu atacă animalele și oamenii, deși păstrează un potențial de risc (Budaeva, 2010).

Numite și „musculițe negre” sau “muște cocoșate” sau “muște columbase”, au corpul scurt și gros, de 1 - 5 mm lungime, colorat de la gri - oliv - negru până la gălbui - brun. Femelele sunt hematofage, adaptate la viața parazitară, atacând mamiferele, păsările și omul. Sursa principală de energie a insectei o constituie nectarul florilor, dar femelele au nevoie de sânge pentru dezvoltarea ovarelor. Depun ouăle pe plantele și frunzele de la suprafața apei sau unele specii, chiar până la 30 cm adâncime, în apele rece și bine oxigenate din zonele de munte, fiind considerate un indicator de puritate al apei. Larvele au aspect vermiform, sunt mobile, se atașează de roci și se hrănesc cu materie organică. Larva se transformă în pupă, care este adăpostită într-un cocon țesut de larvă. Larvele și pupele trec iarna, iar primăvara devin adulți.

Familia *Simuliidae* este formată din peste 2415 specii care au fost enumerate ca fiind valabile de către Adler (2022), dintre care peste 2398 sunt actuale și 17 specii fosile. Ele aparțin sunt predominante în regiunile holarctice. Un studiu al faunei simulidelor romanesti a fost întreprinsă de Dinulescu (1966). Muștele negre adulte sunt destul de mici, aproximativ 1,54 mm lungime, sunt adesea negre, (cum în limbaj popular sunt numite), sunt relativ robuste și sunt renumite pentru agresivitatea lor când atacă și mușcă. La majoritatea speciilor, femelele necesită o masă de sânge de la mamifere, inclusiv oameni, pentru a obține proteinele necesare pentru maturarea ouălor. Atât muștele negre, masculi, cât și femele, se hrănesc cu sucuri de plante și adună substanțele zaharoase, dar numai femelele iau prize de sânge de la mamifere și oameni, unele specii de muște negre hrănindu-se cu sânge aproape exclusiv de la păsări (ornitofagice); fiecare specie atacă un tip de gazdă în mod preferențial. Femele unor specii pot zbura 2-15 km pentru a obține o priză de sânge, ajutate și de vânt. Aceste distanțe lungi pot împovăra programele de control. Mușcătura are loc în aer liber în timpul zilei deși sunt deosebit de active dimineața și seara.

Saliva secretată de muștele negre atunci când se hrănesc pot provoca reacții alergice

gazdei. Dermatita provocată de *Simulium* este frecvent raportată în zone unde apar speciile de *Simulium*; poate afecta oamenii și animalele, în special în terenurile rurale și suburbii. Clinic, se caracterizează prin erupții repetitive de papule și vezicule eritematoase, cu prurit intens, uneori dure. Această condiție este rezultat al unei reacții de hipersensibilitate la mușcătura simuliidelor.

În general, comunitățile de insecte acvatice reflectă condițiile din ecosistemele acvatice dar nu răspund în mod asemănător la modificările factorilor de mediu, la unele, sensibilitatea este mai mare, altele cum sunt simuliidele sunt mai rezistente, conform Agenției de Mediu Franceze (AFNOR, 2004). Izolarea indivizilor de *Simuliidae*, în diferite stadii de dezvoltare, se realizează prin prelevarea de probe de pe substratul pâraielor de munte, iar identificarea se face folosind cheile de determinare din determinatoarele entomologice. În acest sens se urmăresc trăsăturile caracteristice fiecărui gen, în stadii diferite de dezvoltare.

În capitolul dedicat studiului macronevertebratelor benthice din afluenții bazinului Dornelor vom detalia aceste aspecte.

CAPITOLUL 3. APA: STRUCTURĂ, PROPRIETĂȚI

CHAPTER 3. WATER: STRUCTURE, PROPERTIES

Prin structura sa, apa a creat dintotdeauna diferite concepte, a creat întrebări și a fost considerată un miracol al vieții. Deși ca substanță chimică este formată din hidrogen și oxigen, cu o formulă chimică H_2O cunoscută de absolut toată lumea, această formulă a fost stabilită pe baza greutăților relative ale hidrogenului și oxigenului din moleculă, cu un raport de 2,0160/1,6000 (doi atomi gram de hidrogen și un atom gram de oxigen). Construcția asimetrică a moleculei face ca unghiul dintre cele două legături ale hidrogenului să formeze cu atomul central de oxigen un unghi de 105^0 , ceea ce face ca forțele electrice intramoleculare să nu se neutralizeze complet, cu părți ale acestora să se manifeste la exterior, denumite polaritate electrică negativă pentru oxigen și polaritate pozitivă pentru hidrogen.

Polaritatea moleculară sau dipolul dă apei calitatea unui bun solvent. Versatilitatea apei ca solvent este esențială pentru organismele vii. Ca și lichid, este fără gust și iodoră, doar statutul de incolor este marcat de faptul că apa are de fapt o culoare albastră intrinsecă, cauzată de ușoară absorbție a luminii la lungimea de undă a culorii roșii. Toate organismele vii depind de soluțiile apoase ca sângele, sucurile digestive, pentru majoritatea proceselor biologice.

Din punct de vedere chimic, una dintre cele mai importante proprietăți chimice este capacitatea sa de a se comporta atât ca un acid (un donor de protoni) cât și ca o bază (un acceptor de protoni), proprietate caracteristică a substanțelor amfotere, după descrierile atributelor acestui lichid, lui Mănescu & col. 1973, în cartea „Exploatarea apelor subterane”. Apa este considerată cel mai bun solvent, pentru că are capacitatea de a dizolva aproape toate substanțele, fără ca proprietățile ei să fie modificate, fapt care este extrem de important pentru viața organismelor acvatice. Este și un produs de consum, dar apa pură nu poate îndeplini condițiile necesare vieții, odoarece organismele vii folosesc sărurile dizolvare în apă (de calciu, magneziu, fosfor, fier, sodiu) implicate în ontogeneză.

Apa ca factor de mediu are rol fundamental prin participarea ei activă și prin implicarea în toate transformările fizico-chimice care au loc fie în aer, fie edafice, implicându-se și în toate procesele atmosferice care stabilesc tipurile de climat. Apa nu este numai un cuvânt cheie, dar are un rol cheie în asigurarea vieții atât a oamenilor cât și a celorlalte viețuitoare, inclusiv plantele, fiind astfel un element indispensabil al mediului înconjurător. Apa meteorică (sub formă de precipitații ajunge pe sol sau în sol. Pe sol, formează lacuri, bălți sau mlaștini, în solul permeabil, se infiltrează prin porii acestuia. Deasupra solurilor impermeabile ca argila, apa se colectează formând apa subterană. Aceste ape subterane sunt în continuă mișcare și în funcție de înclinarea straturilor de sol ajung la suprafață sub formă de izvoare, care împreună cu apa meteorică dau naștere fluviilor, râurilor care se varsă la rândul lor în lacuri, mări și oceane,

reluându-se circuitul prin evaporareaa acesteia și constituirea norilor din a căror condens rezultă precipitațiile (Mănescu,1984).

Pentru organismele vii știm despre apă că pentru mediul intern al acestora, toate reacțiile biochimice au ca substrat chimic apa. Apa vehiculează mediul metabolic. Puterea de dizolvare a apei produce dispersii moleculare. Niciun proces metabolic nu poate fi realizat fără apă, nici excreția. Procesele de bază ale presiunii osmotice (izotonia), asigurarea constanței termice (izotermia) precum și echilibrul acido-bazic sunt asigurate de apă. Apa în organisme variază ca procent, în funcție de ontogeneză și filogenia acestora, dar în general, vorbim de un procent al compartimentului intracelular de 60 % din apa totală a organismului iar cel extracelular de 40 % din apa totală a organismului, și deasemeni 20-30 % din greutatea organismului. Sectorul plasmatic prezintă 5% din greutatea corporală iar cel interstițial de 20% (Popescu et.al., 1981).

În legătură cu relațiile ecologice ale apei, în toate tipurile de acumulări de ape există o interacțiune cu o gamă largă de organisme (plante, animale acvatice), asigurând o circulație a materiei și energiei, o productivitate acvatică a diferitelor ecosisteme prin interacțiunea între diferitele populații de microorganisme care există la acest nivel. (ZARNEA, 1994). Pot fi întâlnite microorganisme autohtone, permanente, care caracterizează sursa de apă, fie că vorbim de ape minerale mai bogate în astfel de microorganisme sau ape subterane, mai sărace în substanțe organice dar unde putem găsi populații de microorganisme indigene, unele bacterii (*Micrococcus*, *Nocardia*, *Clostridium*). Dintre bacteriile autotrofe ale apei, după efectul produs pot fi clasificate astfel:

- bacterii feruginoase (oxidează ionii feroși în ioni ferici), sulfatoreducătoare (de reducere a sulfului), nitrozobacterii (oxidează amoniacul în nitriți), nitrobacterii (transformă nitriții în nitrați), bacterii denitrificatoare (reduc nitrații în nitriți), bacterii care oxidează în condiții aerobe hidrogenul gazos. (Dan, 1999).

Dacă apa este poluată temporar, pot apare microorganisme alohtone (microfloră temporară) care supraviețuiesc doar dacă au suficienți nutrienți. Mai există o microfloră de tranziție, reprezentată de bacteriile patogene care trăiesc în apă un timp limitat, neavând condiții de prielnică multiplicare.

În cursurile de apă în care abundă substanțele organice, se dezvoltă alge albastre și verzi, producând înflorirea algală, iar la poluarea cu ape reziduale fecaloid menajere apar și bacterii patogene.

Caracterizarea apelor curgătoare

Râul își are originea într-un izvor și debutează cu un pâraiaș. Pe parcurs, mici izvoare se unesc dând cursul principal (Stugren & col., 1988).

Râul este definit ca un ecosistem lotic, în accepțiunea lui Hyness (1970) care face o sinteză cuprinzătoare în "The ecology of Running Waters" adunând cunoștințele în domeniu până la acea vreme despre apele curgătoare, re-dimensionând limnologia ca știință. El arată

legătura dintre râu și zona malurilor, accentuând rolul detritusului de pe uscat și a celui provenit din materiile organice alohtone, în dinamica ecosistemelor lotice, care pot influența bazinul de recepție prin parametri ca permeabilitatea terenului sau regimul precipitațiilor. Studiul limnologic asupra apelor curgătoare au căpătat o abordare integrativă, holistă, după apariția unor publicații grupate în lucrarea lui Tudorancea (2000) intitulată “Modern theory in the running water ecology”.

În anul 1980, Vannote introduce conceptul de râu continuu, elaborat pentru râuri cu temperaturi mici, situate în spații naturale, neinfluențate de comunități umane, el considerând râul un sistem în care complexitatea fenomenelor din aval sunt dependente de ceea ce se petrece în amonte. Astfel de teorii au fost elaborate și de Bănărescu, 1984, râul fiind comparabil cu un sistem lotic colector. În raport de viteza de curgere, apa sculptează albia râului. În zonele montane, cum este cazul bazinului Dornelor, unde panta este foarte înclinată și apa are o viteză de curgere mare, fundul este stâncos și bolovănos, iar pe măsură ce panta scade, substratul este constituit din pietriș, prundiș, nisip și măr. Variațiile acestea du substrat vor influența și diversifica biocenozele (Mălăcea, 1969).

Viteza apei scade de la suprafață spre zonele de adâncime, așa încât la nivelul substratului, curgerea este de tip laminar, cu o viteză redusă, de o grosime de 1-10 mm. (Dussart, 1962, cit.de Mălăcea, 1969). Aici, în „stratul limită” se instalează pe pietre alge, protozoare, și larvele unor insecte. Macronevertebratele bentice se adăpostesc aici, formând microhabitate, în care organisme reactionează diferit față de intensitatea curentului. Unele (*Baetis vernis*, *Simulium sp.*, *Hydropsihe angustipennis*) rezistă în curent puternic în timp ce altele preferă o viteză redusă a curentului (*Ephemerella ignita*, *Gammarus pulex*), până la limita la care mai pot exista elemente planctonice fiind de 1 m/s (Behning, 1929 cit.de Pârnu, 1980).

CAPITOLUL 4. MACRONEVERTEBRATELE BENTICE

CHAPTER 4. BENTHIC MACROINVERTEBRATES

O caracterizare completă a rețelelor trofice din apele curgătoare nu poate fi făcută doar prin analize ale parametrilor fizico-chimici ai apei unor tributari, ci trebuie să includă și descrierea rețelei trofice microbiene. Materia organică rezultată prin moartea organismelor acvatice dar și din acumularea de metaboliți, formează detritusul care este descompus bacterian în compuși ca fosfor și potasiu, necesari dezvoltării plantelor. Microorganismele din apă sunt consumate de protozoare flagelate, ciliate, care servesc drept hrană rotiferelor și crustaceelor. Unele organisme moarte și reziduuri organice sunt consumate de nevertebratele saprofage și de către microfage, completând circuitul microbial. Toată această producție realizată va fi transferată către macronevertebrate, formându-se rețele trofice care vor diferi de la izvor către confluența râului.

Apele de munte sunt populate cu specii de mavronevertebrate reofile, iar viteza de curgere a apei este limitativă pentru unele specii care nu se pot fixa de substrat (Koehl, 1984). Rapiditatea curentului influențează mărimea particulelor substratului dar și adaptarea morfologică a unor larve de insecte, cum ar fi aplatizarea corpului la larvele de *Perla*, care au astfel o formă hidrodinamică, deși la unele specii ale genului *Heptagenia*, apare acest caracter, chiar dacă populează biotopi neexpuși curentului. Larvele de *Baetis* se fixează cu picioarele de substrat, pentru a-și menține echilibrul în plin curent, iar când viteza apei crește, larvele își coboară corpul pe substrat, adăpostindu-se în patul albiei (Gabriel, 2001). Antonescu, în 1963 descrie că larva de *Perla* mișcă pentru deplasarea pe substrat primul și ultimul picioruș dintr-o parte simultan cu piciorușul mijlociu din partea opusă corpul fiind împins înainte fără să se ridice de pe substrat.

Pentru evaluarea curentă a calității apei conform indicelui biologic general normalizat, (IBGN) care a fost omologat în Franța în 1992, se face o analiză a macrozoobentosului din apele curgătoare, permițând încadrare calității biologice a apei într-o cheie specială, din care se pot deduce după numărul de taxoni și după grupul taxonomic de care aparțin, eventuale efecte ale unor perturbări în amonte sau în aval zonelor de studiu, stabilind alterări ale condițiilor de mediu. Se realizează un punctaj în conformitate cu natura și varietatea taxonomică a macrofaunei bentice.

În studiul nostru am colectat macronevertebrate bentonice din stațiile de lucru descrise pentru celelalte metode de analiză, utilizând aceste date pentru a le compara cu celelalte aprecieri ale caracteristicilor fizico-chimice ale apei, a încărcăturii microbiologice și parazitologice în perioadele de timp dedicate acestei analize integrative.

Ca și repere am folosit lista taxonilor utilizați în această metodă (38 taxoni) dar am reținut grupul faunistic specific stației de colectare (amonte/aval) doar pentru a constata diversitatea faunistică și amprenta unor perturbări extreme (de tip debite minime, temperaturi ridicate, deversări, activități umane sezoniere, aluviuni datorate furtunilor, etc.

Dintre Insecte, enumerăm câteva ordine și familiile acestora:

*Ord. Plecoptera sunt familiile: Capniidae, Chloroperlidae, Leuctridae, Nemouridae, Perlidae, Perlodidae, Taeniopterigidae

*Ord. Trichoptera: Beraeidae, Brachycentridae, Glossosomatidae, Goeridae, Hydropsychidae, Lepidostomatidae, Leptoceridae, Limnephilidae, Odontocentridae, Phylopotamidae, Polycentropodidae, Psychomyidae, Rhyacophilidae, Sericostomatidae

*Ord. Ephemeroptera: Baetidae, Caenidae, Ephemerellidae, Ephemeridae, Heptagenidae, Leptophlebiidae, Polymitarcidae, Potamanthidae *Ord. Heteroptera: Aphleocheiridae,

*Ord. Coleoptera: Elmidae

*Ord. Diptera: Chironomidae,

*Ordinele: Odonata, Ord. Megaloptera, ord. Planipennia ord. Hymenoptera și Ord. Lepidoptera.

Mai sunt: Crustacee, amfipode (Gamaridae), izopode, decapode, moluște (bivalve), Gastropoda, Viermi (Hirudinea, Oligochaeta, Nematelminthes), Hidracarina, Hidrozoa, Porifera, Bryozoa, Nemertini.

Poluarea apei are un rol capital în distribuția comunităților benthice. (Arscott et.al., 2002). Scăderea oxigenului dizolvat din apă și impactul poluării industriale cu diferiți compuși anorganici duc la eliminarea plecopterelor, reducerea treptată a trichopterelor și a speciilor cele mai sensibile din efemeroptere. În ceea ce privește poluarea organică, *Baetidele* ca familie prezintă o varietate a sensibilității, unele fiind mai tolerante, altele mai sensibile. Dipterele familiei *Simuliidae* preferă biotopii lotici deși unele specii ale genului pot supraviețui o scurtă perioadă de timp (Hynes, 1970).

Încă din anul 1920, Thienemann a formulat niște principii ecologice conform cărora, cu cât condițiile de mediu sunt mai apropiate de optim, cu atât numărul speciilor este mai mare și numărul indivizilor este mai mic. Invers, cu cât condițiile de mediu sunt mai îndepărtate de normal, cu atât numărul de specii va scăde și cel de indivizi va crește.

PARTEA A II-A – CONTRIBUȚII PERSONALE

PART II – PERSONAL CONTRIBUTIONS

CAPITOLUL 5. LOCUL DESFĂȘURĂRII EXPERIMENTELOR, SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRIILOR

CHAPTER 5. PLACE OF EXPERIMENTS, AIM AND OBJECTIVES OF THE RESEARCH

Extinderea și dezvoltarea zonei montane a Depresiunii Dornelor a impus protecția și conservarea unor habitate, declarate rezervațiilor naturale protejate, precum și a unor specii faunistice și floristice cu deosebită importanță ecologică, științifică, peisagistică și culturală, de interes național și internațional.

Zona se caracterizează printr-un potențial hidrologic mare, atât de suprafață (râurile Dorna, Bistrița și afluenții lor), cât și subteran. Râul Bistrița, are în total 288 km, având cel mai lung traseu montan dintre râurile din România. Râul Dorna și râul Neagra izvorăsc din Munții Călimani, primul are 53 km și este cel mai important afluent al râului Bistrița, al doilea are 34 Km.

Suprafața agricolă a depresiunii reprezintă 26.28 % din suprafața totală. Din total suprafață agricolă terenurile arabile ocupă doar 4.03%, restul fiind reprezentat de pășuni și fânețe, susținând astfel sectorul zootehnic, în special creșterea bovinelor -70.94%, fiind urmată de creșterea ovinelor, ecvinelor, caprinelor și a altor specii. Valorificarea produselor lactate este un brand național cunoscut: LaDorna.

Pentru identificarea influențelor antropice în bazinul hidrografic al Dornelor, prezentul studiu a fost realizat în vederea caracterizării încărcăturii parazitare a unor emisari principali de la care au fost colectate și analizate probe din zece stații de lucru de pe pâraurile Bancu, Secu și Călimănel. În mod similar, pentru analizele fizico-chimice periodice ale apei emisarilor au fost utilizate aceleași puncte de lucru, ca și pentru probele recoltate în vederea analizelor microbiologice.

Teza de doctorat a fost realizată pe parcursul a 5 ani de studii, cu stagii de specializare la Facultatea de Medicină Veterinară din Timișoara și cu prelucrarea probelor în laboratorul de Parazitologie a Facultății de Medicină Veterinară din Iași precum și Laboratoarele unui grup de firme la care lucrez.

Scopul lucrării a fost acela de a corobora o succesiune de date provenite din analiza calității apei unor emisari din bazinul Dornelor, pentru a evalua aceste ecosisteme acvatice dintr-o modalitate holistă de abordare, pentru a oferi o imagine cât mai reală a statusului ecologic al acestui important bazin hidrografic, și pentru a realiza un studiu necesar celor care doresc să dezvolte zona aceasta, pe de o parte din punct de vedere al utilizării resurselor de ape minerale, pe de altă parte pentru dezvoltarea agroturismului și a creșterii animalelor în micro-ferme, la toate fiind nevoie de o rezoluție a impactului antropic.

Ca și **obiective**, s-au stabilit afluenții destinați studiului și zonele de recoltare a probelor, în amonte și aval de unele așezări urbane, urmărind concomitent, pentru a avea o analiză comparativă, următoarele analize pe patru paliere:

1. o analiză a încărcăturii parazitare cu specii de protozoare zoonotice
2. o analiză a indicatorilor fizico-chimici ai apei:
 - temperatură, pH, substanțe organice, conductivitate, oxigen dizolvat, alcalinitate, duritate
 - determinarea nitraților și nitriților (spectrofotometric și colorimetric)
 - determinarea anionilor și a cationilor dizolvați
 - determinarea anionilor și a cationilor dizolvați în apă prin cromatografie ionică
3. o analiză a parametrilor microbiologici și urmărirea biomasei algale în corelație cu sursele de poluare:
 - NTG
 - bacterii coliforme
 - determinarea coliformilor și a speciei *Pseudomonas aeruginosa*
 - determinarea sporilor de bacterii sulfito-reducătoare
 - determinarea biomasei algale: alge verzi, diatomee, criptofite, alge albastre
4. o analiză a macrozoobentosului care este expresia sintetică a calității generale a apelor curgătoare:
 - trierea manuală a probelor din fiecare curs de apă, de pe cele 10 stații de colectare, corelate cu tipurile de substrat în faciesul lotic cu prelevatorul de tip Surber și determinarea până la nivel de familie sau clasă a taxonilor colectați cu ajutorul cheilor de determinare.

Gradul de noutate și originalitatea acestor studii

Pornind de la tema lucrării de față, în cadrul laboratorului de microbiologie, în anul 2022 am reușit transpunerea în activitatea curentă a metodei de izolare și indentificare a chisturilor de *Giardia* și a oochisturilor de *Cryptosporidium* din apă, matricea fiind deja autorizată DSVSA și în curs de acreditare RENAR, conform standardului internațional ISO 15553.

Au fost recoltate probe de pe pâraiele -Bancu, Secu, Arinu și Călimănel în total din zece stații în amonte și aval de zonele antropizate, cu eventuale poluări prin prezența micro-fermelor private, din 4 zone ale afluenților astfel:

S-au fixat două stații de prelevare, pe Pârâul Bancu una în sat aproape de vărsarea în râul Teșna și una la ~10 km în amonte, într-o zonă în care influența factorului antropic este redusă.

S-au fixat 2 stații de prelevare, pe Pârâul Secu, una în sat, la vărsarea în râul Dorna și una la ~ 5 km în amonte, într-o zonă în care factorul antropic intervine în mică măsură.

S-au fixat două stații de prelevare, pe Pârâul Arinul una în sat, la vărsarea în Bistrița și una ~ 7 km în amonte, într-o zonă în care apele au un grad redus de poluare umană, datorită lipsei factorului antropic, conform schiței de mai jos:

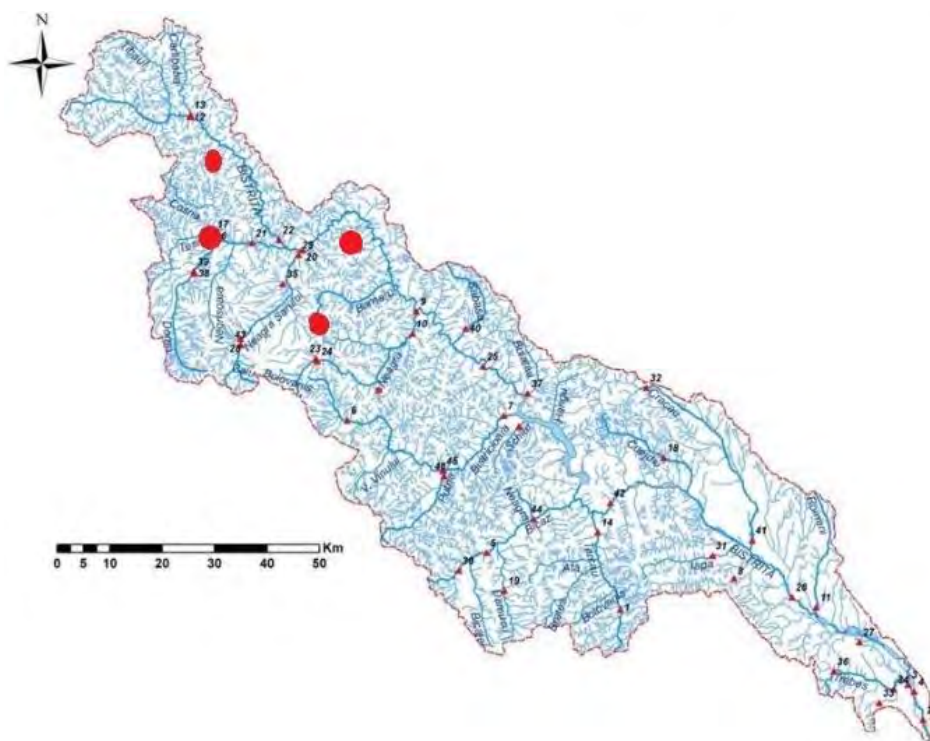


Fig. 5.1. Stații de colectare a probelor din bazinul Dornelor
Fig. 5.1. Sample collection stations from the Dornelor basin
(Source: Cojoc et al. 2016)

S-au fixat 4 stații de colectare, una în satul Coverca și 3 în amonte la ~ 3 / 5 / 7 km, din 3 pâraie de alimentare, în zone cu influență antropică diferită, pe pârâul Călimănel care este afluent de dreapta al râului Neagra, cu o lungime de 12 km după cum se poate observa în schema de mai sus.

CAPITOLUL 6. METODE DE DEPISTARE CANTITATIVĂ ȘI CALITATIVĂ A OOCISTURILOR DE *CRYPTOSPORIDIUM* ȘI A CHISTURILOR DE *GIARDIA* DIN APELE DE SUPRAFAȚĂ

CHAPTER 6. METHODS OF QUANTITATIVE AND QUALITATIVE DETECTION OF *CRYPTOSPORIDIUM* OOCYSTS AND *GIARDIA* CYSTS IN SURFACE WATERS

Concentratul de apă rezultat în urma filtrării și centrifugării probelor, ~ 8 ml, a fost prelucrată după metoda descrisă și utilizată de către Agenția pentru Protecția Mediului a Statelor Unite (metoda USEPA 1623). Izolarea oocisturilor de *Cryptosporidium spp* și *Giardia spp* s-a realizat prin separarea imunomagnetică (IMS), folosind kit-ul GC-Dynabeads™ Combo (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Lithuania), în conformitate cu instrucțiunile producătorului. Concentrația finală obținută (100 µl) a fost împărțită în două jumătăți. Prima repriză a fost folosită pentru identificarea și numărarea oocisturilor de *Cryptosporidium spp.* și *Giardia spp.* prin microscopie imunofluorescentă (IFA), (Motic-031, Motic Corporation LTD., Wetzlar, Germania), după colorarea cu marker fluorescent (FITC) a anticorpilor monoclonali (Merifluor®, *Cryptosporidium/ Giardia*, Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, SUA), în conformitate cu recomandarea producătorului.

6.1. Izolarea și identificarea oocisturilor de *Cryptosporidium spp.* și a chisturilor de *Giardia spp.*

Pentru izolarea și identificarea oocisturilor de *Cryptosporidium spp.* și a chisturilor de *Giardia spp.* s-a folosit protocolul de lucru adaptat de colegii de la Facultatea de Medicină Veterinară din Timișoara, care include următoarele etape:

- Prelevarea probei de apă + Filtrarea probei de apă + Spălarea filtrului în laborator
- Centrifugarea succesivă a concentratului
- Separarea imunomagnetică a oocisturilor
- Colorarea prin tehnica imunofluorescenței
- Examinarea la microscopul cu lumină fluorescentă
- Cuantificarea prezenței sau absenței oocisturilor
- Caracterizarea moleculară a speciilor

6.1.1. Prelevarea probelor de apă

Probele de apă s-au colectate din cele 10 stații de prelvare stabilite la începutul studiului, în cursul anului 2017, din luna mai până în luna octombrie, urmând ca în aceeași perioadă a

anului 2018 să fie continuate cercetările. Pentru prelevare s-au folosit bidoane de inox de 30 de litri fiecare, spălate și dezinfectate în prealabil. Din fiecare stație s-au prelatat câte 2 bidoane, adică aproximativ 60 litri -fig 6.1(a).

În fiecare lună, prelevarea probelor din cele 10 stații s-a efectuat în decursul a 2 zile, probele fiind transportate imediat cu mașina către laborator pentru a evita încălzirea probelor care favorizează dezvoltarea microorganismelor, care pot afecta oochisturile paraziților. fig. 6.1(b). Fiecare bidon s-a notat cu numele stației, data și ora prelevării.



(a)



(b)



(c)

Fig.6.1. Prelevarea probei de apă de pe pârau (a).Transportul la laborator (b).

Dispozitiv bicameral de filtrare (c)

Fig.6.1. Taking the water sample from the stream (a). Transport to the laboratory (b). Two-chamber filter device (c)

6.1.2. Filtrarea probelor de apă

Probele de apă s-au filtrat utilizând un dispozitiv bicameral, cu pereți din plastic transparent, legat de o pompă de imersie, conectate la un acumulator auto. (Fig 6.1.(c)). Pentru fiecare probă s-a pregătit în prealabil, din laborator, câte un recipient steril cu volum de aproximativ 600 ml și un filtru cu porozitate de 2 microni, de unică folosință, capacul recipientului fiind notat cu datele de identificare ale probei (fig. 6.2.; fig. 6.3).



(a)



(b)

Fig.6.2. Recipienți sterili cu filtre de unică folosință (a) Recuperarea filtrului la finalul filtrării(b)

Fig.6.2. Sterile containers with disposable filters (a); retrieving the filter at the end of filtering(b)

Pentru a realiza filtrarea probelor se parcurg următorii (11) pași:

- se așează un filtru de unică folosință în camera superioară a dispozitivului, prin apăsarea, în lăcașurile speciale ale separatorul dintre camerele dispozitivului,
- se fixează capacul prin înfiletarea moderată a sistemelor de prindere,
- se introduce în apă capătul furtunului care intră în dispozitivul de filtrare, furtun care în capăt trebuie să aibă un filtru pentru a reține impuritățile grosiere,
- se conectează pompa de lichide un acumulator (baterie auto),
- se pornește pompa
- se filtrează cantitatea de apă care o permite filtrul (adică până când pompa trage foarte greu)
- se oprește pompa
- se deschide camera superioară prin desfiletare sistemului de prindere
- caseta de filtrare se îndepărtează din camera de filtrare și se așează în recipientul steril, peste care se adaugă cca. 400 de ml din apa rămasă în camera superioară, de filtrare, pentru a evita deshidratarea filtrului –fig.6.2.(b)
- se notează volumul de apă filtrat, pentru a fi folosit ulterior la raportarea rezultatelor,
- se spală aparatul cu apă curată pentru a evita contaminarea încrucișată.

Filtrarea probelor s-a efectuat în ziua prelevării, seara. Recipienții cu proba s-au pastrat la frigider, în laborator, până la momentul prelucrării probelor, de obicei sâmbătă partea de centrifugare și duminică restul pașilor. Cantitatea filtrată, a variat în cazul probelor preluate în 2017, de la 15 litri (în luna septembrie în cazul probei prelevate din stația Bancu jos) până la 60 de litri de apă (în cazul mai multor probe, în mai multe luni). Pentru probele preluate în 2018, cantitatea a variat de la 5 litri (în luna august în cazul probelor prelevate de la stațiile Arinu sus și Arinu jos, probe prelevate după o ploaie puternică), până la 60 de litri de apă (în cazul mai multor probe, în mai multe luni). Cantitatea totală de apă filtrată în 2017 a fost de 2654 L, cu o

medie de 44,23 L / stație / lună, iar în 2018 a fost de 2250 L, cu o medie de 37.5 L / stație / lună. S-a urmărit volumul de apă filtrat pe debitmetrul dispozitivului de filtrare, dar pentru acuratețea datelor, de fiecare dată s-a măsurat exact cantitatea de apă rămasă după filtrare. Cantitatea de apă filtrată în fiecare lună, din fiecare stație, a fost înregistrată în fișele de lucru (tab.6.1.). Recipientii cu probele (filtrele) se transportă în laborator, filtrarea realizându-se în afara laboratorului, pentru a evita manipularea suplimentară a bidoanelor cu apă.

Tab.6.1. Volume de probă filtrate în 2017 - 2018 pentru identificarea oocisturilor de *Cryptosporidium* și a chisturilor de *Giardia*

Tab.6.1. Sample volumes filtered in 2017 - 2018 for the identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts

STAȚIE PRELEVARE	2017						2018						total	medie
	Cantitate filtrată, (litri)													
	mai	iun	iul	aug	sept	oct	mai	iun	iul	aug	sept	oct	stație	stație
Secu jos	30	55	30	30	30	30	20	20	30	20	30	30	355	29.6
Secu sus	56	45	60	60	30	60	60	40	40	20	60	60	591	49.3
Arinu jos	45	35	30	30	30	30	30	20	30	5	30	25	340	28.3
Arinu sus	58	30	60	60	55	60	45	60	60	5	60	30	583	48.6
Bancu jos	47	45	30	30	15	30	25	10	30	20	30	50	362	30.2
Bancu sus	55	30	60	60	40	60	60	30	50	40	60	10	555	46.3
Călimănel jos (în Panaci)	28	55	30	30	30	30	30	15	30	25	30	15	348	29.0
Călimănel jos (în Buciniș)	25	55	30	30	30	30	30	30	30	25	30	25	370	30.8
Călimănel sus (pârâu)	60	55	60	60	60	60	60	60	60	60	60	30	685	57.1
Călimănel sus (fermă)	60	55	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	715	59.6
Total / lună	464	460	450	450	380	450	420	345	420	280	450	335	4904	40.86
Medie / lună	46.4	46	45	45	38	45	42	35	42	28	45	34		
Total / an	2654						2250							

6.1.3. Spălarea filtrului, centrifugarea concentratului inițial, obținerea concentratului final

În laborator, se realizează toate etapele următoare ale protocolului de lucru pentru identificarea oocisturilor de *Cryptosporidium* și chisțurilor de *Giardia*.

Volumul de probă din recipientii ajunși în laborator se măsoară exact cu ajutorul unor cilindri gradati sterili și se adaugă apă distilată până la gradația de 450 ml. În fiecare probă se adaugă 45 ml (10%) soluție de spălare PET și se agită bine. Soluția PET 10X conține 2 g pirofosfat de sodiu, 3 g trisodium EDTA, 1 ml Tween 20 și apă distilată până la 1000 ml și are rolul de a facilita desprinderea (oo)chisturilor de pe filtru în timpul spălării. Fiecare filtru se

spală atent în laborator pentru a îndepărta tot reziduul, folosind o periută (dezinfectată în prealabil în clor și alcool și la final clătită cu apă distilată), cum se poate observa în fig. 6.3.(a). În urma spălării rezultă o cantitate de aproximativ 450 de ml de concentrat inițial (apă tulbure), care se repartizează în tuburi Falcon de ~ 45 - 50 ml.



(a)



(b)



(c)

Fig. 6.3.(a). Spălarea filtrelor;(b) centrifugarea concentratului inițial; obținerea concentratului final în tuburile Dynal

Fig. 6.3.(a). Filter washing; (b) centrifugation of the initial concentrate (c) obtaining the final concentrate in Dynal tubes

Centrifugarea concentratului inițial. (fig. 6.3.(b)). Centrifugarea se realizează în mai multe etape, în tuburi Falcon de 50 ml (~ 8 - 9 tuburi) până se ajunge la un volum final de 8 - 10 ml concentrat final. Pentru fiecare probă, după centrifugări se tot elimină o parte din supernatant și se amestecă sedimentele din toate tuburile inițiale, se clătesc cu supernatant și apă distilată până se ajunge în final la 1-2 tuburi, cu sedimentul din toată proba, care se recentrifugează. Se elimină din nou supernatantul din tuburile finale, rămânând cca. 3-5 ml de concentrat final în fiecare tub. Acest sediment de concentrat final din tuburile Falcon finale se agită pe Vortex și se trece în câte un tub Dynal, pregătindu-se pentru separarea imunomagnetică. Tuburile Falcon se clătesc cu cca. 3 ml apă distilată, care se trece din unul în altul, pentru a recupera cât mai mult sediment, se agită pe agitatorul Vortex și se adaugă în final peste sedimentul din tubul Dynal, rezultând aproximativ 10 ml probă.

6.1.4. Separarea imunomagnetică

Separarea imunomagnetică a oocisturilor de *Cryptosporidium spp.* și a chisturilor de *Giardia spp.* se realizează prin utilizarea kitului comercial Dynabeads™ GC-Combo', care include toți reactivii necesari. De fiecare dată înainte de folosire, toți reactivii se agită pe Vortex. În fiecare tub Dynal care conține o probă se introduc reactivii din kit:

- 1 ml Buffer A 10X SL agitată în prealabil
- 1 ml Buffer B 10X SL agitată în prealabil

Se agită pe Vortex tubul cu probă + soluțiile Buffer

Se adaugă apoi:

- 100 μ L anti-*Cryptosporidium* agitat în prealabil
- 100 μ L anti-*Giardia* agitat în prealabil

Fiecare anti-*Cryptosporidium* și anti-*Giardia* conțin pilitură metalică "legată" de anticorpi specifici, care vor interacționa cu antigenele *Cryptosporidium*, respectiv *Giardia*, dacă există în probă. Fiecare tub Dynal se agită manual foarte bine, apoi se fixează în mixerul MX-1 pentru agitare la 15 - 20 rotații / minut, timp de cel puțin 1 h, la temperatura camerei

În acest timp se pregătește soluția Buffer A 1X SL necesară pentru după agitare:

- într-un tub eppendorf se introduc 100 μ L Buffer A 10X SL agitată în prealabil
- se adaugă 900 μ L apă distilată, se introduce 0,4 ml într-un tub eppendorf curat

După 1 oră de agitare, tubul Dynal cu probă se introduce în magnetul mare MPC-1, se ține în poziție orizontală, iar apoi se agită timp de 2 minute, prin înclinarea la 90° (dacă proba stă nemișcată mai mult de 20 secunde, trebuie repetat pasul de agitare în magnetul MPC-1.

- se golește lichidul din tubul Dynal într-un flacon de plastic (se poate arunca)
- pe peretele tubului Dynal, în zona magnetului, rămâne toată pilitura
- se adaugă 1 ml PBS și se spală tubul

Soluția PBS se prepară prin dizolvarea unor pastile cumparate.

- se atașează la magnetul MPC-1, se agită prin răsturnări repetate și se urmărește ca pe perete să fie pilitură
- se golește PBS-ul peste lichidul din flaconul de plastic (se poate arunca)
- se scoate tubul Dynal din magnetul MPC-1 și se adaugă 0.4 ml Buffer 1X SL (deja preparat și măsurat în tubul eppendorf) și se agită ușor pentru a resuspenda materialul din tub
- se transferă lichidul în tubul eppendorf și se atașează la magnetul mic MPC S
- apoi se trece înapoi în tubul Dynal și se agită pe vortex, pentru a nu mai rămâne nimic pe pereti; se repetă acești 2 pași, de câteva ori, agitându-se și pe Vortex
- se transferă înapoi în tubul eppendorf, se așează în magnetul mic MPC S și se răstoarnă de câteva ori, pentru a se fixa toată pilitura de magnet
- se aruncă buffer-ul și pilitura rămâne pe peretele cu magnet
- se elimină tot lichidul cu o pipetă
- se scoate magnetul din dispozitivul MPC S
- se adaugă 50 μ L HCl 0.1N în tubul eppendorf pentru a dizloca pilitura metalică, de fapt complexul antigen – anticorp, se agită pe vortex
- în contact cu HCl la temperatura camerei, timp de 10 minute, se detașează pilitura metalică de complexul antigen - anticorp; proba trebuie să fie la baza tubului
- se pune introduce magnetul în dispozitivul MPC S în poziția înclinat și se ține tubul nemișcat 10 sec - 2 min.

6.1.5. Colorarea prin tehnica imunofluorescenței

Colorarea prin tehnica imunofluorescenței se realizează cu ajutorul kitului Merifluor

Combo C&G 50 Tests, folosind un volum de 50 μ l de concentrat rezultat în urma separării imunomagnetice.

Pentru realizarea colorării se parcurg următorii pași:

- se ia tot HCl cu o micropipită și se pune pe o lamă specială a KIT-ului, care are cate 3 godeuri transparente,
- se etalează proba și standardele de control.
- în tubul eppendorf se mai adaugă 25 μ l HCl
- se lasă încă 10 min
- se introduce magnetul în dispozitivul MPC S,
- se ia tot acidul cu o micropipeta și se pune pe lamă
- pe lamă se pun 7.5 μ l NaOH 1M pentru neutralizarea acidului
- se iau de pe lamă 40 μ l (cca. 1/2 din cantitate) și se trec într-u tub eppendorf curat și se păstrează pentru a face PCR -ul în cazul unor rezultate pozitive
- pe lamă, se pun standardele + și - , cate 20 μ l în cate un godeu transparent
- se lasă la uscat, la temperatura camerei, nu direct pe o sursă de căldură
- pe proba uscată se pune o picătură de *Detection reagent*,
- apoi se pune o picătură din colorantul fluorescent *Counterstain*
- se omogenizează cu o ansă de unică folosință
- se lasă la întuneric, la temperatura camerei, 30 minute
- se spală cu soluția de spălare, *20X wash Buffer*, folosind o pipetă, lăsând sa curgă lichidul ținând lama în poziție orizontală
- se lasă la scurs pe un șervețel, punând lama tot în poziție orizontală
- se sterge marginea lamei cu un șervețel, astfel încât să rămână umed doar godeul
- se pune câte o picătură de lichid de montare (*Mounting medium*)
- se pune deasupra lamela

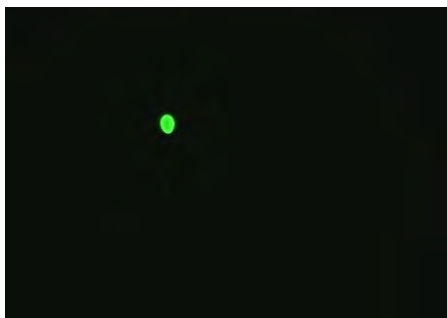
6.1.6. Examinarea la microscop a preparatului colorat și fixat

Preparatul colorat și fixat este examinat la microscopul cu lumină fluorescentă, dotat cu o cameră foto pentru capturarea imaginilor și transferarea lor direct în calculator.

Prima dată se vizualizează martorii pozitiv și negativ, pentru a avea dovada colorării și fixării corespunzătoare. În continuare, sunt vizualizate pe rând toate probele, cu atenție maximă, pentru a parcurge întreaga suprafață a fiecărui godeu al lamelor.

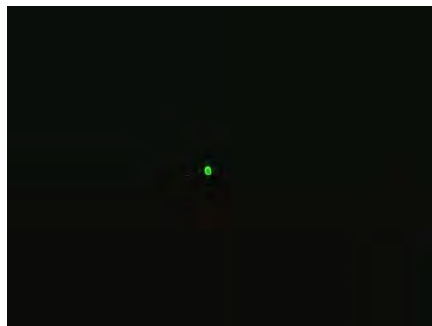
În probele prelevate în 2017 - 2018 s-au identificat chisturi de *Giardia spp* (Fig. 6.4 a) și oochisturi de *Cryptosporidium spp* (Fig. 6.4 b) în probe prelevate din toate stațiile, în toate lunile, cu diferențe de la lună la lună și de la stație la stație.

În cazul probelor pozitive se capturează imagini cu chisturile sau oochisturile găsite în probe.



Chist de *Giardia spp.* în proba prelevată din
pârâul Bancu jos, stația din sat, august 2017
*Cyst of Giardia spp. in the sample taken
from Bancu down stream, village station,
August 2017*

(a)



Oochist de *Cryptosporidium spp* în proba
prelevată din pârâul Bancu sus, stația
amonte, mai 2017
*Oocyst of Cryptosporidium spp in the
sample taken from Bancu up stream,
upstream station, May 2017*

(b)

Fig. 6.4. Imagini cu chisturi de *Giardia spp.* (a) și oochisturi de *Cryptosporidium spp.* (b) în probele de apă recoltate din stațiile de lucru

Fig.6.4. Images of Giardia spp. cysts (a) and Cryptosporidium spp. oocysts (b) in water samples collected from work stations

Pentru ***Giardia spp.*** în intervalul mai - octombrie 2017 s-au identificat 39 de probe pozitive cu 108 chisturi vizualizate la microscop, ceea ce înseamnă o medie 18 chisturi / lună.

În intervalul mai - octombrie 2018 s-au identificat 23 de probe pozitive cu 31 chisturi vizualizate, ceea ce înseamnă o medie 5.1 chisturi / lună, fiind mai multe stații (Sesu sus, stațiile de la Călimănel sus), cu probe negative în mai multe luni.

În luna mai 2017 au fost 5 probe pozitive, cu un total de 13 chisturi vizualizate, înregistrându-se un maxim de 8 chisturi în proba prelevată din stația Călimănel sus (fermă).

În luna mai 2018 au fost cele mai multe probe pozitive, 6 la număr, cu un total de 9 chisturi vizualizate, dar cu cel mult 2 chisturi / probă.

În luna iunie s-au înregistrat cele mai multe valori pozitive, în 8 din cele 10 stații de prelavare și anume au fost vizualizate 39 chisturi, dintre care 13 chisturi doar în proba prelevată din stația Secu jos, cea mai mare încărcătură din anul 2017.

În luna iunie 2018 s-au înregistrat probe pozitive la 5 stații, cu un maxim de 2 chisturi / probă, fiind vizualizate în total 7 chisturi.

În luna iulie au fost 7 probe pozitive, cu un total de 14 chisturi vizualizate, dar numărul de chisturi pe probă a fost de maxim 3.

În luna iulie 2018 au fost 3 probe pozitive, fiecare cu câte un chist vizualizat.

În luna august au fost 7 probe pozitive, cu un total de 17 chisturi vizualizate și cu un maxim de 8 chisturi în proba prelevată din stația Călimănel jos (în Panaci).

În luna august 2018 au fost 4 probe pozitive, cu un total de 5 chisturi vizualizate.

În luna septembrie au fost tot 7 probe pozitive, cu un total de 19 chisturi vizualizate și cu un maxim de 8 chisturi în proba prelevată din acstația Călimănel jos (în Panaci).

În luna septembrie 2018 au fost 2 probe pozitive, cu câte 2 chisturi vizualizate.

În luna octombrie au fost 5 probe pozitive, cu un total de 6 chisturi vizualizate, dar numărul de chisturi pe probă a fost de maxim 2, fiind luna cu cea mai scăzută încărcătură din 2017.

În luna octombrie 2018 au fost 3 probe pozitive, cu 3 chisturi vizualizate, fiind de asemenea cea mai redusă încărcătură a anului 2018. (tab.6.2).

Tab.6.2. Nr. chisturi de *Giardia spp* identificate în stațiile de lucru în 2017 - 2018

Tab.6.2. No. cysts of *Giardia spp* identified in workstations in 2017 – 2018

STAȚIE PRELEVARE	2017						2018						total stație	medie stație
	Chisturi <i>Giardia spp</i>													
	mai	iun	iul	aug	sept	oct	mai	iun	iul	aug	sept	oct		
Secu jos	0	13	3	2	2	0	2	1	0	0	0	0	23	1.9
Secu sus	0	3	0	1	2	1	0	0	0	0	2	1	10	0.8
Arinu jos	1	3	2	1	3	2	2	0	1	1	0	0	16	1.3
Arinu sus	2	6	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	12	1.0
Bancu jos	1	2	2	1	1	1	2	0	1	0	0	0	11	0.9
Bancu sus	0	1	1	0	2	0	0	0	0	1	0	0	5	0.4
Călimănel jos (în Panaci)	0	7	2	8	8	0	1	2	1	2	2	0	33	2.8
Călimănel jos (în Buciniș)	1	4	2	3	0	1	1	1	0	0	0	1	14	1.2
Călimănel sus (pârâu)	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	3	0.25
Călimănel sus (fermă)	8	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	12	1.0
Total / lună	13	39	14	17	19	6	9	7	3	5	4	3	139	1.15
Medie / lună	1.3	3.9	1.4	1.7	1.9	0.6	0.9	0.7	0.3	0.5	0.4	0.3		
Total / an	108						31							
Medie / an	18						5.1							

Dintre cele 10 stații de prelevare, încărcătura cea mai mare s-a înregistrat la Călimănel jos (Panaci), urmată de stația Secu (jos). La extrema cealaltă, cea mai redusă încărcătură s-a înregistrat la Călimănel sus (pârâu), urmată de stația Bancu sus. În ambele stații au fost mai multe luni în care nu s-au identificat chisturi de *Giardia spp.* (Fig 6.5.)

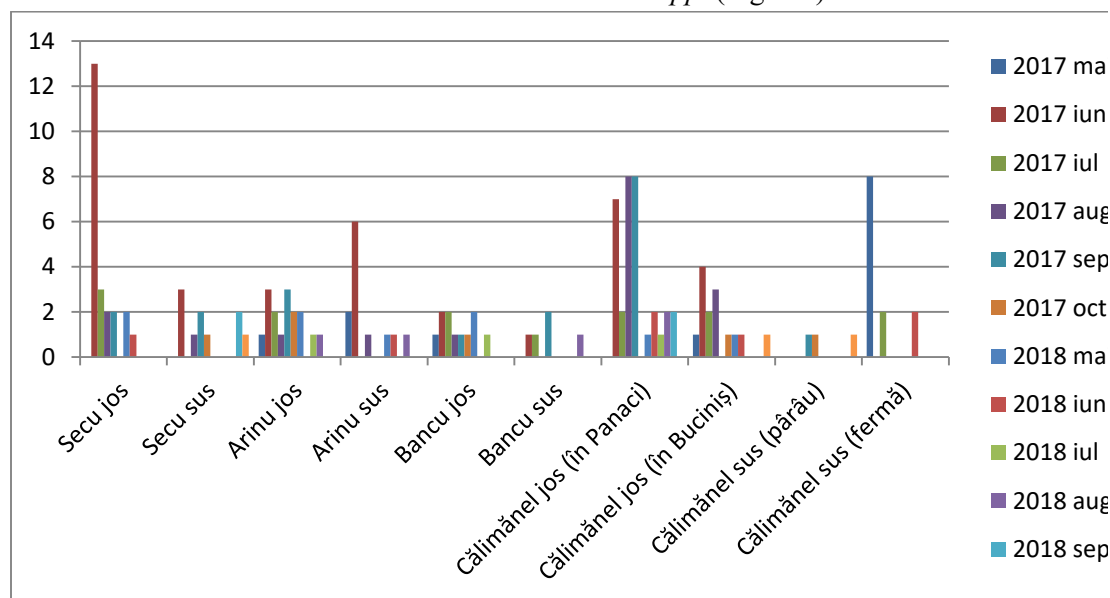


Fig 6.5 . Nr. de chisturi de *Giardia spp.* pe luni, în probele prelevate din afluenți din bazinul Dornelor în 2017 - 2018

Fig. 6.5. No. of cysts of *Giardia spp.* per month, in the samples taken from the tributaries of the Dornelor basin in 2017 – 2018

Probele prelevate în 2017 au avut o încărcătură semnificativ mai mare față de 2018, această diferență fiind datorată cantităților diferite de precipitații, care în 2018 au fost mult mai scăzute, în special sub formă de ploi torențiale, dar de scurtă durată, în timp ce 2017 au fost un an cu o vară ploioasă.

Pentru *Cryptosporidium spp.* în intervalul mai - octombrie 2017 s-au identificat 13 de probe pozitive cu 13 oochisturi vizualizate la microscop, ceea ce înseamnă o medie 2.16 oochisturi / lună.

În intervalul mai - octombrie 2018, numărul probelor pozitive a fost la jumătate, identificându-se doar 6 probe pozitive cu 6 oochisturi vizualizate la microscop, ceea ce înseamnă o medie 1 oochist / lună, fiind mai multe luni cu majoritatea probelor negative. (tab. 6.3; Fig 6.6).

Tab. 6.3. Nr. de oochisturi de *Cryptosporidium spp.* pe luni, în probele prelevate din afluenți din bazinul Dornelor în 2017 - 2018

Tab. 6.3. No. of cysts of *Cryptosporidium spp.* per month, in the samples taken from the tributaries of the Dornelor basin in 2017 – 2018

STAȚIE PRELEVARE	2017						2018						total	medie
	Chisturi <i>Cryptosporidium spp</i>													
	mai	iun	iul	aug	sept	oct	mai	iun	iul	aug	sept	oct	stație	stație
Secu jos	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0.25
Secu sus	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	3	0.25
Arinu jos	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.1
Arinu sus	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0.2
Bancu jos	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.1
Bancu sus	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	4	0.3
Calimanel jos (in Panaci)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	0.2
Calimanel jos (in Buciniș)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.1
Calimanel sus (parau)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
Calimanel sus (ferma)	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.2
Total / lună	2	1	3	4	3	0	1	2	1	0	1	1	19	0.15
Medie / lună	0.2	0.1	0.3	0.4	0.3	0	0.1	0.2	0.1	0	0.1	0.1		
Total / an	13						6							
Medie / an	2.16						1							

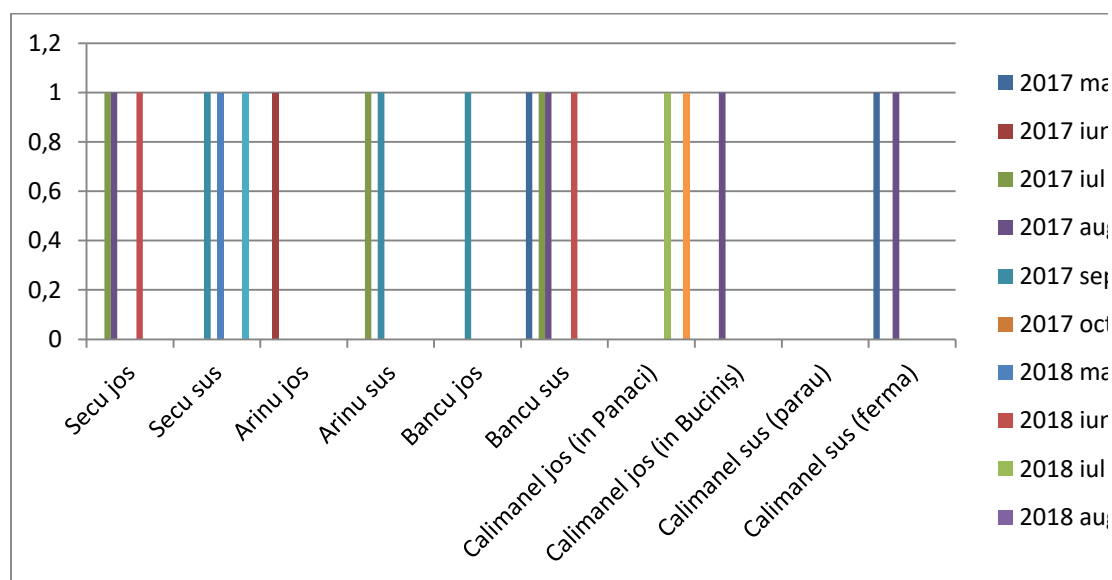


Fig. 6.6. Nr. de oochisturi de *Cryptosporidium spp.* pe luni, în probele prelevate din afluenți din bazinul Dornelor în 2017

Fig. 6.6. No. of cysts of *Cryptosporidium spp.* per month, in the samples taken from the tributaries of the Dornelor basin in 2017

Caracterizarea moleculară a speciilor

A doua jumătate rezultată din cei 80 μ l de produs Dynabeads a fost analizată la Facultatea de Medicină Veterinară din Timișoara pentru extracție ADN, PCR - RFLP și secvențare, pornind de la un volum de 40 μ l de concentrat.

Un total de 27 (22.5%) de probe din 120 prelucrate au arătat benzi caracteristice speciei *Giardia duodenalis* (cunoscut anterior *Giardia intestinalis*) la dimensiuni de 432 bp (Fig. 6.7). Tehnicile de secvențare pe catena "forward" a celor 15 ampliconi de *Giardia duodenalis* s-a realizat cu succes în cazul a 13 izolate. Ansamblurile genotipice identificate au fost *Giardia duodenalis* ansamblul E (9 din 13 izolate – 69.2%), *Giardia duodenalis* ansamblul A (3 din 13 izolate – 23.1%), respectiv *Giardia duodenalis* ansamblul D (1 din 13 izolate – 7.7%).

Pentru *Cryptosporidium spp.* în intervalul mai - octombrie 2017 s-au identificat 13 probe pozitive cu 13 chisturi vizualizate la microscop, ceea ce înseamnă o medie 2.166 chisturi / lună. Pentru *Cryptosporidium spp.* lună cu încărcătura cea mai mare a fost august cu 4 oochisturi vizualizate, iar în luna octombrie toate probele au fost negative. În probele pozitive nu s-a vizualizat mai mult de un oochist. În intervalul mai - octombrie 2018 s-au identificat 6 probe pozitive cu 6 chisturi vizualizate la microscop, ceea ce înseamnă o medie 1 chist / lună.

Pentru *Cryptosporidium spp.* luna cu încărcătura cea mai mare a fost iunie cu 2 oochisturi vizualizate, iar în luna august toate probele au fost negative. În probele pozitive nu s-a vizualizat mai mult de un oochist. Probele prelevate din stațiile Arinu jos, Arinu sus, Bancu

jos, Călimănel jos (în Buciniș), Călimănel sus (pârâu) și Călimănel sus (fermă) au avut toate probele negative în cursul anului 2018.

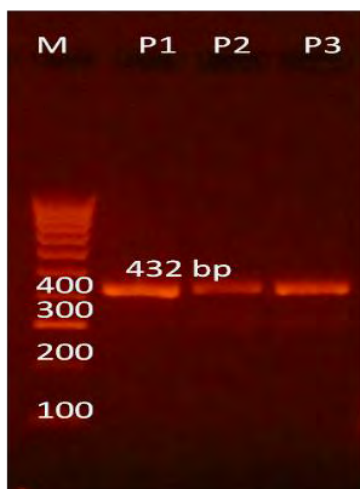


Fig.6.7. Imaginea gelului de electroforeză în diagnosticul molecular al speciei *Giardia duodenalis*; M – marker molecular; P1-P3 – Probe de lucru arătând benzi de migrare caracteristice la 432 baze perechi

Fig.6.7. Image of the gel electrophoresis in the molecular diagnosis of the *Giardia duodenalis* species; M – molecular marker; P1-P3 - Work samples showing migration bands characteristic to 432 base pairs

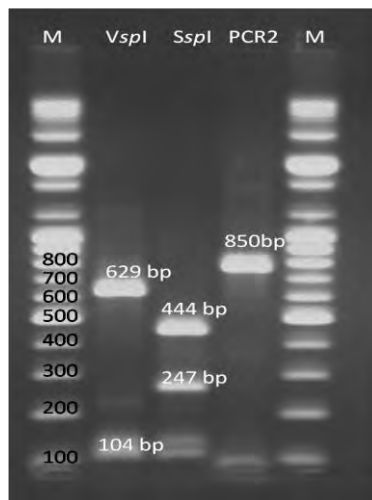


Fig.6.8. Imaginea gelului de electroforeză în diagnosticul molecular al speciei *Cryptosporidium parvum/hominis* obținută în urma amplificării genei SSUrRNA. Coloanele 1 și 5 – markere moleculare (din 100 în 100 bp); coloana 2 – produs de digestie rezultat în urma acțiunii enzimei *VspI*; coloana 3 - produs de digestie rezultat în urma acțiunii enzimei *SspI*; coloana 4 – amplicon de 850 baze perechi caracteristic diagnosticului molecular al genului *Cryptosporidium*

Fig.6.8. Image of the gel electrophoresis in the molecular diagnosis of the *Cryptosporidium parvum/hominis* species, obtained following the amplification of the SSUrRNA gene; Columns 1 and 5 - molecular markers (every 100 bp); column 2 – digestion product resulted after the *VspI* enzyme action; column 3 - digestion product resulted after the *SspI* enzyme action; column 4 - amplicon of 850 base pairs specific to the molecular diagnosis of the *Cryptosporidium* genus

Pe baza analizei genei SSU-rRNA, la 6 (5%) dintr-un total de 120 de probe prelucrate, metoda "*nested PCR*" a dezvăluit că dimensiunea ampliconilor secundari a fost de ~ 850 bp (fig. 6.8.). Mărimea acestor benzi a sugerat faptul că organismele caracterizate din punct de vedere genetic aparțin genului *Cryptosporidium*.

Analiza polimorfismului lungimii fragmentului de restricție (RFLP) a produsului "*nested PCR*" final cu ajutorul endonucleazei *SspI* a relevat două benzi distincte la regiunile 444 și 247 bp (fig. 6.7). Acest fapt sugerează că, este vorba de un parazitism fie cu *Cryptosporidium parvum* fie cu *Cryptosporidium hominis*. Diferențierea dintre aceste două specii s-a făcut cu ajutorul enzimei de digestie *VspI* care a pus în evidență benzi la regiunile de 629 și 104 bp (fig. 6.8). Aceste mărimi au indicat în mod clar că a fost vorba despre un parazitism cu specia *Cryptosporidium parvum*.

Tehnicile de secvențare a celor 6 izolate de *Cryptosporidium parvum* au fost realizate cu succes și au demonstrat faptul că patru (66.6%) izolate au aparținut subtipului familial IIa, iar două (33.3%) subtipului IId. În cadrul acestor familii au fost identificate subtipurile IIaA15G2R1 (n=3), IIaA17R1 (n=1), IIdA19G1 (n=1) și IIdA18G1 (n=1).

Concluzii parțiale

Bazinul Dornelor se indentifică prin numeroase surse de apă de foarte bună calitate, lucru dovedit de faptul că din această zonă provin principalele ape minerale comercializate. Acest studiu a avut ca scop identificarea și caracterizarea unor specii de paraziți care au ca și principală proveniență activitatea antropică.

Speciile de paraziți cercetate au fost *Giardia spp.* și *Cryptosporidium spp.*, reprezentând principalii factori de risc în toxiinfecțiile de origine parazitară în legatură cu consumul de apă.

Cercetările s-au efectuat pe 10 stații de prelevare prestabilite în amonte și în aval de comunitățile antropice, iar scopul a fost atât identificarea din punct de vedere cantitativ, cât și calitativ, mergând până la identificarea speciilor de *Giardia spp.* și *Cryptosporidium spp.* prin teste PCR și secvențiere genomică, indentificându-se speciile *Giardia duodenalis (intestinalis)* și *Cryptosporidium parvum*.

Probele de apă s-au colectate din 10 stații de prelevare stabilite la începutul studiului, în cursul anului 2017, din luna mai până în luna octombrie, precum și în aceeași perioadă a anului 2018.

Pentru *Giardia spp.* în intervalul studiat 2017 - 2018 s-au identificat 62 de probe pozitive cu 139 chisturi vizualizate la microscop, ceea ce înseamnă o medie 11.5 chisturi / lună. Dintre cele 10 stații de prelevare, încărcătura cea mai mare s-a înregistrat la Călimănel jos (Panaci), cu un total de 33 chisturi identificate pe tot intervalul 2017 - 2018, cu o medie de 2.8 chisturi / lună, urmată de stația Secu (jos) cu un total de 23 chisturi vizualizate și ci o medie de 1.9 chisturi / lună.

Cea mai redusă încărcătură s-a înregistrat la Călimănel sus (pârâu), unde totalul chisturilor vizualizate a fost de doar 3, cu o medie de 0.25 chisturi / lună, urmată de stația Bancu

sus cu un total de 5 chisturi identificate și o medie de 0.4 chisturi / lună. În ambele stații au fost mai multe luni în care nu s-au identificat chisturi de *Giardia spp.*

Pentru ***Cryptosporidium spp.*** în intervalul mai - octombrie 2017-2018 s-au identificat 19 de probe pozitive cu 19 oochisturi vizualizate la microscop, ceea ce înseamnă o medie 1.58 oochisturi / lună. Dintre cele 10 stații de prelevare, încărcătura cea mai mare s-a înregistrat la Bancu sus, cu un total de 4 oochisturi identificate pe tot intervalul 2017 - 2018, cu o medie de 0.33 oochisturi / lună, urmată de stațiile Secu cu un total de câte 3 oochisturi vizualizate în 2017 - 2018 și cu o medie de 0.25 oochisturi / lună.

De semnalat este faptul că probele prelevate de la stația Călimănel sus (pârâu) nu s-a înregistrat nici o probă pozitivă pe parcursul întregii cercetări. La stațiile Arinu jos, Bancu jos și Călimănel jos (Buciniș) s-a identificat pe parcursul studiului doar câte 1 oochist de *Cryptosporidium*.

Rezultatele obținute au scos la iveală faptul că apele emisarilor luați în studiu au o încărcătură parazitară redusă și că în amonte așezărilor umane apa are un grad de puritate ridicat. Încărcătura mai mare cu *Giardia spp* și *Cryptosporidium spp.* a corespuns unei activități zootehnice existente în zonă, precum și fondului cinegetic.

Încărcătura parazitară mai redusă în amonte față de aval dovedește influența comunităților umane, iar identificarea exclusivă a speciei zoonotice *Cryptosporidium parvum* poate fi un indicator al efectului pe care îl exercită fermele de bovine din zona rurală, precum și al fondului cinegetic, asupra pâraielor din zona de munte.

Pornind de la tema lucrării de față, în cadrul laboratorului de microbiologie, în anul 2022 anul acesta s-a reușit transpunerea în activitatea curentă a metodei de izolare și indentificare a chisturilor de *Giardia* și a oochisturilor de *Cryptosporidium* din apă, matricea fiind deja autorizată DSVSA și în curs de acreditat RENAR, conform standardului internațional ISO 15553.

CAPITOLUL 7. CARACTERIZAREA PRIN INDICATORI FIZICO-CHIMICI AI EMISARILOR CERCETAȚI ÎN BAZINUL DORNELOR

CHAPTER 7. CHARACTERIZATION THROUGH PHYSICAL-CHEMICAL INDICATORS OF THE EMISSAIRES RESEARCHED IN THE DORNELOR BASIN

7.1. Indicatori fizici ai apei

Măsurarea temperaturii apei

Temperatura apei variază în general în funcție de temperatura atmosferică, având, în zona de munte valori cuprinse între 0 și 15°C, dar în timpul iernii poate coborî sub limita înghețului, iar vara poate urca însă peste aceste valori. Acest parametru fizic afectează direct dezvoltarea organismelor acvatice, dar influențează indirect și unele proprietăți ale apei, cum ar fi solubilitatea sărurilor, de exemplu. Pentru determinarea temperaturii se folosește un termometru obișnuit cu mercur sau alcool, precum și termometul electronic. Exprimarea rezultatelor se face în grade Celsius (°C). În teren, pentru monitorizarea temperaturilor s-a folosit termometrul electronic. În cadrul studiului, probele au fost prelevate în perioada mai - octombrie din 2017 și 2018, media temperaturilor măsurate fiind de 12,08 grade C, cu maxima înregistrată în 2017, iar minima în 2018, toate valorile fiind centralizate în tab. 7.1.

Tab.7.1. Temperaturi înregistrate în afluenți din bazinul Dornelor-2017-2018
Tab.7.1. Temperatures recorded in tributaries of the Dornelor basin-2017-2018

STAȚIE PRELEVARE	2017						2018					
	Mai	Iunie	Iulie	Aug.	Sept.	Oct	Mai	Iunie	Iulie	Aug.	Sept.	Oct.
Secu jos	12.4	13.5	16.4	18.7	13.1	7	14	15.6	13.9	14	13.9	7.9
Secu sus	10.2	11.5	13.5	14.6	11.2	6.7	11	12.6	11.5	11.7	11.1	5.6
Arinu jos	13.4	13.9	17.1	18.3	12.5	7.9	14.8	16.5	14.2	14	15.5	9
Arinu sus	11.8	12.5	14.8	15.7	11	7.2	12.5	14.5	14.5	12.3	12.1	6.3
Bancu jos	13.6	13.9	15.7	19.7	13.6	6.4	15	16.4	15.7	17.5	13.9	7.2
Bancu sus	12.9	13.7	14.9	19.6	12.7	5.9	14.8	15.2	16.6	17.9	11.3	5.2
Călimănel jos (în Panaci)	11.5	12.7	13.2	12.6	10.2	6	7	10.7	13.6	12	12.5	2.3
Călimănel jos (în Buciniș)	11.9	13.1	13.4	12.5	11	6.5	7.4	11.5	15.9	12.4	12.7	3
Călimănel sus (pârâu)	10.7	11.6	13.3	11.9	10.09	5.8	13.9	11.7	17.5	12.4	11.5	3.7
Călimănel sus (fermă)	10.1	11.4	12.9	11.8	10.8	6	9	10.9	16.1	11.7	12.8	3.5
medie / luna	11.85	12.78	14.52	15.54	11.61	6.54	11.94	13.56	14.95	13.59	12.73	5.37
medie / an	12.14						12.02					
medie înregistrări	12.08											

Se observă variații mici de temperatură (fig.7.1., fig. 7.2) între aceleași luni din cei doi ani de studiu, maximul fiind 19,7 grade C pentru luna august 2017. Deasemnea, s-a observat că cele mai mari temperaturi înregistrate au fost cele din august și cele mai scăzute au fost cele din octombrie, atât în 2017, cât și 2018. Temperaturile măsurate în anul 2017 au fost cuprinse între 5,8 grade C (la proba prelevată în data de 27 octombrie de la stația Călimănele sus - pârau) și 19,7 grade C (la proba prelevată în data de 17 august de la stația Bancu jos), cu o medie de 12,14 grade C.

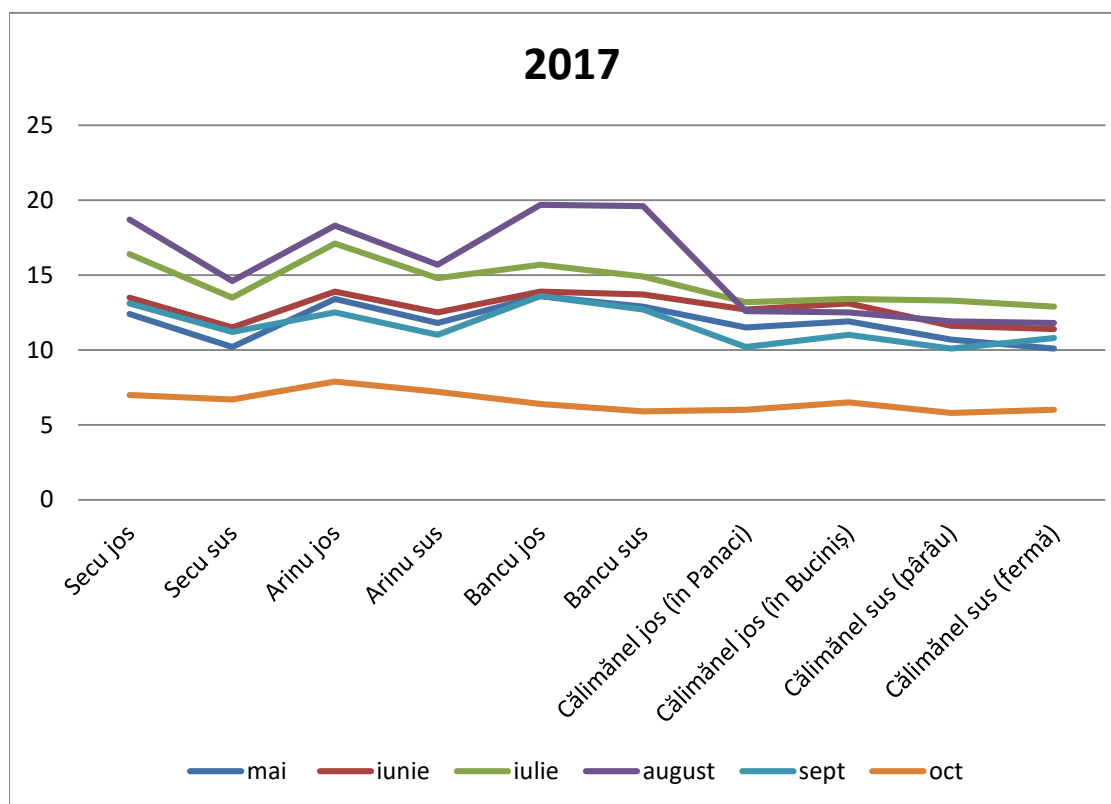


Fig.7.1. Evoluția temperaturilor -2017-2018
 Fig. 7.1. Evolution of temperatures -2017-2018

Temperaturile măsurate în anul 2018 au fost cuprinse între 2,3 grade C (la proba prelevată în data de 05 octombrie de la stația Călimănele jos - în Panaci) și 17,9 grade C (la proba prelevată tot în data de 17 august de la stația Bancu sus), cu o medie de 12,03 grade C. Valorile temperaturilor înregistrate în 2018 au fost mai mici față de anul anterior, deoarece și media temperaturilor atmosferice a fost mai scăzută, plus un volum de precipitații mult mai mare, în al doilea an de studiu.

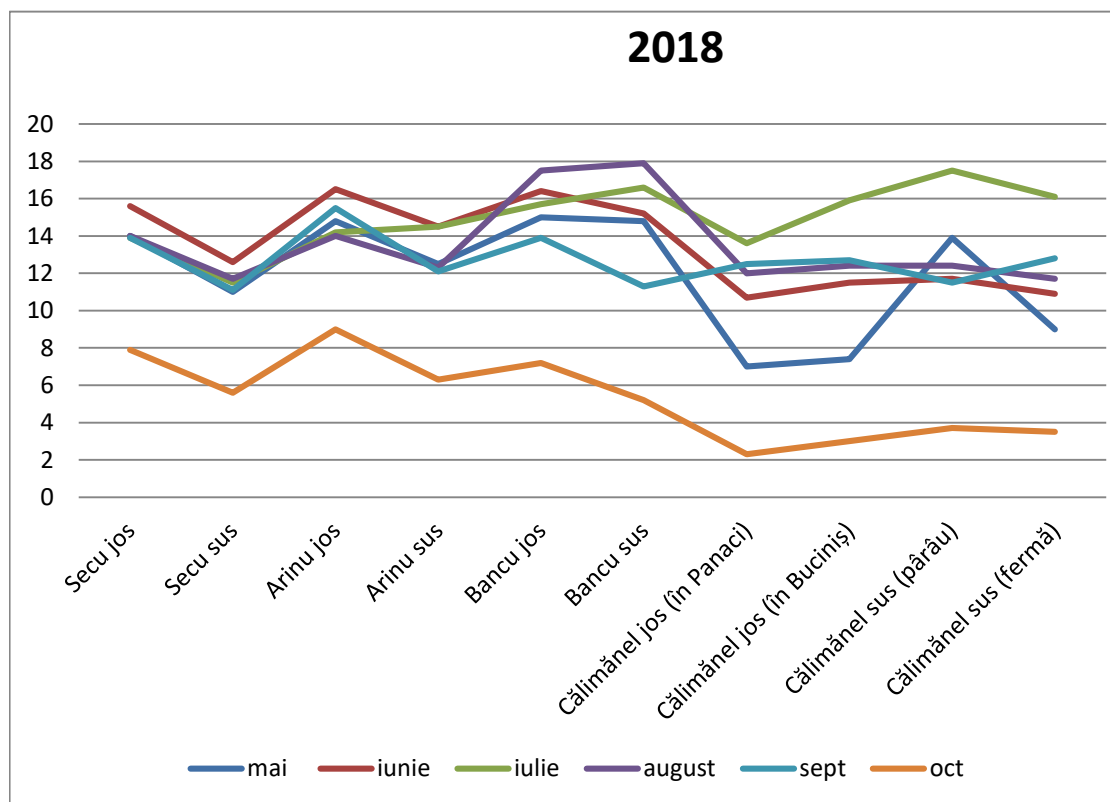


Fig.7.2. Evoluția temperaturilor -2018
Fig. 7.2. Evolution of temperatures -2018

7.2. Determinarea unor indicatori chimici ai apei

7.2.1. Determinarea pH-ului

pH - ul este măsura activității ionilor de hidrogen dintr-o soluție. Valoarea pH - ului este logaritmul zecimal negativ al raportului hidrogen molar - activitate ionică. Datorită interacțiunilor ionice, activitatea ionilor de hidrogen este sensibil inferioară concentrației lor. Scara de referință a pH - urilor este constituită dintr-o serie de soluții etalon de referință.

Exprimarea rezultatelor se face în unități de pH.

Această metodă respectă prevederile standardul în vigoare SR ISO 10523 : 2000.

Pentru determinarea acestui parametru se pot folosi mai multe tipuri de echipamente, iar în laborator în care s-au efectuat analizele s-au folosit mai multe dintre cele din dotare : InoLab – Multi 720, Multi 9310P, în timp ce în teren poate fi utilizat pH - metru WTW 330 sau hârtie indicatoare.

În cadrul studiului, probele au fost prelevate în perioada mai - octombrie din 2017 și 2018, media valorilor măsurate pentru parametrul pH fiind de 7.82 unități pH, cu valoarea maximă înregistrată în iulie 2018 și minima înregistrată în septembrie 2017, toate valorile fiind centralizate în tab.7.2.

Tab.7.2. Valorile ale pH-lui înregistrate în 2017-2018

Table 7.2. The pH values recorded in 2017-2018

STAȚIE PRELEVARE	2017						2018					
	mai	iunie	iulie	august	sept	oct	mai	iunie	iulie	august	sept	oct
Secu jos	7.88	8.11	7.56	8.12	8.02	8.1	7.75	8.01	7.86	7.4	7.97	7.73
Secu sus	8.04	8.06	7.93	8.21	8.17	8.3	8.03	8.2	7.91	7.83	8.21	8.03
Arinu jos	7.69	8.17	7.32	7.84	7.87	7.83	7.79	7.87	7.6	7.42	8.55	7.45
Arinu sus	8.02	8.07	7.65	8.14	8.17	8.22	8.08	8.16	8.11	7.51	8.21	7.85
Bancu jos	7.56	7.69	7.73	8.22	8.07	8.09	8	8.05	8.71	8.02	8.15	8
Bancu sus	7.58	7.88	7.73	8.23	8.09	8.15	7.98	7.84	7.76	7.93	8.04	7.91
Călimănel jos (în Panaci)	7.55	7.59	7.68	7.53	6.77	7.6	7.41	7.72	7.27	7.18	7.26	7.62
Călimănel jos (în Buciniș)	7.53	7.77	7.7	7.85	7.9	7.85	7.61	7.89	7.78	7.52	7.47	7.73
Călimănel sus (pârâu)	7.63	7.68	7.58	7.77	7.75	7.7	7.5	7.65	7.67	7.31	7.35	7.39
Călimănel sus (fermă)	7.99	7.88	7.85	7.97	8.09	8	7.82	7.91	7.92	7.58	7.62	7.76
Medie / luna	7.74	7.89	7.67	7.98	7.89	7.98	7.79	7.93	7.85	7.57	7.88	7.74
medie / an	7.86						7.79					
medie înregistrări	7.82											

Valorile pH-ului măsurate în anul 2017 au fost cuprinse între 6,77 unități pH (la proba prelevată în data de 22 septembrie de la stația Călimănel jos - în Panaci) și 8,3 unități pH (la proba prelevată în data de 26 octombrie de la stația Secu sus), cu o medie de 7.86 unități pH. De notat este faptul că pe parcursul studiului valorile pH-ului au fost mai mici la stațiile de prelevare de pe cursul pârâului Călimănel, mai ales în punctul cel mai din aval, cu o medie de 7.43 unități de pH pentru cei doi ani de cercetare. Deasemenea, valorile cele mai mari au jos ale pH-ului au fost înregistrate pe pârâul Sucu, la stația din amonte, cu o medie de 8,07 unități pH.

Tabloul complet al celor 4 pâraie cu toate stațiile de prelevare este redat în tab.7.3.

Tab.7.3. Media pH-ului în stațiile de prelevare

Tab. 7.3. Average pH in sampling stations

STAȚIE PRELEVARE	Medie /stație 2017 - 2018	Medie / pârâu 2017 - 2018
Secu jos	7.87	7.98
Secu sus	8.07	
Arinu jos	7.78	7.89
Arinu sus	8.01	
Bancu jos	8.02	7.97
Bancu sus	7.92	
Călimănel jos (în Panaci)	7.43	7.65
Călimănel jos (în Buciniș)	7.71	
Călimănel sus (pârâu)	7.58	
Călimănel sus (fermă)	7.89	

O explicație a acestor diferențe ale pH-ului apei este influența factorului uman, malurile pârâului Călimănel fiind intens populate, existând un număr însemnat de gospodării, în timp de valea pârâului Secu este mult mai puțin expusă factorului uman.

7.2.2. Determinarea substanțelor organice

Substanțele organice din apă nu au efect nociv asupra organismului uman și nici nu limitează folosirea apei. Importanța lor constă în faptul că sunt indicatori pentru poluarea apei mai ales cu microorganisme, care reprezintă un risc epidemiologic pentru populație.

Determinarea substanțelor organice oxidabile (consumul chimic de oxigen): CCO

Această metodă respectă prevederile standardul în vigoare SR ISO 6060 : 1996 Calitatea apei. Determinarea consumului chimic de oxigen.

Cantitatea de substanțe organice din apă se exprimă prin consumul chimic de oxigen (CCO), care reprezintă cantitatea de oxigen necesară oxidării substanțelor organice, în prezența unui oxidant puternic, cel mai frecvent, KMnO_4 . Cantitatea de oxigen echivalentă cu consumul de oxidant se mai numește și oxidabilitate. Rezultatele se exprimă în mg / l (ppm).

Principiul metodei : Substanțele organice sunt oxidate cu permanganat de potasiu în mediu acid, prin fierbere. Excesul de permanganat de potasiu neutilizat în reacția de oxidare este redus cu acid oxalic, iar excesul de acid oxalic este titrat la cald, cu permanganat de potasiu până la persistența unei tente de roz pal.

În cadrul studiului, probele au fost analizate în perioada mai - octombrie din 2017 și 2018, media valorilor obținute pentru substanțele organice oxidabile fiind de 19.96 mg/l KMnO_4 , cu valoarea maximă înregistrată în august 2018 și minima înregistrată în august 2017.

De notat este faptul că în august 2018, cu câteva ore înainte de prelevarea probelor, în zona pârâului Arinu a fost o furtună puternică, rezultatele analizelor fiind vizibil influențate de

acest fenomen, valorile obținute fiind de peste 50 ori mai ridicate decât media celorlate valori obținute., cum se poate observa din fig. 7.3.

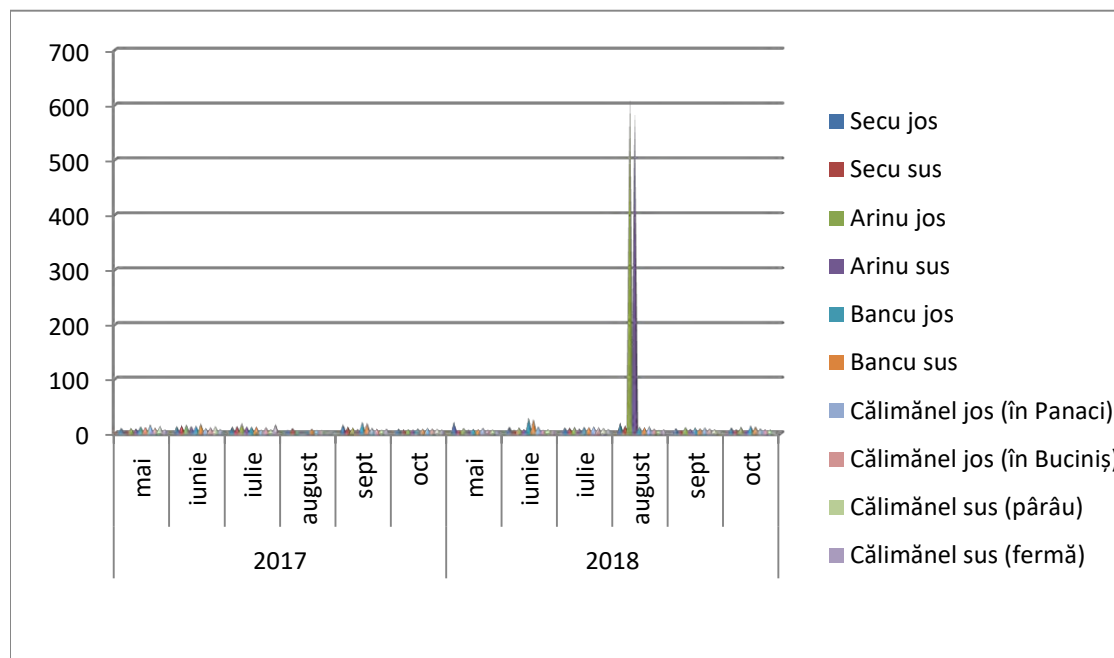


Fig.7.3 Comparație substanțelor organice oxidabile 2017 – 2018

Fig.7.3 Comparison of oxidable organic substances 2017 – 2018

Eliminând această lună din calcul, media celor 2 ani este foarte apropiată, 10.15 mg/l KMnO_4 în 2017 și 10.08 mg/l KMnO_4 în 2018, cu o medie generală de 10.11 mg/l KMnO_4 .

Pentru anul 2017, rezultatele obținute se încadrează între 1.89 mg/l KMnO_4 , valoare înregistrată pe 18 august 2017 la proba prelevată de la stația Călimănel sus (pârâu) și 21.04 mg/l KMnO_4 , valoare obținută la probă prelevată de la stația Bancu jos în data de 21 septembrie 2017. Toate datele sunt redată în tab. 7.4.

Valoarea minimă este corelată cu o încărcătură microbiologică redusă și cu absența paraziților, precum și cu o masă algală deloc abundentă, în timp de valoarea maximă este asociată cu o încărcătură bacterină și o masă algală semnificativă, și foarte important de notat, prezența parazitilor, un chist de *Giardia* și un oochist de *Cryptosporidium*, într-un volum de doar 15 litri de apă filtrată pentru analiza parazitară.

Tab.7.4. Valori ale substantelor organice oxidabile, 2017
Tab. 7.4. Values of oxidizable organic substances, 2017

STAȚIE PRELEVARE	2017						medie	medie	
	mai	iunie	iulie	august	sept	oct	/stație	pârâu	
Secu jos	9.96	13.29	12.53	6.1	16.09	8.24	11.03	10.75	
Secu sus	5.4	14.81	13.45	9.78	12.37	7.02	10.47		
Arinu jos	9.65	16.33	18.97	3.03	10.51	7.32	10.96	9.81	
Arinu sus	8.74	13.29	12.84	3.03	7.41	6.71	8.67		
Bancu jos	12.95	14.02	12.23	2.73	21.04	8.86	11.97	12.46	
Bancu sus	11.47	18.07	12.53	8.24	19.18	8.24	12.95		
Călimănel jos (în Panaci)	16.33	9.65	6.71	6.1	10.32	10	9.85	8.87	9.51
Călimănel jos (în Buciniș)	10.26	10.87	11.31	5.79	8.13	8.75	9.18		
Călimănel sus (pârâu)	13.6	12.99	7.32	1.89	6.56	7.81	8.36		8.23
Călimănel sus (fermă)	6.92	7.53	16.52	2.73	8.44	6.56	8.11		
medie / luna	10.52	13.08	12.44	4.94	12	7.95			
medie / an	10.15								

Pentru anul 2018, rezultatele obținute se încadrează între 4,74 mg/l KMnO_4 , valoare înregistrată pe 04 mai 2018 la proba prelevată de la stația Călimănel sus (fermă) și 618 mg/l KMnO_4 , valoare obținută la proba prelevată de la stația Arinu jos în data de 17 august 2018.

Având în vedere că pentru acest parametru chimic rezultatele din data de 17 august 2018, pentru probele prelevate de la pârâul Arinu au fost influențate de fenomenele meteorologice din ziua respectivă, notăm ca și valoare maximă reprezentivă rezultatul de 29.07 mg/l KMnO_4 , obținut la stația Bancu jos pentru proba prelevată în data de 08 iunie 2018.

Valoarea minimă este corelată cu o încărcătură microbiologică redusă și cu absența parazitilor, precum și cu o masă algală deloc abundentă.

Valoarea maximă obținută la stația Banu jos pentru proba prelevată în data de 08 iunie 2018 este asociată cu o încărcătură bacteriană și o masă algală semnificativă, dar totuși nu a fost evidențiată prezența parzitelor.

Probele preluate din cele două stații Arinu în data de 17 august 2018 și care au avut valori exagerat de ridicate pentru substanțele organice oxidabile au prezentat de asemenea încărcătură microbiologică și algală, precum și câte un chist de *Giardia* într-un volum de doar 5 litri de apă filtrată pentru analiza parazitara. (tab.7.5.)

Tabel 7.5. Valori ale substanțelor organice oxidabile, 2018

Tab.7.5. Values of oxidizable organic substances, 2018

STAȚIE PRELEVARE	2018						medie	medie	medie luna stații	fără august Arinu
	mai	iunie	iulie	august	sept	oct	/stație	pârâu		
Secu jos	20.5	12.38	10.82	19.58	9.47	10.72	13.91	11.08		
Secu sus	6.1	6.32	10.2	14.37	5.48	7.12	8.26			
Arinu jos	9.78	10.87	11.75	618	11.31	11.92	112.27	108.01	11.1	9.11
Arinu sus	6.4	7.23	8.65	587	7.94	5.32	103.75		7.1	
Bancu jos	7.94	29.07	11.75	11.92	10.69	14.03	14.23	13.59		
Bancu sus	7.32	26.03	11.44	11	9.16	12.82	12.96			
Călimănel jos (în Panaci)	10.11	12.37	12.69	13.15	10.82	8.92	11.34	8.11	9.63	
Călimănel jos (în Buciniș)	6.32	6.02	10.87	8.24	8.65	7.42	7.92			
Călimănel sus (pârâu)	6.63	7.11	9.96	5.79	7.41	6.52	7.23		6.6	
Călimănel sus (fermă)	4.74	5.09	7.83	7.32	5.56	5.32	5.97			
medie / luna	8.58	12.24	10.59	129.63	8.64	9.01				
medie / an	29.78									
									10.08	

Privind tabloul de ansamblu al tuturor analizelor pentru parametrul substanțe organice oxidabile, se observă că în general stațiile din amonte au valori mai mici decât cele din aval, fiind dovada influenței comunităților umane în toate zonele.

7.2.3. Determinarea conductivității

Conductivitatea electrică (conductanța specifică) este inversul rezistenței măsurată în condiții specifice între fețele opuse ale unui cub unitate (de dimensiuni determinate) dintr-o soluție apoasă. Pentru controlul calității apei, conductivitatea poate fi utilizată ca măsură a concentrației soluțiilor ionizabili prezenți în probă.

Exprimarea rezultatelor se face în micro-siemens pe centimetru cub ($\mu\text{S} / \text{cm}^3$).

Această metodă respectă prevederile standardul în vigoare SR EN 27888 / ISO 7888:1997. Pentru determinarea acestui parametru se pot folosi mai multe tipuri de echipamente, iar în laboratorul în care s-au efectuat analizele s-au folosit mai multe dintre cele din dotare : InoLab – Multi 720 și Multi 9310P.

În cadrul studiului, probele au fost analizate în perioada mai - octombrie din 2017 și 2018, media valorilor obținute pentru conductivitate fiind de $200.95 \mu\text{S}/\text{cm}^3$, cu valoarea maximă înregistrată în octombrie 2017 și minimă înregistrată în mai 2017. Pentru anul 2017, rezultatele obținute se încadrează între $74.295 \mu\text{S}/\text{cm}^3$, valoare înregistrată pe 27 mai 2017 la proba prelevată de la stația Călimănel sus (pârâu) și $354 \mu\text{S}/\text{cm}^3$, valoare obținută la probă prelevată de la stația Secu jos în data de 26 octombrie 2017. (tab. 7.6.).

Tab.7.6. Valori ale conductivității, 2017

Table 7.6. Conductivity values, 2017

STAȚIE PRELEVARE	2017					
	mai	iunie	iulie	august	sept	oct
Secu jos	303	204	334	328	324	354
Secu sus	269	205	299	315	302	305
Arinu jos	139.9	288	144	174.5	171.2	170.7
Arinu sus	204	326	226	259	245	244
Bancu jos	187.1	131.3	199	226	194	223
Bancu sus	177.1	215	195	217	192.5	221
Călimănel jos (în Panaci)	127.5	119.1	177	123.4	124.9	135.2
Călimănel jos (în Buciniș)	172	178.6	201	215	221	224
Călimănel sus (pârâu)	74.2	75.8	89.6	110.7	109.5	101.3
Călimănel sus (fermă)	181.7	191.5	215	235	229	232
medie / luna	183.55	193.43	207.96	220.36	211.31	221.02
medie / an	206.27					

Pentru anul 2018, rezultatele obținute se încadrează între $75.5 \mu\text{S}/\text{cm}^3$, valoare înregistrată pe 19 iulie 2018 la proba prelevată de la stația Călimănel sus (pârâu) și $353 \mu\text{S}/\text{cm}^3$, valoare obținută la probă prelevată de la stația Secu jos în data de 21 octombrie 2018 (tab.7.7.).

Tab.7.7. Valori ale conductivității, 2018

Table 7.7. Conductivity values, 2018

STAȚIE PRELEVARE	2018					
	mai	iunie	iulie	august	sept	oct
Secu jos	291	333	323	310	353	333
Secu sus	275	296	273	272	305	298
Arinu jos	134	161.8	132.1	143.7	178.8	165.3
Arinu sus	216	237	213	178.2	232	227
Bancu jos	166	178.9	199.5	200	212	207
Bancu sus	155	173.7	209	212	232	215
Călimănel jos (în Panaci)	98.3	105.7	121.9	126.7	114.3	133.9
Călimănel jos (în Buciniș)	137.9	201	176.9	188.1	196	199.1
Călimănel sus (pârâu)	81	95.2	75.5	90.4	91.3	91.9
Călimănel sus (fermă)	193.9	218	198.7	216	234	230
medie / luna	174.81	200.03	192.26	193.71	214.84	210.02
medie / an	195.63					

Valoarea minimă este corelată cu o duritate scăzută și cu o valoare mică a alcalinității exprimată în hidrogencarbonat (bicarbonic), toate indicând că pâraul Călimănel este o apă cu mineralizare scăzută. Deasemena, valoarea maximă este corelată cu o duritate crescută și cu o valoare mare a alcalinității exprimată în hidrogencarbonat (bicarbonic), toate indicând că pâraul Sucu sus este o apă cu mineralizare mare. Valorile înregistrate în timpul celor doi ani de studiu au fost apropiate în cazul tuturor stațiilor de prelevare, fapt care se poate observa mai jos.

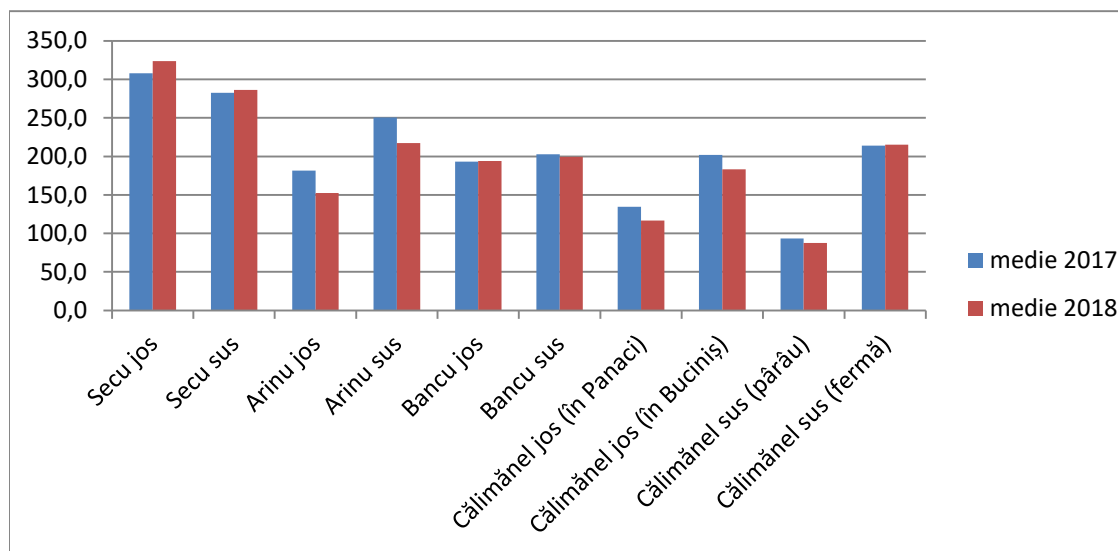


Fig. 7.4 Valorile conductivității între anii 2017 și 2018
Fig 7.4 . Conductivity values between the years 2017 and 2018

7.2.4. Determinarea oxigenului dizolvat

Oxigenul este un indicator de calitate al apei, ale cărei valori depind în general de tipul de apă, de procesele fizice, chimice, biologice acvatic, de climă. Cantitatea de oxigen din apă este un factor care influențează autoepurarea apelor.

Această metodă respectă prevederile standardul în vigoare SR EN ISO 5814 - 2013 Calitatea apei. Determinarea conținutului de oxigen dizolvat. Metoda electrochimică cu sondă.

Se pot folosi mai multe echipamente de laborator, iar în timpul studiului s-a lucrat cu Multi 9310 P și InoLab – Multi 720. Exprimarea rezultatelor se face în mg / l (ppm).

Principiul metodei: Determinarea conținutului de oxigen dizolvat în apă se face cu ajutorul unei celule electrochimice care este izolată de probă printr-o membrană permeabilă la gaz.

În cadrul studiului, probele au fost analizate în perioada mai - octombrie din 2017 și 2018, media valorilor obținute pentru oxigenul dizolvat fiind de 8.97 mg/l, cu valoarea maximă înregistrată în octombrie 2017 și minimă înregistrată în august 2018.

Pentru anul 2017, rezultatele obținute se încadrează între 7.96 mg / l, valoare înregistrată pe 30 iunie 2017 la proba prelevată de la stația Călimănel sus (pârâu) și 10.85 mg / l, valoare obținută la probă prelevată de la stația Călimănel jos (în Panaci) în data de 27 octombrie 2017.(tab.7.8.)

Tab.7.8. Valori ale oxigenului dizolvat, 2017
Table 7.8. Dissolved oxygen values, 2017

2017						
STAȚIE PRELEVARE	mai	iunie	iulie	august	sept	oct
Secu jos	8.96	8.07	8.27	8.01	9.05	8.42
Secu sus	9.88	8.21	8.63	8.37	9.06	8.68
Arinu jos	9.3	8.72	8.55	8.38	9.13	8.93
Arinu sus	9.3	8.43	8.64	8.57	8.99	9.03
Bancu jos	8.66	8.12	8.59	8.35	8.86	9.33
Bancu sus	8.89	8.33	8.75	8.2	8.84	9.17
Călimănel jos (în Panaci)	9.73	8.22	9	8.75	9.57	10.85
Călimănel jos (în Buciniș)	9.91	8.15	9.07	9.15	9.6	10.29
Călimănel sus (pârâu)	10.14	7.96	9.14	9.09	9.49	9.89
Călimănel sus (fermă)	10.03	8.03	8.99	9.2	9.3	9.93
Medie / luna	9.48	8.22	8.76	8.61	9.19	9.45
Medie / an	8.95					

Pentru anul 2018, rezultatele obținute se încadrează între 7.66 mg / l , valoare înregistrată pe 17 august 2018 la proba prelevată de la stația Arinu jos și 10.59 mg / l, valoare obținută la proba prelevată de la stația Călimănel jos (în Panaci) în data de 4 mai 2018 (tab.7.9.).

Tab.7.9. Valori ale oxigenului dizolvat, 2018

Tab. 7.9. Dissolved oxygen values, 2018

2018						
STAȚIE PRELEVARE	mai	iunie	iulie	august	sept	oct
Secu jos	8.05	7.95	8.46	8.18	8.79	9.8
Secu sus	8.53	8.46	8.5	8.72	9.01	10.47
Arinu jos	8.59	8.31	8.24	7.66	8.72	10.26
Arinu sus	8.78	8.33	8.19	7.76	8.87	10.55
Bancu jos	8.58	8.43	8.19	8.08	8.81	10.25
Bancu sus	8.42	8.33	8.16	8.04	8.83	10.34
Călimănel jos (în Panaci)	10.59	9.61	8.01	8.94	9.28	10.84
Călimănel jos (în Buciniș)	10.26	9.28	8.12	8.85	9.18	11.23
Călimănel sus (pârâu)	10.08	9.11	8.08	8.9	9.15	10.89
Călimănel sus (fermă)	9.88	9.04	8.02	9.09	8.77	10.98
medie / luna	9.18	8.69	8.20	8.42	8.94	10.56
Medie / an	9					

Valorile înregistrate pentru oxigenul dizolvat au valori apropiate între cei doi ani de studiu, făcând comparația pe fiecare pârâu luat în studiu. S-a observat cea mai mică diferență la pârâul Bancu, iar cea mai mare la pârâul Secu.

7.2.5. Determinarea alcalinității exprimată în hidrogen carbonat (bicarbonat)

Hidrogencarbonatul reprezintă alcalinitatea totală determinată în prezența metil-oranjului ($\text{pH} = 4,5$) și este dată de bazele libere, carbonații și bicarbonații alcalini. Alcalinitatea apei este dată de prezența bicarbonaților, carbonaților alcalini, alcalino-teroși și a hidroxizilor.

Această metodă respectă prevederile standardul în vigoare SR EN ISO 9963-1 - 2002

Echipamente de încercare și mijloace de măsurare:

Sticlărie de laborator – pipete de 10 ml, biurete 10 ml și 25 ml, pahar Erlenmayer

Reactivi - acid clorhidric, soluție 0.1n și 0.01n

- metilorange (0.05g metilorange pulbere se dizolvă în 100 ml de apă).

Mod de lucru: Se iau în lucru 10 ml probă de analizat, se adaugă 2-3 picături metilorange și se titrează cu acid clorhidric, soluție 0.1n până la culoarea portocaliu-roz.

În cazul apelor cu o mineralizare scăzută se recomandă ca titrarea să fie făcută cu acid clorhidric 0.01n până la culoarea roșie-vioacee, pentru o acuratețe a rezultatelor.

Exprimarea rezultatelor și precizia

$$\text{HCO}_3^- = V_{\text{HCl}} * F_{\text{HCl}} * 0.0061 * \frac{1000}{V_{\text{H}_2\text{O}}} * 1000 = V_{\text{HCl}} * F_{\text{HCl}} * \frac{6100}{V_{\text{H}_2\text{O}}} \text{ mg/l}$$

Unde :

0.0061 - grame de hidrogencarbonat într-un cmc de apă

V_{HCl} - volum de soluție acid clorhidric folosit la titrare

F_{HCl} - factorul soluției de acid clorhidric

$V_{\text{H}_2\text{O}}$ - volumul de apă folosit la analiză

În cazul în care s-a folosit la titrare HCl 0.01n, rezultatul se va împărți cu 10. Probele prelevate lunar s-au lucrat în laborator. În cadrul studiului, probele au fost analizate în perioada mai - octombrie din 2017 și 2018, media valorilor obținute pentru oxigenul dizolvat fiind de 131.24 mg/l, cu valoarea maximă înregistrată în august 2018 și minima înregistrată în iulie 2018.

Pentru anul 2017, rezultatele obținute se încadrează între 48.88 mg / l , valoare înregistrată pe 28 iulie 2017 la proba prelevată de la stația Călimănel sus (pârâu) și 231.8 mg / l, valoare obținută la probă prelevată de la stația Secu jos în data de 26 octombrie 2017. (tab.7.10). Pentru anul 2018, rezultatele obținute se încadrează între 42.7 mg / l , valoare înregistrată pe 8 iunie 2018 la proba prelevată de la stația Călimănel sus (pârâu) și 244 mg / l, valoare obținută la probă prelevată de la stația Secu jos în data de 21 septembrie 2018. (tab.7.11).

Tab.7.10. Valori ale bicarbonatului, 2017

Tab. 7.10. Bicarbonic values, 2017

2017						
STAȚIE PRELEVARE	mai	iunie	iulie	august	sept	oct
Secu jos	201.3	134	219.6	219.6	213.5	231.8
Secu sus	183	140	195.2	213.5	201.3	195.2
Arinu jos	79.3	195.2	103.7	122	109.8	103.7
Arinu sus	134.2	219.6	152.5	176.9	164.7	158.6
Bancu jos	103.7	85.4	122	152.5	128.1	140.3
Bancu sus	128.1	146.4	122	146.4	122	140.3
Călimănel jos (în Panaci)	79.3	79.3	97.6	73.2	73.1	79.3
Călimănel jos (în Buciniș)	103.7	115.9	109.8	134.2	128.1	152.5
Călimănel sus (pârâu)	48.8	54.9	48.8	67.1	67.1	61
Călimănel sus (fermă)	109.8	134.2	134.2	152.5	146.4	152.5
Medie / luna	117.12	130.49	130.54	145.79	135.41	141.52
Medie / an	133.47					

Tab.7.11. Valori ale bicarbonatului, 2018

Tab. 7.11. Bicarbonic values, 2018

2018						
STAȚIE PRELEVARE	mai	iunie	iulie	august	sept	oct
Secu jos	201.3	225.7	213.5	201.3	244	225.7
Secu sus	183	195.2	170.8	183	201.3	195.2
Arinu jos	79.3	109.8	91.5	79.3	122	97.6
Arinu sus	134.2	158.6	134.2	109.8	152.5	146.4
Bancu jos	103.7	115.9	128.1	122	134.2	128.1
Bancu sus	91.5	109.8	140.3	134.2	152.5	128.1
Călimănel jos (în Panaci)	79.3	61	79.3	79.3	79.3	146.4
Călimănel jos (în Buciniș)	122	122	115.9	109.8	122	122
Călimănel sus (pârâu)	61	42.7	48.8	48.8	54.9	48.8
Călimănel sus (fermă)	122	140.3	134.2	140.3	164.7	152.5
Medie / luna	117.73	128.1	125.66	120.78	142.74	139.08
Medie / an	129.01					

Valorile înregistrate pentru bicarbonat deasemenea au valori apropiate între cei doi ani de studiu, făcând comparația pe fiecare pârâu luat în observație. Cea mai mare diferență între media valorilor înregistrate de-a lungul celor doi ani de studiu pentru parametrul bicarbonic a fost înregistrată la pârâul Arinu, indicând faptul ca a scăzut cantitatea sărurilor dizolvate în al doilea an de monitorizare, aspect susținut și de o duritate medie mai scăzută pentru acest pârâu. Pentru celelalte pâraie, valorile au fost apropiate, cea mai mică diferență înregistrându-se la pârâul Călimanel.

7.2.6. Determinarea durității apei

Duritatea apei este dată de prezența tuturor cationilor din apă în afară de cationii metalelor alcaline, exprimată prin concentrațiile echivalente în calciu.

Această metodă respectă prevederile standardul STAS 3026-76 Calitatea apei. Determinarea durității.

Duritatea apei este de doua feluri:

- duritate temporară sau carbonată, dată de bicarbonații de calciu sau magneziu prezenți în apă
- duritate permanentă sau necarbonată, dată de celelalte săruri de calciu și magneziu (azotați, sulfati, cloruri, fosfați etc)

Suma celor două durități formează duritatea totală.

Duritatea se exprima în grade de duritate (°d)

1 grad de duritate corespunde la 10 mg CaO/l.

Principiul metodei: Metoda constă în complexarea cationilor metalici care formează duritatea, cu sarea disodică a acidului etilen-diamino-tetraacetic (EDTA), la pH=10, în prezența indicatorului eriocrom negru T.

Echipamente de încercare și mijloace de măsurare:

Sticlărie de laborator –cilindri gradati de 100 ml, biuretă, pahare erlenmayer, pipete, balon cotelat 100 ml și 1000 ml

Reactivi

-soluție de titrare pentru duritate : soluție EDTA 0.01M (1.8615g de acid etilen-diaminotetraacetic (EDTA) se cântăresc la balanța analitică, se introduc într-un balon cotelat 500 ml, se completează cu apă distilată până la semn)

-soluție buffer pentru duritate (se cântăresc pe balanța analitică 13.5 g clorură de amoniu NH_4Cl și se introduc cu apă distilată într-un balon cotelat de 250ml, peste care se adaugă 88 ml amoniac 25% și se completează până la semn cu apă distilată).

-indicator duritate totală : 0.5 g eriocrom negru T

Mod de lucru :

Determinarea durității totale

1. Se clătește cilindrul și paharul cu proba de analizat .
 2. Se măsoară 50 ml de apă cu cilindrul gradat.
 3. Se adaugă 0.5 ml de soluție buffer
 4. Se adaugă 1g eriocrom negru T
 5. Soluția are culoare roșie și se titrează cu soluție EDTA 0.01M, sub agitare continuă, până când culoarea virează la albastru
 6. În cazul în care virarea este greu vizibilă, se repetă testul cu 10 ml de probă diluată până la 50 de ml cu apă distilată; diluția se utilizează în cazul apei cu duritate mare și elimină efectul substantelor care produc interferențe
 7. Duritatea totală = $20 \times \text{ml soluție de titrare (mg/l CaCO}_3) = \text{mg/l CaCO}_3 / 17.8^\circ\text{dH (grade germane)}$
- unde 20 este un coeficient

În cazul probelor diluate (10 ml proba + 40 ml apă distilată), coeficientul = 100

În cadrul studiului, probele au fost analizate în perioada mai - octombrie din 2017 și 2018, media valorilor obținute pentru duritate fiind de 6.1 grade duritate, cu valoarea maximă înregistrată în septembrie 2017 și minimă înregistrată în iunie 2018.

Pentru anul 2017, rezultatele obținute se încadrează între 2.24 grade duritate, valoare înregistrată pe 28 iulie 2017 la proba prelevată de la stația Călimănel sus (pârâu) și 11.79 grade duritate, valoare obținută la probă prelevată de la stația Arinu sus în data de 21 septembrie 2017, cu o medie de 6.44 grade duritate (tab. 7.12).

Pentru anul 2018, rezultatele obținute se încadrează între 1.34 grade duritate, valoare înregistrată pe 6 iunie 2018 la proba prelevată de la stația Călimănel sus (pârâu) și 11.23 grade

duritate, valoare obținută la probă prelevată de la stația Secu jos în data de 5 octombrie 2018 (tab.7.13.). Valorile înregistrate pentru duritate au valori apropiate între cei doi ani de studiu, cea mai mare diferență între media valorilor înregistrate de-a lungul celor doi ani de studiu pentru parametrul duritate a fost înregistrată la pârâul Arinu, pentru celelalte pâraie, valorile au fost apropiate, cea mai mică diferență înregistrându-se la pârâul Secu.

Tab. 7.12. Valori ale durității, 2017

Tab. 7.12 Hardness values, 2017

2017						
STAȚIE PRELEVARE	mai	iunie	iulie	august	sept	oct
Secu jos	8.98	6.17	8.98	10.67	11.23	5.44
Secu sus	6.74	6.51	10.11	7.3	10.67	8.65
Arinu jos	5.05	8.87	5.61	5.61	7.86	4.83
Arinu sus	6.74	9.21	8.42	11.23	11.79	6.96
Bancu jos	5.61	3.48	6.17	7.3	7.3	6.62
Bancu sus	5.39	6.4	5.95	8.42	7.86	6.17
Călimănel jos (în Panaci)	5.05	3.25	6.74	3.37	3.93	3.93
Călimănel jos (în Buciniș)	5.05	4.49	5.71	6.74	6.17	6.17
Călimănel sus (pârâu)	2.8	2.47	2.24	1.12	3.93	3.14
Călimănel sus (fermă)	5.61	5.84	6.74	7.86	7.3	6.96
medie / luna	5.702	5.669	6.667	6.962	7.804	5.887
medie / an	6.44					

Tab. 7.13. Valori ale durității, 2018

Tab. 7.13. Hardness values, 2018

2018						
STAȚIE PRELEVARE	mai	iunie	iulie	august	sept	oct
Secu jos	8.42	9.55	8.42	8.31	9.55	11.23
Secu sus	7.86	8.42	7.19	7.64	7.86	8.98
Arinu jos	5.61	4.49	4.15	3.7	5.16	6.18
Arinu sus	7.86	7.19	6.4	4.94	6.74	7.86
Bancu jos	5.05	5.28	5.28	5.95	5.84	8.42
Bancu sus	5.05	5.05	5.84	5.84	6.4	7.3
Călimănel jos (în Panaci)	3.37	3.03	3.37	3.37	2.8	3.93
Călimănel jos (în Buciniș)	5.05	5.61	5.05	4.83	5.05	5.61
Călimănel sus(pârâu)	2.58	1.34	2.02	2.13	2.35	2.92
Călimănel sus (fermă)	5.39	6.4	5.61	5.95	6.74	6.74
medie / luna	5.62	5.636	5.33	5.266	5.85	6.917
medie / an	5.77					

7.3. Determinarea nitraților și a nitriților

Nitrații și nitriții sunt compuși naturali ai solului, care fac parte din circuitul azotului. Acești compuși se formează prin mineralizarea substanțelor organice azotoase provenite de la plante și animale. Nitrații sunt absorbiți de rădăcinile plantelor și contribuie la sinteza proteinelor, iar surplusul rămas contaminează pânza freatică, ajungând în râuri, lacuri sau chiar în apele subterane.

În mod natural, între nitrații din sol, apă și plante există un echilibru, dar activitatea omului prin utilizarea excesivă în agricultură a îngrășămintelor organice naturale și mai ales a celor sintetice, produce dezechilibre grave în acest circuit. Îngrășămintele ajută solul, însă excesul de nitrați se acumulează în plante. Consumați din alimente, nitrații se transformă în nitriți, substanțe mult mai toxice decât nitrații, devenind astfel un pericol pentru om.

7.3.1. Determinarea nitraților

7.3.1.1. Determinarea spectrofotometrică

Această metodă respectă prevederile standardul în vigoare SR ISO 7890 - 3 : 2000 Calitatea apei. Determinarea conținutului de azotați. Partea 3 : Metoda spectrometrică cu acid sulfosalicilic.

Pentru determinare se utilizează în laborator echipamentul spectrofotometru WTW PhotoLab 600 UV-VIS și KIT - urile Spectroquant 1.09713.0001 sau Spectroquant 1.09713.00012 de la producătorul Merck, pentru diferite domenii de măsurare, în funcție de gradul de poluare al apei analizate : 0.10 - 5.00 mg / l sau 1.0 - 25 mg / l (ppm). Exprimarea rezultatelor se face în mg / l (ppm).

Principiul metodei : Ionul azotat are proprietatea de a reacționa cu 2,6 – dimetilfenolul în prezența acidului sulfuric și a acidului fosforic formând 4-nitro-2,6-dimetilfenol, care este determinat fotometric. Durata reacției este de aproximativ cinci minute. Măsurarea spectrofotometrică a absorbanței produsului de reacție se face la o lungimea de undă de 415 nm. *Această metodă a fost folosită pentru unele probe, dar rezultatele nu au fost luate în calcul pentru studiu, deoarece s-au considerat mai relevante valorile obținute pentru acest parametru prin metoda ioncromatografică.*

7.3.1.2. Determinarea colorimetrică folosind trusa rapidă Microquant 1.18387.0001

Această metodă se utilizează pentru ape cu un conținut de nitrați cuprins în domeniul de măsurare între 5.00 și 90.00 mg/l (ppm) și poate fi aplicată atât în teren, cât și în laborator.

Principiul metodei: În acid sulfuric concentrat, ionii azotat reacționează cu derivații acidului benzoic formând compuși de culoare roșie. Concentrația nitraților este măsurată semicantitativ prin compararea vizuală a culorii soluției de măsurat cu câmpurile unui comparator de culori. Exprimarea rezultatelor se face în mg / l (ppm).

7.3.1.3. Determinarea colorimetrică folosind trusa rapidă Aquaquant 1.11170.0001

Această metodă se utilizează pentru ape cu un conținut de nitrați cuprins în domeniul de măsurare între 10.00 și 150.00 mg/l (ppm) și poate fi aplicată atât în teren, cât și în laborator.

Principiul metodei : Ionii nitrat sunt reduși la ioni nitrit, care reacționează în soluție acidă cu acidul sulfanilic formând o sare. Aceasta reacționează cu un derivat al acidului benzoic formând compuși de culoare galben - portocalie. Concentrația nitraților este măsurată semicantitativ prin compararea vizuală a culorii soluției de măsurat cu câmpurile unui comparator de culori. Exprimarea rezultatelor se face în mg / l (ppm).

Aceste metode colorimetrice au fost folosite în teren, în scop orientativ asupra încărcăturii cu nitrați a cursurilor de apă studiate.

7.3.2. Determinarea nitriților

7.3.2.1. Determinarea spectrofotometrică

Această metodă respectă prevederile standardul în vigoare SR EN 26777 / C 91 : 2006 / SR ISO 6777 Calitatea apei. Determinarea conținutului de nitriți. Metoda prin spectrometrie de absorbție moleculară.

Pentru determinare se utilizează în laborator echipamentul spectrofotometru WTW PhotoLab 600 UV-VIS și KIT - uri Spectroquant 1.14776.0001 sau Spectroquant 1.14776.0002 de la producătorul Merck, pentru diferite domenii de măsurare, în funcție de gradul de poluare al apei analizate : 0.002 - 0.200 mg / l sau 0.02 - 1.00 mg / l (ppm). Exprimarea rezultatelor se face în mg / l (ppm).

Principiul metodei : Ionul azotit din proba de analizat are proprietatea de a reacționa la un pH de 1.9, cu reactivul 4 – amino benzen sulfonamida, în prezența acidului ortofosforic, pentru a forma o sare de diazoniu, ce formează un complex de culoare roșie cu N(1-naftil)-etilen-diamina diclorhidrat (ajutat de reactivul 4 – amino benzen sulfonamida). Se măsoară absorbanta la o lungime de undă de 540 nm.

Această metodă a fost folosită pentru unele probe, dar rezultatele nu au fost luate în calcul pentru studiu, deoarece s-au considerat mai relevante valorile obținute pentru acest parametru prin metoda ioncromatografică.

7.3.2.2. Determinarea colorimetrică folosind trusa rapidă Aquaquant 1.14408.0001

Această metodă se utilizează pentru ape cu un conținut de nitriți cuprins în domeniul de măsurare 0.005 și 0.1 mg/l (ppm).

Principiul metodei : Metoda se bazează pe reacția ionului azotit cu acidul sulfanilic formând acid 4 – diazobenzensulfonic de culoare roșu - violet, în funcție de concentrația anionului azotit. Concentrația nitriților este măsurată semicantitativ prin compararea vizuală a culorii soluției de măsurat cu câmpurile unui comparator de culori și poate fi aplicată atât în teren, cât și în laborator. Exprimarea rezultatelor se face în mg / l (ppm).

7.3.2.3. Determinarea colorimetrică folosind trusa rapidă Aquamerck 1.08025.0001

Această metodă se utilizează pentru ape cu un conținut de nitriți cuprins în domeniul de măsurare 0.025 și 0.5 mg/l (ppm) și poate fi aplicată atât în teren, cât și în laborator.

Principiul metodei : În mediu acid, ionii NO_2^- reacționează cu acidul sulfanilic pentru a forma o sare de diazoniu, care în reacție cu N-1-naftil-etilendiamina dihidroclorhidric dă o colorație roșu - violet. Concentrația nitriților este măsurată semicantitativ prin compararea vizuală a culorii soluției de măsurat cu câmpurile unui comparator de culori. Exprimarea rezultatelor se face în mg / l (ppm).

Aceste metode colorimetrice au fost folosite în teren, în scop orientativ asupra încărcăturii cu nitriți a cursurilor de apă studiate.

7.4. Determinarea anionilor și a cationilor dizolvați prin cromatografie ionică

Cromatografia este o metodă de separare și analiză a substanțelor chimice din amestecuri, care se bazează pe interacțiunea diferențiată a doi sau mai mulți compuși de separat (numiți soluți) cu două faze cromatografice:

- faza staționară (aflată de regulă într-un tub numit coloană);
- faza mobilă (aflată în mișcare, se deplasează prin golurile primei faze).

Pentru determinare, în laboratorul în care s-au făcut determinările pentru acest studiu s-a utilizat echipamentul Ioncromatograf Metrohm (Fig. 7.5).



Fig. 7.5. Ion cromatograf Metrohm
Fig. 7.5 Metrohm Ion chromatograph

7.4.1. Determinarea cromatografică a anionilor dizolvați în apă

Această metodă respectă prevederile standardul în vigoare SR EN ISO 10304 - 1: 2009 Calitatea apei. Determinarea anionilor dizolvați prin cromatografia ionilor în fază lichidă.

Partea 1: Determinarea ionilor bromură, clorură, fluorură, azotat, azotit, fosfat și sulfat.

Pentru determinare se utilizează în laborator echipamentul Ioncromatograf. Limita inferioară de aplicare este 0.05 mg / l pentru bromură și azotit, și 0.01 mg / l pentru clorură, fluorură, azotat, ortofosfat și sulfat.

Exprimarea rezultatelor se face în mg / l (ppm).

Principiul metodei: Probă este pretrată în scopul îndepărtării substanțelor solide, ionilor sulfid și metalici, dacă este necesar.

Anionii de interes (bromură, clorură, fluorură, azotat, azotit, ortofosfat și sulfat) sunt separați prin cromatografie în fază lichidă, prin aplicarea unei rășini schimbătoare de anioni ca fază staționară și a soluțiilor apoase ale sărurilor acizilor mono - și dibazici slabi ca eluenți pentru eluția izocrată sau în gradient.

Detecția se efectuează utilizând un detector de conductivitate.

Pentru ANIONII FLUORURI, valorile determinate au fost cuprinse între 0.003 mg / l și 0.079 mg / l, cu o medie de 0.033 mg / l, cu cele mai mici valori înregistrate constant la stațiile de pe cursul pârâului Secu. Pe restul cursurilor, au fost fluctuații de la o lună la alta, în cei doi ani de studiu, aspecte care se pot vedea în fig. 7.6.

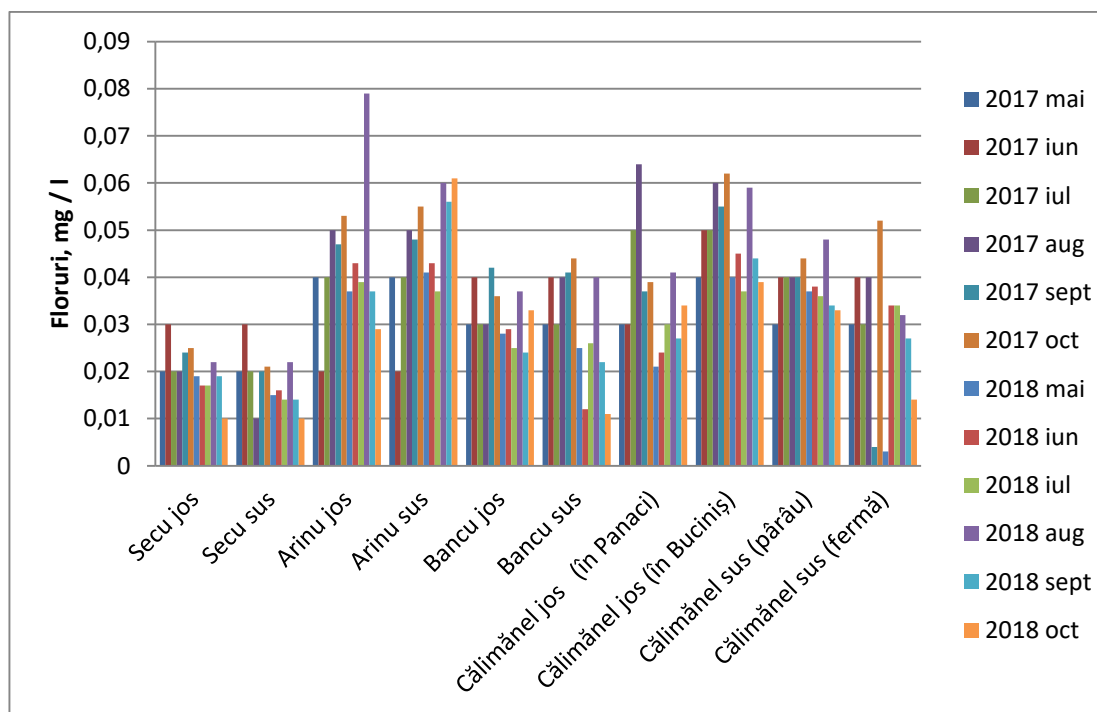


Fig.7.6 Comparatie fluoruri 2017 – 2018
Fig.7.6.Comparison of fluorides 2017 – 2018

Pentru ANIONII CLORURI, valorile determinate au fost cuprinse între 0.42 mg / l și 3.66 mg / l, cu o medie de 1.136 mg / l, cu cele mai mari valori înregistrate constant la stațiile din aval, de pe cursul pârâului Călimănel, în timp ce la stațiile din amonte au fost cele mai mici valori. Pe restul cursurilor, nu au fost fluctuații semnificative în cei doi ani de studiu, aspecte care se pot vedea în fig. 7.7.

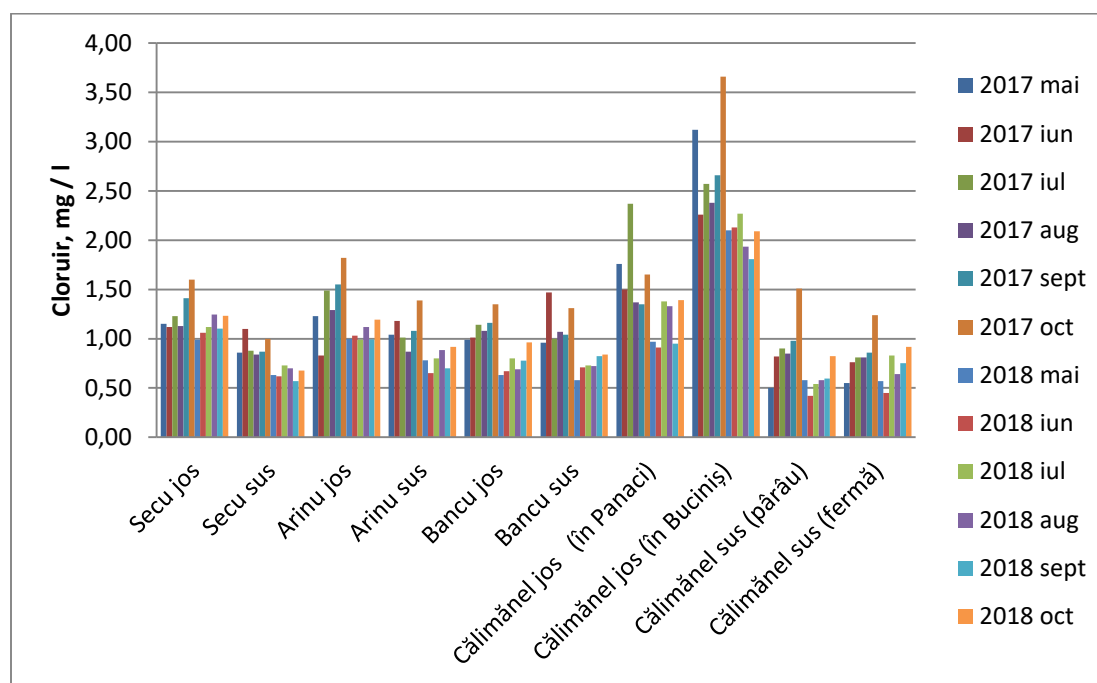


Fig.7.7 Comparatie cloruri 2017 - 2018

Fig. 7.7 Comparison of chlorides 2017 - 2018

Pentru ANIONII BROMURI, au fost determinate valori doar în luna august 2017 la stația Bancu jos - 0.005 mg / l și în luna octombrie 2018 la stația Secu jos - 0.036 mg / l, la restul probelor valorile fiind sub limita de detecție a aparatului.

Pentru ANIONII NITRIȚI, valorile determinate au fost cuprinse între 0 mg /l(de fapt sub limita de detecție a aparatului) și 0.08 mg / l, cu o medie de 0.013 mg / l, cu cea mai mare valoare înregistrată la stația Călimănel jos (în Panaci), în timp ce la stația Călimănel sus (pârâu) au fost cele mai mici valori.

Pentru ANIONII NITRAȚI, valorile determinate au fost cuprinse între 0.34 mg / l și 2.98 mg / l, cu o medie de 1.52 mg / l, cu cea mai mare valoare înregistrată la stația Secu sus, în timp ce la stațiile din amonte ale pârâului Călimănel au fost cele mai mici valori. (fig.7.8.)

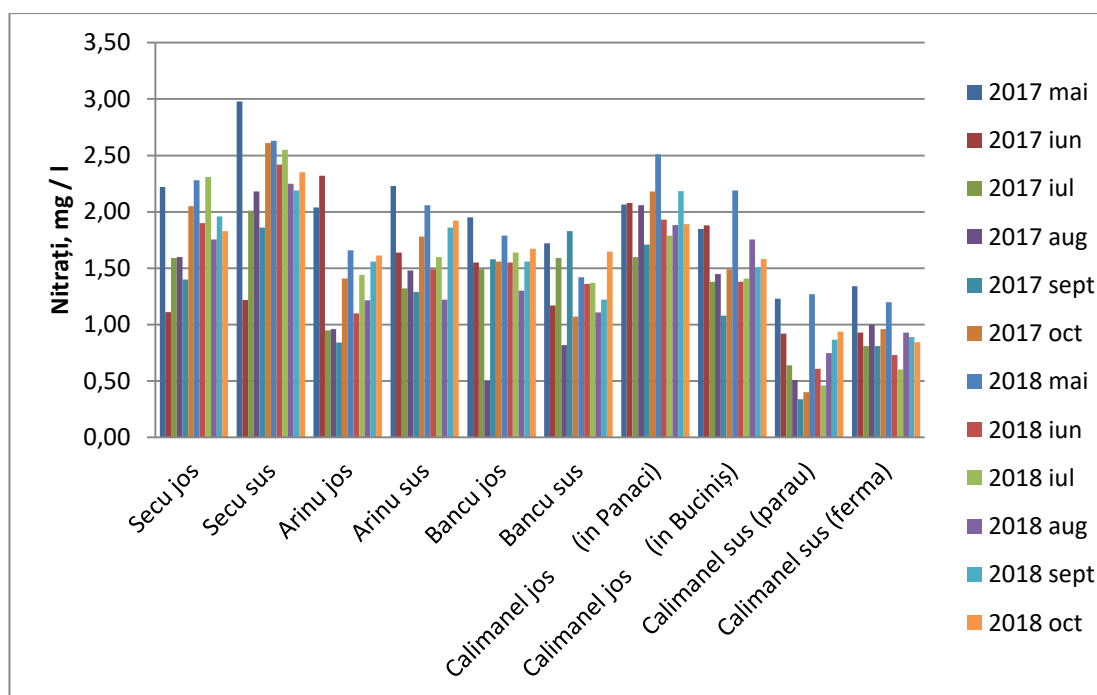


Fig.7.8 Comparație nitrați 2017 – 2018

Fig. 7.8 Nitrates comparison 2017 – 2018

Pentru ANIONII SULFAȚI, valorile determinate au fost cuprinse între 6.23 mg / l și 16.23 mg / l, cu o medie de 9.94 mg / l, cu cele mai mari valori înregistrate la stațiile din amonte ale pârlului Călimănel, în timp ce la stația Arinu jos au fost cele mai mici valori. Pe restul cursurilor, nu au fost fluctuații semnificative în cei doi ani de studiu

7.4.2. Determinarea cromatografică a cationilor dizolvați în apă

Această metodă respectă instrucțiunile de lucru ale aparatului Ioncromatograf Metrohm și este folosită pentru determinarea cationilor : litiu, sodiu, amoniu, potasiu, calciu și magneziu din apă. Pentru determinare se utilizează în laborator echipamentul Ioncromatograf Metrohm. Exprimarea rezultatelor se face în mg / l (ppm).

Principiul metodei : Cationii de interes (litiu, sodiu, amoniu, potasiu, calciu și magneziu) sunt separați prin cromatografie în fază lichidă, folosind eluenți specifici.

Pentru CATIONII de AMONIU, au fost determinate valori peste limita de detecție a aparatului doar în 2018, la stațiile Arinu jos în lunile iunie - 0.057 mg / l și iulie - 0.053 mg / l și la stațiile de la pârlul Bancu în luna iunie : în aval - 0.057 mg / l și în amonte - 0.049 mg / l. În restul probelor valorile pentru acești cationi au fost sub limita de detecție a aparatului.

Pentru CATIONII de LITIU, nu au fost înregistrate valori pe parcursul studiului la nici una din probele prelevate din cele 10 stații, toate fiind sub limita de detecție a aparatului.

Pentru CATIONII de SODIU, valorile determinate au fost cuprinse între 1.27 mg / l și 4.54 mg / l, cu o medie de 2.35 mg / l, cu cele mai mari valori înregistrate la stațiile din aval ale pârâului Călimănel, în timp ce la stația Arinu sus au fost cele mai mici valori. Pe restul cursurilor, au fost fluctuații semnificative în cei doi ani de studiu, aspecte care se pot vedea în fig.7.9.

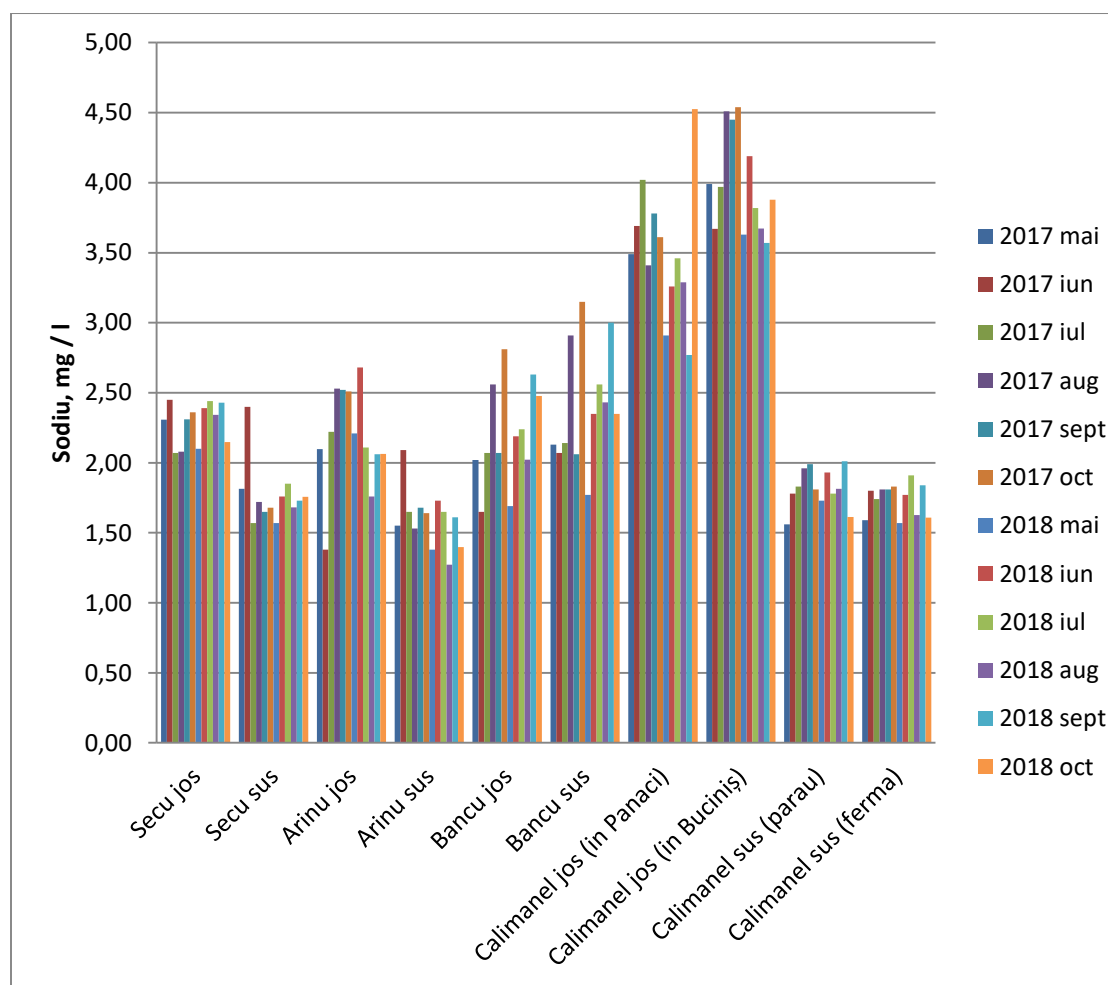


Fig.7.9 Comparație cationi de sodiu 2017 - 2018

Fig. 7.9 Sodium cations comparison 2017 - 2018

Pentru CATIONII de POTASIU, valorile determinate au fost cuprinse între 0 mg / l (de fapt sub limita de detecție a aparatului) și 2.37 mg / l, cu o medie de 0.97 mg / l, cu cele mai mari valori înregistrate la stația Călimănel jos (în Panaci), în timp ce la Călimănel sus (pârâu) sus au fost cele mai mici valori. Pe restul cursurilor, au fost fluctuații semnificative în cei doi ani de studiu, aspecte care se pot vedea în fig.7.10.

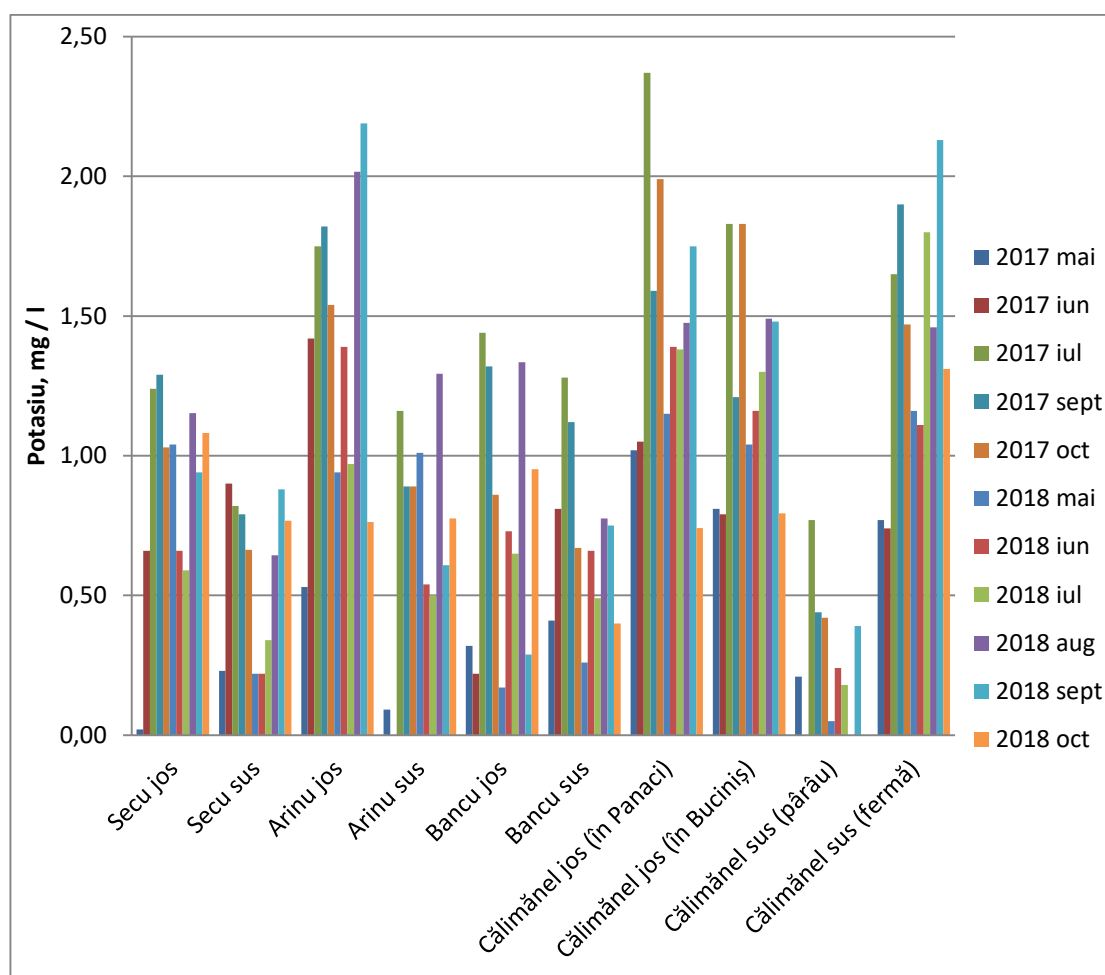


Fig.7.10. Comparație cationi de potasiu 2017 - 2018
Fig. 7.10 Comparison of potassium cations 2017 – 2018

Pentru CATIONII de CALCIU, valorile determinate au fost cuprinse între 2.58 mg / l și 58.62 mg / l, cu o medie de 23.86 mg / l, cu cele mai mari valori înregistrate la stațiile de pârâu Secu, în timp ce la Călimănel sus (pârâu) sus au fost cele mai mici valori. Pe restul cursurilor, au fost fluctuații în cei doi ani de studiu, aspecte care se pot vedea în fig.7.11.

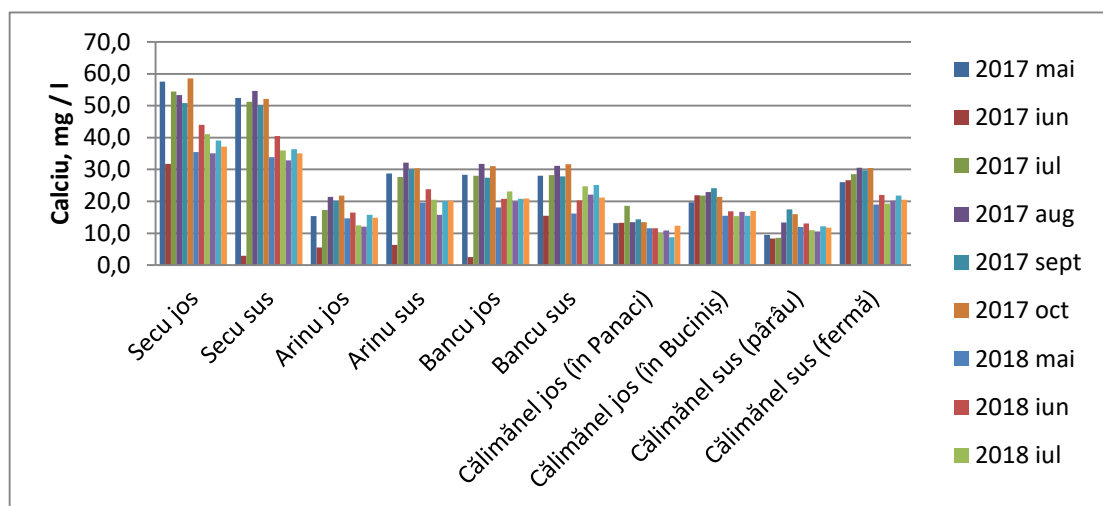


Fig.7.11. Comparație cationi de calciu 2017 - 2018

Fig. 7.11. Calcium cations comparison 2017 – 2018

Pentru CATIONII de MAGNEZIU, valorile determinate au fost cuprinse între 1.53 mg/l și 10.57 mg / l, cu o medie de 4.7 mg / l, cu cele mai mari valori înregistrate la stația Arinu sus, în timp ce la stațiile de pa pârâu Secu, în mod special cea din amonte, au fost cele mai mici valori. Pe restul cursurilor, au fost fluctuații în cei doi ani de studiu, aspecte care se pot vedea în fig.7.12.

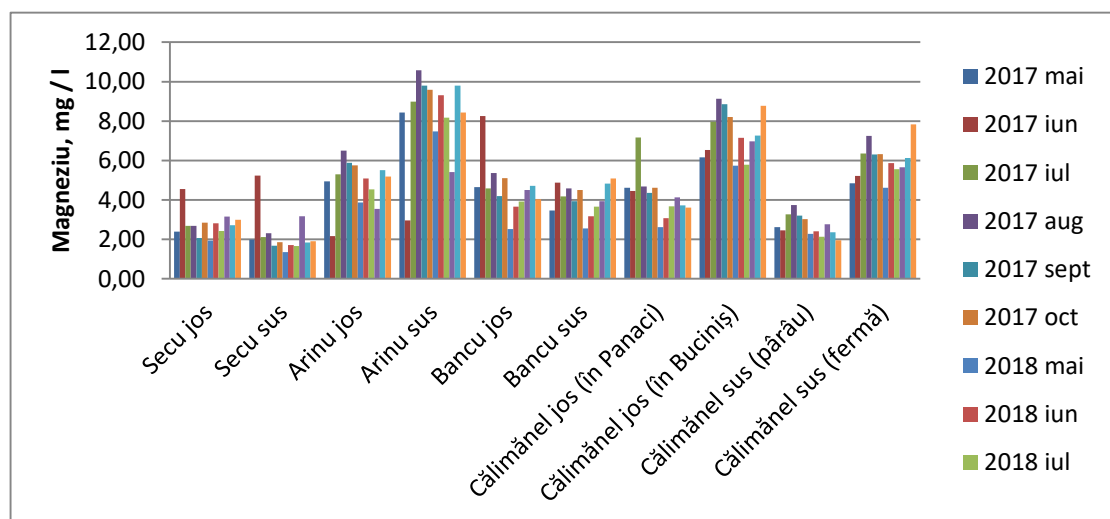


Fig.7.12. Comparație cationi de magneziu 2017 - 2018

Fig. 7.12. Magnesium cations comparison 2017 – 2018

Concluzii parțiale

Principala concluzie a studiului este faptul că emisarii urmăriți au proprietăți fizico-chimice care se apropie de standardele impuse pentru apele minerale naturale, resursă geologică principală pentru bazinul Dornelor, descoperită și utilizată de peste 300 de ani. Activitatea antropică reprezentată în principal de creșterea animalelor, în mare parte în sistem extensiv (ecologic) pare a nu avea un efect negativ asupra calității cursurilor de apă din zonă. Anumiți parametri au avut o evoluție în funcție de sezon, de debit, de fenomene meteorologice extreme (ploi torențiale cu cantități semnificative de apă), de locul de prelevare, adică în amonte sau în aval comunităților umane și nu în ultimul rând de structura geologică a masivelor muntoase din care izvorăsc pâraielor luate în studiu. Ca și concluzii specifice pe fiecare indicator urmărit, se pot extrage următoarele:

- temperatura apei a variat în funcție de sezon și locul prelevării
- valorile pH-ului sunt în ușor alcaline, peste 7.00, cu o singură excepție (Călimănel jos, septembrie 2017) pe care o considerăm o posibilă contaminare accidentală. Variațiile acestui parametru sunt corelate cu substratul geologic, dar și cu activitățile economice diferite. Astfel, valorile cele mai mici ale pH-ului sunt înregistrate la stațiile de pe pâraul Călimănel, unde activitățile antropice sunt mai intense.
- substanțele organice sunt un indicator strâns legat de încărcătura microbiologică și este direct influențat de ploile torențiale de vară, care spală materiile organice de pe versanți. De asemenea și o activitate economică mai intensă din aval determină o creștere a valorilor pentru acest parametru. Valorile cele mai mari au fost obținute la probe prelevate din ambele stații de pe pâraul Arinu după o furtună puternică.
- oxigenul dizolvat este direct influențat de viteza de curgere a apei și de activitatea microorganismelor din apă, dar toate sursele urmărite, fiind ape repezi de munte, au valori crescute la acest parametru, cu observația că daterminarea a fost făcută în maxim o oră de la prelevare. Valorile cele mai mari au fost obținute la probe prelevate din stația Călimănel jos, se datorează vitezei de curgere a apei foarte mare
- conductivitatea, bicarbonicul și duritatea sunt parametri strâns legați de structura geomorfologică specifică locului de izvorâre a fiecarui pârau, fiind indicatori ai mineralizării totale a apei, cu valorile cele mai mici la pâraul Călimănel, care are mineralizarea cea mai scăzută și cele mai mari la pâraul Secu, mineralizare, susținută și de conținutul cel mai ridicat de calciu.
- conținutul de anioni (floruri, bromuri, cloruri, sulfati, fosfati, nitrati, nitriti) este foarte scăzut, valorile obținute încadrându-se în normele impuse pentru apele minerale naturale.
- la nitriti, valoarea maxim admisă este 0,1 mg / L, iar valoarea maximă citită pe ioncromatograf a fost 0.08 mg / L, iulie 2017 în proba prelevată de la stația Călimănel jos (în Panaci). Pentru nitrati, valoarea maxim admisă este 50 mg / L, iar valoarea maximă citită pe ioncromatograf a fost 2.98 mg / L, mai 2017 în proba prelevată de la stația Secu sus.
- cationii (amoniu, litiu, sodiu, potasiu, magneziu, calciu)-este în limitele normale.

CAPITOLUL 8. MONITORIZAREA UNOR PARAMETRI MICROBIOLOGICI AI APEI ȘI A BIOMASEI ALGALE

CHAPTER 8. MONITORING OF SOME MICROBIOLOGICAL PARAMETERS OF WATER AND ALGAE BIOMASS

Un obiectiv important al tezei îl reprezintă monitorizarea unor parametri microbiologici ai apei și urmărirea biomasei algale, în corelație cu sursele de poluare, pentru emisarii cercetați. Indicatorii microbiologici urmăriți au fost: numărul total de germeni, *Escherichia coli* și bacteriile coliforme, enterococii (streptococii) intestinali, *Pseudomonas aeruginosa* și sporii bacteriilor sulfito-reducatoare (genul *Clostridium*).

8.1. Monitorizarea unor parametri microbiologici ai apei

8.1.1. Determinarea numărului total de germeni (NTG)

Numărul total de germeni este format dintr-un grup larg de microorganisme, provenite din diverse surse (sol, vegetație), iar estimarea numărului total oferă informații utile pentru evaluarea și supravegherea calității apei.

Un prim indicator este reprezentat de microorganismele mezofile, care se dezvoltă la 37°C, iar cu cât numărul lor este mai mare, cu atât se presupune că pot include și microorganisme patogene.

Cele mai multe microorganisme din apă sunt cele psihrofile, care cresc la temperaturi cuprinse între 10 și 25°C.

Conform studiilor de specialitate, raportul dintre cele două grupe de bacterii este de 3 : 1, în favoarea florei psihrofile. Micșorarea acestui raport sau inversarea în favoarea florei mezofile, este un indicator al nivelului de poluare al apei, precum și un semnal de alarmă referitor la posibila prezență a unor bacterii patogene (Mănescu, 1989). Metoda folosită în laborator respectă prevederile standardului în vigoare, SR EN ISO 6222 / 2004 Calitatea apei. Numărarea microorganismelor de cultură. Numărarea coloniilor prin însămânțare în mediu de cultură agar.

Procedura de lucru cuprinde mai mulți pași, după cum urmează :

1. Însămânțare
2. Incubare și examinare :
 - Se întorc plăcile și se incubează la 37°C timp de 24 h și la 22°C timp de 72h
 - Se examinează plăcile imediat ce sunt scoase din incubatoare. Se elimină placile cu colonii convergente
3. Numărarea coloniilor

- Pentru fiecare temperatură și pentru fiecare probă, se selectează plăcile care conțin între 10 și 300 de colonii

4. Exprimarea rezultatelor:

- Se exprimă rezultatele obținute în UFC per ml de apă, pentru fiecare temperatură de incubare
- Dacă nici o colonie nu este prezentă în placă, se exprimă rezultatul ca și "Mai puțin de 1 CFU per 1 ml probă" sau în funcție de diluția pe care s-a făcut citirea.
- Dacă sunt mai mult de 300 de colonii în plăci, se exprimă : "mai mare de 300 CFU per 1 ml probă" sau în funcție de diluția pe care s-a făcut citirea.

Medii de cultură: Agar cu extract de drojdie:

- Incubator 22⁰C
- Incubator 37⁰C
- Baie de apă 45⁰C
- Autoclava
- Termometre
- pH-metru
- Numarator de colonii

Materiale necesare :

- Placi Petri sterile cu diametru de 90-100 mm
- Pipete sterile
- Mediu de cultura

Determinarea numărului total de germeni (NTG) la 22 grade C

Modul de lucru este cel descris anterior, specific fiind doar faptul ca plăcile sunt incubate pentru 72 de ore la temperatura de 22 grade C.

Pentru numărul total de germeni la 22 grade C, valorile citite s-au încadrat între 240 UFC/ ml și 82.000 UFC / ml, lucrându-se cu diluții de până 10⁻³, pentru o mai bună acuratețe a rezultatelor.

Analizând toate rezultatele pentru acest parametru, se observă că cele mai mici valori au fost obținute la probele prelevate din stațiile din amonte ale pârâului Călimănel, unde constant rezultatele au fost mult mai mici decât la toate celelalte probe. Valorile cele mai mari au fost citite la probele prelevate de la stațiile de pe Secu și Arinu, toate aceste aspecte fiind mult mai evidente în fig. 8.1.

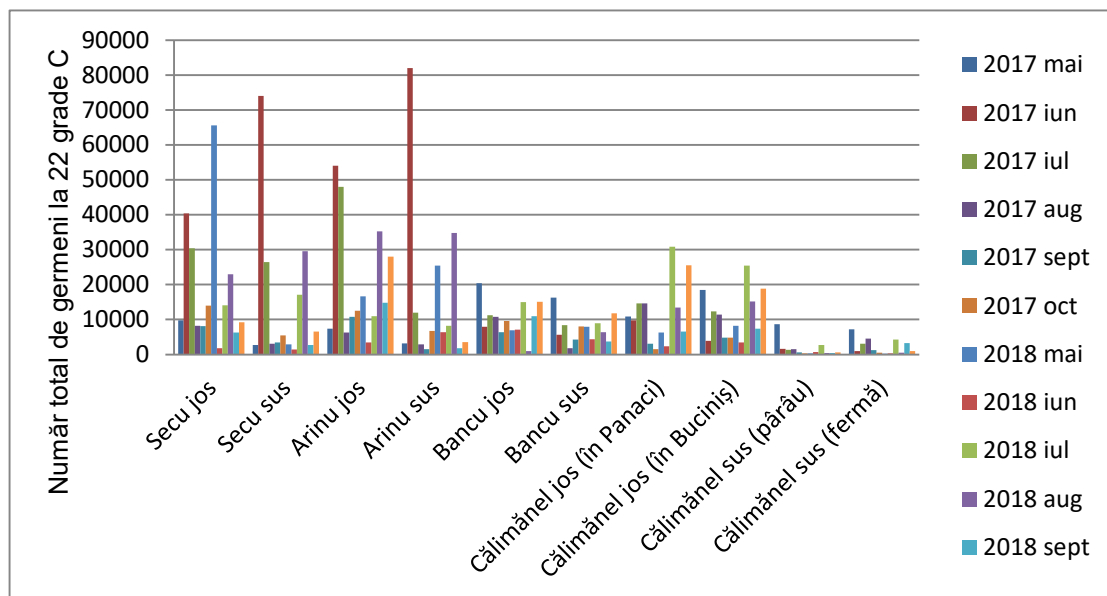


Fig.8.1. Evoluția numărului total de germeni la 22⁰ C, 2017 - 2018

Fig.8.1. Evolution of the total number of germs at 22⁰ C, 2017 - 2018

8.1.2. Determinarea numărului total de germeni (NTG) la 37 grade C

Modul de lucru este același, specific fiind doar faptul ca plăcile sunt incubate pentru 24 de ore la temperatura de 37 grade C.

Pentru numărul total de germeni la 37 grade C, valorile citite s-au încadrat între <100 UFC/ ml și 4.300 UFC / ml, lucrându-se cu diluții de până 10⁻³, tot pentru o mai bună acuratețe a rezultatelor.

Analizând toate rezultatele pentru acest parametru, se observă că cele mai mici valori au fost obținute deasemenea la probele prelevate din stațiile din amonte ale pârâului Călimănel, unde constant rezultatele au fost foarte mici comparativ cu toate celelalte probe. La probele prelevate de la restul stațiilor rezultatele au fluctuat de la o luna la alta, dar se observă valori mai mici la stațiile din amonte față de cele din aval.

Toate aceste aspecte sunt clar evidențiate în fig.8.2.

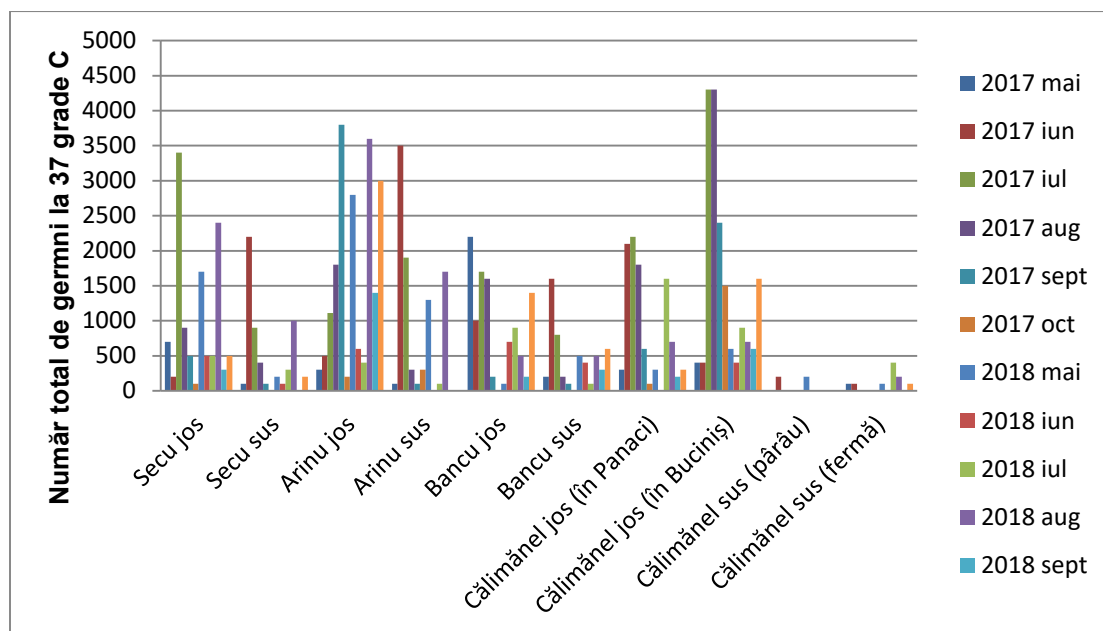


Fig.8.2. Evoluția numărului total de germeni la 37⁰ C, 2017 – 2018
 Fig.8.2. Evolution of the total number of germs at 37⁰ C, 2017 - 2018

8.2. Determinarea bacteriilor coliforme și izolarea speciei *Escherichia coli*

Bacteriile coliforme sunt bacilli Gram -, oxidază -, catalază +, nesporulati, care aparțin familiei *Enterobacteriaceae*, incluzând genurile *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*. Fermentează rapid lactoza cu producere de acid și gaz, la $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (Zarnea, 2011). Au habitatul obișnuit în partea posterioară a tubului digestiv al omului și animalelor, dar pot trăi și se pot multiplica și în mediul extern, motiv pentru care sunt considerate un indicator igienic pentru poluarea cu microorganisme cu origine fecală.

Escherichia coli se diferențiază de restul bacteriilor din grupul coliformelor prin producerea de indol din triptofan, în 21 ± 3 ore, la $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$, de unde se folosește și termenul de termotolerant, iar identificarea acestui germen indică indiscutabil poluarea fecală (Mănescu, 1989). Metoda folosită în laborator respectă prevederile standardului în vigoare, SR EN ISO 9308-1/ 2015 Calitatea apei. Numărarea *Escherichia coli* și a bacteriilor coliforme. Partea 1 : Metoda filtrării prin membrană.

Numărul total de bacterii coliforme este reprezentat de suma coloniilor care au confirmat ca și bacterii coliforme, plus coloniile confirmate ca și *Escherichia coli*. Rezultate se exprimă ca și număr de *Escherichia coli* și / sau bacterii coliforme prezente în 50, 100 sau 250 ml de probă, în funcție de volumul de apă filtrat.

Procedura de lucru cuprinde mai mulți pași, după cum urmează:

1. Filtrare

2. Incubare la 37°C timp de 24 h și diferențiere

Notă: Extinderea timpului de incubare la 44 ± 4 H poate fi utilă în special pentru placile care nu prezintă colonii tipice după $21 \text{ H} \pm 3 \text{ H}$

- Se examinează membranele și se consideră ca și colonii beta-D-galactozidază pozitive toate coloniile de la roz până la roșu, iar ca și colonii beta-D-galactozidază pozitive + beta-D-glucuronidază pozitive cele de la albastru închis până la violet.

- Pentru testele de indol, (fig. 8.4) fermentarea lactozei și oxidază, se selectează de preferință toate coloniile tipice obținute sau un număr reprezentativ (cel puțin 10). Se fac subculture pe agar neselectiv (pentru testul oxidazei), pe mediu cu tergitol (pentru fermentarea lactozei) și într-un bulion triptofan (pentru detectarea *E. coli*).

a) Testul oxidazei

- Se incubează agarul neselectiv la 37° C timp de $21 \text{ H} \pm 2 \text{ H}$.

- Pe o hârtie de filtru se pun 2-3 picături de reactiv pentru oxidază

- Cu o baghetă de sticlă, lemn, ansă de plastic sau platină se recoltează câte o colonie și se etalează pe hartia de filtru

- În prezența oxidazei, o culoare albastru-purpuriu apare imediat (30 secunde).

b) Fermentarea lactozei (fig.8.3.)

- Se incubează placa cu agar TTC tergitol la 37° C timp de $21 \text{ H} \pm 2 \text{ H}$.

- O reacție pozitivă este atunci când apare decolorarea mediul din verde în galben. cum se poate observa în fig. 8.3.

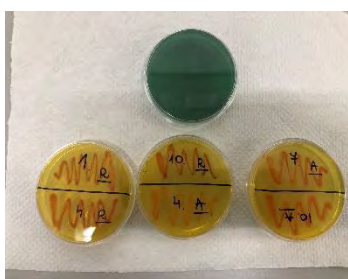


Fig. 8.3 Confirmarea bacteriilor coliforme prin fermentarea lactozei

Fig. 8.3 Confirmation of coliform bacteria by fermentation of lactose



Fig. 8.4 Confirmarea *E. coli* prin testul indolului

Fig. 8.4 Confirmation of *E. coli* by indole test

3. Numărarea coloniilor

- Toate coloniile care au o reacție negativă la oxidază și pozitivă la lactoză= bacterii coliforme.

- Toate coloniile care au o reacție negativă la oxidază și pozitivă la lactoză și indol = *E. coli*.

4. Exprimarea rezultatelor:

- Folosind numărul de colonii caracteristice enumerate pe membrane și luând în considerare rezultatele testelor de confirmare care au fost efectuate, se calculează numărul de *E. coli* și bacterii coliforme prezente în cantitatea de probă însămânțată.

În cadrul laboratorului, toate probele prelevate în timpul studiului au fost lucrate observându-se pregătirea plăcilor pentru determinările microbiologice prin filtrarea prin membrană (bacteriilor coliforme și *E. coli*, enterococi fecali și *Pseudomonas aeruginosa*). (fig.8.5).



Fig.8.5. Pregătirea plăcilor pentru însămânțarea prin metoda filtrării cu membrană

Fig. 8.5 Preparation of plates for seeding by the membrane filtration method

Pentru parametrul bacterii coliforme, valorile citite s-au încadrat între <1 UFC/50 ml și 1650 UFC /50 ml. Analizând toate rezultatele pentru acest parametru, se observă că cele mai mici valori au fost obținute de asemenea la probele prelevate din stațiile din amonte ale pârâului Călimănel, unde constant rezultatele au fost foarte mici comparativ cu toate celelalte probe. La probele prelevate de la restul stațiilor rezultatele au fluctuat de la o lună la alta, dar se observă valori mai mici la stațiile din amonte față de cele din aval. Toate aceste aspecte sunt evidențiate în fig.8.6.

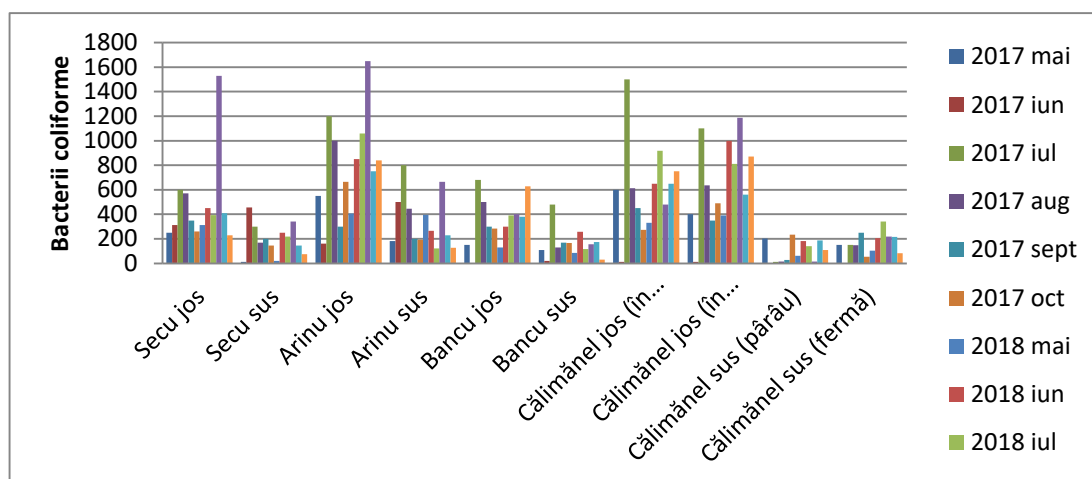
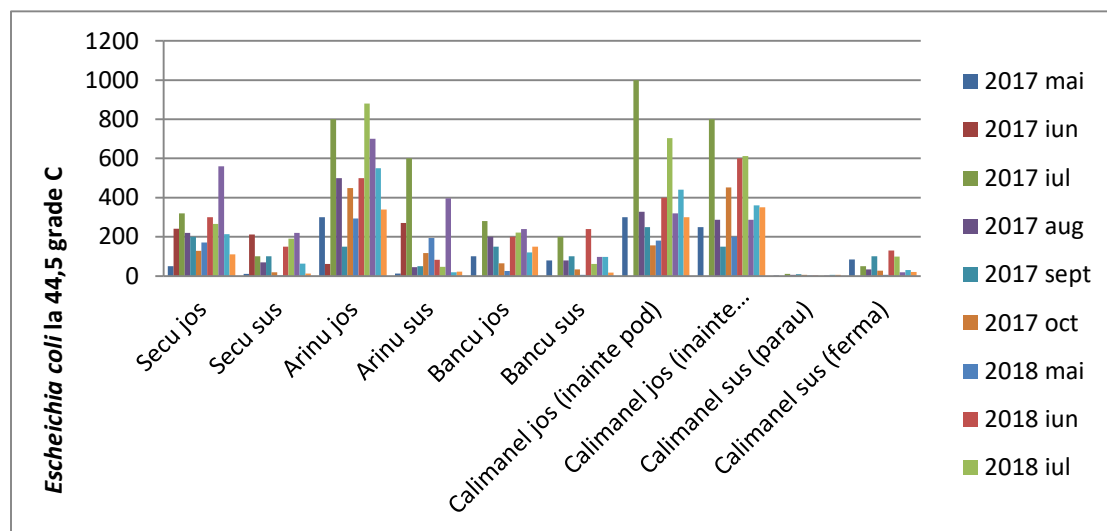


Fig.8.6. Evoluția bacteriilor coliforme, 2017 – 2018

Fig. 8.6 Evolution of coliform bacteria, 2017 – 2018

Pentru *Escherichia coli*, valorile citite s-au încadrat între <1 UFC/ 50 ml și 1000 UFC /50 ml. Analizând toate rezultatele pentru acest parametru, se observă că cele mai mici valori au fost obținute deasemenea la probele prelevate din stațiile din amonte ale pârâului Călimănel, unde constant rezultatele au fost foarte mici comparativ cu toate celelalte probe. La probele prelevate de la restul stațiilor rezultatele au fluctuat de la o lună la alta, dar se observă valori mai mici la stațiile din amonte față de cele din aval. Toate aceste aspecte sunt evidențiate în fig. 8.7.

Fig. 8.7. Evoluția *Escherichia coli*, 2017 – 2018Fig. 8.7 Evolution of *Escherichia coli*, 2017 – 2018

Suplimentar s-au realizat și teste de identificarea speciilor folosind KIT - uri Biomerieux, denumite comercial *API E* pentru grupa coliformilor, care au ca principiu de determinare, un complex de teste biochimice.

Acceste teste au confirmat rezultatele microbiologice de prezență a bacteriei *Escherichia coli* în mai multe probe, de exemplu în proba 2 - Secu sus prelevată în 05 octombrie 2018, după cum se poate observa în fig.8.8.

Fig.8.8. Confirmarea *E. coli* prin testul API. EFig. 8.8. Confirmation of *E. coli* by API. E test

Prin aceleași teste au fost identificate mai multe specii din familia coliformilor, precum *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter amnigenus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia vulgaris*.

8.3. Determinarea Enterococilor (Streptococilor) intestinali

Enterococii (streptococii) sunt bacterii Gram +, nesporulate, catalază -, peroxidază -, sub formă de coci relativ mici (diametru $<2\ \mu$), grupați sub formă de lanțuri, care fac parte din familia *Streptococcaceae*. Se dezvoltă pe medii care conțin sodium azidă (inhibă dezvoltarea bacteriilor gram -), reduc clorhidratul de 2,3,5 trifeniltetrazolium la formazan, hidrolizează esculina în mediu, la $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Au ca și habitat obișnuit tubul digestiv al omului și păsărilor și reprezintă factori de contaminare fecală (indicator igienico-sanitar); în general sunt considerați nepatogeni, dar uneori sunt incriminați în declanșarea unor toxinfecții alimentare.

Metoda folosită în laborator respectă prevederile standardului în vigoare, SR EN ISO 7899-2/ 2002.

Rezultatele se exprimă ca și număr de *Enterococi intestinali* prezenți în 50, 100 sau 250 ml de probă, în funcție de volumul de apă folosit la filtrare.

Procedura de lucru cuprinde mai mulți pași, după cum urmează:

1. Filtrare și incubare:

- Se filtrează cantitatea stabilită de apă
- Se așează membrana pe mediul de cultură agar Slanetz & Bartley, fără a rămâne aer între membrană și mediu.
- Se incubează la 37°C timp de 48 h

2. Confirmarea și numărarea coloniilor:

- După incubare se consideră și caracteristice coloniile crescute, de culoare roșie, maro sau roz, fie în centrul coloniei cât și lateral.

Dacă există colonii tipice, cu o pensetă sterilă, se transferă membrane cu coloniile, într-o placă cu mediu bile-aesculine-azide agar; placa trebuie să fie preîncălzită la 44°C .

- Se incubează la 44°C timp de 2 h
- Se citesc imediat : coloniile tipice care înnegresc mediul de sub membrană sau doar prezintă o tentă neagră de jur împrejur în mediu se considera enterococi intestinali.

3. Exprimarea rezultatelor:

- Folosind numărul de colonii caracteristice numărate pe membrane și luând în considerare rezultatele testelor de confirmare care au fost efectuate, se calculează numărul de enterococi intestinali prezenți în cantitatea de probă filtrată

Echipamente necesare:

- Autoclava
- Echipament pentru filtrarea prin membrană

- Membrane filtrante sterile, diametru 47-50 mm, cu caracteristici de filtrare echivalente unui diametru al porilor de 0,45 μm .

- Incubator 37⁰C, - Incubator 44⁰C, - Baie de apă 45⁰C, - pH-metru, - Termometre

Pentru enterococii intestinali, valorile citite s-au încadrat între <1 UFC/ 50 ml și 650 UFC /50 ml.

Analizând toate rezultatele pentru acest parametru, se observă că cele mai mici valori au fost obținute deasemenea la probele prelevate din stațiile din amonte ale pâraului Călimănel, unde constant rezultatele au fost foarte mici comparativ cu toate celelalte probe. La probele prelevate de la restul stațiilor rezultatele au fluctuat de la o luna la alta, dar se observă valori mai mici la stațiile din amonte față de cele din aval. Toate aceste aspecte sunt clar evidențiate în fig.8.9.

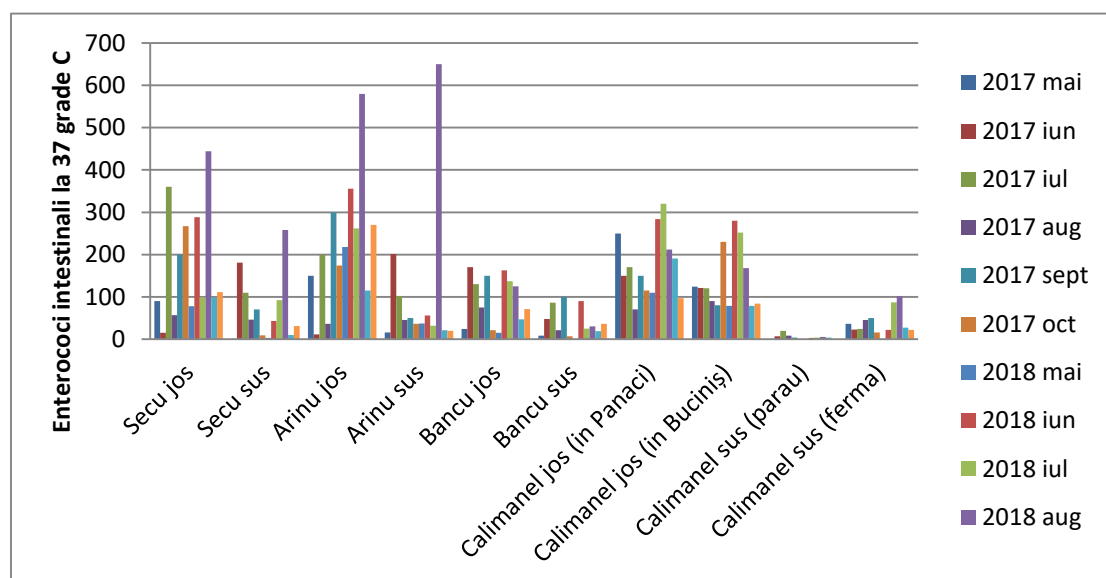


Fig.8.9. Evoluția enterococilor intestinali, 2017 - 2018

Fig. 8.9 Evolution of intestinal enterococci, 2017 - 2018

8.4. Determinarea speciei *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, cunoscut sub denumirea de bacilul piocianic, este o bacterie Gram -, oxidază +, catalază +, nesporulate, bacil cu lungime de 0.5-4 μ , mobil datorită cililor. Este o bacterie de putrefacție, cu habitatul obișnuit în sol, apă dulce stătătoare, apă de canal, dar este frecvent izolată de pe mucoase, piele și tubul digestiv al omului și animalelor sănătoase. Poate provoca infecții purulente la om și animale. Se dezvoltă pe medii de cultură simple ce conțin cetrimid și produc piocianina, coloniile având un miros plăcut, aromat, de amino-acetofenonă (miros de tei).

Metoda folosită în laborator respectă prevederile standardului în vigoare SR EN 16266 / 2008 Calitatea apei. Detectarea și numărarea *Pseudomonas aeruginosa*. Metoda prin filtrare pe membrană.

Se consideră ca și *Pseudomonas aeruginosa*, suma coloniilor caracteristice crescute pe membrană după incubare, adică cele producătoare de piocianină, plus toate coloniile confirmate. Rezultate se exprimă ca și număr de *Pseudomonas aeruginosa* prezente în 50, 100 sau 250 ml de probă, în funcție de volumul de apă folosit la filtrare.

Procedura de lucru cuprinde mai mulți pași, după cum urmează :

1. Filtrare și incubare

- Se filtrează cantitatea stabilită de apă
- Se așază membrana pe mediul de cultura CN agar, fără a rămâne aer între membrană și mediu.
- Se incubează la 37°C timp de 48 h

2. Examinarea membranelor

- Se examinează membranele după 48 ore
- Toate coloniile de culoare albastră/verde (datorită prezenței piocianinei) sunt considerate ca și *Pseudomonas aeruginosa*, fără confirmare
- Se examinează sub radiație UV membranele care au crescut la suprafața colonii albe, gălbui, maro-roșcate (se evită expunerea de lungă durată pentru a evita distrugerea coloniilor care urmează să fie subcultivate pe medii de confirmare)
- Coloniile non-piocianinice fluorescente sunt presumptive de *Pseudomonas aeruginosa* și trebuie confirmate folosind testul oxidazei și bulion acetamidă
- Toate celelalte colonii maro-roșcate care nu prezintă fluorescență sunt presumptive *Pseudomonas aeruginosa* și trebuie confirmate folosind testul oxidazei, mediul King și bulion acetamidă.
- Citirea la 22±2 H este de folos în cazul concreșterii și unirii coloniilor care poate apărea după 44±4 H. Se ia în calcul numărul cel mai mare de colonii *Pseudomonas aeruginosa*.

3. Confirmare

- a) Testul oxidazei
- b) Bulionul acetamidă
- c) Mediu King

Se urmărește apariția fluorescenței pe traseul ansei, care indică prezența *Pseudomonas aeruginosa*.

4. Numărarea

- Se numără ca și *Pseudomonas aeruginosa* toate coloniile care produc piocianina (pigment albastru/verde) sau care sunt oxidază pozitive, fluorescente sub lumină UV, produc amoniac din acetamidă și produc fluorescență în mediul King.

5. Exprimarea rezultatelor

- Folosind numărul de colonii caracteristice enumerate pe membrane și luând în considerare rezultatele testelor de confirmare care au fost efectuate, se calculează numărul de colonii de *Pseudomonas aeruginosa* prezente în cantitatea de probă filtrată.

Pentru enterococii intestinali, valorile citite s-au încadrat între <1 UFC/ 50 ml și 48 UFC /50 ml. Analizând toate rezultatele pentru acest parametru, se observă absența acestei bacterii la toate probele prelevate de la stațiile Călimănel sus (pârâu) și Secu sus, în cei doi ani de studiu. Și la restul stațiilor din amonte au fost puține probe pozitive cu valori mic. La probele prelevate de la stațiile din aval rezultatele au fluctuat de la o luna la alta. Toate aceste aspectele sunt clar evidențiate în fig.8.10.

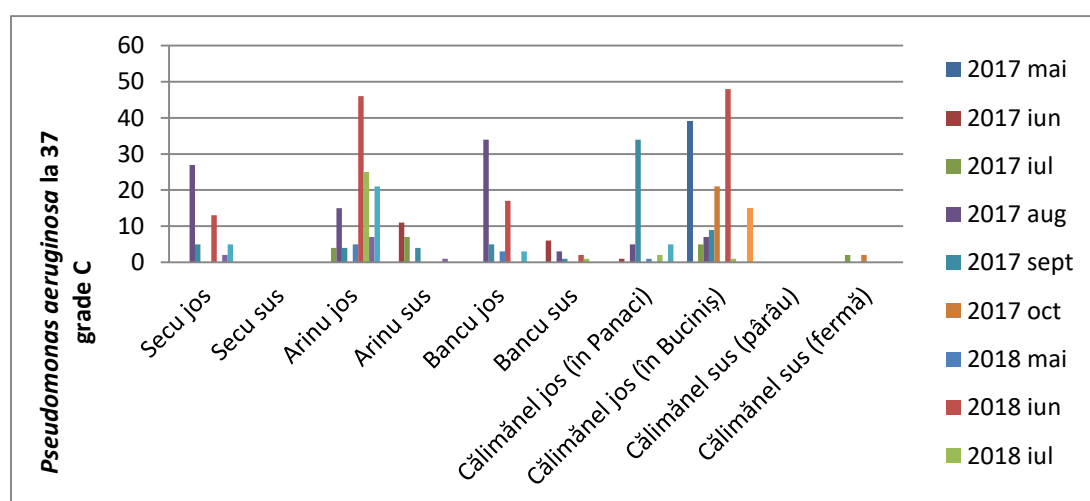


Fig.8.10. Evoluția *Pseudomonas aeruginosa*, 2017 – 2018

Fig. 8.10 Evolution of *Pseudomonas aeruginosa*, 2017 – 2018

Suplimentar s-au realizat și teste de identificarea speciilor folosind KIT - uri Biomerieux, denumite comercial *API NE*, care au ca principiu de determinare, un complex de teste biochimice. Prin aceste teste s-au identificat mai multe specii ale genului *Pseudomonas*: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. luteorla*, *P. stutzeri*.

8.5. Determinarea sporilor de bacterii anaerobe sulfito-reducatoare (*Clostridium*)

Clostridiile sunt bacterii sub formă de bastonașe, din familia *Bacillaceae*, anaerobe, Gram +, sulfito -reducatoare, mobile, sporulate. Sporii supraviețuiesc în sol o perioadă lungă de timp, fiind mult mai rezistenți decât formele vegetative și formează al treilea grup de bacterii cu rol de indicator al poluării fecale, alături de coliformii fecali și streptococii fecali (Mănescu, 1989).

Metoda folosită în laborator respectă prevederile standardului în vigoare SR EN 26461 – 2/ 2001 Calitatea apei. Detectarea și numărarea sporilor de bacterii anaerobe sulfito-reducatoare (*Clostridium*). Partea 2 : Metoda prin filtrare pe membrană.

Principiul metodei : Selectarea sporilor din probă se face prin încălzirea acesteia pe baia de apă la 75°C timp de 15 minute din momentul în care este atinsă temperatura, cu scopul de a distruge formele vegetative. După răcirea probei, se filtrează un volum stabilit de 50 ml de apă, printr-o membrană filtrantă cu diametrul porilor de 0.22 µm, urmând incubarea în condiții de anaerobioză la 36 ± 2°C timp de 44 ± 4 ore pe un mediu de cultură selectiv, sulfid fier agar.

Se consideră ca și spori ai bacteriilor sulfito-reducatoare (*Clostridium*) toate coloniile negre crescute între mediu și membrană după incubare.

Procedura de lucru cuprinde mai mulți pași, după cum urmează:

1. Selecția sporilor

- proba se încălzește în baia de apă la 60°C timp de 15 min. din momentul în care este atinsă temperatura. Paralel, într-un flacon cu apă se menține un termometru pentru supravegherea constantă a temperaturii.

2. Filtrare și incubare

- Se filtrează cantitatea stabilit de probă, încălzită și răcită (50 ml).
- Se așează membrana pe mediul de cultură sulfid fier agar, fără să ramane aer între membrană și mediu.
- Se incubează la 44 ° C timp de 21 ± 3 ore, în condiții de anaerobioză.

3. Confirmare

- Se confirmă toate coloniile crescute pe membrană: negre sau de la gri până la galben maronii, chiar și cele de culoare pală.
- Coloniile crescute pe membrană se pasează pe un mediu de îmbogățire (agar cu sânge, agar columbia sau tripton-soia-agar și se incubează la 44 ° C timp de 21 ± 3 ore în condiții de anaerobioză.
- Coloniile crescute pe mediu de îmbogățire sunt etalate pe o hartie de filtru și se pun 2-3 picături de acid fosfatază. O culoare vișinie dezvoltată în 3-4 minute este considerată reacție pozitivă.

4. Interpretare și exprimarea rezultatelor

- Se consideră *Clostridium perfringens* toate coloniile negre sau gri până la galben maronii, chiar și palide, care au dat reacție pozitivă la acid fosfatază. Pentru acest parametru, valorile citite s-au încadrat între <1 UFC/ 50 ml și 25 UFC /50 ml.

Analizând toate rezultatele pentru acest parametru, se observă absența acestor bacterii la majoritatea probele prelevate de la stațiile din amonte ale pârâului Călimănel, fiind o sigura probă pozitivă, în iulie 2018. La probele prelevate de la restul stațiilor rezultatele au fluctuat de la o luna la alta, dar se observă valori mai mici la stațiile din amonte față de cele din aval. Toate aceste aspecte sunt clar evidențiate în fig.8.11.

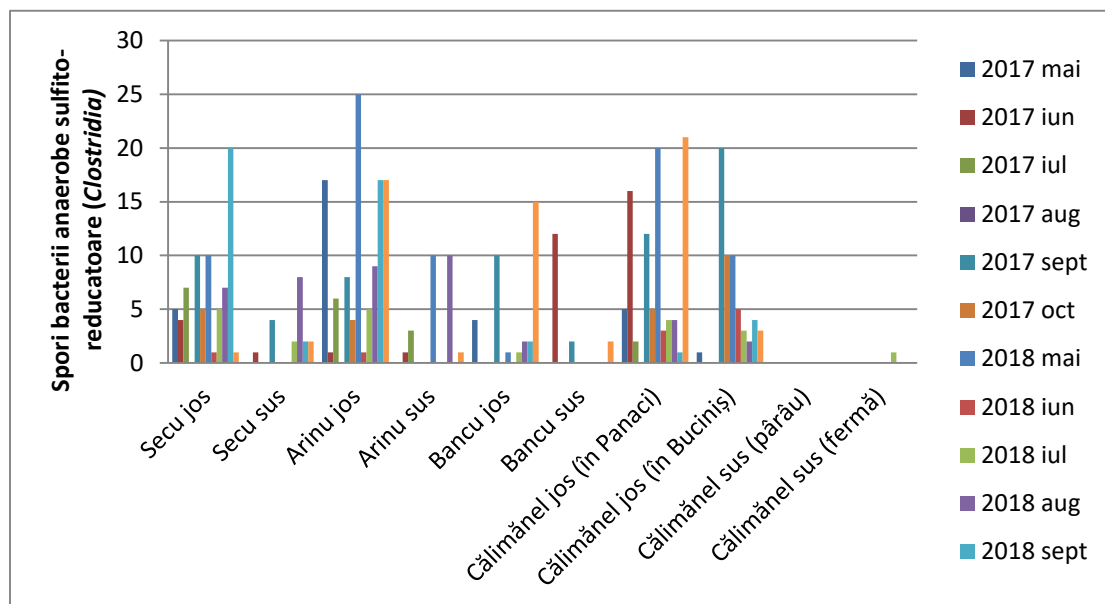


Fig.8.11 Evoluția încărcăturii cu spori al unor bacterii anaerobe sulfito-reducătoare, 2017-2018

Fig. 8.11 Evolution of the spore load of some anaerobic sulfite-reducing bacteria, 2017-2018

8.6. Urmărirea evoluției biomasei algale în corelație cu sursele de poluare

Algele formează un grup de organisme cu importanță practică în lanțurile trofice acvatice, fiind sursă considerabilă de substanță proteică (Șchiopu, 2008).

Cea mai importantă funcție a algelor este fenomenul de fotosinteză, contribuind la oxigenarea mediului acvatic și totodată reprezintă o sursă de materie organică în lanțul trofic al organismelor care trăiesc în apă (Peterfi, 1975).

Clorofila *a* este pigmentul fotosintetic esențial al algelor verzi. Conținutul de clorofilă *a* al apelor de suprafață este un indicator al stării lor trofice. Determinarea sa furnizează informații asupra biomasei și activității fotosintetice al algelor. Cei mai importanți metaboliți ai clorofilei sunt feopigmenții : feofitina și feoforbida, iar raportul clorofila *a* / feopigmenți este un indicator al stării fiziologice al algelor. Conținutul de alge în apă diferă de la sezon la sezon. Primăvara primele alge care apar sunt diatomeele, iar apoi încep să se dezvoltecloroficeele. Cianobacteriile și cloroficeele se succed, având momente maxime de dezvoltare diferite. În momentele de maximă dezvoltare a cianoficeelor, toate celelalte grupe de alge sunt inhibate, singurele care rezintă fiind diatomeele.

Valoarea nutritivă a cloroficeelor este mare, dar datorită volumului celular redus, sunt

depășite în biomasă de cianoficee, care au volum celular mare, dar valoare trofică scăzută, în timp ce diatomeele au o valoare nutritivă medie. Masa algală are o primă etapă de dezvoltare în iunie - iulie și o a doua în septembrie - octombrie. Transparența apei și natura compușilor chimici dizolvați în apă influențează dezvoltarea diferitelor grupe de alge pe parcursul anului.

Metoda folosită în laborator respectă prevederile standardului în vigoare SR ISO 10260 / 1996 Calitatea apei. Măsurarea parametrilor biochimici. Determinarea spectrometrică a conținutului de clorofilă *a*. Pentru toate grupele de alge din apă, rezultatele se exprimă în μg clorofilă *a* / L.

În laborator s-a folosit Spectrometrul BBE Moldaenke AlgaeLabAnalyser, care permite măsurarea absorbției în domeniul vizibil, folosind LED-uri cu diferite lungimi de undă, așa cum se poate observa în fig.8.12.



Fig.8.12. Determinare alge folosind echipamentul BBE ALA
Fig. 8.12 Algae determination using the BBE ALA equipment

8.6.1. Determinarea algelor verzi

Algele verzi sunt încadrate în clasa *Chlorophyceae* și sunt organisme unicelulare sau pluricelulare, cu taluri foarte variate, colorate în verde viu; pot fi microscopice, de la 10 - 30 microni, dar și macrofile, ajungând până 3 m lungime; conțin clorifila *a*, însoțită totdeauna de clorofilă *b* (Peterfi, 1979).

În laborator, folosind spectrometrul BBE, algele verzi sunt citite de LED -urile cu 470 nm lungime de undă, iar rezultatele obținute se încadrează între 0 și 2.35 $\mu\text{g/l}$, cu o medie 0.23 $\mu\text{g/l}$.

Valorile maxime înregistrate sunt la probele prelevate pe 17 iulie 2018, de la stațiile de pe pârâul Arinu, după o ploaie abundentă, valori coroborate cu creșteri exagerate ale substanțelor organice, valori ridicate ale încărcăturii microbiene, dar și cu valori crescute ale algelor albastre-verzi și diatomee. Toate rezultatele sunt centralizate în fig.8.13.

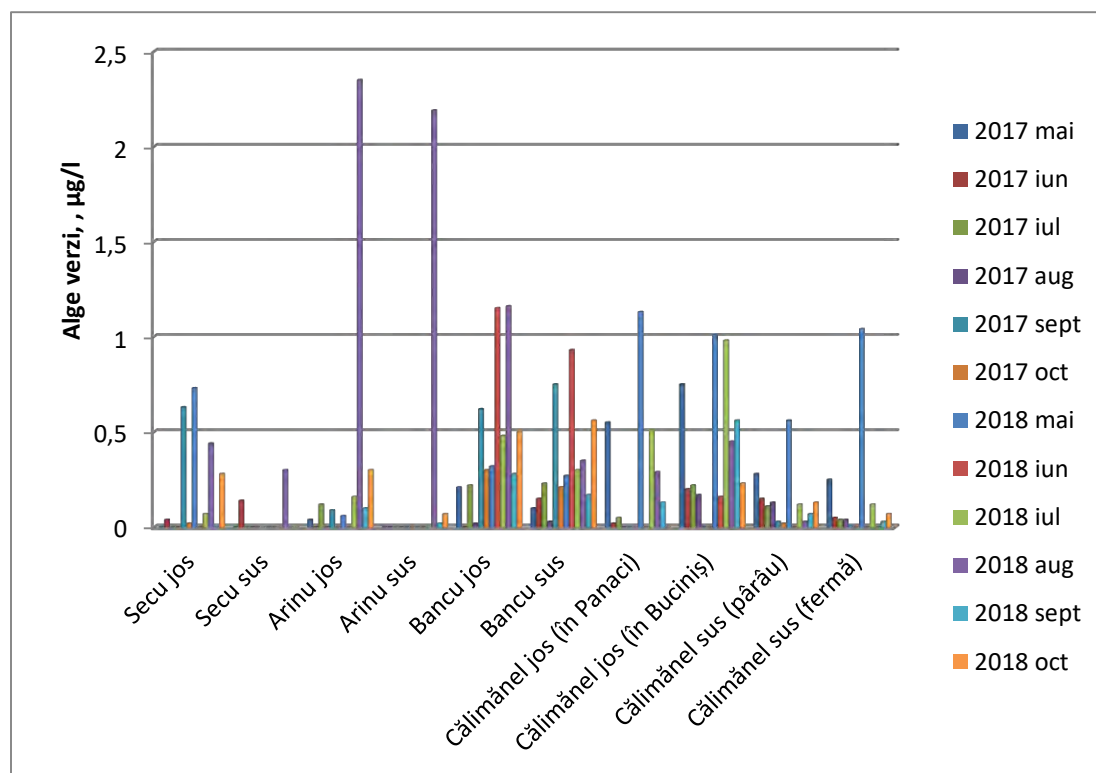


Fig.8.13. Comparație alge verzi, 2017-2018
Fig. 8.13 Green algae comparison, 2017-2018

8.6.2. Determinarea algelor diatomee

Grupul algelor diatomee sunt încadrate în clasa *Bacillariophyceae* și în clasa *Dinophyceae*. Diatomeele din clasa *Bacillariophyceae* sunt alge unicelulare cunoscute sub denumirea de diatomee, cu diametrul de 2 - 400 μm , care au caracteristic prezența la exterior a unui schelet silicios numit frustulă; conțin clorofilă *a*, clorofilă *c*, β caroten, fucoxantină, diatoxantină, diadinoxantină, neofucoxantină A și B (Peterfi, 1981).

Diatomeele din clasa *Dinophyceae* sunt alge unicelulare, denumite ca dinoflagelate; conțin clorofilă *a*, clorofilă *c*, β caroten și xantofile specifice: peridinină, neoperidinină, dinixantină, diadinoxantină (Peterfi, 1981).

În laborator, folosind spectrometrul BBE, diatomeele sunt citite de LED -urile cu 525 nm lungime de undă, iar rezultatele obținute se încadrează între 0 și 2.71 $\mu\text{g/l}$, cu o medie de 0.72 $\mu\text{g/l}$. Se observă valori ușor mai mici la probele prelevate de la stațiile din amonte, dar de observă fluctuații între luni (fig.8.14).

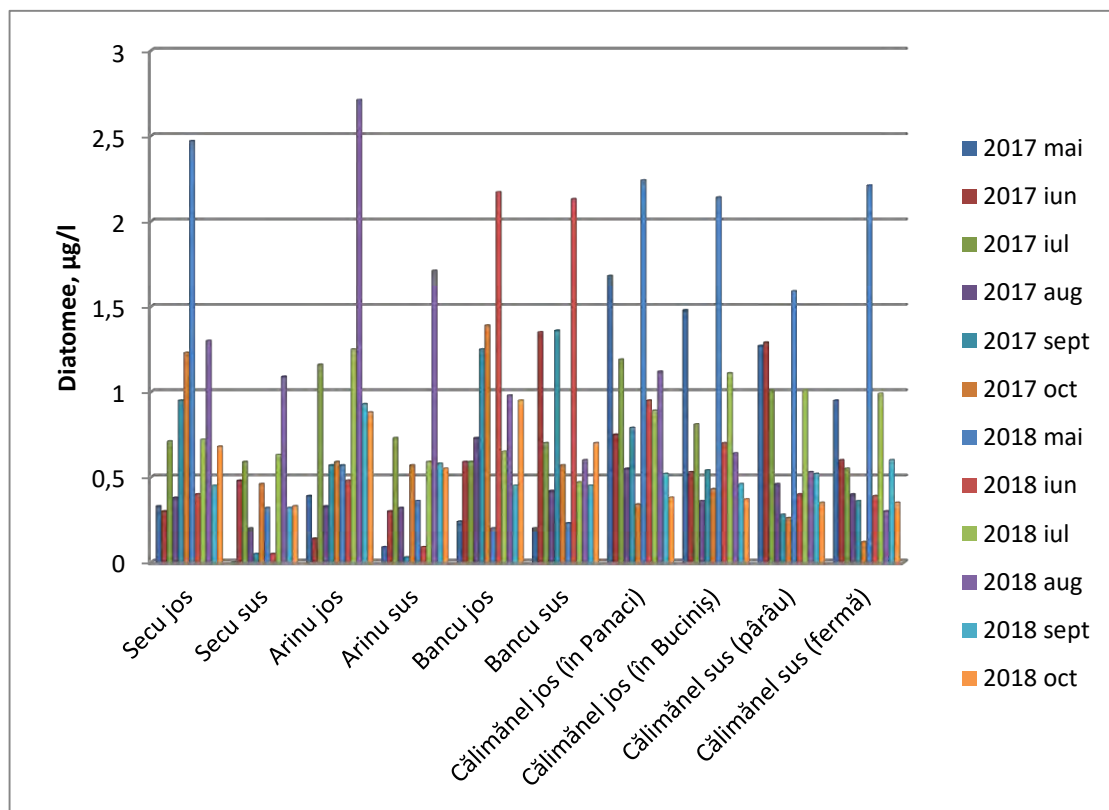


Fig.8.14. Comparație diatomee, 2017-2018

Fig. 8.14 Diatomee Comparison, 2017-2018

8.6.3. Determinarea algelor criptofite

Algele criptofite fac parte din încregătura *Cryptophyta*, grup destul de restrâns de organisme flagelate, care conțin clorofilăa, clorofilăc, α și β caroten, xantofile, ficoeritrină și ficocianică și au amidonul ca principal produs în urma fotosintezei (Peterfi, 1981).

În laborator, folosind spectrometrul BBE, criptofitele sunt citite de LED - urile cu 570 nm lungime de undă, iar rezultatele obținute se încadrează între 0 și 0.58 $\mu\text{g/l}$, cu o medie 0.24 $\mu\text{g/l}$.

Valorile maxime au fost înregistrate la probele prelevate de la stațiile de pe pârâurile Secu sus și Arinu sus. Pentru restul stațiilor de prelevare rezultatele fluctuează semnificativ de la o lună la alta, aspecte care se pot observa în fig.8.15.

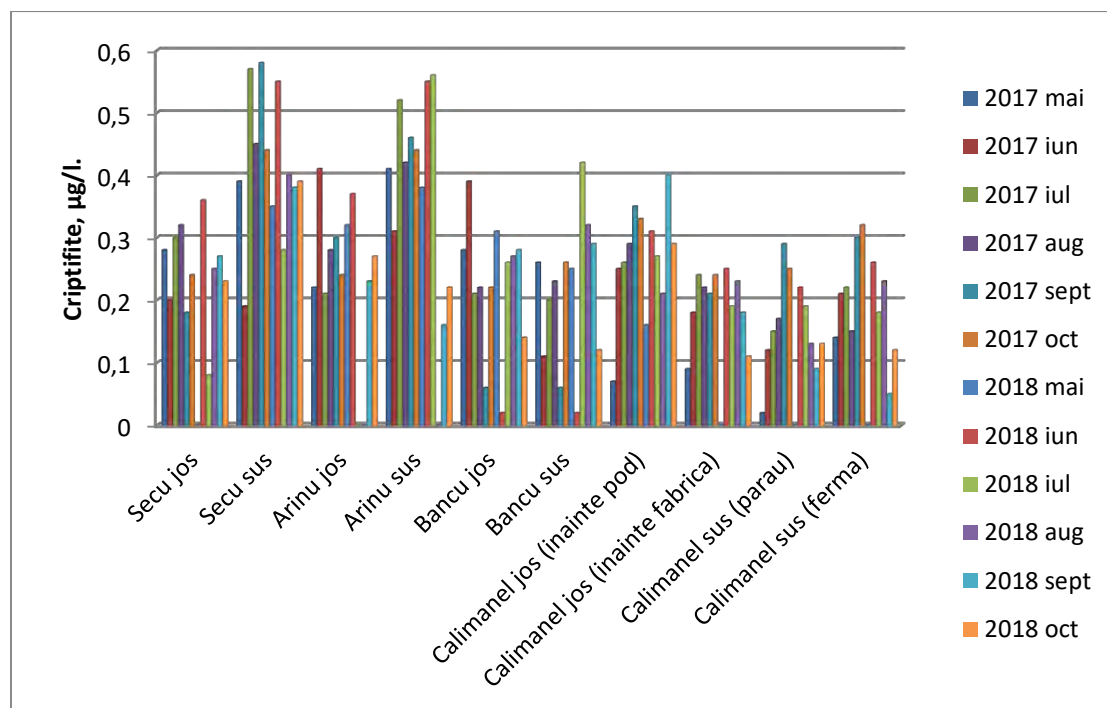


Fig.8.15. Comparație criptofite, 2017-2018

Fig. 8.15 Cryptocurrency Comparison, 2017-2018

8.6.4. Determinarea algelor albastre - verzi

Algele algele albastre - verzi fac parte din grupa *Cyanophyceae*, organisme unicelulare sau pluricelulare, care prezintă clorofilă *a*, ficocianină, ficoeritrină, carotenoizi și alloficocianină, ceea ce le așează în categoria algelor, dar lipsa unui nucleu adevărat, a plastidelor și a reproducerii sexuate, le înrudește cu bacteriile., (Peterfi, 1981)

În laborator, folosind aparatul BBE, algele albastre - verzi sunt citite de LED - urile cu 610 nm lungime de undă, iar rezultatele obținute se încadrează între 0 și 2.49 µg/l, cu o medie de 0.14 µg/l.

Valorile maxime au fost înregistrate la probele prelevate de la stațiile Arinu, iar la probele prelevate de la stațiile din amonte ale pâraului rezultatele au fost negative exceptând luna octombrie 2017. Toate rezultatele sunt centralizate în fig.8.16.

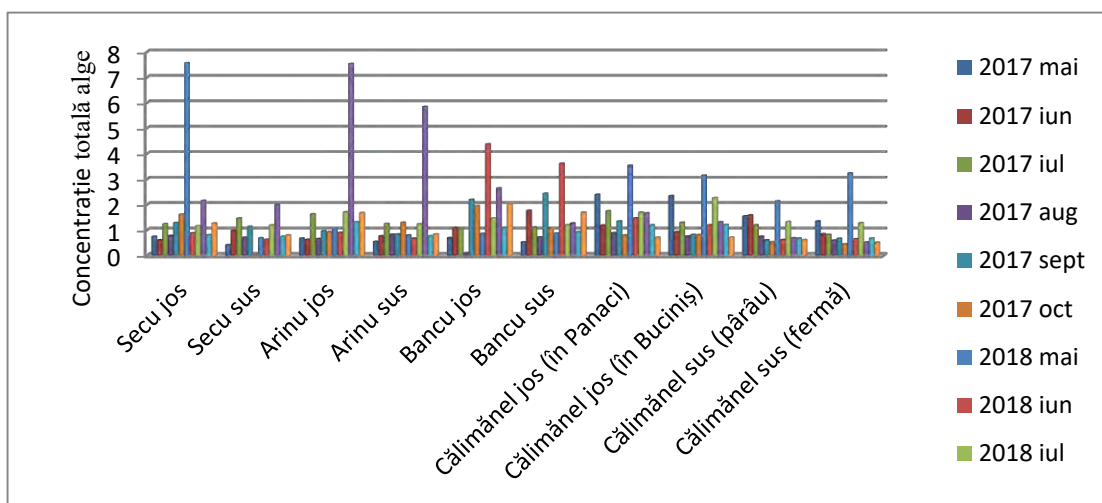


Fig.8.16. Comparație alge albastre - verzi, 2017-2018

Fig. 8.16 Blue-green algae comparison, 2017-2018

8.6.5. Determinarea concentrației algale totală

Prin însumarea valorilor obținute la alge verzi, diatomee, criptofite și alge albastre - verzi se obține concentrația totală algală. Concentrațiile algale totale se încadrează între $0.03 \mu\text{g/l}$ și $7.57 \mu\text{g/l}$, iar media este de $1.35 \mu\text{g/l}$, iar dinamica acestor rezultate este redată în fig.8.17.

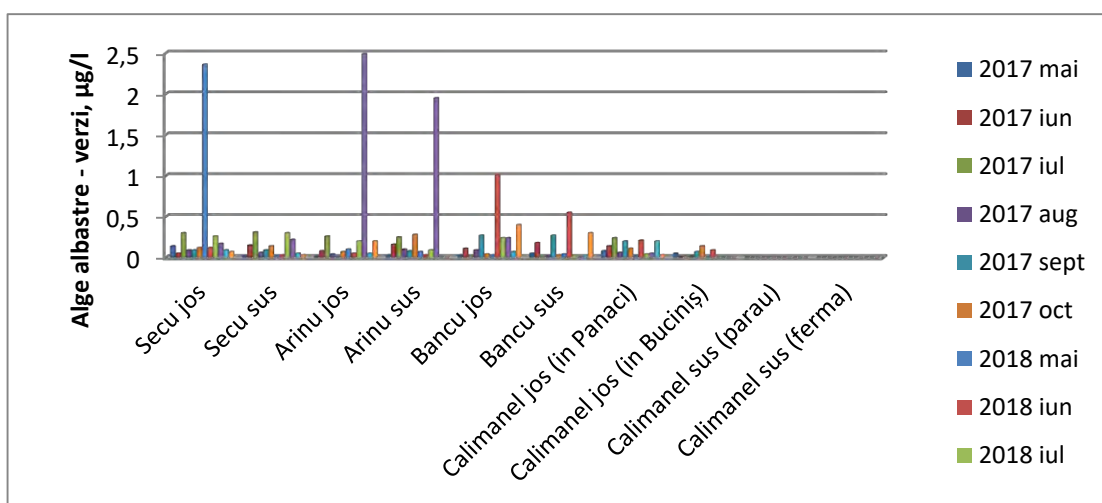


Fig.8.17. Comparație concentrație algală totală, 2017-2018

Fig. 8.17. Total algae concentration comparison, 2017-2018

8.6.6 . Determinarea substanței galbene

Alături de încărcătura algală, se determină și "substanța galbenă", care reprezintă substanțe organice din apă, de altă proveniență decât din alge, fiind un indicator al încărcături organice din apă. Rezultatele se exprimă în unități relative, nu în masă / volum.

În laborator, folosind spectrometrul BBE, substanța galbenă este citită de LED - urile cu 370 nm lungime de undă. Valorile maxime înregistrate sunt coroborate cu valorile foarte ridicate de la substanțele organice din probele prelevate pe 17 iulie 2018, de la stațiile de pe pârâul Arinu, după o ploaie abundentă. Restul valorilor prezintă omogenitate fiind fluctuații mici între luni și stații de prelevare. Aceste aspecte se pot observa în fig. 8.18.

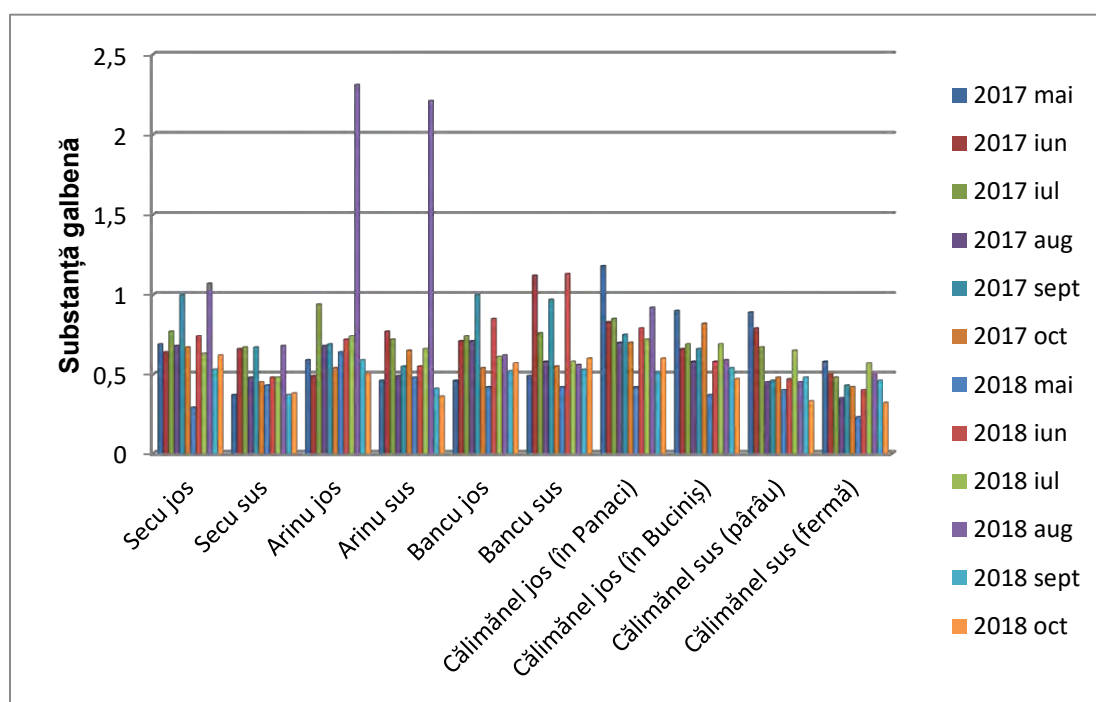


Fig.8.18. Comparație concentrație substanță galbenă, 2017-2018

Fig. 8.18 Yellow matter concentration comparison, 2017-2018

Concluzii parțiale

1. Apele de suprafață au o încăcătură microbiană semnificativă care se multiplică exponențial de la izvor spre colector.

2. Parametrii microbiologici sunt influențați puternic de materiile fecale provenite atât de la animale (sălbatică și domestice), precum și de la gospodăriile populației, neracordate la un sistem centralizat de canalizare, folosindu-se de fose septice, în multe cazuri improprii.

Încărcătura microbiană mare se datorează și sistemului extensiv (ecologic) de creștere a animalelor, care au acces liber la pâraie și izvoare. La cele deja menționate se mai adaugă și exploatarea forestieră care, în majoritatea cazurilor afectează cursul apelor prin trecere cu utilaje grele și material lemnos prin cursurile de apă.

Analizând rezultatele pentru toți parametrii studiați, concluziile specifice sunt următoarele:

- toți indicatorii microbiologici au prezentat variații semnificative între stațiile de prelevare de pe cursul aceluiași pârâu, astfel în amonte valorile sunt mult mai mici decât în aval. Pentru toți parametrii, probele cele mai puțin contaminate au fost cele din amonte ale pârâului Călimănel.
- Indicatorul *Pseudomonas aeruginosa*, la două dintre stații, Călimănel sus (pârâu) și Secu sus, iar sporii de bacterii anaerobe sulfito-reducătoare (*Clostridium*) la stația Călimănel sus (pârâu) au fost absenți în toate probele prelevate în timpul studiului. Probele cu contaminarea cea mai mare au fost cele prelevate din stația Arinu jos și cele din Călimănel jos, fiind evidentă influența antropică prin activitățile economice desfășurate.
- toate tipurile de alge analizate au avut valori apropiate între ele pentru fiecare tip de alge, valori mai mari la toți parametrii fiind înregistrate la probele prelevate de la stația Arinu jos.
- valorile maxime au fost înregistrate la probele prelevate de la stațiile de pe pârâul Arinu în august 2018, după o ploaie torențială, când au fost antrenate cantități mari de substanțe organice.

CAPITOLUL 9. MACRONEVERTEBRATELE BENTICE

CHAPTER 9. BENTHIC MACROINVERTEBRATES

Discutând despre organismele saproxene care se regăsesc în cursurile de apă din bazinul Dornelor, trebuie luate în considerare aspecte importante privind biologia apelor, în primul rând acelea care ne conduc la evaluarea biocenozelor acvatice, prin analiza unor bioindicatori cum sunt larvele acvatice de insecte (de ex.: efemeroptere, plecoptere, trichoptere ș.a.), făcând parte din macrozoobentosul râurilor.

Am găsit necesar acest studiu, întrucât există mai multe directive europene transpuse în legislația românească în domeniul apelor, care au ca obiectiv final, ca toate statele membre să obțină pentru apele de suprafață „starea ecologică și chimică bună”. (Dir.75/440EEC privind calitatea apelor de suprafață destinate prelevării de apă potabilă, Dir.76/46/EEC privind descărcarea apelor periculoase, Dir.78/EEC asupra calității apelor dulci ce necesită protecție sau îmbunătățire pentru a susține viața peștilor, Dir.79/923/EEC asupra calității apelor pentru moluște, transpuse toate în legislația românească respective prin HG 100/2002, HG 459/2002, HG 202/2002, HG 201/2002.

Conform Directivei cadru pentru Ape- Directiva 2000/60EEC (DCA), monitorizarea apelor trebuie să aibă la bază principiul abordării ecosistemice și biologice.

Dacă în capitolele precedente s-a făcut referire la aspecte legate de monitorizarea calității apei și concentrarea unor elemente parazitare ale unor protozoare care pot genera boli zoonotice, ca efect al deversării de materii organice provenite în urma creșterii animalelor în microferme sau în gospodării ale populației din zona montană a bazinului Dornelor, analizând concomitent și calitatea apei prin măsurători multianuale fizico-chimice, microbiologice sau ale conținutului algal, în acest capitol ne-am propus să evidențiem studiul macronevertebratelor bentice existente în aceleași 10 stații de lucru de pe cursurile de apă studiate, în amonte și aval de unele microferme sau aglomerări de comunități umane care ar putea influența calitatea apei prin diferite deversări.

Din punctul de vedere al abordării ecosistemice, apa nu constituie doar o resursă pentru folosințe complexe, ci este privită ca un ecosistem cu valoare ecologică intrinsecă, cu cele două componente: masa apei și sedimentele, unde se află componentele biologice. Potrivit acestei abordări, și noi am studiat în această lucrare, atât factorii abiotici cât și factorii biotici.

Deoarece calitatea actuală a acestor emisari este reflectată și de prezența unor macronevertebrate aparținând unor grupe taxonomice mai pretențioase privind calitatea biocenozei bentonice, am încercat să facem această evaluare biologică fără a recurge la stabilirea IBGN (a indicelui biologic general normalizat), metodă ce presupune o analiză mult mai complexă a taxonilor.

În funcție de dimensiuni, zoobentosul este definit ca și „macrofaună” întrucât animalele care sunt reținute de sita cu ochiuri de 0,5mm iar „microfauna” (meiofaună) este formată din organisme animale care trec prin sita de 0,5mm dar care sunt reținute de sita cu ochiuri de 0,062mm.

Noi am prelevat probe de apă din stații informative (care nu sunt obligatoriu reprezentative pentru un curs de apă dar pun în evidență o particularitate ecologică) –am utilizat stații în amonte și aval de microferme de creștere a animalelor sau gospodării ale populației.

Au fost respectate condițiile optime de prelevare sunt în perioadele de vară și toamnă, datorită poluării maxime, temperaturilor ridicate și a perturbațiilor relativ mici din apă. În alegerea perioadelor de prelevare, se ține cont de faptul că anumiți taxoni pot fi în faza aeriană, de aceea am ales minimum 2 perioade de prelevare, în două stații comparabile ca dimensiuni, viteză de curgere a apei, natura substratului.

Prelevarea probelor s-a realizat folosind prelevatorul tip Surber pe cursurile mai iuți de apă sau ciorpacul limnologic pentru cursurile mai lente de apă (Surgiu, 2008) fig.9.1.



Fig.9.1. Fileul Surber pentru colectarea macronevertebratelor bentonice de pe Neagra, 2018
Fig. 9.1. The Surber net for the collection of benthic macroinvertebrates from Neagra, 2018

O stație de prelevare este definită ca un tronson de apă a cărui lungime trebuie să fie de aproximativ 10 ori mai mare decât lățimea. Pentru a evalua calitatea generală a unui curs de apă, s-a ales o stație reprezentivă. Pentru evaluarea efectului unui poluant, s-au ales 2 stații comparabile.

Indivizii reprezentanți ai macrozoobentosului au fost reținuți în fileul Surber prin poziționarea lui contracurentul apei, apoi au fost triați pe grupe faunistice, fixați în formol 10% și ulterior determinați până la nivel de familie în laborator, cu ajutorul lupei binocular și a determinatoarelor specifice. (fig.9.2.a,b,c).



Fig. 9.2.a. Recoltarea primară cu tot cu sedimente a zoobentosului

Fig. 9.2.a. *Primary harvesting with sediments of the zoobenthos*



Fig. 9.2.b Trierea și fixarea organismelor bentice

Fig. 9.2.b *Sorting and fixation of benthic organisms*



Fig. 9.2.c. Masa de lucru cu probe colectate și fixate în formol, în recipiente

Fig. 9.2.c. *Work table with samples collected and fixed in formalin, in containers*



Pe masa laboratorului de lucru s-a instalat lupa binocular cu camera foto, o lupă portabilă, au fost așezate probe fixate în recipiente cu formol 10% din stațiile de recoltare, au fost așezate acele și pensele penru separarea indivizilor din aceeași specie, notându-se conform

determinatoarelor familiile cărora aparțin reprezentanții macronevertebratele bentonice și aparatul de fotografiat tavile de recoltare cu indivizii din fiecare stație de lucru. (9.2.c.).

La colectările din iunie și octombrie 2018 au fost triate următoarele probe (fig.9.3):

Fig.9.3. (1-18). Macronevertebratele colectate din stațiile de lucru din bazinul Dornelor în 2018

Fig.9.3(1-18)-Macroinvertebrates collected from the workstations in the Dornelor basin in 2018



(1)



(2)



(3)



(4)



(5)



(6)



(7)



(8)



(9)



(10)



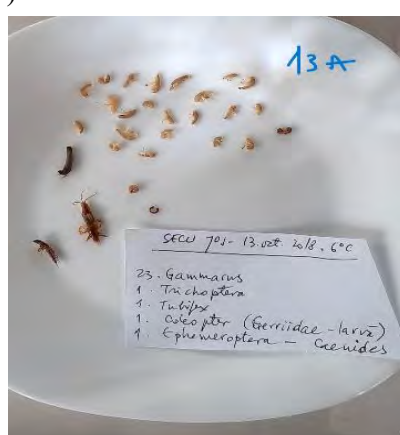
(11)



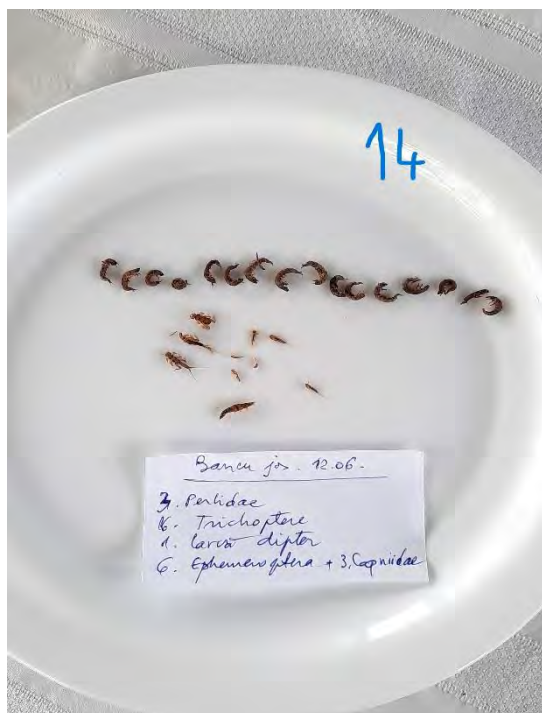
(12)



(13)



(13A)



(14)



(15)



(16)





(17)



(18)

Fig. 9.3 (1-18) Macrozoobentosul din stațiile de lucru colectat în 2017-2018

Fig. 9.3 (1-18) Macrozoobenthos from workstations collected in 2017-2018

Din cadrul comunităților de nevertebrate benthice, efemeropterele (E), plecopterele (P) și trichopterele (T), sunt cele mai utilizate ca bioindicatori având o diversitate a speciilor, sensibile la variațiile factorilor de mediu, sau la modificarea habitatelor (variații rapide de debit, viteză, temperatură, turbiditate). Acest grup de bioindicatori (EPT) răspund atât la impactul de scurtă durată cât și la cel de lungă durată.

Distribuția zoobentosului este influențată și de tipul de substrat, de viteza sau absența curentului, dar și de prezența poluării sub toate formele sale. Cunoșcând aceste condiții hidromorfologice, putem aprecia structura populațiilor și invers, cunoscând structura populațiilor se pot aprecia condițiile în care trăiesc. (Agence de l'Eau, 1993). Ceea ce este de apreciat, pentru acest spectru de biotopuri, în funcție de valența saprobă, putem în general concluziona că taxonii care aparțin celor 3 ordine (EPT) sunt cei mai numeroși în colectările noastre în toate stațiile și în ambele perioade de colectare.

În tabelele 9.1 și 9.2. am sintetizat grupele de macronevertebrate colectate în cele două perioade iunie-octombrie 2018 în emisari, iar în tab.9.3 am cumulat prezența lor pe familii.

Tab.9.1. Tabloul sinoptic al macronevertebratelor bentice recoltate în stații din bazinul
Dornelor în două perioade de colectare : 8 -12- 13- VI. 2018 (6°C)

Table 9.1. Synoptic table of benthic macroinvertebrates collected in stations from the
Dornelor basin in two collection periods: 8 -12- 13- VI. 2018 (6°C) tab.1,2,3)

FAM.	8 -12- 13- VI. 2018 (6 ⁰ C)									
	Arinu		Bancu		Călimănel		Secu			
	sus	jos	sus	jos	sus	jos	sus	jos		
Ord. EPHEMEROPTERA										
Ephemeridae				6						
Ephemerellidae		8		1						
Heptageniidae	1									
Caenidae									1	
Baetidae		8			35	23				
ORD. PLECOPTERA										
Perlidae	10	4	5	3	1	10				
Perlodidae	5	10	10		10	3	2			
Capniidae	10	22	3	3	7	7				
ORD. TRICHOPTERA										
Rhyacophilidae	42				1	3				
Hydropsichidae		6	3	16				1		
Tubi										
T. cu căsuță					3					
ORD DIPTERA										
Simuliidae						2				
Chironomidae										
Ceratopogonidae										
Himenoptera			1*	1*		1				
S.cl.OLIGOCHAETA										
Tubificidae		3	3				1	1		
Ord. AMPHIPODA										
Gammarus						2	29	23		
CL. MOLLUSCA										
Planorbis										

Tab.9.2. Tabloul sinoptic al macronevertebratelor bentice recoltate în stații din bazinul Dornelor în două perioade de colectare : 8 -12- 13- X. 2018 (3-5-7 °C)

Table 9.2. Synoptic table of benthic macroinvertebrates collected in stations from the Dornelor basin in two collection periods: 8 -12- 13- X. 2018 (3-5-7 °C)

FAM.	8 -12- 13- X. 2018 (3-5-7 °C)									
	Arinu (7°C)		Bancu		Călimănel		Secu			
	sus	jos	sus	jos	sus	jos	sus	jos	sus	jos
Ord. EPHEMEROPTERA										
Ephemeridae										
Ephemerellidae			1							
Heptageniidae										
Caenidae								1		
Baetidae										
ORD. PLECOPTERA										
Perlidae										
Perlodidae	15	2	7	16			3			
Capniidae										
Taeniopterigidae			1							
ORD. TRICHOPTERA										
Rhyacophilidae										
Hydropsichidae	6		8	10			2	1		
Tubi	16									
T. cu căsuță	1		8	38				1		
ORD. DIPTERA										
Simuliidae		3								
Chironomidae										
Ceratopogonidae	1		2							
Himenoptera		3								
S.cl. OLIGOCHAETA										
Tubificidae							1			
Ord. AMPHIPODA										
Gammarus		1					82	23		
CL. MOLLUSCA										
Planorbis							1			

Tab.9.3. Tabloul sinoptic al tuturor macronevertebratelor bentice recoltate în stațiile Arinu, Bancu, Călimănel și Secu recoltate în două perioade de colectare.

Table 9.3. Synoptic table of all benthic macroinvertebrates collected in the Arinu, Bancu, Călimănel and Secu stations collected in two collection periods.

FAM.										
	Arinu		Bancu		Călimănel		Secu			
	sus	jos	sus	jos	sus	jos	sus	jos		
Ord. EPHEMEROPTERA										
Ephemeridae				6						
Ephemerellidae		8	1	1				1		
Heptageniidae	1				2	1				
Caenidae								1		
Baetidae		8			35	23				
ORD. PLECOPTERA										
Perlidae	10	4	5	3	1	10				
Perlodidae	20	12	17	16	10	3	5			
Capniidae	10	22		3	7	7				
ORD. TRICHOPTERA										
Rhyacophilidae	42	7			1		1	1		
Hydropsichidae			19	11				2		
Tubi	16	6		16						
T. cu căsuță				38	3	1	2	1		
ORD. DIPTERA										
Simuliidae		3		1		2				
Chironomidae										
Ceratopogonidae	1	1		1						
Himenoptera										
S.cl. OLIGOCHAETA										
Tubificidae	1	3					2	1		
Ord. AMPHIPODA										
Gammarus			3			2	111	46		
CL. MOLLUSCA										
Planorbis							1			

Concluzii parțiale

La stațiile de prelevare din iunie 2018 (tab.9.1.) se observă o abundență a taxonilor în Arinu, cu 68/61 taxoni amonte/aval, la Bancu raportul este 25/30, la Călimănel 57/51 iar la Secu 32/26. Ponderea cea mai mare aparține efemeropterelor, plecopterelor și trichopterelor (EPT). Spre deosebire de sezonul estival, unde abundența taxonilor este mare, în luna octombrie, deși se păstrează ponderea efemeropterelor, plecopterelor și trichopterelor, constatăm o diminuare la jumătate a acestor familii atât în amonte cât și în aval în stațiile de prelevare, odată cu reducerea gradientului termic. (tab.9.2.).

Ouăle simuliidelor se atașează de roci, iar stadiile larvare se hrănesc cu substratul lotic, stând sub apă până la stadiul de pupă, iar atunci când emerg, pot cădea padă păstrăvilor care le vânează la răsăritul soarelui. Simulidiotoxicoza este o boala care apare în zona Dornelor, în cazul invaziilor insectelor asupra bovinelor care pășunează în preajma cursurilor de râu.

Analizând tabloul sinoptic al taxonilor identificați în perioadele de colectare a macronevertebratelor bentonice (9.3), constatăm o abundență crescută în amonte față de aval la toate stațiile, cu o detașare clară a taxonilor de pe pârâul Arinu, cu un număr de taxoni remarcabil, dintre care majoritatea fiind trichoptere (64) și plecoptere (40), aparținând la 8 grupe faunistice. Chiar și în stația Arinu-jos (aval), cei 74 de taxoni identificați, majoritatea fiind plecoptere, ne arată relevanța ecologică a acestor biotopuri.

Din punctul de vedere al abundenței taxonilor, urmează Bancu –sus (amonte) cu 45 taxoni, și respectiv 96 taxoni în stația din aval, dominante fiind în ordine trichopterele (65), urmate de plecoptere (22) și efemeroptere (7).

Pe pârâul Călimănel, semnalăm o abundență a taxonilor din grupul Baetidelor (35 amonte-23 aval). Nimfele de *Baetis* pot fi influențate de viteza curentului, de încărcarea crescută a sedimentelor, de densitate, de schimbări ale oxigenării, de diferiți poluanți, de disponibilitatea hranei sau prădătorii, factori care determină aceste nimfe să realizeze un “drift” - adică un mijloc prin care nimfele se mută într-un habitat mai optim, aspect de comportament important al colonizării noilor habitate în aval. De aceea abundența acestor larve de insecte este remarcabilă doar pe un singur traseu în stațiile analizate, și anume pe pârâul Călimănel, atât în amonte, cât și în aval.

Pârâul Călimănel în zona de amonte este bogat în taxoni, cu reprezentanți din efemeroptere, (*Heptageniidae* 2, *Baetidae* 35), plecoptere (*Perlidae* 1, *Perlodidae* 10, *Capniidae* 7), trichoptere (*Rhyacophilidae* 1, trichoptere cu căsuță 3), diptere (*Simuliidae* 1), amfipode (*Gammarus* 3). În aval lipsesc atât taxoni cât și familii din zoobentosul colectat, observându-se o tendință clară de diminuare a numărului de specii sensibile la presiunea antropică (se reduc plecopterele, dar și trichopterele, nu mai sunt amfipode -*Gammarus*).

Grupul cel mai numeros de taxoni ai pârâului Secu a fost reprezentat de *Gammaridae*. Aceste crustacee amfipode joacă un rol important în ciclul detritusului (de descompunere a gunoii), oferind pradă consumatorilor secundari. Se știe că sunt printre cele mai sensibile specii la compușii toxici metalici dar și poluanții organici, alături de alte crustacee acvatice și cladocere

(*Daphnia*). Gamaridele se hrănesc adesea în mare măsură cu frunzele detritice în descompunere și cresc și supraviețuiesc cel mai bine cu cele care au fost condiționate de colonizarea microbilor și ciupercilor. Amfipodele se pot hrăni, de asemenea, cu o varietate de alte detritusuri organice fine și grosiere, biofilme de alge, microbi și ciuperci și materie animală vie sau moartă. În stația Secu au fost identificate 32 de *Gammaridae* în amonte și 23 în aval, perlodidele și trichopterele cu căsuță făcând deosebirea între cele două stații. Pârâul Secu are o diversitate taxonomică redusă. Efectivele mari realizate de indivizii aparținând genului *Gammarus* denotă în general vorbind, un grad moderat de oxigenare al apei și o viteză redusă a curentului. Trebuie aici să apreciem pe de o parte influența factorilor naturali (variația debitului) iar pe de altă parte impactul antropic generat. Tot pe pârâul Secu, în zona de amonte a fost recoltat un molusc gastropod, reprezentant al genului *Lymnea*, *Planorbis*.

În stațiile Arinu și Secu, în aval de comunitățile umane au fost colectate ca probe, organisme poluo-tolerante ca și tubificidele, viermi oligocheți. Pe lângă aceste grupe a mai fost semnalată prezența unor amfipode, hirudinee, turbelariate, gastropode, isopode, dar în număr redus. (tab.9.2)

CAPITOLUL 10. CONCLUZII FINALE

CHAPTER 10. FINAL CONCLUSIONS

Monitorizarea calității apei prin concentrarea unor elemente parazitare ale unor protozoare care pot genera boli zoonotice, ca efect al deversării de materii organice provenite în urma creșterii animalelor în microferme sau în gospodării ale populației din zona montană a bazinului Dornelor, a fost realizată concomitent cu analiza calității apei prin măsurători multianuale fizico-chimice, microbiologice sau ale conținutului algal, precum și al prezenței macronevertebratelor bentice existente în aceleași 10 stații de lucru de pe cursurile de apă studiate, în amonte și aval de unele microferme sau aglomerări de comunități umane care ar putea influența calitatea apei prin diferite deversări.

1. **Speciile de paraziți cercetate au fost *Giardia spp.* și *Cryptosporidium spp.***, reprezentând principalii factori de risc în toxiinfecțiile de origine parazitară în legătură cu consumul de apă. S-a realizat identificarea din punct de vedere cantitativ al celor două specii, prin teste PCR și secvențiere genomică, indentificându-se speciile *Giardia duodenalis (intestinalis)* și *Cryptosporidium parvum*, prezenți în emisarii bazinului Dornelor, astfel:

Pentru *Giardia spp.* în intervalul studiat 2017 - 2018 s-au identificat 62 de probe pozitive cu 139 chisturi vizualizate la microscop, ceea ce înseamnă o medie 11.5 chisturi / lună. Dintre cele 10 stații de prelevare, încărcătura cea mai mare s-a înregistrat la Călimănel jos (Panaci), cu un total de 33 chisturi identificate pe tot intervalul 2017 - 2018, cu o medie de 2.8 chisturi / lună, urmată de stația Secu (jos) cu un total de 23 chisturi vizualizate și ci o medie de 1.9 chisturi / lună.

Cea mai redusă încărcătură s-a înregistrat la Călimănel sus (pârâu), unde totalul chisturilor vizualizate a fost de 3, cu o medie de 0.25 chisturi / lună, urmată de stația Bancu sus cu un total de 5 chisturi identificate și o medie de 0.4 chisturi / lună. În ambele stații au fost mai multe luni în care nu s-au identificat chisturi de *Giardia spp.*

Pentru *Cryptosporidium spp.* în intervalul mai - octombrie 2017-2018 s-au identificat 19 de probe pozitive cu 19 oochisturi vizualizate la microscop, ceea ce înseamnă o medie 1.58 oochisturi / lună. Dintre cele 10 stații de prelevare, încărcătura cea mai mare s-a înregistrat la Bancu sus, cu un total de 4 oochisturi identificate pe tot intervalul 2017 - 2018, cu o medie de 0.33 oochisturi / lună, urmată de stațiile Secu cu un total de cate 3 oochisturi vizualizate în 2017 - 2018 și cu o medie de 0.25 oochisturi / lună.

De semnalat este faptul că la Călimănel sus (pârâu) nu s-a înregistrat nici o probă pozitivă pe parcursul întregii cercetări. La stațiile Arinu jos, Bancu jos și Călimănel jos (Buciniș) s-a identificat pe parcursul studiului doar câte 1 oochist de *Cryptosporidium*.

Rezultatele obținute au scos la iveală faptul că apele emisarilor luați în studiu au o încărcătură parazităredusă și că în amonte așezărilor umane apa are un grad de puritate ridicat.

Încărcătura mai mare cu *Giardia spp* și *Cryptosporidium spp.* a corespuns unei activități zootehnice existente în zonă, precum și fondului cinegetic. Încărcătura parazităredusă în amonte față de aval dovedește influența comunităților umane, iar identificarea exclusivă a speciei zoonotice *Cryptosporidium parvum* poate fi un indicator al efectului pe care îl exercită fermele de bovine din zona rurală, precum și al fondului cinegetic, asupra pâraielor din zona de munte.

Rezultatele in extenso au fost publicate:

Ionela VOLOSENIUC, Kálmán IMRE, Liviu MIRON, 2022- *Characterisation of the parasite load of river Bistrita tributaries, in Dornelor basin, Romania.* Journal of Applied Life Sciences and Environment, Vol. LIV, Issue 4 (188) / 2021: 450-457.
<https://doi.org/10.46909/journalalse-2021-039>

Pornind de la tema lucrării de față, în cadrul laboratorului de microbiologie, anul acesta am reușit transpunerea în activitatea curentă a metodei de izolare și indentificare a chisturilor de *Giardia* și a oochisturilor de *Cryptosporidium* din apă, matricea fiind deja autorizată DSVSA și în curs de acreditat RENAR, conform standardului international ISO 15553.

2. Cercetarea indicatorilor fizico-chimici ai apei din stațiile cercetate arată că proprietățile fizico-chimice se apropie de standardele impuse pentru apele minerale naturale, resursă geologică principală pentru bazinul Dornelor, descoperită și utilizată de peste 300 de ani. Activitatea antropică reprezentată în principal de creșterea animalelor, în mare parte în sistem extensiv (ecologic) pare a nu avea un efect negativ asupra calității cursurilor de apă din zonă.

Anumiți parametri au avut o evoluție în funcție de sezon, de debit, de fenomene meteorologice extreme (ploi torențiale cu cantități semnificative de apă), de locul de prelevare, adică în amonte sau în aval comunităților umane și nu în ultimul rând de structura geologică a masivelor muntoase din care izvorăsc pâraielor luate în studiu.

Ca și concluzii specifice pe fiecare indicator urmărit, se pot extrage următoarele:

- temperatura apei a variat în funcție de sezon și locul prelevării
- valorile pH-ului sunt în ușor alcaline, peste 7.00, cu o singură excepție (Călimănel jos, septembrie 2017) pe care o considerăm o posibilă contaminare accidentală. Variațiile acestui parametru sunt corelate cu substratul geologic, dar și cu activitățile economice diferite. Astfel, valorile cele mai mici ale pH-ului sunt înregistrate la stațiile de pe pâraul Călimănel, unde activitățile antropice sunt mai intense.
- substanțele organice sunt un indicator strâns legat de încărcătura microbiologică și este direct influențat de ploile torențiale de vară, care spală materiile organice de pe versanți. Deasemenea și o activitate economică mai intensă din aval determină

o creștere a valorilor pentru acest parametru. Valorile cele mai mari au fost obținute la probe prelevate din ambele stații de pe pâraul Arinu după o furtună puternică.

- oxigenul dizolvat este direct influențat de viteza de curgere a apei și de activitatea microorganismelor din apă, dar toate sursele urmărite, fiind ape repezi de munte, au valori crescute la acest parametru, cu observația că daterminarea a fost făcută în maxim o oră de la prelevare. Valorile cele mai mari au fost obținute la probe prelevate din stația Călimănel jos, unde viteza de curgere a apei este foarte mare, chiar dacă influență factorului uman este una însemantă.

- conductivitatea, bicarbonicul și duritatea sunt parametrii strâns legați de structura geo - morfologică specifică locului de izvorâre a fiecărui pârau, fiind indicatori ai mineralizării totale a apei, cu valorile cele mai mici la pâraul Călimănel, care are mineralizarea cea mai scăzută și cele mai mari la pâraul Secu, mineralizare, susținută și de conținutul cel mai ridicat de calciu.

- conținutul de anioni (floruri, bromuri, cloruri, sulfati, fosfati, nitrati, nitriti) este foarte scăzut, valorile obținute încadrându-se în normele impuse pentru apele minerale naturale.

- pentru nitriti, valoarea maxim admisă este 0,1 mg / L, iar valoarea maximă citită pe ioncromatograf a fost 0.08 mg / L, iulie 2017 în proba prelevată de la stația Călimănel jos (în Panaci).

- pentru nitrati, valoarea maxim admisă este 50 mg / L, iar valoarea maximă citită pe ioncromatograf a fost 2.98 mg / L, mai 2017 în proba prelevată de la stația Secu sus.

- conținutul de cationi (amoniu, litiu, sodiu, potasiu, magneziu, calciu) - în limitele normale.

Rezultatele acestui studiu au fost publicate :

Ionela VOLOȘENIUC, Liviu MIRON, 2021- *Monitorizarea unor parametri fizico-chimici pentru apele de suprafață ale unor emisari din bazinul Dornelor*. Scientific Papers Journal - vol. 64 no 2 /ar, VETERINARY SERIES: 66-69.

3. **Parametrii microbiologici analizați în cele 10 stații de lucru** arată că apele de suprafață au o încălătura microbiană semnificativă care se multiplică exponențial de la izvor spre colector. Parametrii microbiologici sunt influențați puternic de materiile fecale provenite atât de la animale (sălbatică și domestice), precum și de la gospodăriile populației, neracordate la un sistem centralizat de canalizare, folosindu-se de fose septice, în multe cazuri improprie.

Încălătura microbiană mare se datorează și sistemului extensiv (ecologic) de creștere a animalelor, care au acces liber la pâraie și izvoare. La cele deja menționate se mai adaugă și exploatarea forestieră care, în majoritatea cazurilor afectează cursul apelor prin trecere cu utilaje grele și material lemnos prin cursurile de apă.

Analizând rezultatele pentru toți parametrii studiați, concluziile specifice sunt următoarele:

- toți indicatorii microbiologici au prezentat variații semnificative între stațiile de prelevare de pe cursul aceluiași pârâu, astfel în amonte valorile sunt mult mai mici decât în aval. Pentru toți parametrii, probele cele mai puțin contaminate au fost cele din amonte ale pârâului Călimănel. - Indicatorul *Pseudomonas aeruginosa*, la două dintre stații, Călimănel sus (pârâu) și Secu sus, iar sporii de bacterii anaerobe sulfito-reducătoare (*Clostridium*) la stația Călimănel sus (pârâu) au fost absenți în toate probele prelevate în timpul studiului. Probele cu contaminarea cea mai mare au fost cele prelevate din stația Arinu jos și cele din Călimănel jos, fiind evidentă influența antropică prin activitățile economice desfășurate.
- toate tipurile de alge analizate au avut valori apropiate între ele pentru fiecare tip, valori mai mari la toți parametrii fiind înregistrate la probele prelevate de la stația Arinu jos.

Rezultatele studiului au fost publicate:

Ionela VOLOȘENIUC, Liviu MIRON, 2021- Monitorizarea unor parametri microbiologici și a compoziției algale în apele de suprafață ale unor emisari din bazinul Dornelor. Scientific Papers Journal - vol. 64 no 2 / 2021, VETERINARY SERIES: 63-65

4. În ceea ce privește analiza calitativă a macronevertebratelor bentice cu rol de bioindicatori de calitate a apei în stațiile analizate, concluzionăm :

La stațiile de prelevare din iunie 2018 se observă o abundență a taxonilor în pârâul Arinu, cu 68/61 taxoni (amonte/aval), la Bancu raportul este 25/30, la Călimănel 57/51 iar la Secu 32/26. Ponderea cea mai mare aparține efemeropterelor, plecopterelor și trichopterelor (EPT). Spre deosebire de sezonul estival, unde abundența taxonilor este mare, în luna octombrie, deși se păstrează ponderea efemeropterelor, plecopterelor și trichopterelor, constatăm o diminuare la jumătate a acestor familii atât în amonte cât și în aval în stațiile de prelevare, odată cu reducerea gradientului termic.

Analizând taxonii identificați în perioadele de colectare a macronevertebratelor bentonice constatăm o abundență crescută în amonte față de aval la toate stațiile, cu o detașare clară a taxonilor de pe pârâul Arinu, cu un număr de taxoni remarcabil, dintre care majoritatea fiind trichoptere (64) și plecoptere (40), aparținând la 8 grupe faunistice. Chiar și în stația Arinu-jos (aval), cei 74 de taxoni identificați, majoritatea fiind plecoptere, ne arată relevanța ecologică a acestor biotopuri.

Din punctul de vedere al abundenței taxonilor, urmează Bancu –sus (amonte) cu 45 taxoni și respectiv 96 taxoni în stația din aval, dominante fiind în ordine trichopterele (65), urmate de plecoptere (22) și efemeroptere (7).

Pe pârâul Călimănel, semnalăm o abundență a taxonilor din grupul Baetidelor (35amonte-23 aval). Nimfele de *Baetis* pot fi influențate de viteza curentului, de încărcarea

creșcută a sedimentelor, de densitate, de schimbări ale oxigenării, de diferiți poluanți, de disponibilitatea hranei sau prădătorii, factori care determină aceste nimfe să realizeze un “drift” - adică un mijloc prin care nimfele se mută într-un habitat mai optim, aspect de comportament important al colonizării noilor habitate în aval. De aceea abundența acestor larve de insecte este remarcabilă doar pe un singur traseu în stațiile analizate, și anume pe pârâul Călimănel, atât în amonte, cât și în aval.

Pârâul Călimănel în zona de amonte este bogat în taxoni, cu reprezentanți din efemeroptere, (*Heptageniidae* 2, *Baetidae* 35), plecoptere (*Perlidae* 1, *Perlodidae* 10, *Capniidae* 7), trichoptere (*Rhyacophilidae* 1, trichoptere cu căsuță 3), diptere (*Simuliidae* 1), amfipode (*Gammarus* 3). În aval lipsesc atât taxoni cât și familii din zoobentosul colectat, observându-se o tendință clară de diminuare a numărului de specii sensibile la presiunea antropică (se reduc plecopterele, dar și trichopterele, nu mai sunt amfipode - *Gammarus*).

Grupul cel mai numeros de taxoni ai pârâului Secu a fost reprezentat de *Gammaridae*. Aceste crustacee amfipode joacă un rol important în ciclul detritusului (de descompunere a gunoierului), oferind pradă consumatorilor secundari. Se știe că sunt printre cele mai sensibile specii la compușii toxici metalici dar și poluanții organici, alături de alte crustacee acvatice și cladocere (*Daphnia*). Efectivele mari realizate de indivizii aparținând genului *Gammarus* denotă în general vorbind, un grad moderat de oxigenare al apei și o viteză redusă a curentului. Trebuie aici să apreciem pe de o parte influența factorilor naturali (variația debitului) iar pe de altă parte impactul antropic generat. Tot pe pârâul Secu, în zona de amonte a fost recoltat un molusc gastropod, reprezentant al genului *Lymnea*, *Planorbis*.

În stațiile Arinu și Secu, în aval de comunitățile umane au fost colectate ca probe, organisme poluo-tolerante ca și tubificidele, viermi oligocheți.

Pe lângă aceste grupe a mai fost semnalată prezența unor hirudinee, turbelariate, gastropode, isopode, dar în număr redus.

BIBLIOGRAFIE

REFERENCES

1. Adler Peter 2022-*World blackflies (diptera: simuliidae): a comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory*. Department of Plant and Environmental Sciences, Clemson University, Clemson, South Carolina 29634-0310, USA, 145 p.
2. Ailenei C., 2005- *Data regarding the diversity of the caddisflies (Insecta, Trichoptera) from the Bistrița River middle basin* In: "Analele Științifice ale Universității "Al.I. Cuza", Iași ", s. Biologie Animală, 51: 85-89.
3. Amoros C., Petts G.E., 1993- *Hydrosystemes fluviaux* . Ed. Masson Paris, 1993, 300p.
4. Airinei Ș.T., Pricăjan A., 1979 - *Apele minerale de consum alimentar din România*, 34, 90
5. AFNOR, N.F. t 90-350, 1992 - *Qualité de l'eau - Détermination de l'indice biologique global normalisé (IBGN)*.
6. Amber J., Appbell R.C., Aandrew T., Merle E, 2005- *Giardia and Cryptosporidium in mammalian life*. Trends in parasitology, Vol.21, no8, aug.2005
7. Antonescu C.S, 1963 - *Biologia apelor*, 18 - 26, 232 – 277
8. Arscott D.B.R., Glatthar, K., Tockner W., J.V., 2002 - *Larval black fly (Diptera:simuliidae). Distribution and diversity along a foodplain river in Alps:* Verh.intrenat.verein.Limnol.,28:1-8
9. *black fly salivary gland extract*. J Immunotoxicol, 11:126-32.
10. Blitz E., 1967 - *Hidrotehnica*, Ed. Tehnică București.
11. Borah S, Goswami S, Agarwal M, Rahman I, Deka M, Chattopadhyay P, et al., 2012 - *Clinical and histopathological study of Simulium (blackfly) dermatitis from North-Eastern India-a report*. Int J Dermatol 2012;51:63-6
12. Botoșăneanu L. 1955. *Note trichopterologice* (I). In:"Bul. Științ. Sect. Biol.", 7(3):791-802.
13. Botoșăneanu L. 1957. *Quelques trichopteres nouveaux de Roumanie*, Tidjdsch. Entomologia, 100(2):179-194.
14. Botoșăneanu L. 1961. *Materiaux pour servir a la connaissance de Trichopteres d'Europe orientale et centrale*. Folia Entomologica Hungarica, Ser. Nov., 14(2): 11-91.
15. Bornuz M., Fazakas B., Simionescu O., Elias M.I., Dăncescu P., Petcu I., 1981 - *Parazitologie Medicală*, 24 - 29, 79 – 81
16. Chattopadhyay P, Goyary D, Dhiman S, Rabha B, Hazarika S, Veer V., 2014 - *Immuno-modulating effects and hypersensitivity reactions caused by Northeast Indian*
17. Chiriac Anca, Piotr Brzezinski, Liviu Miron, Cosmin Moldovan, Cristian Podoleanu, Simona Stolnicu, 1995 - *Simuliosis –a dermatosis caused by black flies*. Int. Japanese

- Society of Allergology- Vol. 65, Issue 2, 217-218.
<https://doi.org/10.1016/j.alit.2015.11.005>
18. Chiriță V., 2003 - *Depresiunea Dornelor, Studiu fizico - geografic*, 11, 218
 19. Ciubuc, C., 1993. Cecklist of Romanian Trichoptera (Insecta), Trav.Mus.Hist.nat. "Gr. Antipa", 33.
 20. Cojoc Gianina et. al., 2016 - *Analiza regimului hidrologic al raului Bistrita in contextual amenajarilor hidrotehnice*. Ed. Terra Nostra, Iasi, ISBN: 978-606-623-061-2
 21. Coman I., 1988 - *Zooigiena și protecția mediului*. Curs lito, IAI
 22. Corlețianu, 1975 - *Regimul termic al apelor freatice din România – INMH*. Studii și cercetări Hidrologice, vol. XLIX, p.337-400, București
 23. Cosoroabă I., 2005- *Zoonoze parazitare*. Ed. First, Timisoara
 24. Cosoroabă I., Dărăbuș Gh., Oprescu I., Morariu S., 2002 - *Diagnostic paraclinic și tehnici experimentale în parazitologie*, 13, 30 - 32, 44 – 45
 25. Dăncescu P. , 2002 - *An invasion of insect Simulium columbaczense (Diptera, Simuliidae) described in an old Romanian chronicle*. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 107:424-6.
 26. Dărăbuș Gh. Și Kalman Imre, 2010 – *Criptosporidioza*. Ed. Agroprint, Timișoara
 27. Decun, M. 1974 – *Cercetări privind răspândirea tipurilor de Escherichia coli in mediul ambiant și rolul lor ca surse de infecție pentru animale și om*. Teză de doctorat, Inst. Agronomic Timișoara.
 28. Dinulescu G., 1966 - *Fauna Republicii Socialiste Romania. Diptera: Simuliidae (mustele columbace), XI, 8].* Bucharest: Editura Academiei Republicii Socialiste Romania; 1966 (in Romanian).
 29. Dulceanu N., Terinte C., 2007- *Parazitologie veterinară, Vol.I*, Ed. Tipo, Moldova Iași.
 30. Duca E., Duca M., Furtunescu G., *Microbiologie medicală*, 1979, 460, 485
 31. Dunca S., Nimițan E., Ailiesei O., Ștefan M., *Microbiologie aplicată*, 2004, 223
 32. Fauna RPR, Tom 7 fasc.3, *Insecta Ephemeroptera*. (Bogoescu C.) Ed. Acad. RPR, 1958.
 33. Fauna RPR, *Crustacea, vol.IV fasc. 4 Amphipoda*, 1955 410 p.
 34. Fleituch, T.M.,1994- Macroinvertebrate drift patterns in relation to eston dynamics in a mountain stream (southern Poland). Verh.intern. Verein. Limnol., 25:1595-1597
 35. Ghețeu, D, 2007 - *Trichoptera larvae as bioindicators for Bistrița River quality assessment*. Entomol.rom., 12: 263-265, 2007. ISSN 1224 – 2594.
 36. Ghețeu D. ,2007- *Contributions to the study of Trichoptera (Insecta: Trichoptera) from the superior catchment area of Bistrița River*. Anal. Stiint. Univ. "Al. I. Cuza", Iași", s., Biol. Anim., v.53
 37. Iacob O, 2002 - *Parazitologie și clinica bolilor parazitare*. Ed. Terra Nostra, Iași
 38. Ionescu A. Mihail., Matilda Lăcătușu. *Entomologie*. Editura Didactică și Pedagogică, București, 1971, 417 p
 39. IFE - Institut francais de l'education, *L'indice biologique global normalise (IBGN)*, 1999

40. James M Trout, Monica Santin, Ellis Greiner, Ronald Feyer, 2005 - *Prevalence and genotypes of Giardia duodenalis in post-weaned dairy calves*. Vet Parasitology 130, 177-183
41. I.N.C.D.D.D. Tulcea - revista *Probleme de Ecologie Teoretică și Aplicată în România – Direcții Actuale*, nr. 13 - *Tehnici de monitoring și evaluare a înfloririlor algale*, 3-4
42. Ivanov A., Ciupe M., Sașcă C., Vancea Doina, *Microbiologie*, 1982, 169, 191
43. Hynes H.B.N., 1970 - *Anatomical and behavioral adaptations on benthic invertebrates, in the Ecology of running waters*. Univ.of Toronto Press, Ontario 161-182
44. Kalman I., 2010 - *Cryptosporidium: de la genă la entitate morbidă*. Ed. Marineasa, Timișoara
45. Macan, T., T., 1979- *A key to the Nymphs of the British species of Ephemeroptera*. Stevney, Outgate, Ambleside. Freshwater Biological Assoc. No.20. Third Ed. 1979.
46. Mălăcea, I., 1969- *Biologia apelor impurificate*. Ed. Academiei RSR, București, 23-115
47. Mănescu S., *Microbiologie sanitară*, 1989, 153 - 136
48. Mihalca I.A., 2015 - *Țara Dornelor - studiu de geografie regională*, , 211-212, 297-298, 300
49. Miron L., 2002 – *Parazitologie veterinară*. Vol.1, Ed. “Ion Ionescu de la Brad”, Iași
50. Miron I., 1960- Contribuții la cunoașterea efemeropterelor din bazinul mijlociu al Bistriței. An. Șt.ale UAIC Iași, secț.II t.VI, fasc.2: 307-314.
51. Miron I., 1960- Plecopterele Carpaților orientali. În An. Șt.ale USAIC Iași, secț.II t.VI. fasc.2:295-300
52. Mitrănescu E., et.al., 1988 - *Din riscurile poluării mediului și alimentului*. Ed. MAST, București.
53. Mitrea I.L., 2002 – *Boli parazitare la animale cu noțiuni de parazitologie generală*. Ed. Ceres București.
54. Motaș C. & V. Anghelescu, 1939- *Punerea în valoare a apelor de munte*, Instit. Cercet. Agron. Ser. Metode, Îndrumări, Rapoarte, Anchete: 49.
55. Motaș C. & V. Anghelescu, 1944- *Cercetări hidrobiologice în bazinul râului Bistrița (Carpații Orientali)*. In: "Publicațiile Institutului de cercetări Piscicole", Ser. Monografii, 2: 1-319.
56. Mohan Gh., Ardelean A., 1993 - *Ecologia și protecția mediului*, 93 – 95
57. Murgoci A., 1953 - *Câteva genuri și specii de Trichoptere noi pentru fauna României*. Bull. Sect. Scient. Biol., 5(1):29-36.
58. Murgoci A., 1960- *Noi contribuții la fauna trichopterelor din bazinul Bistriței (Carpații Orientali)*. Anal. Științ. Univ. Iași, 2, 6(3): 791-800.
59. Năstase C. M.Liliana (Roșca), 2009- *Cercetări privind evoluția indicatorilor microbiologici cantitativi și calitativi la apele potabile în corelație cu parametrii fizico-chimici*. Teza de doctorat USAMV Iași.
60. Naum Tr., Butnaru E., 1989 - *Munții Călimani*, 39, 41

-
61. Olteanu C, 2010 - *Ghid montan*. Rezervații naturale din Bucovina, alpinet. org,
 62. Ortega, G., Pierres Simone M. Caccio, Fayer R., mank T., Smith H, Andrew R thompson 2009 - *Veterinary Parasitology, Giardia and Cryptosporidium from moelcules to dieases*, 30-32, vet Parasitology, Ed. AMA Dataset, Preston
 63. Petrovici Milca, 2009 - *Evaluarea calității râului Crișul Repede, utilizând larvele de efemeroptere (insecta ephemeroptera) ca bioindicatori*. Editura Universității din Oradea, ISBN 978-973-759-978-0
 64. Pața C. GH., 1993 - *Ținutul Vatra Dornei*, 48, 55-56
 65. Pârnu, 1980- *Ecosistemele din România*. Ed. CeresBucurești.
 66. Peterfi St., Ionescu Al., 1976-*Tratat de algologie*, volumul 1, 375 – 376
 67. Peterfi St., Ionescu, Al., 1979-*Tratat de algologie*, volumul 2, 254 – 260
 68. Peterfi St., Ionescu, Al., 1979-*Tratat de algologie*, volumul 3, 152 – 153
 69. Peterfi St., Ionescu Al., 1981- *Tratat de algologie*, volumul 4, 13 - 47, 239 - 246, 261 - 279, 357 - 359
 70. Plutzer Judith, Panagiotis Karanis, Klarissza Domokos, Andrea Törökné, Károly Márialigeti- 2008 - *Detection and characterisation of Giardia and Cryptosporidium in Hungarian raw, surface and sewage water samples by IFT, PCR and sequence analysis of the SSUrRNA and GDH genes*. Int J Hyg Environ Health. DOI: 10.1016/j.ijheh.2008.04.004
 71. Popa N., 1997 - *Vatra Dornei Schiță monografică*, 10, 11, 13, 15, 22, 25-26
 72. Popa M.I., 1999- *Microbiologie generală și microbiologie specială*, note de curs, , 155, 179
 73. Popescu-Marinescu,V., Tesio C., M.Marinescu., Staicu, C., 1997- *Structural cganges induced by zinc action in Tubifex tubifex (Verms Oligochaeta)*, in Rev.Rom. Biol.anim. București t.42, nr.2: 201-212
 74. RIZA report nr: 95.006, *Biological Assessment Methods for Watercourses*, UN/ECE Task Force on Monitoring & Assessment, Working programme 1994/1995, Volume 3.
 75. Rey R., 1979 - *Viitor în Carpați*, 77, 86, 170
 76. Rey R., 1985- *Civilizație montană*. Ed. Șt. Și Enciclopedică, București
 77. Roback, S.S., 1974 - *Insects (Arthropoda: Insecta)*. pp: 313-377 in: C.W. Hart jr. and S.L.H. Fuller (eds.): “*Pollution Ecology of Freshwater Invertebrates*”. Academic Press, N.Y., San Francisco, London.
 78. Rogers, E.B. 1982. *Production of Caenis (Ephemeroptera: Caenidae) in elevated water temperatures*. Freshwater Invertebrate Biology: 1(2): 2-16.
 79. Ronaldo Figueiró, Suzana Silva Dos Santos, Tatiana Nascimento Docile, Tayanna Rodrigues Da Costa1, Christina De Albuquerque Ferreira, Leonardo Henrique Gil-Azevedo, 2020 - *Preliminary observations on the patterns of co-occurrence of Black fly (Diptera: Simuliidae) larvae and some of their potential macroinvertebrate predators*. Revista Brasileira de Entomologia 64(3):e20200046.
-

80. Roșca O.E.(Mare)-2008- Cercetări saprobiologice asupra râului Săsar. Teză de doctorat, Iași.
81. Seghedin T, Răducu A., 1969 - *Rezervațiile naturale din Ținuturile Sucevei*, 21-22, 26-28, 35-36
82. Studemann Denise, Landolt p., Sartori M., Hefti D., Tomka, I.,1992- *Insecta helvetica Fauna. Ephemeroptera*. Edite par la Societe entomologique Suisse par redacteur prof. Sauter W., (version francaise).
83. Stugren b, Dordea m, 1988, Ecologie, Vol.1, 116-118
84. Surugiu V., 2008 - *Limnologie și saprobiologie. Compendiu de lucrări practice*, 9 - 14, 253 – 259
85. Șchiopu E. B., 2008 - *Algologie*, 7- 8
86. Tachet Henri., Bournaud Michel., Richoux Philippe., 1991 - *Introduction a l'etude des macroinvertebres de eaux douces*, Universite Lyon, 132
87. Tachet H, Richoux P.,Ornaud M, Usseglio-Polatera Ph., 2000- Invertebrates d'eau douce.
88. Topală N.D., 1978 -*Microbiologie generală*, vol. I și II, 276-341
89. Țaranu P., 1999 - *Memoria Dornelor - stațiunea balnoclimaterică*, Vol. 3, 17, 56-57, 81
90. Țaranu P., 2002 - *Memoria Dornelor - repere istorice*, Vol. 5, 8, 11, 73-74
91. Tronciu C, Miron L, Acatrinei D., Pavel I, Alexa Ana, Ciuca Lavinia, Ișan Elena, 2014 - *Preliminary research on the parasitic complex of Eimeria , Giardia and Cryptosporidium in young cattle from Nothern Moldavia*. Lucr.st. med. Vet. Timi;oara XLVII(3)
92. Tronciu C, Miron L, Acatrineid., Pavel I,Alexa Ana, Feder Andrei, 2014 - *The distribution of the parasitic complex of Eimeria, Giardia and Criptosporidium in housed calves from Moldavia*. Lucr.st. Med. Vet. Vol.57, 120-125
93. Tudorancea M.M., Tudorancea C., 2000- The need for a conceptual synthesis on a ecological succession. Evol. and adaptation, T.6: 3-16
94. Tudorancea M.M., Tudorancea C., 2002- Are chironomid larvae bioindicators of the water quality in running waters under urban impact?
95. Tudorancea M.M., 2004- Ecologia unor populații de Chironomidae (Diptera) din râul Someșul Mic și bazinul de drenaj al Crișului repede. Teză de doctorat, CjNapoca :62-64)
96. Ujvari I., 1959 - *Hidrografia R.P.R.*, 128
97. Ungureanu D., 2007 - *Studiu economico-managerial privind valorificarea eficientă a potențialului agroturistic în localitățile rurale din Bazinul Dornelor*- Teză de doctorat: Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad” – Iași
98. Vlădică M., 2007 - *Vatra Dornei plai mmioritic de istorie și legendă, leagăn de credință și cultură bucovineană*, 17-25
99. Voloșeniuc Ionela, Kalman Imre, Liviu Miron, 2022 - *Characterisation of the parasite load of river Bistrita tributaries, in Dornelor basin, Romania*. Journal of Applied Life Sciences and Environment, Vol. LIV, Issue 4 (188) / 2021: 450-457
<https://doi.org/10.46909/journalalse-2021-039>

-
100. Voloșeniuc Ionela, Liviu Miron, 2021- Monitorizarea unor parametri microbiologici și a compoziției algale în apele de suprafață ale unor emisari din bazinul Dornelor. *Scientific Papers Journal* – vol. 64 no 2 / 2021, *Veterinary Series*: 63-65
 101. Voloșeniuc Ionela, Liviu Miron, 2021- *Monitorizarea unor parametri fizico-chimici pentru apele de suprafață ale unor emisari din bazinul Dornelor*. *Scientific Papers Journal* -vol. 64 no 2 /, *Veterinary Series*: 66-69.
 102. Wenzel, F., Meyer, E., Schwoerbel, J., 1989. Morphometry and biomass determination of dominant mayfly larvae (Ephemeroptera) in running waters. *Archiv für Hydrobiologie* 118(1): 31-46.
 103. Wetzel, R.G., Likens, G.E., 1979- *Limnological Analyses*. W.B.Saunders Company. Philadelphia-London-Toronto. Wiggins, G.B. 1977. *Larvae of the North American caddis fly genera (Trichoptera)*. University of Toronto. Toronto Press.
 104. Wiley, M.J. and Kohler, S.L., 1980- Positioning changes of mayfly nymphs due to behavioral regulation of oxygen consumption. *Can. J. Zool.* 58: 618-622.
 105. Winberg, G.G. (ed.). 1971. *Methods for the Estimation of Production of Aquatic Animals*. (Trans. by Annie Duncan). Academic Press, London.
 106. Winkler, L.W. 1888. *The determination of dissolved oxygen in water*. Berlin. Deut. Chem. Ges. 21: 2843. Wise, E.J., 1980 - *Seasonal distribution and life histories of Ephemeroptera in a Northumbrian River*. *Freshwater Biology* 10: 101-111.
 107. Wolman, M.G. 1954. *A method of sampling coarse bed material*. *Transactions of the American Geophysical Union* 15: 951-956.
 108. Wright, J.F., Furse, M.T., Armitage, P.D. 1994. *Use of macroinvertebrate communities to detect environmental stress in running waters*. pp: 15-34 in: D.W. Sutcliffe (ed.): “Water Quality and Stress Indicators in Marine and Freshwater Systems”.
 109. Wright, J.F., Hiley, P.D., Berrie, A.D. 1981. *A 9-year study of the cycle of Ephemera danica Müll. (Ephemeridae: Ephemeroptera) in the River Lambourn, England*. *Ecological Entomology* 6: 321-331.
 110. Zamora-Muñoz, C., Sanchez-Ortega, A., Alba-Tercedor, A. 1993. *Physico-chemical Factors that Determine the Distribution of Mayflies and Stoneflies in a High-Mountain Stream in Southern Europe (Sierra Nevada, Southern Spain)*. *Aquatic Insects* 15(1): 11
 111. Zarnea G., *Microbiologie*, 1963, 15, 33
 112. Zarnea G., *Tratat de microbiologie generală, vol II*, 1984, 325
 113. Zarnea G., *Tratat de microbiologie generală, vol IV*, 1994, 681
 114. Zelinka, M. 1977. *The production of Ephemeroptera in running waters*. *Hydrobiologia* 56: 121-125.
 115. Zelinka, M. 1980. *Differences in the production of mayfly larvae in partial habitats of a barbel stream*. *Archiv für Hydrobiologie* 90(3): 284-297. Zarnea G., *Microbiologie generală*, 1970, 241, 435
 116. SR EN ISO 5667 - 1 / 2008 Calitatea apei. Prelevare. Partea 1: Ghid general pentru
-

stabilirea programelor și a tehnicilor de prelevare

117. SR EN ISO 5667 - 3 / 2008 Calitatea apei. Prelevare. Partea 3: Ghid pentru conservarea și manipularea probelor de apă
118. SR EN ISO 5667 - 6 / 2009 Calitatea apei. Prelevare. Partea 6: Ghid pentru prelevări efectuate în râuri și alte cursuri de apă
119. SR EN ISO 5667 - 16 / 2006 Calitatea apei. Prelevare. Partea 16: Ghid general pentru testări biologice ale probelor
120. SR ISO 6107 - 1 / 1998 Calitatea apei. Vocabular. Partea -4
121. SR EN ISO 19458 / 2007: Calitatea apei. Prelevarea pentru analiza microbiologică

Surse internet

<http://eduterre.ens-lyon.fr/thematiques/hydro/travail-coop/protocoles/ibgn/ibgntxt>

***<http://www.donnees.paca.developpement-durable.gouv.fr/docHTML/bilan-labo/IBGN.html>

***http://www.donnees.centre.developpement-durable.gouv.fr/Sta_Qual/IBGN_2007.htm

***<http://lapalettdecouleurs.over-blog.com/article-ecologie-des-cours-d-eau-l-i-b-g-n-78883604.html>

***www.tara-dornelor.ro

***<http://judetulsuceava.ro/descopera/turism/legende/legenda-dornei/>

***<http://www.inbucovina.ro/natura/rezervatii-naturale/12-apostoli/>

***<http://judetulsuceava.ro/locuri/arii-naturale-protejate/rezervatii-naturale/piatra-tibaului/>

***<http://judetulsuceava.ro/locuri/arii-naturale-protejate/rezervatii-naturale/tinovul-poiana-stampeii/>

***<http://judetulsuceava.ro/locuri/arii-naturale-protejate/rezervatii-naturale/tinovul-saru-dornei/>

***<http://turism.bzi.ro/rezervatia-naturala-cheile-zugrenilor-judetul-suceava-galerie-foto-21153>

***<http://judetulsuceava.ro/locuri/arii-naturale-protejate/rezervatii-naturale/jnepenis-cu-pinus-cembra-pn-k/>

***<http://judetulsuceava.ro/locuri/arii-naturale-protejate/situri-natura-2000/rarau-giumalau/>

***<http://judetulsuceava.ro/locuri/arii-naturale-protejate/situri-natura-2000/muntii-rarau-giumalau/>

***<http://judetulsuceava.ro/locuri/arii-naturale-protejate/rezervatii-naturale/codrul-secular-giumalau/>

***<http://judetulsuceava.ro/locuri/arii-naturale-protejate/rezervatii-naturale/pietrele-doamnei-rarau/>

***<http://biodiversitate.mmediu.ro/rio/natura2000/static/pdf/rosco0051.pdf>

***<http://judetulsuceava.ro/locuri/arii-naturale-protejate/situri-natura-2000/larion/>

***<http://judetulsuceava.ro/locuri/arii-naturale-protejate/situri-natura-2000/cusma/>

***<http://judetulsuceava.ro/locuri/arii-naturale-protejate/situri-natura-2000/muntii-maramuresului/>

***<http://judetulsuceava.ro/locuri/arii-naturale-protejate/situri-natura-2000/bistrita-aurie/>

***<http://judetulsuceava.ro/locuri/arii-naturale-protejate/situri-natura-2000/pietrosul-brostenilor-cheile-zugrenilor/>

***<http://judetulsuceava.ro/locuri/arii-naturale-protejate/situri-natura-2000/tinovul-de-la-romanesti/>

***https://ro.wikipedia.org/wiki/Depresiunea_Dornelor

***<https://sybaqu.wordpress.com/>

***<http://www.meridianbioscience.com/diagnostic-products/cryptosporidium-and-giardia/merifluor/merifluor-cryptosporidium-and-giardia.aspx>

***https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/DynabeadsGCCCombo_man.pdf

ANEXA 1 – LISTA ABREVIERILOR

ANNEX 1 – LIST OF ABBREVIATIONS

μl – microlitru
°C - grade Celsius
°dH - grade germane
ADN – acid dezoxiribonucleic
Bp – perechi de baze
CaCO₃ – carbonat de calciu
CCO - consum chimic de oxigen
CFU – unități formatoare de colonii
EDTA – acid etilendiaminotetraacetic
fig. - figură
g – gram
h – oră
HCl – acid clorhidric
IBGN - indice biologic general normalizat
IFT – immunofluorescence test
km – kilometru
KMnO₄ – permanganat de potasiu
l – litru
m - metru
mc – metru cub
mg – miligram
ml – mililitru
mm – milimetru
NaOH – hidroxid de sodiu
NTG - numărului total de germeni
Ord. – ordin
PCR – polymerase chain reaction
pH – indicator acido-bazic
Ppm – părți per milion
Q_{max} – debit maxim
Q_{min} – debit minim
RFLP – restriction fragment length polymorphism
s – secundă
spp. – species
tab. - tabel
μS / cm³ - micro - siemens pe centimetru cub

ANEXA 2 – LISTA FIGURILOR

ANNEX 2 - LIST OF FIGURES

Fig.1.1 Harta depresiunii Dornelor	3
Fig.2.1. Ciclul evolutiv la <i>Cryptosporidium spp.</i>	11
Fig. 2.2. Ciclul evolutiv la <i>Giardia spp.</i>	13
Fig. 2.3. Ciclul evolutiv la <i>Fasciola hepatica</i>	16
Fig. 5.1. Stații de colectare a probelor din bazinul Dornelor	28
Fig.6.1. Prelevarea probei de apă de pe pârâu (a).Transportul la laborator (b). Dispozitiv bicameral de filtrare (c)	30
Fig.6.2. Recipienți sterili cu filtre de unică folosință (a) Recuperarea filtrului la finalul filtrării(b)	31
Fig. 6.3.(a). Spălarea filtrelor; (b) centrifugarea concentratului inițial; obținerea concentratului final în tuburile Dynal	33
Fig. 6.4. Imagini cu chisturi de <i>Giardia spp.</i> (a) și oochisturi de <i>Cryptosporidium spp.</i> (b) în probele de apă recoltate din stațiile de lucru	37
Fig 6.5. Nr. de chisturi de <i>Giardia spp.</i> pe luni, în probele prelevate din afluenți din bazinul Dornelor în 2017 - 2018	38
Fig. 6.6. Nr. de oochisturi de <i>Cryptosporidium spp.</i> pe luni, în probele prelevate din afluenți din bazinul Dornelor în 2017 - 2018	40
Fig.6.7. Imaginea gelului de electroforeză în diagnosticul molecular al speciei <i>Giardia duodenalis</i> ; M – marker molecular; P1-P3 – Probe de lucru arătând benzi de migrare caracteristice la 432 baze perechi	41
Fig.6.8. Imaginea gelului de electroforeză în diagnosticul molecular al speciei <i>Cryptosporidium parvum/hominis</i> obținută în urma amplificării genei SSUrRNA. Coloanele 1 și 5 – markere moleculare (din 100 în 100 bp); coloana 2 – produs de digestie rezultat în urma acțiunii enzimei <i>VspI</i> ; coloana 3 - produs de digestie rezultat în urma acțiunii enzimei <i>SspI</i> ; coloana 4 – amplicon de 850 baze perechi caracteristic diagnosticului molecular al genului <i>Cryptosporidium</i>	41
Fig.7.1. Evoluția temperaturilor -2017-2018	45
Fig.7.2. Evoluția temperaturilor -2018	46
Fig.7.3 Comparatie substanțelor organice oxidabile 2017 – 2018	49
Fig. 7.4. Valorile conductivității între anii 2017 și 2028	54
Fig. 7.5. Ion cromatograf Metrohm	64
Fig.7.6 Comparatie fluoruri 2017 – 2018	65
Fig.7.7 Comparatie cloruri 2017 - 2018	66
Fig.7.8 Comparatie nitrați 2017 – 2018	67
Fig.7.9 Comparatie cationi de sodiu 2017 - 2018	68

Fig.7.10. Comparație cationi de potasiu 2017 - 2018	69
Fig.7.11. Comparație cationi de calciu 2017 - 2018	70
Fig.7.12. Comparație cationi de magneziu 2017 - 2018	70
Fig.8.1. Evoluția numărului total de germeni la 22 ⁰ C, 2017 - 2018	75
Fig.8.2. Evoluția numărului total de germeni la 37 ⁰ C, 2017 – 2018	76
Fig. 8.3 Confirmarea bacteriilor coliforme prin fermentarea lactozei	77
Fig. 8.4 Confirmarea <i>E. coli</i> prin testul indolului	77
Fig.8.5. Pregătirea plăcilor pentru însămânțarea prin metoda filtrării membrană	78
Fig.8.6. Evoluția bacteriilor coliforme, 2017 – 2018	79
Fig. 8.7. Evoluția <i>Escherichia coli</i> , 2017 – 2018	79
Fig.8.8. Confirmarea <i>E. coli</i> prin testul API E	80
Fig.8.9. Evoluția enterococilor intestinali, 2017 - 2018	82
Fig.8.10. Evoluția <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , 2017 – 2018	84
Fig.8.11 Evoluția încărcăturii cu spori al unor bacterii anaerobe sulfito-reductoare, 2017-2018	86
Fig.8.12. Determinare alge folosind echipamentul BBE ALA	87
Fig.8.13. Comparație alge verzi, 2017-2018	88
Fig.8.14. Comparație diatomee, 2017-2018	89
Fig.8.15. Comparație criptofite, 2017-2018	90
Fig.8.16. Comparație alge albastre - verzi, 2017-2018	91
Fig.8.17. Comparație concentrație algă totală, 2017-2018	91
Fig.8.18. Comparație concentrație substanță galbenă, 2017-2018	92
Fig.9.1. Fileul Surber pentru colectarea macronevertebratelor bentonice de pe Neagra, 2016	95
Fig.9.2.a. Recoltarea primară cu tot cu sedimente a zoobentosului	96
Fig.9.2.b Trierea și fixarea organismelor bentice	96
Fig. 9.2.c. Masa de lucru	96
Fig. 9.3 (1-18) Macronevertebratele colectate din stațiile de lucru din bazinul Dornelor în 2018	97

ANEXA 3 – LISTA TABELELOR

ANNEX 3 – LIST OF TABLES

Tab.1. 1. Debite lunare multianuale 1950-2015 pentru pâraul Bancu	4
Tab.1. 2. Debite minime și maxime, 2013 - 2015, pentru pâraul Secu	5
Tab. 1.3. Debite minime și maxime, 2013 - 2015, pentru pâraul Arinul	6
Tab. 1.4. Debite minime și maxime, 2013 - 2015, pârau Călimănel	6
Tab. 6.1. Volume de probă filtrate în 2017 – 2018 pentru identificarea oochisturilor de <i>Cryptosporidium</i> și a chisturilor de <i>Giardia</i>	32
Tab.6.2. Nr. chisturi de <i>Giardia spp</i> identificate în stațiile de lucru în 2017 - 2018	36
Tab.6.3. Nr. de oochisturi de <i>Cryptosporidium spp.</i> pe luni, în probele prelevate din afluenți din bazinul Dornelor în 2017 - 2018	39
Tab.7.1.Temperaturi înregistrate în afluenți din bazinul Dornelor-2017-2018	44
Tab.7.2. Valorile ale pH-lui înregistrate în 2017-2018	47
Tab.7.3. Media pH-ului în stațiile de prelevare	48
Tab.7.4. Valori ale substantelor organice oxidabile, 2017	50
Tab. 7.5. Valori ale substantelor organice oxidabile, 2018	51
Tab.7.6. Valori ale conductivității, 2017	52
Tab.7.7. Valori ale conductivității, 2018	53
Tab.7.8. Valori ale oxigenului dizolvat, 2017	54
Tab.7.9. Valori ale oxigenului dizolvat, 2018	56
Tab.7.10. Valori ale bicarbonicului, 2017	57
Tab.7.11. Valori ale bicarbonicului, 2018	58
Tab. 7.12. Valori ale durității, 2017	60
Tab. 7.13. Valori ale durității, 2018	61

ANEXA 4 – LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

ANNEX 4 – LIST OF PUBLISHED PAPERS

1. Ionela VOLOSENIUC, Kálmán IMRE, Liviu MIRON, 2022- *Characterisation of the parasite load of river Bistrita tributaries, in Dornelor basin, Romania*. Journal of Applied Life Sciences and Environment, Vol. LIV, Issue 4 (188) / 2021: 450-457. <https://doi.org/10.46909/journalalse-2021-039>
2. Ionela VOLOȘENIUC, Liviu MIRON, 2021- Monitorizarea unor parametri microbiologici și a compoziției algale în apele de suprafață ale unor emisari din bazinul Dornelor. Scientific Papers Journal – vol. 64 no 2 / 2021, VETERINARY SERIES: 63-65, ISSN 1454-7406
3. Ionela VOLOȘENIUC, Liviu MIRON, 2021- Monitorizarea unor parametri fizico-chimici pentru apele de suprafață ale unor emisari din bazinul Dornelor. Scientific Papers Journal – vol. 64 no 2 /, VETERINARY SERIES: 66- 69. 63-65. ISSN 1454-7406