

Mic ghid de stabilire a eco-toxicității solului și apelor Small guide establishing eco-toxicity of soil and water

Crina L. Moşneang, Romeo T. Cristina
Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara

Cuvinte cheie: soluri, ape, eco-toxicitate, ghid
Key words: soils, waters, eco-toxicity, guide

Rezumat

Ecotoxicitatea solului și a apelor este una din preocupările majore cu implicații deosebite în calitatea viteții omului și animalelor. În consecință, au apărut numeroase metode de stabilire a gradului de poluare a mediului, care în ultimul deceniu, au cunoscut o dezvoltare extraordinară în ultimii ani, cu aplicare în legislațiile europene și naționale. În review-ul de față se dorește familiarizarea cititorilor cu câțiva indicatori de testare a poluării apei și solului; respectiv testarea pe peștii zebra și râme, organisme recunoscute ca indicatori viabili și sensibili ai poluării. Sunt descrise metodologiile de testare cele mai cunoscute: toxicitatea acută și cronică asupra peștilor; determinarea poluării prin utilizarea râmelor (Protocolul OECD 207). În plus, în capitolul Metodologia analitică de stabilire a eco-toxicității solului și apelor este prezentată sintetic gaz- cromatografia cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS) și aplicațiile în stabilirea gradului de poluare a mediului, iar în ultimul capitol, este prezentată Legislația în domeniul managementul deșeurilor cu legislația Europeană și Românească conexasă.

Abstract

Soil and water ecotoxicity is one of the major concerns with important implications for human and animal life's quality. Consequently, there were appeared many methods to determine the level of environmental pollution, which in the last decade have seen a tremendous development, with the implementation of European and national legislations. The present review is intended to familiarize readers with some indicators of water pollution and soil testing; testing that zebra fish and earthworm bodies recognized as viable and sensitive indicators of pollution. It describes the testing methodology known: acute and chronic toxicity on fish; determining pollution by using earthworms (OECD Protocol 207). In addition, analytical methodology chapter establishing eco-toxicity is summarized soil and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) and applications in determining the degree of environmental pollution, and the last chapter is presented legislation manure management in the EU and Romanian legislation related.

1. Despre utilizarea indicatorilor moderni de poluare apei și solului

1.1. Peștii zebra

Cercetătorii de la Universitatea din Singapore reprezentați prin Gong și col., au utilizat prin manipulare genetică un tip de **pești zebra** care detectează poluanții din apă prin schimbarea culorii.

De obicei, peștii zebra sunt de culoare neagră și argintie iar prin inginerie genetică s-au obținut varietăți de culoare verde sau roșu fluorescent (Fig.1-2.) [7, 12].

Genele fluorescente sunt extrase din meduze și injectate în icrele peștilor zebra. Cu aceste gene corpul peștilor zebra este capabil să ofere o strălucire fluorescentă (Fig.3).

Activarea acestor gene va funcționa ca un comutator pentru activarea diferitelor țesuturi ale peștilor (Fig.4-5).

Până în prezent, cercetătorii au reușit să izoleze două tipuri de promotori de gene la peștii zebra, un promotor inductibil de estrogen și un promotor receptor de stres.

Acești promotori au fost utilizați pentru a induce genele fluorescente de culoare la peștii zebra transgenici [7].

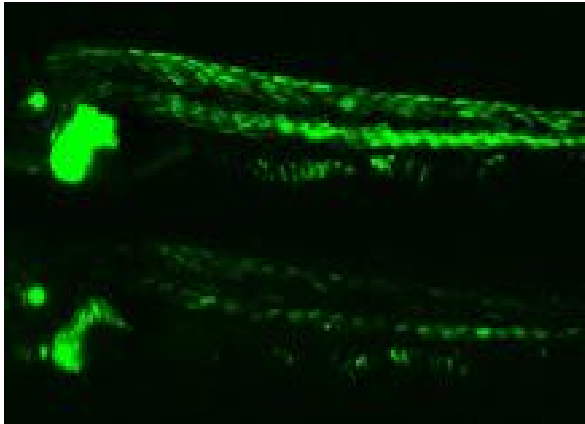


Fig.1. Evidențierea peștilor zebură fluorescenți [37]

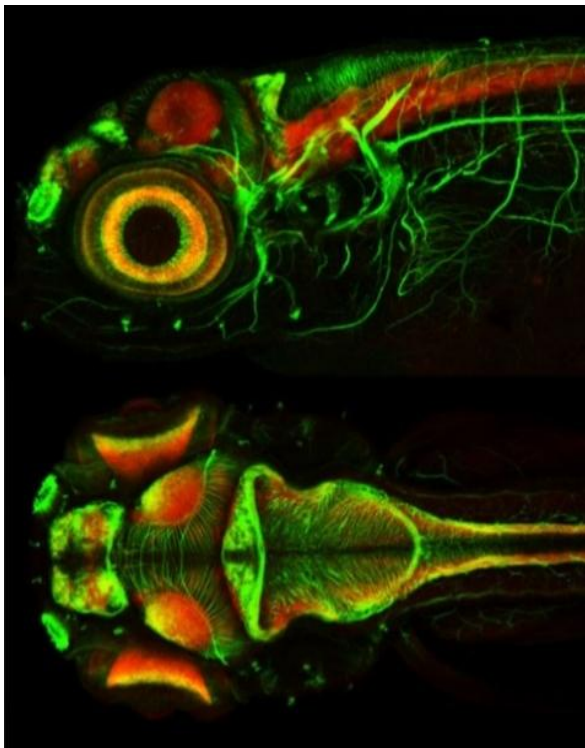


Fig. 2. Neuroanatomia peștilor zebură: axoni (verde) și neuropil (roșu) [45]



Fig. 3. Pești zebură transgenici [37]

Peștii zebură transgenici vor fi capabili să răspundă la prezența substanțelor chimice ca estrogenul prin promotori estrogenici, metale grele și toxine prin promotori receptori de stres.

Peștii își schimbă culoarea dependent de tipul de mediu pentru care a fost specificată culoarea respectivă. Deși s-a conceput doar culoarea roșie și verde a peștilor zebură, Gong a evidențiat faptul că poate adăuga până la cinci culori pe un pește zebură, fiecare culoare indicând un poluant diferit [7, 12, 47].



Fig.4. Embrioni de pești zebură- modificări de culoare ca indicatori de poluare [41]

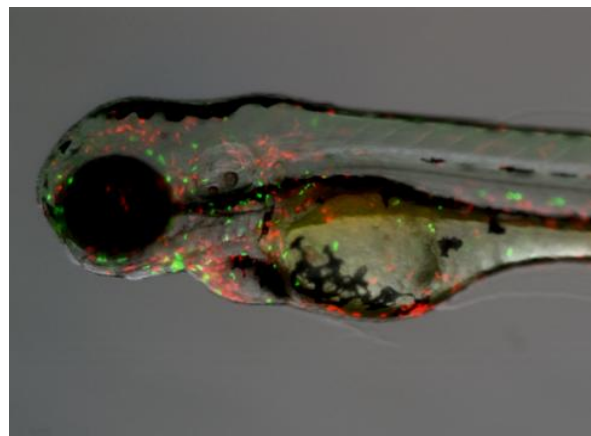


Fig. 5. Embrioni de pești zebură- utilizați în cercetarea bolilor infecțioase la om [40]

1.2. Râmele

Râmele sunt frecvent folosite ca determinanți ai poluării solului [1, 6, 33].

Râmele sunt incluse în încrengătura *Annelida*, clasa *Oligochaeta* (Fig. 6), au un corp aproape cilindric, acoperit cu peri dispuși numai pe părțile laterodorsale și lateroventrale ale segmentelor. În treimea anterioară a corpului se observă o îngroșare

a tegumentului cu aspect de şa, denumit clitellum, cu rol în reproducerea viermilor, secretând un cocon în care sunt depuse ouăle. Formele terestre ale clasei *Oligochaeta* trăiesc în sol, frunzar, humus brut etc., săpându-şi galerii în stratul superficial al solului printre rădăcinile plantelor sau în profunzime.



Fig.6. Aspect macroscopic al reprezentantului clasei *Oligochaeta* [44]

Efectele benefice asupra solului sunt reprezentate de aerarea solului, transportul solului mineral din profunzime spre suprafaţă şi al solului biogen spre profunzime.

O mare parte participă şi la procesele de transformare a resturilor vegetale în humus.

Mediul de viaţă este reprezentat de sol, care odată înghiţit trece prin tubul digestiv, unde substanţele nutritive sunt reţinute iar resturile nedigerate eliminate sub formă de excremente la suprafaţa solului [1, 10, 14].

1.2.1. Etologia şi ecologia râmelor

Râmele nu prezintă organe respiratorii adecvate astfel fiind necesar un contact intim între suprafaţa corporală şi apă pentru a realiza schimburi gazoase. Amoniacul excretat se elimină în prezenţa unei cantităţi crescute de urină hipotonică.

Presiunea hidrostatică a lichidului celomic influenţează mobilitatea şi săparea galeriilor fiind dependente de o cantitate de apă a organismului de peste 18% [13].

Durata de viaţă pentru *Eisenia fetida* este de 4,5 ani iar pentru *Lumbricus terrestris* în jur 6 ani [46].

Lumbricidele pot fi împărţite în trei grupuri morfo-ecologice, specii dependente de modul de hrănire şi de construcţie a galeriilor după cum urmează:

1. Epigeice, trăiesc pe suprafaţa solului, în tăviţele plantelor, în substraturi organice. Sunt organisme de dimensiuni reduse adaptate la condiţiile de umiditate şi temperatură de la suprafaţa solului şi sunt greu adaptabile în straturile de adâncime.

Pe perioada diapauzei sapă galerii temporare în solul mineral. *Eisenia fetida* se utilizează în vermicompostare dispunând de o perioadă scurtă între generaţii.

2. Endogeice, trăiesc în straturile de sol de la suprafaţă şi se hrănesc cu sol şi materie organică. Acestea nu construiesc galerii permanente, canalele temporare se vor umple cu material coprolitic în urma deplasării râmelor şi excreării din intestine.

Galeriile săpate sunt orizontale şi arborescente. Importanţa acestora este în descompunerea rădăcinilor, amestecarea straturilor de sol şi în aerarea solului.

3. Anecice, care construiesc galerii verticale permanente, pătrunzând adânc în sol. Sunt detritivore trăgând hrana în galerii săpate până la câţiva metri în sol.

Dezavantajul este că pot forma dopuri de materie organică sau coprolite (sol excretat şi particule minerale) astfel blocând deschiderea galeriilor. Efectul benefic al acestor specii printre care se află şi *Lumbricus terrestris* este de a descompune materia organică, a realiza circuitul substanţelor nutritive şi de a forma solul [1].

Hrănirea se realizează prin procese de reacţie a materialului de sol coloid, organic şi anorganic neresorbit cu formarea unor complexe argilo-humice [18, 46].

Mecanismul de hrănire se bazează pe triturare şi amestecare în stomacul muscular cu ajutorul grăunţelor de nisip înghiţite, apoi digestia se continuă în intestinul mediu cu participarea enzimelor digestive şi a concreţiunilor de calcar produse de glandele calcaroase urmând apoi resorbţia [10].

În excrementele proaspăt eliminate de râme s-a identificat o cantitate de germeni aproape similară probelor de sol din jur [10].

Conţinutul de humus și calciu, forța de retenție a apei și stabilitatea glomerulelor sunt mai mari în excrementele de râme decât în probele de sol colectate din apropierea canalelor săpate de viermi [10].

Lumbricidele sapă galerii în sol prin contracții coordinative ale benzilor de mușchi circulari și longitudinali din peretele corpului.

Aceste contracții sunt realizabile de către segmentele corpului care sunt menținute turgescențe de către lichidul celomic. Aceste mișcări coordinative permit viermelui să transfere contracția de la un segment la altul cu efect de undă care propulsează organismul spre înainte [46].

Efectele benefice ale lumbricidelor sunt reprezentate de faptul că [10, 36, 38]:

- descompun materia organică moartă și a celei aflate în descompunere cu o nutriție bazată pe bacteriile și ciupercile care se dezvoltă pe aceste substraturi
- reduc incidența bolilor produse de fungi
- fragmentează materia organică, desfășoară activități de forare a galeriilor, amestecă solul și participă la formarea agregatelor structurale de sol
- ajută la creșterea ratei de infiltrare a apei și capacitatea de reținere a apei în sol, îmbunătățesc procesele de aerare din sol
- oferă canale pentru creșterea rădăcinilor plantelor și mărunțesc și îngroapă resturile plantelor

Pe lângă materia organică moartă, lumbricidele ingeră particule de sol de dimensiuni mici amestecând și macerând totul până la particule foarte mici asemenea unei paste fine care apoi va fi digerată în stomac.

Coprolitele proaspete ale lumbricidelor sunt de cinci ori mai bogate în azot accesibil plantelor, de șapte ori în fosfor și de 11 ori mai bogate în potasiu comparativ cu primii centimetri de la suprafața solului. Dacă există o cantitate mare de humus accesibil,

greutatea coprolitelor excretate poate depăși 4,5 kg / lumbricid / an, fiind un indicator al interesului sporit al grădinarilor și fermierilor de a menține populațiile de viermi la un nivel înalt [36].

Cercetările realizate în SUA au evidențiat faptul că lumbricidele conțin substanțe cu proprietăți antiinflamatoare pentru tratarea artritei și a altor patologii ale articulațiilor [46].

1.2.2. Importanța și efecte asupra umidității din sol

Galeriile grăbesc scurgerea apei în și din sol. O rată crescută a infiltrării ajută la prevenirea poluării prin minimalizarea eroziunii de suprafață și transportul chimic spre apele de suprafață [46].

Totodată galeriile favorizează transportul poluanților, nitrați sau pesticide spre pânzele freatice [5].

Galeriile orizontale ale speciilor endogeice nu transportă apa și soluțiile la aceeași adâncime ca și galeriile verticale ale speciilor anecice [46].

2. Metodologii uzuale

2.1. Toxicitatea acută asupra peștilor

Metodologiile conform **Ordinului nr. 245 din 26 martie 2005** sunt [30]:

2.1.1. Caracteristicile principale

- aprecierea toxicității acute letale a substanțelor din apele de suprafață asupra peștilor;
- necesitatea însușirii proprietăților fizico-chimice ale substanțelor de investigat: gradul de solubilitate în apă, presiunea vaporilor, caracterul biodegradabil, stabilitatea substanței, în vederea alegerii unei metode de test adecvate pe sistem static, semi-static sau prin curgere continuă în scopul de a asigura concentrații de substanță neschimbate pe întreaga durată a testului;

- conferirea unor informații legate de formula chimică, puritatea, natura, observarea prezenței și a cantităților de aditivi, valoarea coeficientului de partiție n-octanol / apă, care se vor lua în calcul pentru o bună organizare a testului și pentru a interpreta rezultatele.

2.1.2. Definiții aferente

- **Toxicitate acută** – decelarea efectelor defavorabile într-un timp scurt (96 h) asupra organismelor de test în prezența unei substanțe; care se expune prin concentrația medie letală.

- **CL₅₀** – concentrația care omoară 50 % din peștii care se găsesc în apa de testare într-o perioadă de expunere continuă.

- **Unitățile de măsură:** greutate/ volum (mg/L) ori greutate/ greutate (mg/kg) [30].

2.1.3. Principiul de realizare a metodei

Limita superioară de testare poate fi realizată la 100 mg/L substanță pentru a dovedi că CL₅₀ reprezintă o concentrație ridicată față de această concentrație.

Peștii se expun la substanța de testare în concentrații seriate pe parcursul a 96 h; mortalitățile fiind înregistrate la intervale de minim 24 h iar concentrațiile la care letalitatea peștilor este de 50 % (CL₅₀) sunt luate în vedere și înregistrate [30].

2.1.4. Criteriile de calitate

Lotul de control trebuie să aibă o mortalitate mai mică de 10 % la sfârșitul testului. **Saturația oxigenului dizolvat trebuie să fie mai mare de 60 %.**

Substanțele de testare vor reprezenta circa 80% din concentrația de început pe toată durata testării. Pentru substanțele ușor dizolvabile în mediu sau care sunt stabile, concentrația inițială este apreciată a fi un echivalent al concentrației nominale. Se evidențiază care au fost concentrațiile utilizate pe toată durata testării și care au fost condițiile experimentale. Acestea se

subliniază pentru substanțele care îndeplinesc următoarele caracteristici:

- dețin o solubilitate scăzută în mediul de testare;
- pot forma dispersii și emulsii stabile;
- sunt instabile în soluții apoase,
- concentrația inițială va fi măsurată în soluție la începutul testării.

Concentrația va fi apreciată după o perioadă de stabilizare, dar înaintea introducerii peștilor. Determinările care se realizează pe toată durata testării trebuie să afirme că pH -ul nu diferă cu mai mult de o unitate [30].

2.1.5. Modul de lucru

Metoda de testare poate fi de trei feluri:

- **testul static** – este un test la care soluția de testare nu se schimbă;
- **testul semi-static:** soluțiile de testare sunt reînnoite în mod regulat;
- **testul cu curgere continuă:** apa este reînnoită permanent în acvariile de testare.

Reactivii

Soluția stoc de testare – se prepară printr-o dizolvare a substanței în apă deionizată. Concentrațiile se pregătesc din soluția stoc printr-o diluare seriată; iar în cazul utilizării unor concentrații mari, substanța se poate dizolva nemijlocit în apa de diluție.

Gradul de solubilitate este important în obținerea acestor concentrații. Substanțele se testează până la limita de solubilitate găsită. Substanțele cu solubilitate redusă sau cele care formează o dispersie cu stabilitate, au la bază realizarea unei concentrații regăsite peste limita de solubilitate a substanței de testare cu scopul de a obține o concentrație maximă solubilă sau stabilă.

O dispersie ultrasonică se poate utiliza, pentru substanțele cu o solubilitate scăzută în apă, pentru a prepara soluțiile stoc. Utilizarea unor substanțe auxiliare, implică ca toate concentrațiile de testare să conțină o cantitate egală de substanță auxiliară [24].

Martorii se vor expune la o concentrație identică de substanțe auxiliare de tipul celor utilizate în seriile de testare.

Concentrația substanțelor auxiliare va fi redusă, fără depășirea a 100 mg /L în mediul de testare. Testul se va realiza fără ajustarea pH -ului.

Orice modificare evidentă a valorii pH-ului implică repetarea testului prin folosirea unui pH adaptat și cu înregistrarea rezultatelor.

Astfel, valoarea pH-ului pentru soluția stoc va fi adaptată cu pH-ul apei de diluție.

Astfel sunt preferate substanțele de tipul HCl și NaOH. Se va acționa cu prudență pentru a nu modifica concentrația substanței de testare printr-o ajustare a pH-ului. Se va înregistra orice reacție de precipitare sau chimică rezultată.

Apa utilizată pentru diluție:

Se folosește apa cu caracter potabil, necontaminată cu clor sau metale grele, apa naturală cu valoare calitativă sau cea reconstituită. Duritatea apei trebuie să fie între 10 și 250 mg/L (CaCO_3) și pH-ul să fie cuprins între 6,0 și 8,5 [24].

Aparatura necesară:

- aparatura trebuie să fie în totalitate din material inert chimic;
- un sistem de diluție care va fi automatic;
- un dozator de oxigen;
- un echipament pentru a determina duritatea apei;
- un echipament pentru menținerea adecvată a temperaturii;
- un pH-metru.

Peștii utilizați în testare:

Peștii vor fi într-o stare de sănătate fără anomalii fizice și comportamentale, aleși dependent de criteriile de vârstă, cu o posibilitate de întreținere, sensibilitatea la substanțele chimice va fi relativă, și cu posibilitatea de a compara datele obținute cu cele deja existente la nivel internațional.

Pregătirea materialului pt. experiment:

Peștii vor proveni din același stoc, vor avea aceeași lungime și vârstă și vor fi ținuti un minim de 12 zile în următoarele condiții:

- sistem de recirculare/curgere continuă;
- apa;
- lumina: 12-16 ore iluminat zilnic;
- concentrația oxigenului dizolvat de cel puțin 80 % saturație;
- hrănirea se va face de trei ori pe săptămână, hrănirea lor încetând cu 24 h înainte de începerea testării;
- mortalitatea obținută într-un interval de 48 h de la introducerea peștilor în acvariile de acomodare.

Se vor înregistra mortalitățile și se vor aplica următoarele criterii:

- mortalități peste 10% din populație în șapte zile conduc la eliminarea lotului per ansamblu;
- letalitate cuprinsă între 5-10% din populație conduce la o prelungire a perioadei de acomodare pentru încă șapte zile; iar în cazul în care nu mai sunt înregistrate mortalități, lotul se acceptă, altfel se elimină în întregime.
- letalitate sub 5 % din populație duce la o acceptare a lotului.

Adaptare:

Toți peștii se vor menține în apă la o temperatură constantă pe o durată de șapte zile înainte de a începe testului.

Procedura de testare:

Se va face o testare preliminară pentru a obține date referitoare la șirul de concentrații care trebuie utilizat în testul de bază.

Dacă se folosesc substanțe auxiliare pentru a măsura gradul de solubilitate al substanțelor se realizează o probă martor (control). Dependent de proprietățile fizico-chimice ale substanței de testare se va selecta metoda cea mai adecvată din cele menționate. Peștii se vor expune la acțiunea substanțelor astfel:

- durata va fi de 96 h;
- numărul de pești: minim șapte pentru fiecare concentrație;

- acvariile de o capacitate convenabilă în concordanță cu încărcarea cu animale de test; 1 g/l pentru testele semi-stactice și stactice iar pentru cele cu curgere continuă încărcarea ar putea fi mai mare;
- concentrația de testare: se aleg minim cinci concentrații diferențiate printr-un factor de maxim 2,2, pe un domeniu care să acopere mortalitatea între 0 - 100 %;
- lumina: 12 - 16 h /zi;
- temperatura: dependent de specie, dar +1°C în orice testare;
- concentrația oxigenului dizolvat: minim 60 % saturație a oxigenului;
- hrănire: peștii nu se hrănesc.

Peștii se vor observa după 2 – 4 ore de la introducere și la intervale de cel puțin de 24 ore. Peștii se consideră morți, dacă la atingerea înotătoarei codale nu se înregistrează reacții și nu se observă mișcări respiratorii. Se vor nota peștii morți și se îndepărtează din acvarii.

Se înregistrează anomaliile legate de echilibru, înot, respirație și pigmentație. Se va monitoriza zilnic pH-ul, oxigenul dizolvat și temperatura.

Testul limită:

Prin utilizarea procedurilor descrise se poate stabili o limită de testare de 100 mg/L pentru a demonstra că CL_{50} are o valoare superioară acestei concentrații. Dacă substanța nu permite atingerea unei concentrații de 100 mg/L în apa de testare, limita de test se stabilește pentru o concentrație identică cu solubilitatea substanței.

Pentru testul limită se utilizează același număr de pești (7 -10 pești) – la fel ca pentru testul martor; teoria distribuției binomiale afirmă că în cazul în care se utilizează 10 pești cu mortalitate zero, gradul de încredere va fi de 99,9 % iar CL_{50} va fi mai mare decât concentrația utilizată în testul limită.

Dacă sunt folosiți între 7 și 9 pești, absența mortalității implică un grad de

încredere de minim 99 %, însemnând că CL_{50} va avea o valoare superioară concentrației folosite. Apariția mortalității impune dezvoltarea unui studiu complex. Efectele subletale apărute se înregistrează.

2.1.6. Evaluarea și raportarea

Fiecare perioadă de observație va avea drept corespondent un grafic de mortalitate dependent de perioada de expunere față de logaritmul concentrației. Dacă se poate, se vor estima CL_{50} și limitele de confidență ($p = 0,05$). Dacă panta curbei concentrație / mortalitate depășește gradul de înclinare, pentru a permite calcularea CL_{50} , este suficientă o estimare grafică a valorii [39].

Dacă două concentrații consecutive în raport de 2,2 au valori ale mortalității de 0% și 100 %, aceste valori sunt suficiente pentru a aprecia intervalul în care se situează CL_{50} .

În cazul în care se observă că nu se poate menține o stabilitate și o omogenitate a substanței de testare, se vor nota observațiile și se va ține cont de ele la o viitoare interpretare a rezultatelor.

Raportul trebuie să includă următoarele:

- observații referitoare la organismele de testare – denumire științifică, numărul folosit pentru fiecare concentrație, gen, specie, mărime;
- caracteristicile chimice și sursa pentru apa de diluție (pH-ul, duritatea, temperatura);
- pentru substanțele cu solubilitate redusă în apă, se include metoda de realizare a soluției stoc și a soluțiilor de testare;
- concentrația substanțelor auxiliare;
- lista concentrațiilor utilizate și orice alte date referitoare la stabilitatea concentrațiilor în soluția de testare;
- realizarea analizelor chimice implică redarea metodelor utilizate și a rezultatelor obținute;
- se va înregistra rezultatul testului limită;
- motivația și detaliile procedurii de testare (pe sistem static, semi-static, cu

curgere continuă, doza, viteza de curgere, încărcarea cu organisme de testare, aerarea apei);

- descrierea echipamentului utilizat;
- iluminarea;
- concentrația oxigenului dizolvat, valorile pH și temperatura obținută la fiecare 24 h;
- aprecierea îndeplinirii criteriilor de calitate;
- redarea sub formă tabelară a mortalității cumulative pentru fiecare concentrație și a martorului la timpul de observație recomandat;
- graficul curbei concentrație/ procent răspuns la sfârșitul testării;
- CL₅₀ la fiecare timp de observație (limită de confidență 95%);
- procedurile statistice utilizate pt. LC₅₀;
- concentrația cea mai mare a testării, la care nu se observă mortalitate pe toată durata testării;
- concentrația cea mai mică care provoacă mortalitate 100% pe perioada testării [30].

Alte metodologii de testare se vor descrie în partea de cercetări proprii a tezei.

2.2. Metodologia de determinare a toxicității cronice asupra peștilor

2.2.1. Principiul metodei

Pentru monitorizarea efectelor cronice ale substanțelor cu risc s-a ales metoda de colorare hematoxilina-eozină, fiind o metodă accesibilă, care permite înregistrarea efectelor legate de structura mai multor organe vitale-branhii, intestine subțiri, ficat, rinichi și musculatură [30].

Modul de lucru

Reactivii:

- alcoolul etilic absolut,
- formol,
- acetona,
- benzen,
- hematoxilina,

- eozina,
- albumina,
- parafina.

Aparatura:

- un microtom;
- un termostat cu includere în parafină;
- plită pentru întinderea secțiunilor;
- un microscop;
- un aparat de fotografiat.

Sticlăria utilizată:

- vase de tip Borel,
- lame,
- și lamele [30].

Metodologia de intoxicare:

- peștii din experiment se introduc în acvării cu capacitatea de 30 L;
- se utilizează 20 de organisme/acvariu;
- concentrațiile din testare vor fi subletale;
- concentrațiile alese depind de caracteristicile substanței.

Testele cronice se vor realiza în regim static.

Metoda de prelevare

Peștii intoxicați se vor preleva pentru investigații histopatologice la interval de maximul 30 zile.

Procedura de testare

Recoltarea peștilor pentru testarea histopatologică se face la un interval de 30, 60, 90, 120 și respectiv 150 zile, până la cel mult un an. Obținerea preparatelor histologice impune o recoltare a fragmentelor și o prelucrare a lor după o tehnică de manipulare histopatologică. După disecția anatomică a peștelui se vor preleva fragmente de branhii, ficat, intestin subțire, rinichi, și musculatură, deoarece acestea sunt organe vitale și organe țintă pentru substanțele care se acumulează sau au un efect toxic.

Fixarea

Fragmentele de organe obținute în urma disecției se fixează în formol 10 %, pentru a opri procesele de degradare care apar după moarte.

Deshidratarea și clarificarea

După fixare, piesele se deshidratează în baie de alcool etilic, la concentrații crescătoare (70°, 90°, 100°); iar după deshidratare fragmentele se clarifică în acetonă și benzen. Piesele astfel deshidratate și clarificate se includ în parafină și se mențin la o temperatură constantă de 57°C. Blocurile de parafină, cu fragmente de organe, vor fi secționare la microtom; cu o grosime a secțiunilor de 5 – 6μ.

Colorarea cu hematoxilină eozină

Secțiunile vor fi întinse pe lame cu albumină Mayer și vor fi păstrate la termostat cu includere în parafină timp de 5 - 24 h, la temperatura constantă de 37°C.

Pentru observarea efectelor produse de substanțele investigate este necesar să se realizeze o colorare a secțiunilor și obținerea unor preparate fixe. Astfel lamele cu secțiuni vor fi deparafinate în benzen. Apoi vor fi trecute prin băi succesive de alcool etilic cu concentrații descrescătoare (100°, 90°, 70°), pentru a înlătura solventul parafinei, ultima baie realizându-se cu apă distilată.

Secțiunile se colorează cu hematoxilină și eozină. Acești coloranți evidențiază nucleul și citoplasma. După colorare, secțiunile se deshidratează în alcool etilic cu concentrații crescătoare (70°, 90°, 100°) și apoi clarificate în benzen [30]. Preparatele microscopice sunt montate în balsam de Canada devenind preparate fixe.

2.2.2. Examinarea și raportarea

Se realizează examinarea la microscopul optic și se compară cu martorul. Modificările celulare se descriu detaliat și se fotografiază [30].

2.3. Metode de determinare a poluării prin utilizarea râmelor

2.3.1. Protocolul OECD 207

Protocolul utilizează răspunsul unei singure specii, *Eisenia fetida*, aleasă datorită

caracteristicii de a nu săpa prea adânc în sol și a preferenței acesteia pentru soluri bogate în materie organică, provenită de obicei din resturi vegetale descompuse sau dejectii animale [26].

Testul de toxicitate pe hârtie de filtru

Pentru acest test sunt necesare eprubete de sticlă cu fund plat, de aproximativ 8 cm lungime și 3 cm diametru, care se căptușesc cu hârtie de filtru, tăiată cu dimensiuni potrivite pentru a evita suprapunerea în eprubetă.

Se folosește substanța de testare dizolvată în apă distilată, acetonă, hexan sau cloroform, dependent de solubilitate.

Din soluție se va lua 1 ml și se va introduce în fiecare eprubetă de test iar apoi eprubetele se așează în poziție orizontală în fața unui curent slab de aer pentru ca hârtia de filtru din interior să se usuce.

După uscare, în fiecare eprubetă se introduce 1 ml soluție de testare respectiv apă distilată în eprubeta martor.

Eprubetele se închid cu dopuri prevăzute cu un orificiu pentru aerare.

Înainte de introducerea râmelor în eprubete, câte una în fiecare eprubetă pentru a nu periclita interpretarea rezultatelor în eventualitatea mortalității acestora, acestea se vor menține trei ore pe hârtie de filtru umedă pentru golirea tubului digestiv, după care se spală și se usucă.

Pe parcursul testului eprubetele se mențin în tăvi într-o poziție orizontală.

Eprubetele se mențin la 20±2 °C, în condiții de întuneric iar mortalitatea se înregistrează după 72 h.

Râmele se consideră moarte dacă nu răspund la stimuli mecanici fin aplicați pe capătul anterior al corpului [10, 43].

Testul de toxicitate pe sol artificial

Substanța de testare se amestecă cu apă distilată care se adaugă peste solul artificial (10% turbă de Sphagnum, 20% argilă caolin și 70% nisip industrial).

Fiecare vas de cultură conţine 750 g sol artificial peste care se pun 10 râme (menţinute în prealabil 24 h într-un alt vas şi spălate). Vasele se acoperă cu folie de plastic perforată care să împiedice evaporarea şi să permită totodată aerarea mediului de testare.

Durata testului este de 14 zile iar în ziua 7 şi 14 se înregistrează datele referitoare la mortalitatea rămelor din testare.

Evaluarea mortalităţii în ziua 7 se face golind conţinutul vaselor de sticlă pe o tavă, se sortează râmele şi li se testează reacţia la stimuli mecanici aplicaţi pe partea anterioară a corpului.

Rezultatele testului cuprind:

- stabilirea biomasei medii vii şi a numărului de râme vii/tratament la începutul şi la sfârşitul testului
- descrierea modificărilor patologice şi etologice (leziuni, ulcerări ale tegumentului, capacitatea de săpare a galeriilor)
- trasarea grafică a curbei concentraţie/efect
- stabilirea ratei mortalităţii pentru probele martor
- stabilirea ratei mortalităţii pentru probele de testare (descompunerea rapidă post-mortem a rămelor va duce la concluzia că absenţa acestora la momentul numărării semnifică mortalitatea acestora)
- determinarea umidităţii solului artificial la începutul şi sfârşitul testului
- precizarea concentraţiei la care mortalitatea a fost zero
- precizarea concentraţiei la care mortalitatea a fost 100% [10, 43].

3. Metodologia analitică de stabilire a eco-toxicităţii solului şi apelor

3.1. Gaz- cromatografia cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS)

Gaz-cromatografia cuplată cu spectrometria de masă se utilizează pentru

identificarea calitativă şi măsurarea cantitativă a unor componente din amestecuri complexe.

Strategia analizei calitative

Pentru asigurarea identificării calitative a componentelor organice prin GC-MS se vor respecta anumite criterii: spectrul de masă a compușilor cunoscuți sau necunoscuți trebuie să corespundă întregului registru de spectre de masă. Astfel spectrele compușilor autentici vor fi însoțite de o bibliotecă de referință spectrală sau de o mostră a produsului respectiv.

Strategia analizei cantitative

Cuantificarea vizează zona picurilor cromatogramelor de masă sau monitorizarea ionică. Cu ajutorul tehnicii de monitorizare ionică, spectrometrul de masă nu este setat pentru scanarea tuturor maselor, în schimb, instrumentul face salturi de la o masă la alta.

Avantajul este că spectrometrul de masă este reținut o perioadă mai mare la o masă selectată, raportul semnal- zgomot la acea masă se îmbunătățește iar sensibilitatea globală a experimentului crește cu un factor de la 100 la 1000 [35].

3.1.1. Gaz-cromatografia

Procesul de separare cromatografică se desfășoară în coloana cromatografică.

Coloanele în cromatografia de gaze pot fi clasificate în următoarele tipuri:

1) **Coloane umplute**, în care umplutura este reprezentată de către faza staționară depusă pe un suport inert iar materialul astfel rezultat este introdus mecanic într-o coloană (metalică sau silice topită, cu diametrul de ordinul mm și lungimea de până la 1 m).

2) **Coloane capilare (WCOT – „wall coated open tubular”)** având pe peretele interior un film lichid imobilizat, cu grosime de strat între 0,1 și 5 μm (de regulă 0,25 μm). Coloanele capilare sunt construite din silice topită sau borosilicat, acoperite la

exterior dintr-un strat protector de polimer.

Lungimea acestora este de până la 100 m, iar diametrul interior între 0,05 – 1 mm. Eficiența acestora este foarte mare, separările cromatografice pe astfel de coloane atingând 5.000-10.000 talere/m lungime de coloană.

3) Coloane capilare (SCOT – „support-coated open tubular”) având pe peretele interior depus un strat cu grosimea de cel mult 30 μm , alcătuit din particule ale unui suport inert (de exemplu, pământ diatomeic) pe care este depusă faza staționară propriu-zisă dată de un film lichid cu grosimea de maximum 1 μm (Fig. 7) [16].

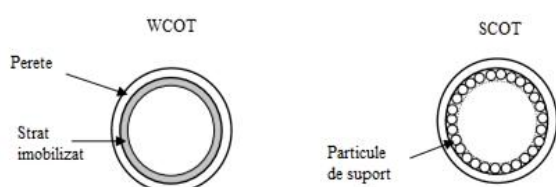


Fig.7. Imagini pe secțiune WCOT și SCOT [16]

Gaz-cromatografia cuplată cu spectrometria de masă poate fi utilizată pentru analiza componentelor volatile care sunt stabile la temperaturi ridicate de separare.

Hong și col. (2001) a utilizat GC-MS, cromatografia prin excluderea mărimii SEC, cromatografia de extracție în fază solidă SPE pentru măsurarea a 18 pesticide din praf [9].

Pesticidele volatile din plante și sol s-au analizat prin microextracție de fază solidă [2]. Diferențe considerabile s-au observat între capacitățile de adsorbție a fibrelor, adsorbția pesticidelor fiind mai mare pe polidimetilsiloxan comparativ cu fibrele de poliacrilat [4].

Realizarea cuplajului GC-MS are la bază faptul că substanța organică este deja în fază gazoasă.

Dacă se utilizează coloanele cu umplutură, debitul de gaz purtător este în jur de 20÷30 cm^3/min , cu efecte asupra valorii presiunii din spectrometru (1 cm^3 de gaz aflat

la presiune atmosferică ocupă un volum de 10^7 cm^3 la presiunea de 10^{-4} mm Hg ; astfel că pompa de vid trebuie să asigure un debit de evacuare de 150 l/s pentru a îndepărta 1 cm^3 de gaz purtător).

Pentru îndepărtarea unui volum crescut din gazul purtător se utilizează mai multe tipuri de interfețe, bazându-se pe viteza superioară de difuzie a eluentului (de obicei heliu) comparativ cu moleculele probei (Fig.8.).

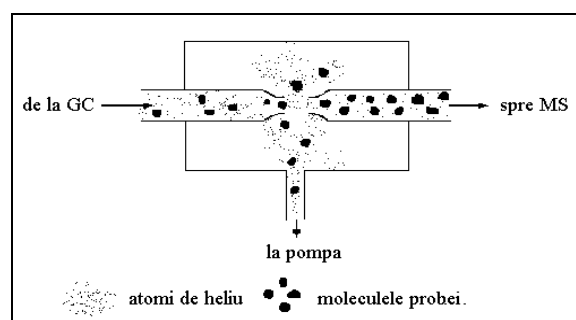


Fig.8. Interfață gaz-cromatograf cuplat cu spectrometrie de masă de tip jet [16]

Efluentul provenit de la gaz-cromatograf este ejectat, printr-un orificiu într-o cameră vidată; din jetul astfel format are loc difuzia preferențială a moleculelor gazului purtător, mai ușoare decât moleculele probei.

Un al doilea orificiu, coaxial cu primul și aflat la o distanță de circa 1 mm de acesta, face legătura cu spectrometrul de masă: aproximativ 90 % din heliu și 40 % din probă nu trec prin al doilea orificiu, astfel încât în aparat ajunge o probă îmbogățită.

Coloanele cromatografice capilare pot fi racordate direct la spectrometrul de masă deoarece debitele la ieșire au valori de numai 1÷5 cm^3/min [16].

3.1.2. Spectrometria de masă

Spectrometria de masă este o metodă instrumentală de analiză a compușilor organici având la bază fragmentarea moleculelor în ioni de masă diferită cu sarcină pozitivă și separarea lor în fascicule de ioni cu aceeași masă folosind

concomitent interacțiunea acestora cu un câmp electric și magnetic.

În principiu, are loc bombardarea substanței de cercetat cu un fascicul de electroni, urmată de accelerarea ionilor formați și separarea lor în funcție de masă prin acțiunea concomitentă a unui câmp electric și magnetic [16].

Un spectrometru de masă cuprinde:

- un compartiment de producere a ionilor sub acțiunea unui fascicul de electroni (1);
- un compartiment de accelerare a ionilor în câmp electric longitudinal (2);
- un compartiment de separare în câmp magnetic transversal funcție de raportul m/e (3);
- un compartiment de detectare a ionilor (4).

Când detectorul (4) este o placă fotografică, care este impresionată mai mult sau mai puțin funcție de numărul ionilor, aparatul se numește spectrograf.

Aparatele moderne înregistrează curentul ionic (proporțional cu numărul de ioni) sub formă de spectru, în funcție de masa ionilor și de abundența lor; asemenea aparate se numesc spectrometre de masă.

Majoritatea spectrometrelor de masă realizează separarea ionilor pozitivi, deoarece la bombardarea moleculelor de cercetat (cel mai adesea organice) cu un fascicul de electroni se expulzează un electron din moleculă formându-se un ion pozitiv.

Diferența esențială a spectrometriei de masă de celelalte metode spectrale constă în aceea că după înregistrarea spectrului substanței cercetate, aceasta nu mai poate fi recuperată, fiind transformată în ioni, pe când în celelalte metode au loc numai modificări în starea fizică a substanței [3, 16].

Schema unui spectrometru de masă cu focalizare magnetică este redată mai jos (Fig.9):

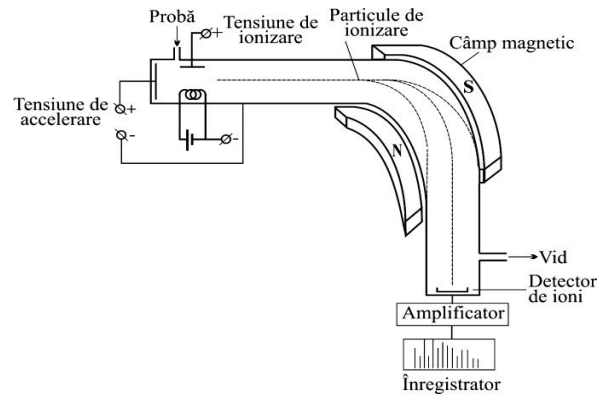


Fig.9. Schema unui spectrometru de masă [16]

- Proba este introdusă în spectrometru și vaporizată;
- Ionii de sarcină z (un multiplu al sarcinii electronului) sunt produși prin bombardarea probei cu un flux de electroni în camera de ionizare; energia electronilor trebuie să fie mai mare de 70 eV ($1 \text{ eV} = 96,5 \text{ KJ.mol}^{-1}$; $70 \text{ eV} = 6750 \text{ KJ.mol}^{-1}$);
- Ionii rezultați sunt accelerați într-un câmp electric căpătând o energie cinetică similară câmpului;
- Ionii de masă m sunt deviați în câmp magnetic funcție de raportul m/z pe diferite traiectorii circulare;
- Variind tăria câmpului magnetic se pot focaliza pe detector ionii de o anumită masă m (m/z);
- Ionii focalizați sunt detectați și se înregistrează spectrul de masă.
- Spațiul interior al spectrometrului de masă este puternic vidat.

Fiecărui raport m/z îi corespunde o traiectorie de o anumită rază:

$$r^2 = \frac{m}{e} \cdot \frac{2U_A}{H^2} \quad (\text{ec.1})$$

În câmp electric energia de accelerare este egală cu energia cinetică:

$$e \cdot U_A = \frac{mv^2}{2} \quad (\text{ec.2})$$

unde:

- m - masa (Kg);
- e - sarcina ionului;
- v - viteza ionului (m/s);
- U_A - tensiunea de accelerare (V).

În câmp magnetic forța magnetodinamică este egală cu forța centrifugă:

$$H \cdot e \cdot v = \frac{mv^2}{r} \quad (\text{ec. 3}) \text{ sau } H \cdot e = \frac{mv}{r} \quad (\text{ec. 4})$$

unde:

H - intensitatea câmpului magnetic (T - tesla);
r - raza traiectoriei ionului (m).

Rezultă că viteza are expresia:

$$v = \frac{H \cdot e \cdot r}{m} \quad (\text{ec. 5})$$

Înlocuind în relația (1) valoarea lui v din expresia (5) obținem:

$$e \cdot U_A = \frac{m \cdot H^2 \cdot e^2 \cdot r^2}{2 \cdot m^2} \quad (\text{ec.6}) \text{ sau}$$

$$2 \cdot m \cdot U_A = H^2 \cdot e \cdot r^2 \quad (\text{ec. 7})$$

de unde rezultă că:

$$r^2 = \frac{m}{e} \cdot \frac{2U_A}{H^2} \quad (\text{ec.8}) \text{ și } \frac{m}{e} = r^2 \cdot \frac{H^2}{2 \cdot U_A} \quad (\text{ec. 9})$$

$$\text{sau } \frac{m}{z} = \frac{r^2 \cdot H^2}{2 \cdot U_A} \quad (\text{ec.10})$$

Spectrul de masă: ionii rezultați prin bombardarea compusului organic sunt instabili și se fragmentează aproape instantaneu.

Spectrul de masă al unui compus organic constituie reprezentarea abundenței relative a fragmentelor de scindare, purtătoare de sarcini pozitive, în funcție de raportul m/e al acestor particule [8].

Drept etalon al abundenței se consideră, de regulă, cel mai intens maxim din spectru - picul de bază - base peak.

Atribuind acestuia valoarea 100% se pot determina cu ușurință abundențele relative ale tuturor ionilor. Întrucât abundențele sunt foarte diferite ca valoare, uneori picurile cele mai importante prezintă în spectru intensități extrem de mici (abundențe foarte reduse).

De regulă, spectrul de masă se dă sub formă grafică. În cazul analizelor cantitative, se înregistrează cantitatea totală de ioni (curentul ionic total); înălțimea unui pic redă ponderea procentuală a celui maxim din cantitatea totală a ionilor.

În acest caz se impune o însumare riguroasă a intensităților tuturor ionilor din spectru până la M (masa moleculară) [17].

3.2. Aplicații

Spectrometria de masă se poate folosi atât în analiza calitativă cât și în cea cantitativă. Spectrometrele de masă se folosesc cuplate cu un gaz cromatograf pentru detectarea și înregistrarea componentelor separate prin gaz cromatografie.

Tehnica mixtă gaz – cromatografie pe coloane capilare - spectrometrie de masă (GC-MSD) cât și cromatografia de lichide de înaltă performanță cu detector spectrometru de masă a putut fi realizată practic datorită faptului că metodele necesită cantități mici de probă și de același ordin de mărime (de la miligrame la nanograme).

Spectrometria de masă folosește și la determinări de mase moleculare și structuri ale substanțelor organice necunoscute prin:

- furnizarea masei moleculare exacte;
- posibilitatea stabilirii unei formule brute;
- prin aducerea unei dovezi asupra existenței posibile a unor element structural caracteristice (alături de alte metode: RMN, IR etc.) [16].

Procesul de ionizare a unei molecule poate avea loc în două moduri:

- cu formare de ioni negativi prin înglobarea electronului (mai rar):



fenomen cunoscut sub numele de "absorbție de rezonanță", cu formarea unui ion pozitiv (cel mai frecvent) prin expulzarea unui electron din moleculă:



Dacă energia electronilor este mică (5 - 10 eV), se formează așa numitul "ion molecular" având aceeași masă ca a moleculei. Ionul molecular format este destul de instabil și se descompune rapid desfăcându-se într-un număr mare de fragmente, de regulă cu formarea unui radical și a unui ion [16]:

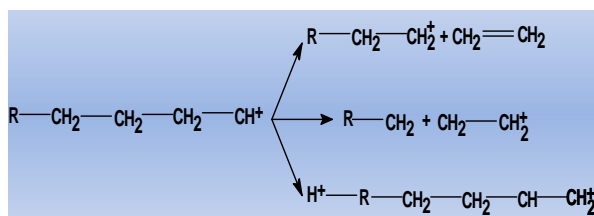


Radicalul fiind neutru din punct de vedere electric nu va fi observat cu spectrometrul de masă. Procesul poate avea loc în mai multe etape. Fragmentările moleculelor în spectrometrul de masă răspund la următoarele trei tendințe:

- formarea de ioni cât mai stabili;
- formarea de radicali cât mai stabili;
- eliminarea de particule neutre stabile (N_2 , CO_2 , H_2O etc.).
- Dintre picurile unui spectru prezintă interes deosebit:
- picul molecular;
- picul de bază care reprezintă etalonul de măsurare a intensității;
- picurile datorate contribuțiilor izotopice.

De exemplu, în cazul hidrocarburilor saturate: ionii moleculari sunt instabili și prin pierderea unui ion de hidrogen se formează ioni de carboniu primari cu formula generală:

$[C_nH_{2n+1}]^+$ O reacție importantă de scindare a acestora este pierderea unei molecule de etilenă, dar se pot scinda radicali liberi alchil sau atomi de hidrogen [8, 11].



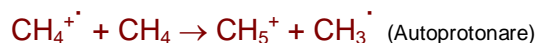
Ionii cu sarcină electrică se stabilizează prin mezomerie iar ionii carboniu trec în ioni mai stabili. Ionizarea moleculelor de analizat se poate face folosind ca reactiv un gaz (metan, metilpropan sau amoniac) care introduși în camera de ionizare, în urma

bombardării cu electroni, produc ioni moleculari, care, reacționează apoi cu moleculele probei cu apariția ionilor de tip MH^+ ; au loc reacțiile:

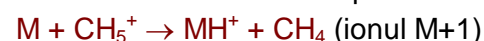
Reacția primară:



Reacțiile secundare:



Coliziune cu molecula din proba M:



Dacă M este de tipul RH: $RH + CH_5^+ \rightarrow R^+ + CH_4 + H_2$ (ionul M-1)

Astfel de ionizare se numește *ionizare chimică (IC)*. În spectrul de masă obținut prin ionizare chimică predomină picul ionului molecular. Avantajul acestui tip de ionizare este creșterea sensibilității detecției la valori de ordinul femtogramelor (10^{-15} g) [74,129].

4. Legislația în domeniul managementul dejecțiilor

4.1. Legislația Europeană

Conform **Directivei nr. 676/ 12 decembrie 1991** privind protecția apelor împotriva poluării cu nitrați proveniți din surse agricole în timpul primului program de acțiune pe patru ani și la sfârșitul acestui program, statele membre pot fixa cantități diferite de cele indicate.

Aceste cantități trebuie determinate astfel încât să nu compromită realizarea obiectivelor prevăzute și trebuie să se justifice prin criterii obiective precum:

- perioadele lungi de vegetație;
- culturi cu o puternică absorbție de azot;
- precipitații nete ridicate în zona vulnerabilă;
- soluri cu capacitate de denitrificare foarte ridicată [21].

Directiva nr. 278/ 12 iunie 1986 CEE (Tabelul 1.) privind protecția mediului, în special a solului, atunci când se utilizează nămoluri de epurare în agricultură, stabilește [19]:

Tabelul 1.

Valorile limită pentru concentrațiile de metale grele în sol [19]

Parametri	Valori limită (mg/kg)
Cadmium	1-3
Cupru	50-140
Nichel	30-75
Plumb	50-300
Zinc	150-300
Mercur	1-1,5

Directiva nr. 83/ 3 noiembrie 1998 CE privind calitatea apei destinate consumului uman stabilește următoarele (Tabelul 2):

Tabelul 2.

Aprecierea parametrilor chimici din apă [22]

Parametri chimici	Parametri valorici	Unitatea
Cadmium	5	µg/l
Cupru	2	mg/L
Nichel	20	µg/l
Plumb	10	µg/l
Mercur	1	mg/L
Crom	50	µg/l

Conform anexei 1 a **Directivei nr. 63 din 22 septembrie 2010** privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice, peștii zebră sunt incluși pe lista animalelor de experiment [20].

4.2. Legislația Românească

Nivelul maxim de azotați conform **Legii 458/2002** este de 50 ppm și 0,5 ppm azotiți, depășirea acestor valori fiind periculoase pentru oameni și mai ales pentru copii. Nivelurile toxice de azotați la animale sunt cuprinse între: 133-220 ppm, fiind riscante dacă se utilizează o perioadă îndelungată; 661-880 ppm- crește posibilitatea pierderilor fiind niște limite nesigure; iar peste 880 ppm nu se recomandă utilizarea, putând determina intoxicații acute [25].

Ordonanța de Urgență nr. 195/2005 privind protecția mediului face referire la

faptul că protecția apelor de suprafață și subterane și a ecosistemelor acvatice are ca obiect menținerea și îmbunătățirea calității și productivității biologice a acestora, în scopul evitării unor efecte negative asupra mediului și sănătății umane [32].

Conform **Ordinului nr. 296/ 11 aprilie 2005** și **Ordinului nr. 216/ 13 aprilie 2005** privind aprobarea Programului cadru de acțiune tehnic pentru elaborarea programelor de acțiune în zone vulnerabile la poluarea cu nitrați din surse agricole, pentru fiecare parcelă fertilizată trebuie precizate localizarea (identificarea) suprafeței, data aplicării îngrășămintelor, cultura care a fost fertilizată și cantitatea totală de azot împrăștiat, furnizat de dejecțiile animaliere utilizate ca îngrășămintă organice naturale [31].

Normele de calitate a apei potabile și câteva aspecte comparative importante sunt prezentate în Tabelul 3.

Legislația pentru zonele vulnerabile la poluarea cu nitrați fixează o limită pentru încărcările cu îngrășământ organic (azot), astfel **250 kg/ha de azot total pe fânețe** și **210 kg/ha de azot total pe terenurile arabile**, acestea reprezentând valori medii pentru întreg terenul agricol încadrat ca zonă vulnerabilă la poluarea cu nitrați.

Este necesar a se avea în vedere că limita de încărcare pentru terenurile arabile scade la 170 kg/ha după primii patru ani de aplicare a planului de acțiune.

Pe solurile nisipoase sau cu un profil scurt, programul de acțiune pentru zone vulnerabile la poluarea cu nitrați impune, în funcție de tipul de cultură, condițiile hidrometeorologice și vulnerabilitatea naturală a zonei, o perioadă închisă maximă (1 august- 1 februarie) și o perioadă minimă (1 august- 1 noiembrie), în care nici un fel de îngrășământ organic, cum ar fi bălegarul animalier de consistență solidă, semilichidă sau lichidă, nu poate fi aplicat pe terenurile care nu sunt fânețe sau nu sunt semănate cu culturi de toamnă și nici dacă solurile sunt nisipoase ori cu un profil scurt.

Tabelul 3.

Normele de calitate a apei potabile- aspecte comparative [15, 34]

Nr. crt.	Parametrul	Unitate de măsură	Directiva CEE	Norme Organizația Mondială a Sănătății
1	Turbiditate	mg/L	10	
2	Temperatura	°C	25	
3	pH		6,5-8,5	6,5-8,5
4	Conductivitate	µS/cm	400	
5	Cloruri	mg/L	25	250
6	Sulfați	mg/L	250	400
7	Calciu	mg/L		
8	Magneziu	mg/L	50	
9	Sodiu	mg/L	150	200
10	Potasiu	mg/L	12	
11	Aluminiu	mg/L	0,2	0,2
12	Oxigen dizolvat	% saturație	Saturație >75% exceptând apele subterane	
13	Nitrați	mg/L	50	44
14	Nitriți	mg/L	0,1	
15	H ₂ S	µg/l	Organoleptic nedetectabil	Organoleptic nedetectabil
16	Hidrocarburi dizolvate	µg/l	10	
17	Fenoli	µg/l	0,5	
18	Fier	µg/l	200	300
19	Mangan	µg/l	50	100
20	Cupru	µg/l		1000
21	Zinc	µg/l		5000
22	Fosfați	mg/L	5000	
23	Fluor	µg/l		1500
24	Argint	µg/l	10	
25	Arsen	µg/l	50	50
26	Cadmiu	µg/l	5	5
27	Cianuri	µg/l	50	100
28	Crom	µg/l	50	50
29	Mercur	µg/l	1	1
30	Nichel	µg/l	50	50
31	Plumb	µg/l	50	50
32	Stibiu	µg/l	10	
33	Seleniu	µg/l	10	10
34	Pesticide totale	µg/l	0,5	
35	Benzen	µg/l		10
36	CCl ₄	µg/l		3
37	Clordan	µg/l		0,3
38	Clorbenzen	µg/l		0,1-3
39	Cloroform	µg/l		30
40	2,4 D	µg/l		100
41	DDT	µg/l		1
42	1,2-diclorețan	µg/l		10
43	1,2-diclorețenă	µg/l		0,3
44	Heptaclor și heptaclorepoș	µg/l		0,1
45	Hexaclorbenzen	µg/l		0,01
46	Gamma HCH (lindan)	µg/l		3
47	Metoxiclor	µg/l		30
48	Pentaclorfenol	µg/l		10
49	Tetraclorētenă	µg/l		10
50	Triclorētenă	µg/l		30
51	2,4,6- Triclorfenol	µg/l		10

Perioada închisă maximă pentru terenurile aflate sub fânețe sau culturi de toamnă este de la 1 septembrie la 1 februarie iar perioada minimă, de la 15 septembrie la 15 noiembrie.

Aceste perioade minime și maxime pot fi modificate în funcție de condițiile locale, la recomandările specialiștilor din cadrul **Sistemului național de monitoring integrat al solului, de supraveghere, control și decizii pentru reducerea aportului de poluanți proveniți din surse agricole și de management al reziduurilor organice provenite din zootehnie în zone vulnerabile și potențial vulnerabile la poluarea cu nitrați**, înființat prin **Ordinul ministrului mediului și gospodăririi apelor și al ministrului agriculturii, pădurilor și dezvoltării rurale nr. 242/197/2005** [27].

Prevederile, conform **Hotărârii de Guvern nr. 964/ 13 octombrie 2000** privind aprobarea Planului de acțiune pentru protecția apelor împotriva poluării cu nitrați proveniți din surse agricole, care duc la reducerea poluării cu nitrați, la raționalizarea și optimizarea utilizării îngrășămintelor ce conțin compuși ai azotului, luând în considerare condițiile din diferite regiuni ale țării trebuie să acopere următoarele probleme [23]:

- Perioadele nepotrivite pentru aplicarea pe teren a îngrășămintelor;
- Modul de aplicare a îngrășămintelor pe terenuri în pante abrupte;
- Restricțiile la aplicarea îngrășămintelor pe terenuri saturate de apă, inundate, înghețate sau acoperite cu zăpadă;
- Condițiile de aplicare a îngrășămintelor pe terenurile amplasate lângă cursurile de apă;
- Volumul și construcția bazinelor de depozitare a deșeurilor de origine animală cât și normele de prevenire a poluării apelor prin infiltrările de la suprafață, a celor apărute în apele subterane și de suprafață a efluenților

rezultați în urma stocării materiilor de origine vegetală și animală [23];

- Aplicarea îngrășămintelor de origine animală și a celor chimice trebuie să se realizeze astfel încât pierderile de nutrienți să fie menținute la niveluri acceptabile (nitrații din apele subterane și de suprafață să fie în limitele admise);
- Managementul terenurilor, rotația culturilor și raportul dintre suprafețele utilizate pentru culturi permanente dependent de terenurile cultivate cu plante anuale;
- Păstrarea pe terenuri a unor suprafețe minime de verdeață care să acopere solul pe perioada cu umiditate maximă, pentru a reține azotul în sol, factor cauzator al poluării cu nitrați a apelor;
- Fertilizarea se va face planificat dependent de tipul de cultură și de înregistrările asupra utilizării îngrășămintelor;
- Apa provenită din șiroire se va proteja împotriva poluării, înainte de infiltrarea apei la rădăcinile vegetației;
- Livrarea se va face exclusiv în vrac, prin utilizarea sacilor de polietilenă, impermeabili, etichetați corespunzător pe care se va menționa tipul de îngrășământ, concentrația și compoziția, solubilitatea, specificațiile pentru depozitare și transport, adresa și numele producătorului etc.);
- Normele privind depozitarea, păstrarea și construcția depozitelor;
- Interdicții în timpul transportului, livrării, depozitării, manipulării și aplicării pe teren;
- Modalități de combinare cu îngrășămintele organice în vederea aplicării pe teren, conform **Hotărârii de Guvern nr. 964/ 13 octombrie 2000** [23].

Măsurile conțin reguli referitoare la: perioadele în care aplicarea anumitor îngrășămintele este nerecomandată sau

interzisă, capacitatea rezervoarelor de stocare a îngrășămintelor de origine animală, această capacitate trebuind să depășească necesarul de stocare în toate zonele vulnerabile, ținându-se seama de restricțiile legate de aplicarea îngrășămintelor pe sol exceptând cazul în care se demonstrează autorității că un exces de îngrășămintă peste capacitatea de stocare va fi supus unui tratament care nu afectează mediul, reducerea aplicării pe sol a îngrășămintelor dependent de caracteristicile zonelor vulnerabile, conform **Hotărârii de Guvern nr. 964/ 13 octombrie 2000 [23]**.

- a) panta de înclinare a solului, condițiile de mediu, clasificarea și caracteristicile terenurilor etc.;
- b) modalitățile de folosire a terenurilor în practicile agricole, inclusiv rotația culturilor.

Aplicarea pe sol a îngrășămintelor are la bază un echilibru între:

- i) evaluarea cantității necesare de azot din culturi;
- ii) aportul de azot din îngrășămintă și sol regăsit în culturi, care trebuie motivat prin:
 - nivelul de azot prezent în sol dependent de necesarul culturii;
 - nivelul de azot obținut prin mineralizare a rezervelor de azot sub formă organică în sol;
 - nivelul de constituenți ai azotului prin administrarea pe sol a îngrășămintelor animale;
 - nivelul de constituenți ai azotului prin administrarea de îngrășămintă de diferite tipuri printre care și chimice.

Ordinul nr. 241/26 martie 2005 și **Ordinul nr. 196/7 aprilie 2005** pentru aprobarea Listei localităților pe județe unde există surse de nitrați din activități agricole și a Listei localităților din bazinele/spațiile hidrografice unde există surse de nitrați din activități agricole (zone vulnerabile și potențial vulnerabile) indică la nivelul județului Timiș, de exemplu zonele [29]:

- Cenei,
- Foeni,
- Gătaia,
- Giarmata,
- Giulvăz,
- Jebel,
- Peciu Nou,
- Periam,
- Șag,
- Satchinez,
- Tormac,
- Uivar,
- Mașloc,
- Pișchia.

Conform **Ordinului nr. 245 din 26/03/2005** pentru aprobarea Metodologiei de evaluare a riscului substanțelor periculoase din listele I și II și al substanțelor prioritare/prioritar periculoase în mediul acvatic prin modelare matematică și a *Metodologiei de evaluare a impactului substanțelor periculoase din listele I și II și al substanțelor prioritare / prioritar periculoase asupra mediului acvatic prin teste ecotoxicologice – alge verzi, dafnia, pești* trebuie respectată următoarea metodologie [30].

Conform **Ordinului nr. 245 din 26 martie 2005** metodologia utilizată se referă la determinarea toxicității acute și cronice asupra peștilor [30].

Prima desemnare a zonelor vulnerabile și potențial vulnerabile în România a fost efectuată în anul 2003 de ICPA împreună cu Administrația Națională "Apele Române" având în vedere prevederile **HG 964/2000** privind aprobarea Planului de acțiune pentru protecția apelor împotriva poluării cu nitrați proveniți din surse agricole se transpun în legislația românească Directiva Consiliul Europei 91/676/EEC [23].

În această desemnare zonele vulnerabile la nitrați din surse agricole au reprezentat perimetrele a 255 localități din România, ceea ce reprezintă 8,64 % din suprafața țării, respectiv 13,93% din

suprafața totală agricolă a țării. Zonele vulnerabile la poluarea cu nitrați desemnate în anul 2003 (Fig. 10-13) au fost stabilite pe baza condițiilor naturale de sol, teren, climă și hidrogeologie referitoare la transferul nitraților către corpurile de ape subterane și de suprafață și pe baza bilanțului de azot (azot produs prin dejecțiile animale – azot extras de culturile vegetale) (Tabelul 4) la nivelul unităților administrative corespunzătoare unităților elementare din nomenclatorul european al unităților administrative: comune, orașe, municipii [42]. Au fost identificate trei tipuri de zone vulnerabile:

- **Zone vulnerabile potențiale:** condițiile de transfer al nitraților către corpurile de apă sunt favorabile, dar nu există un bilanț pozitiv al azotului la nivelul localității și concentrația de nitrați din apele subterane măsurată în rețeaua ANAR e sub 50 mg/L

- **Zone vulnerabile cu surse actuale:** condițiile de transfer al nitraților către corpurile de apă sunt favorabile și există un bilanț pozitiv al azotului la nivelul localității

- **Zone vulnerabile din surse istorice:** condițiile de transfer al nitraților către corpurile de apă sunt favorabile, nu există un bilanț pozitiv al azotului la nivelul localității, în trecut au existat complexe zootehnice pe teritoriul localității și concentrația de nitrați din apele subterane măsurată în rețeaua ANAR este peste 50 mg/L.

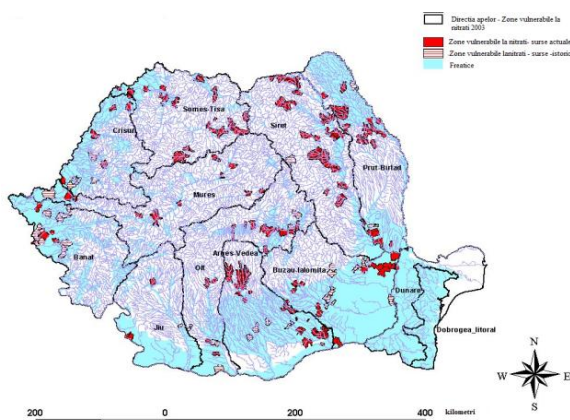


Fig.10. Zone vulnerabile la poluarea cu nitrați – desemnare 2003 [42]

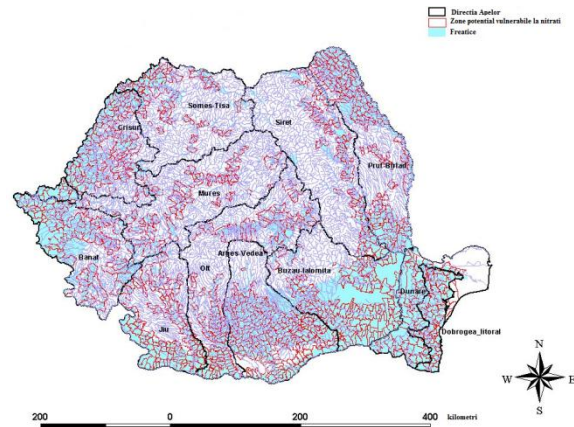


Fig.11. Zone potențial vulnerabile la poluarea cu nitrați – desemnare 2008 [42]

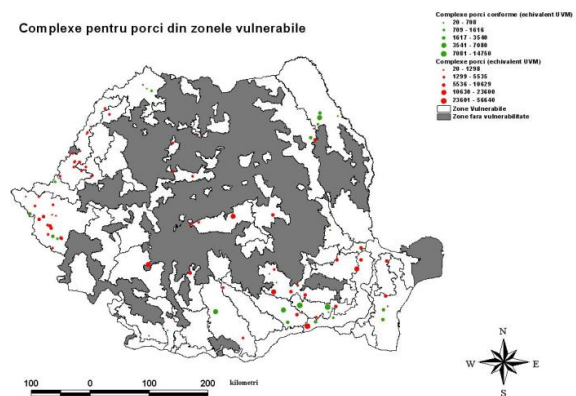


Fig.12. Distribuția complexelor de animale- porci (conforme și ne-conforme) din zonele vulnerabile [42]

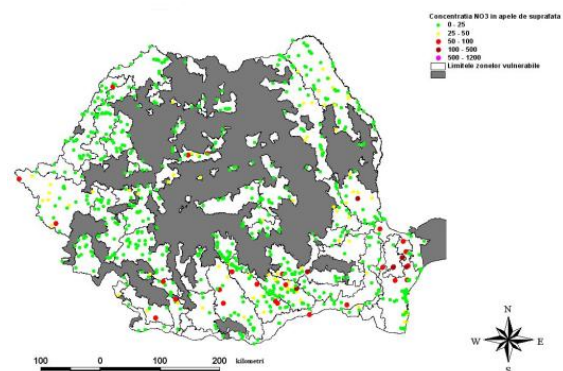


Fig.13. Concentrația maximă (2004-2007) a nitraților pentru măsurarea calității apelor de suprafață [42]

Tabelul 4.

Cantitățile anuale de dejecții și nutrienți pe specii de animale [28, 42]

Specia	Greutatea medie	Producția anuală de gunoi de grajd	Volumul anual de gunoi de grajd	Producția anuală de nutrienți		
	(kg)	(kg)	(litri)	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
Viței sugari	0-50	2.817	3.521	20	4	14
Viței (0,3 – 1 an)	50-250	4.930	6.162	35	5	26
Bovine (1 – 2 ani)	250-600	7.746	9.683	55	20	43
Vaci de lapte	>400	11.408	14.261	81	15	54
Porci	98	1.733	2.167	13	4	8
Porci la îngrășat	68	1.467	1.833	11	4	7
Porci la îngrășat	90	2.000	2.500	15	5	10
Scroafe gestante	125	1.333	1.667	10	4	7
Scroafe cu purcei	170	5.067	6.333	38	13	25
Vieri	160	1.733	2.167	13	4	8
Oi/Capre	45	843	1.054	7	1	5
Păsări reproducție	1,8	18	22	0,36	0,18	0,18
Păsări la îngrășat	0,9	12	15	0,36	0,07	0,1
Cai	450	9.000	12.857	45	8	28

Mulumiri

Această lucrare a fost finanțată din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013, POSDRU / 159 / 1.5 / S / 132765 "Programe doctorale și postdoctorale pentru promovarea excelenței în cercetare, dezvoltare și inovare în domeniile prioritare agronomic și medical veterinar ale societății bazate pe cunoaștere".

Bibliografie

- Bouche MB.** (1977). Strategies lombriciennes, Soil Organisms as Components of Ecosystems, *Biol. Bull.*, Stockholm, 25, 122-132.
- Castro J, Perez RA, Sanchez-Brunete C, Tadeo JL** (2001). Analysis of pesticides volatilised from plants and soil by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography, *Chromatographia*, 53, 361.
- Cort LA.** (1973). An Introduction to Spectroscopic Methods for the Identification of Organic Compounds, vol II, editat de Scheinmann F., Pergamon Press, Oxford.
- Cserhati T.** (2002). Mass spectrometric detection in chromatography. Trends and perspectives, *Biomedical Chromatography*, 16, 303-310.
- Farenhorst A, Topp E, Bowman BT, Tomlin AD.** (2000). Earthworm burrowing and feeding activity and the potential for atrazine transport by preferential flow. *Soil biology & Biochemistry*, 32, 479- 488.
- Feisthauer N.** (2003). Using earthworm behavior to assess contaminated soil, ESG International, Environmental Science & Engineering. <http://www.esemag.com/archive/0503/earthworm.html> (accesat la 01.08.2013).
- Gong Z, Ju B, Wan H.** (2001). Green fluorescent protein (GFP) transgenic fish and their applications, *Genetica* 111, 1-3, 213-225.
- Hoffmann E, Charette J, Stroobant V.** (1994). Spectrométrie de masse, Masson, Paris.
- Hong S, Kim J, Lemley AM, Obendorf SK, Hedge A.** (2001). Analytical method development for 18 pesticides in house dust and settled residues using SEC, SPE, TMS methylation, and GC-MS. *Journal of Chromatographic Science*, 39, 3, 101-112.
- lordache MM.** (2008). Cercetări privind influența unor elemente de tehnologie agricolă asupra pedofaunei (lumbricidelor) cu rol în restaurarea fertilității solurilor, Timișoara, 4-208.
- Kemp W.** (1991) - Organic Spectroscopy, 3rd Ed. W.H. Freeman and Company, New York.
- Lawrence C.** (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review, Elsevier, *Aquaculture*, 269, 1-20.
- Lawrence JM, Singhal S, Bhatia B, Keegan DJ, Reh TA, Luthert PJ, Khaw PT, Limb AG.** (2007). MIO- M1 cell and similar Muller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics, *Stem cells*, 25, 8, 2033-43.
- Manolache C, Boguleanu G.** (1978). Tratat de zoologie agricolă, Dăunătorii plantelor cultivate, Ed. Academiei, 1,158.

15. **Muntean C, Lupa L, Negrea A, Ciopec M.** (2009) – Analiză chimică și fizico-chimică cu aplicații în protecția mediului, *Politehnica*, 187-220.
16. **Scutaru D.** (1998) - Spectrometria de masă, ed. Cermi, 38-149.
17. **Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TC.** (1991). Spectrometric Identification of Organic compounds,. Ediția a 5-a, John Wiley and Sons, New York.
18. **Zorn ML, Van Gestel CAM, Eijsackers H.** (2005). Species-specific earthworms population responses in relation to flooding dynamics in a Dutch floodplain soil, *Pedobiologia*, 49, 189-198.
- Legislație surse**
19. **Directiva nr. 278** /12 iunie 1986 CEE privind protecția mediului, în special a solului, atunci când se utilizează nămoluri de epurare în agricultură
20. **Directiva nr. 63** /22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice.
21. **Directiva nr. 676** /12 decembrie 1991 privind protecția apelor împotriva poluării cu nitrați proveniți din surse agricole
22. **Directiva nr. 83** /3 noiembrie 1998 CE privind calitatea apei destinate consumului uman
23. **Hotărârea de Guvern nr. 964/** 13 octombrie 2000 privind aprobarea Planului de acțiuni pentru protecția apelor împotriva poluării cu nitrați proveniți din surse agricole
24. **ISO 15088:** 2007 Water quality- Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)
25. **Legea nr. 458** din 8 Iulie 2002 privind calitatea apei potabile completată cu Legea nr. 311/2004
26. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals** 203 & 207 (accesat la 20.05.2013)
27. **Ordinul nr. 242/197/2005** pentru aprobarea organizării monitoringului pentru reducerea aportului de poluanți proveniți din surse agricole
28. **Ordinul nr. 1552** /2008 pentru aprobarea listei localităților pe județe unde există surse de nitrați din activități agricole
29. **Ordinul nr. 241** /26 martie 2005 și Ordinul nr. 196/7 aprilie 2005 pentru aprobarea Listei localităților pe județe unde există surse de nitrați din activități agricole și a Listei localităților din bazinele / spațiile hidrografice unde există surse de nitrați din activități agricole (zone vulnerabile și potențial vulnerabile).
30. **Ordinul nr. 245** /26/03/2005 pentru aprobarea Metodologiei de evaluare a riscului substanțelor periculoase din listele I și II și al substanțelor prioritare/prioritar periculoase în mediul acvatic prin modelare matematică și a Metodologiei de evaluare a impactului substanțelor periculoase din listele I și II și al substanțelor prioritare/prioritar periculoase asupra mediului acvatic prin teste ecotoxicologice- alge verzi, dafnia, pești.
31. **Ordinul nr. 296** /11 aprilie 2005 și Ordinul nr. 216/ 13 aprilie 2005 privind aprobarea Programului-cadru de acțiune tehnic pentru elaborarea programelor de acțiune în zone vulnerabile la poluarea cu nitrați din surse agricole
32. **Ordonanța de Urgență 195** /2005 privind protecția mediului
33. **Tests for Toxicity of Contaminated Soil to Earthworms** (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*, or *Lumbricus terrestris*, EPS 1/RM/43, June, 2004.
34. **World Health Organization-** Guidelines for Drinking – water quality, 2011
- Web surse**
35. <http://www.prenhall.com> (accesat la 07.07.2013).
36. http://pnwsteep.wsu.edu/directseed/conf99/jcd_spro.htm (accesat la 18.07.2013)
37. <http://scitechdaily.com/understanding-pollution-from-green-glowing-zebrafish/> (accesat la 11.06.2013).
38. <http://soils.usda.gov/education/facts/soil.html> (accesat la 19.07.2013)
39. http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151_eng.pdf (accesat la 07.08.2013).
40. <http://www.fishforpharma.com/why-zebrafish-17> (accesat la 07.07.2013).
41. <http://www.globalpost.com/photo/5700903/zebrafish-embryos> (accesat la 11.06.2013).
42. http://www.icpa.ro/proiecte/monitoring/atlas/02_Clasa_sol.jpg (accesat la 03.07.2013).
43. <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9720701e.pdf?expires=1374160804&id=id&accname=guest&checksum=1DBF099233FD4922C4AD55FA76426327> (accesat la 18.07.2013)
44. <http://www.sas.upenn.edu/~rlnet/Earthworms.html> (accesat la 03.07.2013).
45. <http://www.ucl.ac.uk/zebrafish-group/research/neuroanatomy.php> (acc 10.07.2013).
46. http://www.uclan.ac.uk/facs/science/envman/cwm/erg/erg_faqs.htm (accesat la 03.05.2013)
47. <http://www.nus.edu.sg> (accesat la 11.06.2013).