Ioan Valentin PETRESCU-MAG

Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca
Facultatea de Agricultură

Andrei Cristian GRĂDINARU

Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Iași
Facultatea de Medicină Veterinară

ECOTOXICOLOGIE

LUCRĂRI PRACTICE

Bioflux, Cluj-Napoca

2018

Referenți științifici:

Prof.univ.dr.ing. **Bogdan Georgescu**

Conf.univ.dr.ing. **Antonia Odagiu**

Contribuția autorilor la scrierea acestui manual a fost egală.

Grafică, desene şi copertă: *Ing.* Cătălina Mihaela GRĂDINARU

Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale a României
PETRESCU-MAG, IOAN VALENTIN
Ecotoxicologie: lucrări practice / Ioan Valentin Petrescu-Mag..., Andrei Cristian Grădinaru.... - Cluj-Napoca: Bioflux, 2018
Conţine bibliografie
ISBN 978-606-8887-41-8

I. Grădinaru, Andrei-Cristian

504

© Autorii și Editura Bioflux

CUPRINS

Introducere 4

1. Măsuri de protecţia muncii în laboratorul de ecotoxicologie 6

2. Calcule în ecotoxicologie 10

2.1 Terminologie 10
2.2 Exprimarea concentraţiilor soluţiilor de lucru 13
2.3 Exprimarea rezultatelor obţinute în urma investigaţiilor de laborator ... 15
2.4 Evaluarea seriilor de date prin calcul statistic 18
2.5 Raportarea rezultatelor obţinute la limitele maxime admise şi dozele zilnice acceptabile (tolerabile) 23
2.6 Calcularea dozelor și concentrațiilor letale 33

3. Recoltarea probelor de laborator în vederea realizării examenelor ecotoxicologice 40

3.1 Considerații generale privind recoltarea probelor de laborator 40
3.2 Organisme model utilizate în ecotoxicologie 42
3.2.1 Organisme model pentru studiul calității apei 42
3.2.2 Organisme model pentru studiul calității solului 53
3.2.3 Organisme model pentru studiul calității aerului 53
3.2.4 Organisme model pentru studiul calității alimentelor 55

4. Poluarea cu metale grele 58

4.1 Surse de poluare, mecanisme de acţiune şi efecte 58
4.2 Metode de identificare ale reziduurilor de metale grele în diverse substraturi 75
4.3 Metode de cuantificare ale reziduurilor de metale grele în diverse substraturi 80
4.3.1 Spectrometria de absorbție atomică 80
4.3.2 Spectrofotometria 83

5. Poluarea cu nitrați / nitriți 86

5.1 Surse de poluare, mecanisme de acţiune şi efecte 86
5.2 Cuantificarea reziduurilor de nitrați / nitriți prin metoda spectrofotometriei de absorbție în U.V.-VIS 89

6. Poluarea cu pesticide 94

6.1 Surse de poluare, mecanisme de acţiune şi efecte 94
6.2 Decelarea reziduurilor de pesticide organoclorurate și organofosforice prin tehnica cromatografiei în strat subțire 98

7. Poluarea cu antibiotice 106

7.1 Surse de poluare şi efecte asupra biocenozei 106
7.2 Identificarea clor- și oxi-tetraciclinelor cu reactiv Sachaguchi 108
7.3 Identificarea penicilinei cu hidroxid de potasiu și clorură ferică..... 109

Bibliografie 112

Index figuri.....120

Index tabele.....122

INTRODUCERE

În contextul diverselor ramuri ale *toxicologiei*, ***ecotoxicologia*** ocupă un loc important prin studiul diverselor surse de poluare, a mecanismelor de acțiune și efectelor contaminanților chimici asupra organismelor vii și mediului în care acestea trăiesc *(apă, aer, sol)*. Dată fiind condiția viețuitoarelor superioare de a se folosi de alte organisme pentru asigurarea creșterii și dezvoltării lor, *furajele și alimentele* devin un al patrulea factor de mediu ce influențează semnificativ existența acestora.

Poluarea chimică este una dintre cele mai importante confruntări ale societății moderne, în contextul diverselor activități industriale dezvoltate de om. Creșterea demografică globală trebuie susținută de o aplicarea diverselor măsuri de control și combarere a poluării mediului. În unele industrii au fost făcuți pași importanți în acest sens, fiind resimțite deja efectele politicilor de reducere a emisiilor poluante din industria autoturismelor și nu numai. În același context se încadrează și limitarea folosirii pesticidelor pe teritoriul României după aderarea țării noastre la Uniunea Europeană în anul 2007, folosirea acestor substanțe de-a lungul vremurilor fiind dovedită a fi *„un rău necesar”,* prin contribuția avută la eradicarea unor boli grave la om, precum malaria, holera, tifosul exantematic, îmbunătățirea recoltelor agricole sau protejarea stocurilor de furaje și alimente împotriva diverșilor dăunători. De factură recentă, antibioticele, o clasă de medicamente mult blamate pentru diverse

fenomene de toxicitate, alergii și dezechilibre la nivelul microflorei intestinale a consumatorului, încă țin sub control numeroase boli infecțioase de origine bacteriană atât în populațiile umane cât și animale, fiind supuse unui control riguros al prezenței reziduurilor lor în diversele componente ale mediului, mai ales în alimente.

Lucrarea intitulată ***„Ecotoxicologie – Lucrări Practice”*** reprezintă un suport practic cu îmbinări armonioase de cunoştinţe teoretice cu privire la definirea celor mai importanţi poluanţi din mediu, sursele lor, mecanisme de acţiune la nivelul organismelor vii, identificarea şi cuantificarea acestora în diverse substraturi prin metode accesibile laboratoarelor didactice.

Lucrarea este structurată în șapte capitole și cuprinde elemente esenţiale cunoaşterii tematicii abordate pentru nivelul studiilor de licenţă. Pentru a facilita înțelegerea informațiilor oferite, textul aceste lucrări este însoţit de un număr de 21 figuri.

Lucrarea se adresează, în primul rând, studenților Facultăților de profil Agronomic, dar și oricăror altor categorii interesate de tematica abordată.

Departe de un conţinut exhaustiv, lucrarea poate fi îmbunătăţită la viitoarele sale ediţii prin sugestii din partea colaboratorilor noştri cadre didactice, laboranţilor din unităţile de profil şi studenţilor pasionaţi de acest domeniu, de la care aşteptăm cu interes opinii constructive.

Autorii

1. MĂSURI DE PROTECŢIA MUNCII ÎN LABORATORUL DE ECOTOXICOLOGIE

Efectuarea *lucrărilor practice* la disciplina de *Ecotoxicologie* presupune existenţa unui spaţiu special amenajat, cu dotări corespunzătoare ca aparatură şi reactivi, şi a unui personal calificat care să urmărească desfăşurarea experimentelor efectuate de către studenţi.

Se va avea în vedere faptul că *probele de lucru* pot fi reprezentate de produse contaminate chimic şi că metodele desfăşurate în vederea identificării sau cuantificării diferitelor toxice pot presupune lucrul cu substanţe chimice nocive pentru sănătatea celor implicaţi, acţionarea unor dispozitive cuplate la o sursă de energie electrică şi folosirea instalaţiilor de gaze naturale.

Pentru evitarea oricăror situaţii neplăcute, este obligatorie respectarea anumitor măsuri de protecţia muncii ce vor fi expuse în cele ce urmează *(a se vedea și Actele normative care reglementează activitatea de protecție a muncii în învățământ, cap. Bibliografie).*

Lucrările de laborator vor fi efectuate doar sub stricta supraveghere a cadrului didactic îndrumător.

Întreg personalul implicat va purta halat cu mâneci lungi şi încheiat la nasturii din faţă şi manşete, dacă este astfel prevăzut. Scopul acestui

demers este de a proteja cât mai bine cu putinţă corpul şi hainele de stradă faţă de acţiunea substanţelor corozive sau colorante. Este recomandată folosirea mănuşilor de unică folosinţă şi a ochelarilor de protecţie, această cerinţă devenind obligatorie în cazul reacţiilor care generează amestecuri cu caracter exploziv.

Efectuarea reacţiilor chimice se va realiza pe o masă destinată acestui scop, numită *masă de lucru*, pe care va fi aranjat conţinutul fiecărei lucrări practice în parte, cu reactivii şi sticlăria necesară. Este interzisă aşezarea obiectelor personale pe *masa de lucru*. Este obligatoriu ca în cadrul laboratorului obiectele personale ale studenţilor să fie dispuse în spaţiile special amenajate în acest sens. Pe mesele de laborator nu se depozitează alimente sau băuturi, iar consumul acestora este strict interzis în acest spaţiu.

La începutul fiecărei lucrări de laborator, cadrul didactic îndrumător este obligat să prezinte conţinutul lucrării practice, importanţa efectuării acesteia, reactivii şi instrumentarul necesar, modul de lucru, precum şi exprimarea rezultatelor şi raportarea acestora faţă de limitele stabilite legislativ. Orice neclaritate din partea studenţilor este lămurită prin explicaţii necesare din partea cadrului didactic îndrumător, în aşa fel încât la începerea activităţilor de laborator studenţii implicaţi să aibă o imagine clară a întregului protocol de desfăşurare a experimentului propus.

Anumite experimente nu vor putea fi efectuate de fiecare student în parte, ci de un reprezentant al grupei sau de câte un reprezentant al echipelor constituite dintr-un număr limitat de persoane. Studenţii care nu participă efectiv la realizarea experimentelor sunt obligaţi să păstreze o conduită academică şi să evite acţiunile care să distragă colegii lor de la buna desfăşurare a activităţilor de laborator.

Este obligatorie explicarea şi cunoaşterea profilului fiecărei substanţe utilizate în realizarea experimentului propus, dacă acestea sunt sau nu volatile, inflamabile, dacă dau reacţii explozive şi în ce amestecuri. De exemplu, sticlele cu eter vor fi bine închise şi ţinute departe de flacără

iar pentru diluarea acidului sulfuric se toarnă acidul încet în apă şi nu invers *(Ivas şi col., 2003).* Reacţiile care presupun folosirea sau rezultarea toxicelor volatile *(de exemplu: acid azotic, amoniac, fenol, formol etc.)* vor fi efectuate doar în spaţii cu ventilare corespunzătoare.

Deşi laboratorul poate avea în dotare pipete clasice din sticlă prevăzute cu filtru de vată, folosirea acestora este recomandată doar pentru probele biologice. Pentru substanţele toxice, măsurarea va fi făcută în mod obligatoriu cu ajutorul biuretelor, a pipetelor automate sau a pipetelor clasice dar la care se ataşează o pară de cauciuc.

Este strict interzisă gustarea substanţelor din laborator iar mirosirea acestora se face cu multă precauţie, doar la indicaţiile cadrului didactic îndrumător şi prin crearea unui curent de aer cu palma în dreptul orificiului sticlei/eprubetei.

În timpul lucrului cu substanţe chimice se va evita ducerea mâinilor la ochi, gură, nas, iar după terminarea experimentului mâinile se spală bine cu apă şi săpun. La finalul fiecărei lucrări practice *masa de lucru* va fi curăţată.

Aparatura necesară efectuării diferitelor determinări va fi cuplată la prize cu împământare şi se va urmări ca firele electrice aferente cablurilor să fie izolate perfect. Fixarea ştecherului în priză şi scoaterea acestuia va fi făcută doar cu mâna uscată. Scoaterea din priză a ştecherului va fi făcută corect, utilizând ambele mâini, una dintre acestea pentru a ţine corpul prizei iar cealaltă pentru a apuca ştecherul.

Becurile de gaz vor fi folosite prin aprinderea, mai întâi, a chibritului şi deschiderea ulterioară a robinetului de gaz.

În caz de accident, prima intervenţie va fi asigurată de către cadrul didactic îndrumător şi ulterior, dacă va fi nevoie, va fi solicitat *Serviciul Public de Urgenţă* prin apel telefonic *112*. În cazul contactului pielii sau ochilor cu diverse substanţe chimice se va avea în vedere principiul

neutralizării acizilor cu soluţii bazice slabe, şi invers, după ce suprafaţa afectată a fost bine clătită cu apă de la robinet. Pentru arsurile cu substanţe alcaline pot fi utilizare soluţiile de acid boric sau acid acetic diluat, iar pentru cele produse de acizi, soluţia de bicarbonat de sodiu *(Ivas şi col., 2003).* În caz de electrocutare, curentul electric va fi întrerupt imediat iar persoana afectată va fi scoasă la aer, aşezată în poziţie orizontală, i se va desface îmbrăcămintea şi i se va face respiraţie artificială cu provocarea alternativă de compresiuni ritmice la nivelul inimii.

În caz de incendiu în incinta laboratorului, cei prezenţi la lucrare vor constitui echipa de primă-intervenţie, acționând în sensul stingerii acestuia cu *stingătorul cu praf carbonic*, dacă focarul este limitat și nu se extinde rapid în spațiile învecinate. În mod practic, se are în vedere scoaterea cuiului de siguranţă şi îndreptarea stingătorului spre focarul de incendiu. Este interzisă utilizarea stingătorului cu spumă, deoarece spuma este formată din soluţie electrolită, bună conductoare electric, care poate genera scurtcircuite suplimentare în echipamente sau electrocutarea celui care intervine. Dacă focarul de incendiu tinde să se extindă cu repeziciune, incinta clădirii va fi imediat părăsită, ajutând la evacularea persoanelor aflate în neputință sau într-un *atac de panică*. Se apelează telefonic *Serviciul Public de Urgență - Pompieri*, pentru intervenția rapidă a echipelor specializate.

Declanșarea unui incendiu este o situație de nedorit ce se poate întâmpla consecutiv scurtcircuitelor provocate în montajele experimentale, asociate cu utilizarea unor siguranţe fuzibile supradimensionate. Prin efect termic, are loc încălzirea firelor de legătură, cedarea izolaţiei din material plastic, apariția altor scurtcircuite care, în final, fac să se propage rapid incendiul în clădire. De asemenea, la extinderea sa pot contribui unele materiale ușor inflamabile *(reactivi din spațiul laboratorului ori materiale introduse din exterior).* Legislația țării noastre interzice fumatul în spațiile publice, țigările aprinse și aruncate la întâmplare constituind, adeseori, cauze în declanșarea incendiilor.

2. CALCULE ÎN ECOTOXICOLOGIE

2.1 Terminologie

Ca orice altă disciplină, și cea de ***Ecotoxicologie*** folosește o terminologie specifică, încadrată în cea a domeniului din care face parte, de ***Toxicologie.*** Dintre cele mai importante concepte care necesită a fi definite la începutul acestui manual practic, amintim:

Toxic. Este un cuvânt cu etimologie controversată; termenul provine din cuvântul grecesc *„toxon" (arc cu săgeţi cu vârfuri otrăvite),* sau din cuvântul egiptean *„tako",* care înseamnă moarte, distrugere, prăpăd. După *Plinius cel Bătrân*, cuvântul toxic derivă din latinescul *„toxicus" (otrăvitor, veninos)* care derivă prin alterare de la *„taxicus"* care, la rândul său, derivă de la numele plantei *Taxus bacata* (tisă), ce conţine un alcaloid foarte toxic *(Oprea, 2007).*

Otravă. Termenul derivă din verbul de origine slavă *„otraviti" (a se mâhni profund),* cuvânt care se referă la fondul psihic. Pentru a indica un compus sau o substanța dăunătoare organismului, poate fi folosit atât termenul de *otravă* cât și cel de *toxic*, fapt întâlnit și la alte popoare, cum

de exemplu francezii folosesc *toxique* şi *poison*, britanicii, *toxic* şi *poison*, germanii, *toxin* şi *gift (Petrescu-Mag și Oroian, 2015).*

Toxicele sau otrăvurile sunt substanţe organice sau anorganice cu puternică activitate nocivă asupra organismului, capabile să producă tulburări chiar și în cantităţi mici. *Otrava* mai poate fi definită ca o substanţă chimică care, introdusă sau formată în organism, produce tulburări sau moartea *(Petrescu-Mag și Oroian, 2015).*

Intoxicaţia este o stare morbidă produsă sub acţiunea unei substanţe organice sau anorganice de origine vegetală, minerală sau sintetică, ce provoacă tulburări profunde ale metabolismului celular şi care are drept rezultat îmbolnăvirea organismului *(Oprea, 2007).*

Toxinele sunt substanţe organice cu structură proteică, produse de organismele vegetale, animale sau microbiene, care provoacă fenomene de intoxicaţie *(Petrescu-Mag și Oroian, 2015).*

Toxicoza este o stare morbidă cauzată de toxine.

Bioacumularea este procesul de creştere a concentraţiei unor substanţe chimice în organismele care trăiesc în medii poluate. Aceste substanțe chimice, în general, nu sunt biodegradabile şi nici nu sunt eficient metabolizate, astfel încât rata cu care sunt absorbite şi stocate în organism este mai mare decât rata cu care sunt eliminate. Sunt cunoscute toxice care se depozitează în ţesutul adipos *(fenomen numit lipofilie, specific pesticidelor)*, în oase *(unele metale grele)* sau la nivelul organelor parenchimatoase *(Petrescu-Mag și Oroian, 2015).*

Biomagnificarea (sporirea biologică sau bioamplificarea) este procesul prin care o substanţă chimică trece de la un nivel trofic la altul superior sau succesiv la niveluri trofice superioare, rezultând în consumatorul succesor reziduuri mai mari *(figura 1). DDT-ul* este un exemplu de pesticid persistent care este degradat greu şi se acumulează în

lanţurile trofice, concentraţia sa în organism devenind tot mai mare la fiecare nivel trofic *(Oprea, 2007)*.

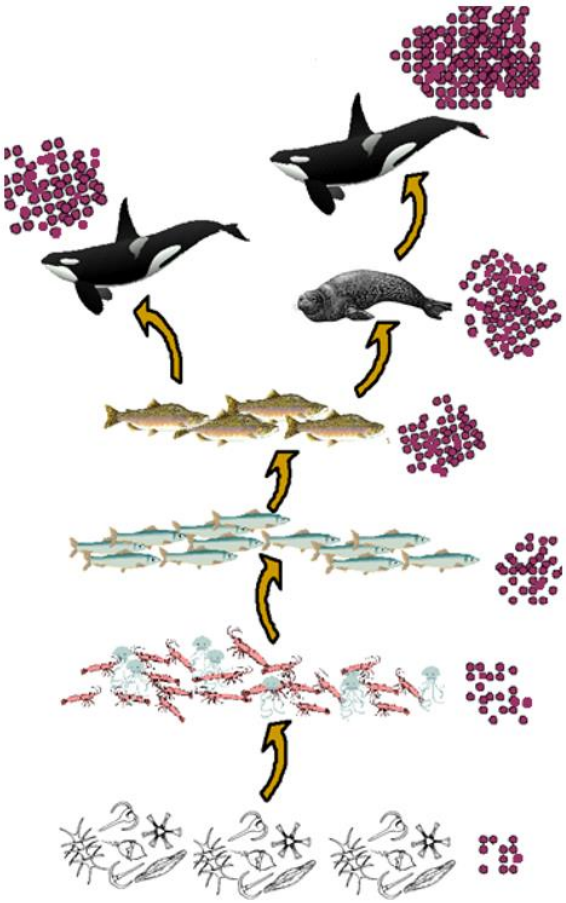


Fig.1: Reprezentarea schematică a procesului biomagnificării în ecosistemul marin *(imagine preluată de pe domeniul liber al internetului)*

Bioconcentrarea este procesul de acumulare de substanţe din apă în organismele acvatice, care rezultă din preluarea şi depurarea simultană. Gradul în care o substanţă este concentrată în ţesuturi peste nivelul din apă reprezintă *„factorul de bioconcentrare”* *(Oprea, 2007)*.

2.2 Exprimarea concentraţiilor soluţiilor de lucru

Protocoalele de lucru ale diverselor metode de interes în *Ecotoxicologie* implică folosirea unor soluţii de concentraţii diferite, exprimate variat în ceea ce priveşte cantitatea de substanţă conţinută într-un anumit volum de soluţie, de exemplu: *concentraţii procentuale, molare, normale*.

Concentraţia procentuală a unei soluţii date arată cantitatea de substanţă, exprimată în grame, conţinută în 100 ml *soluţie (de exemplu: soluţie 3% HNO_3, soluţie 1% H_2SO_4 etc.).*

Concentraţia molară a unei soluţii date arată cantitatea de substanţă, exprimată în grame, egală cu masa sa moleculară *(mol, moleculă-gram),* conţinută într-un litru de soluţie *(1000 ml).* Aceasta se calculează ţinând cont de masele atomice ale elementelor constituente ale respectivului compus chimic. De exemplu, pentru hidroxidul de sodiu *(NaOH),* masa sa moleculară este egală cu 40, ţinând cont de însumarea maselor moleculare ale elementelor componente: 23 *(Na)* + 16 *(O)* + 1 *(H)* = 40. Aşadar, o soluţie de NaOH de concentraţie 1M va conţine 40 g NaOH într-un litru. De multe ori, în practică soluţiile folosite au molarităţi diferite, precum: *2M, 3M,* $\frac{M}{2}$; $\frac{M}{3}$ *(g/l)* etc.

Concentraţia normală a unei soluţii date arată cantitatea de substanţă, exprimată în *echivalent-gram*, conţinută într-un litru de soluţie *(1000 ml)*. Prin *echivalent-gram* se înţelege cantitatea de soluţie exprimată în grame, egală cu echivalentul chimic al substanţei respective.

- *Echivalentul chimic al elementelor chimice luate individual* se calculează prin raportul dintre masa atomică a elementului şi valenţa sa. De exemplu, echivalentul chimic al sodiului este 23, ca rezultat al raportului dintre masa sa atomică (23) şi valenţa sa (1). Echivalentul chimic al oxigenului este 8 ($=\frac{16}{2}$), al calciului 20 ($=\frac{40}{2}$).
- *Echivalentul chimic al acizilor* se calculează prin raportul dintre suma maselor moleculare ale elementelor constituente *(la numărător)* şi numărul atomilor de hidrogen ionizabili din componenţa respectivului acid *(la numitor).* De exemplu, echivalentul chimic al acidului clorhidric *(HCl)* este 36,5 ($=\frac{1+35,5}{1}$) iar al acidului sulfuric *(H_2SO_4)* este 49 ($=\frac{(1x2)+32+(4x16)}{2}$).
- *Echivalentul chimic al bazelor* se calculează prin raportul dintre suma maselor moleculare ale elementelor constituente *(la numărător)* şi numărul grupărilor hidroxil din componenţa respectivei baze *(la numitor).* De exemplu, echivalentul chimic al hidroxidului de sodiu *(NaOH)* este 40 ($=\frac{23+16+1}{1}$) iar al hidroxidului de *calciu [$Ca(OH)_2$]* este 37 ($=\frac{40+(16+1)x2}{2}=\frac{74}{2}$).
- *Echivalentul chimic al sărurilor* se calculează prin raportul dintre suma maselor moleculare ale elementelor constituente *(la numărător)* şi valenţa comună care leagă cationul de anion, altfel spus produsul valenţelor cationului şi anionului *(la numitor).* De exemplu, echivalentul chimic al clorurii de sodiu *(NaCl)* este 58,5 ($=\frac{23+35,5}{1x1}=\frac{58,5}{1}$).

La fel ca în cazul concentraţiilor molare, practica măsurărilor volumetrice poate include soluţii de normalităţi diferite, precum 2N, 3N, $\frac{N}{2}$, $\frac{N}{3}$*(g/l)* etc. Soluţiile $\frac{N}{10}$ se mai numesc *decinormale* iar cele $\frac{N}{100}$, *centinormale*. Soluţiile decinormale sunt dintre cele mai folosite în practică. De exemplu, o astfel de soluţie de NaOH conţine 4 g substanţă la un litru de soluţie, pe când cea de HCl va conţine 3,65 g *(Ivas şi col., 2003).*

2.3 Exprimarea rezultatelor obţinute în urma investigaţiilor de laborator

Rezultatele obţinute în urma investigaţiilor de laborator necesită a fi exprimate în acord cu terminologia internaţională de evaluare a conţinutului de toxic într-un anumit substrat. Cel mai utilizat sistem de exprimare a rezultatelor obţinute este cel care face referire la cât reprezintă toxicul dintr-un milion părţi amestec *(părţi per milion, abreviat ppm),* mai puţin folosite fiind sistemele *părţi per bilion (ppb)* sau *părţi per trilion (ppt).*

Pentru o înţelegere mai bună a acestora, în continuare vor fi prezentaţi multiplii zecimali ai unităţilor de masă, gram *(materii solide, lichide altele decât apa)* şi litru *(pentru probele de apă, unde* $\rho = \frac{m}{V} = 1$ *(tabelele 1 şi 2).*

Tabel 1: Multipli zecimali ai unităţii de masă – *gram*

Multiplu	Nume	Simbol	Valoare
10^{12}	Teragram	Tg	1 000 000 000 000 g
10^{9}	Gigagram	Gg	1 000 000 000 g
10^{6}	Megagram	Mg	1 000 000 g (o tonă)
10^{3}	Kilogram	kg	1 000 g
10^{2}	Hectogram	hg	100 g
10^{1}	Decagram	da g	10 g
10^{0}	Gram	g	1 g
10^{-1}	Decigram	dg	0,1 g
10^{-2}	Centigram	cg	0,01 g
10^{-3}	Miligram	mg	0,001 g
10^{-6}	Microgram	µg (mcg)	0,000 001 g
10^{-9}	Nanogram	ng	0,000 000 001 g
10^{-12}	Picogram	pg	0,000 000 000 001 g

Tabel 2: Multipli zecimali ai unităţii de masă – *litru*

Multiplu	Nume	Simbol		Valoare
10^{12}	Teralitru	Tl	TL	1 000 000 000 000 l
10^{9}	Gigalitru	Gl	GL	1 000 000 000 l
10^{6}	Megalitru	Ml	ML	1 000 000 l
10^{3}	Kilolitru	kl	kL	1 000 l (1 m^3)
10^{2}	Hectolitru	hl	hL	100 l
10^{1}	Decalitru	da l	da L	10 l
10^{0}	Litru	l	L	1 l
10^{-1}	Decilitru	dl	dL	0,1 l
10^{-2}	Centilitru	cl	cL	0,01 l
10^{-3}	Mililitru	ml	mL	0,001 l
10^{-6}	Microlitru	µl	µL	0,000 001 l
10^{-9}	Nanolitru	nl	nL	0,000 000 001 l
10^{-12}	Picolitru	pl	pL	0,000 000 000 001 l

O parte de substanţă de analizat dintr-un milion părţi de amestec *(substrat de investigat)* sau o parte de substanţă de analizat adăugată la 999 000 părţi de amestec definesc *părţile per milion (ppm).*

De exemplu: 1 ppm = 1 mg / 1 000 000 mg

1 000 000 mg = 1 000 g = 1 kg

1 ppm = 1 mg/kg

O parte de substanţă de analizat dintr-un miliard părţi de amestec *(substrat de investigat)* sau o parte de substanţă de analizat adăugată la 999 000 000 părţi de amestec definesc *părţile per bilion (ppb).*

De exemplu: 1 ppb = 1 µg / 1 000 000 000 µg

1 000 000 000 µg = 1 000 g = 1 kg

1 ppb = 1 µg/kg

O parte de substanţă de analizat dintr-un triliard părţi de amestec *(substrat de investigat)* sau o parte de substanţă de analizat adăugată la 999 000 000 000 părţi de amestec definesc *părţile per trilion (ppt).*

De exemplu: 1 ppt = 1 ng / 1 000 000 000 000 ng

1 000 000 000 000 ng = 1 000 g = 1 kg

1 ppt = 1 ng/kg

1 ppt = 0,001 ppb = 0,000 001 ppm

Pentru conversia *ppm* în *concentraţie procentuală (%)* pentru o soluţie cu densitatea *(ρ)* aproximativ egală cu 1, se vor avea în vedere datele din *tabelul 3*.

Tabel 3: Conversia *ppm* în *concentraţie procentuală (%)* pentru soluţii cu *ρ=1 (1 l = 1 kg)*

ppm	*%*
1	0,0001
10	0,001
100	0,01
1000	0,1
10000	1

În general:

$$x_{ppm}\,(\text{mg/kg}) = 10000 \times c\% \times \rho$$

$$c\% = \frac{Xppm}{10000\ x\ \rho}$$

unde,

c% = concentraţia procentuală;

x_{ppm} = concentraţia exprimată în *ppm;*

ρ = densitatea ($\frac{m}{V}$).

2.4 Evaluarea seriilor de date prin calcul statistic

O interpretare cât mai corectă a seriilor de date obţinute în urma analizelor toxicologice de laborator implică folosirea unor indicatori statistici de bază, precum *media aritmetică, abaterea standard, coeficientul de variaţie, testul Student pentru analiza variaţiei (Badea şi Georgescu, 2003; Jaba, 2006).*

În urma analizei mai multor probe de acelaşi tip pentru determinarea concentraţiei unui anume toxic, se obţine o serie de date caracterizată printr-o *valoare minimă* şi *maximă*, şi care indică plaja de valori pe care se întinde respectiva serie de date.

Media aritmetică exprimă tendinţa centrală de grupare a nivelurilor individuale ale unei anume serii de date şi se calculează ca raportul dintre suma valorilor seriei şi numărul lor *(ecuaţia 1).*

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^{n} X_i}{n} \qquad \textit{(ecuaţia 1)}$$

unde,

$$\sum_{i=1}^{n} X_i = x_1 + x_2 + \ldots + x_n$$

$\bar{X}$ - valoarea medie a caracteristicii *„x”* studiate;

x_i - variabila *„i”* a caracteristicii statistice pentru care se calculează media, $i = 1, 2, 3, \ldots, n$;

n - numărul variabilelor caracteristicii statistice.

Abaterea standard *(deviaţia standard* sau *abaterea medie pătratică)* este considerat un indicator fidel al împrăştierii seriei de date *(ecuaţia 2).* Cu cât valoarea abaterii mediei pătratice este mai mică, cu atât valorile seriei de date sunt mai concentrate în jurul mediei şi, în consecinţă, colectivitatea statistică este mai omogenă, şi invers, cu cât valoarea abaterii mediei pătratice este mai mare, cu atât valorile individuale ale seriei de date sunt mai dispersate iar colectivitatea mai puţin omogenă.

$$\sigma_X = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \qquad \textit{(ecuaţia 2)}$$

unde,

$$\sum_{i=1}^{n}(X_i - \bar{X})^2 = (x_1 - \bar{X})^2 + (x_2 - \bar{X})^2 + \ldots + (x_n - \bar{X})^2 \qquad \textit{(ecuaţia 3)}$$

unde,

σ_X = abaterea standard;

$\bar{X}$ - valoarea medie a caracteristicii *„x”* studiate;

x_i - variabila *„i”* a caracteristicii statistice pentru care se calculează media, $i = 1, 2, 3, \ldots, n$;

n - numărul variabilelor caracteristicii statistice.

Pe baza indicatorilor sintetici ai dispersiei se poate calcula *intervalul mediu de variaţie*, definit de următoarele limite:

$$\bar{X} \pm \sigma_X = \{ \begin{matrix} \bar{X} - \sigma_X \\ \bar{X} + \sigma_X \end{matrix}$$

Într-o distribuţie normală standard *(* $\bar{X}$ *=0;* σ_X *=1),* în intervalul mediu $(\bar{X} \pm \sigma_X)$ apar 68,27% din cazuri, 95,45% din cazuri în intervalul $(\bar{X} \pm 2\sigma_X)$, respectiv 99,97% din cazuri în intervalul $(\bar{X} \pm 3\sigma_X)$.

Coeficientul de variaţie reprezintă un alt indicator al împrăştierii valorilor dintr-o serie de date, fiind dat de raportul *deviaţiei standard* faţă de *medie*, exprimat în procente *(ecuaţia 4).* Coeficientul de variaţie poate lua valori cuprinse între 0 şi 100%. Când valoarea sa este apropiată de 0 se consideră că valorile seriei de date au avut o variaţie slabă, colectivitatea de date este omogenă, media fiind, în acest caz, cu un grad ridicat de reprezentativitate. Cu cât coeficientul de variaţie este mai mare *(către 100%),* variaţia valorilor seriei de date este mai intensă, colectivitatea mai heterogenă iar media cu un nivel de reprezentativitate mai scăzut. Aşadar, *coeficientul de variaţi*e poate fi folosit şi ca test de semnificaţie a reprezentativităţii mediei, cu următoarele praguri de semnificaţie:

Tabel 4. Niveluri de reprezentativitate ale mediei aritmetice prin calcularea coeficientului de variație

0 < V% < 16,9%	media este foarte reprezentativă
17% < V%< 34,9%	media este reprezentativă
35% < V% <50%	media este reprezentativă în sens larg
V% > 50%	media este nereprezentativă

$$V = \frac{\sigma_X}{\bar{X}} \; x \; 100 \qquad \textit{(ecuaţia 4)}$$

unde,

V = coeficient de variaţie;

σ_X = abaterea standard;

$\bar{X}$ - valoarea medie a caracteristicii *„x”* studiate.

<u>Testul Student</u> pentru analiza variaţiei *(sau T-testul)* se foloseşte pentru a aprecia dacă între valorile a două serii de date există sau nu diferenţe semnificative din punct de vedere statistic *(de exemplu, probe de sol investigate pentru acelaşi contaminant dar care au fost recoltate din mai multe puncte din două areale diferite).* În aprecierea diferenţei semnificative, acest test ţine cont de măsura variabilităţii şi de ponderea observaţiilor în funcţie de numărul acestora *(grade de libertate)* *(ecuaţia 5).*

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sigma_{X_1X_2} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \qquad \textit{(ecuaţia 5)}$$

unde,

$$\sigma_{X_1X_2} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)\sigma^2_{X_1} + (n_2 - 1)\sigma^2_{X_2}}{n_1 + n_2 - 2}}$$

$\bar{X}_1, \bar{X}_2$ = media eşantionului 1 de valori respectiv, eşantionul 2;

$\sigma_{X_1X_2}$ = abaterea medie pătratică comună celor două eşantioane;

$\sigma^2_{X_1}, \sigma^2_{X_2}$ = estimator nedistorsionat al varianţei celor două eşantioane;

n = volumul eşantionului (număr probe);

$(n_1 - 1), (n_2 - 1)$ = grade de libertate pentru eşantionul 1 respectiv, 2;

$n_1 + n_2 - 2$ = număr total de grade de libertate utilizat în interpretarea *T-test.*

Se consideră o diferenţă semnificativă, cu o probabilitate de 95% ($\alpha = 0{,}05$) dacă*,, t''* calculat este superior celui tabelar sau teoretic *(tabel 5),* pentru gradele de libertate corespunzătoare.

Tabel 5: Valorile critice ale distribuţiei *t – Student* cu ν grade de libertate *(Badea şi Georgescu, 2003; Jaba, 2006)*

ν	$\alpha_{0,1}$	$\alpha_{0,05}$	$\alpha_{0,025}$	$\alpha_{0,01}$	$\alpha_{0,005}$
1	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657
2	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925
3	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841
4	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604
5	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032
6	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707
7	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499
8	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355
9	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250
10	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169
11	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106
12	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055
13	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012
14	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977
15	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947
16	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921
17	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898
18	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878
19	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861
20	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845
21	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831
22	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819
23	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807
24	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797
25	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787
26	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779
27	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771
28	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763
29	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756
∞	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576

2.5 Raportarea rezultatelor obţinute la limitele maxime admise şi dozele zilnice acceptabile (tolerabile)

Rezultatele obţinute în urma investigaţiilor de laborator pentru analiza toxicelor sunt lipsite de valoare în lipsa comparării lor cu ***limita maximă admisă (LMA)*** stabilită legislativ, ori după caz, cu ***doza zilnică acceptabilă (DZA).***

Limita maximă admisă reprezintă concentraţia maximă de reziduu chimic folosit în agricultură sau medicină veterinară, legal tolerată într-un produs destinat alimentaţiei, de origine vegetală sau animală *(www.foodstandards.gov.au). Limita maximă admisă* a fiecărui contaminant în parte se stabileşte luând în considerare concentraţia toxicului în diverse produse alimentare, cantitatea de alimente contaminate ingerate de populaţie, relaţia dintre cantitatea de toxic şi nivelul acestuia în organism, nivelul toxic de contaminant pentru om, distribuţia toxicului în organism şi viteza sa de excreţie *(Banu şi col., 1982). Limita maximă admisă* se stabileşte pentru fiecare produs alimentar, astfel:

$$LMA = \frac{DZA \; x \; G}{CS} \qquad \textit{(ecuaţia 6)}$$

unde,

DZA = doza zilnică acceptabilă de substanţă reziduală pentru om, exprimată în *mg/kg;*

G = greutatea medie a consumatorului adult, exprimată în kg *(60 kg);*

CS = coeficient de consum al produsului alimentar din grupa dată *(Rotaru şi Mihaiu, 2002).*

Doza zilnică acceptabilă (DZA - engl. „ADI", Acceptable Daily Intake) reprezintă cantitatea de substanţă toxică exprimată în *mg* şi raportată la masa corporală a individului *(măsurată în kg şi notată în continuare ca kc – kilocorp, kilogram greutate corporală),* care poate fi ingerată zilnic de către acesta pe toată durata vieţii sale, fără a rezulta un risc apreciabil pentru sănătatea sa *(pentru un om adult se ia în considerare greutatea medie de 60 kg) (Banu şi col., 2007).* Literatura de specialitate face referire şi la *doza zilnică tolerabilă*, mai ales daca respectivul toxic nu este folosit în mod intenţionat pentru a realiza o contaminare.

$$DZA = \frac{NOAEL}{100} \quad \textit{(ecuaţia 7)}$$

unde,

NOAEL = nivelul maxim de contaminant care nu are efecte toxice demonstrabile în testele de laborator efectuate pe animale *(engl. „No Observed Adverse Effect Level");*

100 = factor de siguranţă *(FS)* ce cuprinde două componente, un factor de 10 pentru diferenţele interspecifice *(animale-om),* multiplicat cu un factor de 10 pentru diferenţele intraspecifice *(dintre indivizii aceleiaşi specii) (Banu şi col., 2007).*

Considerând poluanţii abordaţi în această lucrare, principalele date de referinţă cu privire la *limitele maxime admise* şi *dozele zilnice acceptabile* sunt notate în *tabelele 6-9.*

Tabel 6: Limitele maxime admise şi dozele zilnice acceptabile ale reziduurilor de metale grele

Produsul	*LMA (mg/kg)*[†*]		
	Pb	***Cd***	***Hg***
Lapte, lapte pasteurizat	0,020	-	-
Carne (fără măruntaie) de vacă, oaie, porc şi pasăre	0,10	0,050	-
Măruntaie de bovine, oaie, porc şi pasăre	0,50	-	-
Carne de cal, fără măruntaie	-	0,20	-
Ficat de vacă, oaie, porc, pasăre şi cal	-	0,50	-
Rinichi de vacă, oaie, porc, pasăre şi cal	-	1,0	-
File de peşte	0,30	-	-
Fileul următorilor peşti: hamsie, bonito, doradă, ţipar, lumânărică, macrou, luvar, sardină, ton, talpa piciorului	-	0,10	-
Fileul peştelui sabie	-	0,30	-
Fileul următorilor peşti: peştele undiţar, peştele pisică din Atlantic, bonito, ţipar, peştele soldat, grenadier, halibut, marlin, lumânărică, ştiucă, bonito, cod, peştele câine portughez, calcan, peştele roşu, peştele teacă, doradă, rechin, macrou, sturion, peştele sabie, ton.	-	-	1,0
Alţi peşti decât cei anterior menţionaţi	-	-	0,50

Produsul	*LMA (mg/kg)*[†*]		
	Pb	***Cd***	***Hg***
Crustacee, fără carnea maro a crabului, capul şi toracele homarului şi a crustaceelor similare *(Nephropidae şi Palinuridae)*	0,50	0,50	0,50
Moluşte bivalve	1,5	1,0	-
Cefalopode (fără viscere)	1,0	1,0	-
Cereale, legume	0,20	-	-
Cereale, fără tărâţe, grâu şi orez	-	0,20	-
Tărâţe, grâu şi orez	-	0,20	-
Boabe de soia	-	0,20	-
Vegetale, fără Brassicaceae, vegetale frunzoase, ierburi proaspete, fungi. Pentru cartofi, nivelul maxim se aplică pentru cei decojiţi.	0,10	-	-
Vegetale şi fructe, fără vegetale frunzoase, ierburi proaspete, fungi, vegetale cu tulpină, nuci de pin, vegetale rădăcinoase şi cartofi	-	0,050	-
Brassicaceae, vegetale frunzoase, fungi cultivaţi	0,30	0,20	-
Vegetale cu tulpină, vegetale rădăcinoase şi cartofi, fără ţelină. Pentru cartofi, nivelul maxim se aplică pentru cei decojiţi.	-	0,10	-
Fructe, fără cele de pădure şi fructe mici	0,10	-	-

Produsul	*LMA (mg/kg)†**		
	Pb	***Cd***	***Hg***
Fructe de pădure şi fructe mici	0,20	-	-
Grăsimi şi uleiuri, incluzând grăsimea laptelui	0,10	-	-
Sucuri de fructe, sucuri de fructe reconstituite şi nectaruri din fructe	0,050	-	-
Vin (fără lichior), cidru, vin din fructe	0,20	-	-
Vin aromatizat, băuturi pe bază de vin şi cocktailuri aromatizate pe bază de vin	0,20	-	-
***DZA Pb = 3,6 µg/kc/zi*			
***DZA Cd = 0,5 µg/kc/zi*			
***DZA Hg organic preluat oral = 0,1 µg/kc/zi*			
***DZA Hg anorganic = 2 µg/kc/zi*			

†Pentru *Cu* şi *Zn* nu sunt stabilite limite maxime admise

**Commission Regulation (EC) 1881/2006*

***Winter-Sorkina şi col., 2003*

Tabel 7: Limitele maxime admise şi dozele zilnice acceptabile ale reziduurilor de nitraţi (NO_3^-) şi nitriţi (NO_2^-)

Produsul	*LMA (mg NO_3/kg)**	*Menţiuni*
Spanac proaspăt (lat. „Spinacia oleracea”)	*3000*	*Pentru cel recoltat între 1 octombrie şi 31 martie*
	2500	*Pentru cel recoltat între 1 aprilie şi 30 septembrie*
Spanac îngheţat	*2000*	-
Salată verde (lat. „Lactuca sativa”)	*4500*	*Pentru cea recoltată între 1 octombrie şi 31 martie, crescută în solarii*
	4000	*Pentru cea recoltată între 1 octombrie şi 31 martie, crescută în aer liber*
	3500	*Pentru cea recoltată între 1 aprilie şi 30 septembrie, crescută în solarii*
	2500	*Pentru cea recoltată între 1 aprilie şi 30 septembrie, crescută în aer liber*
***DZA NO_3^- = 3,7 mg/kc/zi*		
***DZA NO_2^- = 0,06 mg/kc/zi*		

**Commission Regulation (EC) 1881/2006*
*** www.efsa.europa.eu*

Actele normative în vigoare nu mai stabilesc *limite maxime admise* pentru reziduurile de nitrați și nitriți în produsele alimentare de origine animală. În acest caz, fiecare procesator își va stabili adaosurile de conservanți în funcție de STAS-urile interne de fabricație ori ținând cont de vechile normative, *Ordinul M.S. nr. 611/1995, Ordinul M.S. nr. 975/1998 (Grădinaru și col., 2016).* Conform acestora din urmă, limita maximă admisă pentru *nitritul de potasiu (E_{249})* și *nitritul de sodiu (E_{250})* în carne și produse de carne este de *7 mg%,* iar pentru *nitratul de sodiu (E_{251})* și *nitratul de potasiu (E_{252})* în carne și produse de carne este de *25 mg%*, iar în lapte și produse de lapte, de *5 mg%*.

Tabel 8: Limite maxime admise ale reziduurilor unor pesticide în produse de origine animală

Pesticid	*Produs de analizat*	*Limita maximă admisă** ***ppm (mg/kg)***
Aldrin, dieldrin	Grăsime animală, inclusiv grăsimea intramusculară	0,2
	Lapte de vacă crud și smântână	0,006
	Ouă proaspete în coajă, ouă și gălbenuș de ouă	0,02
DDT (sumă de izomeri DDT, DDE, DDD)	Grăsime animală, inclusiv grăsimea intramusculară	1,0
	Lapte de vacă crud și smântână	0,04
	Ouă proaspete în coajă, ouă și gălbenuș de ouă	0,05

Pesticid	*Produs de analizat*	*Limita maximă admisă** **ppm (mg/kg)**
HCH *(izomer β)*	Lapte de vacă crud și smântână	0,004
	Ouă proaspete în coajă, ouă și gălbenuș de ouă	0,02
	Grăsime animală, inclusiv grăsimea intramusculară	0,1
	Lapte de vacă crud și smântână	0,003
	Ouă proaspete în coajă, ouă și gălbenuș de ouă	0,1
HCH *(izomer γ - Lindan)*	Grăsime animală, inclusiv grăsimea intramusculară	2,0 *(excepție pentru carnea de oaie)* 1,0 *(pentru alte produse)*
	Lapte de vacă crud și smântână	0,008
	Ouă proaspete în coajă, ouă și gălbenuș de ouă	0,1
Carbofuran	Grăsime animală, inclusiv grăsimea intramusculară	0,1
	Lapte de vacă crud și smântână	0,1
	Ouă proaspete în coajă, ouă și gălbenuș de ouă	0,1

Pesticid	*Produs de analizat*	*Limita maximă admisă** **ppm (mg/kg)**
Amitraz	Grăsime animală, inclusiv grăsimea intramusculară	0,02 *(pentru carne de pasăre)*
	Lapte de vacă crud și smântână	-
	Ouă proaspete în coajă, ouă și gălbenuș de ouă	0,02
Propoxur	Grăsime animală, inclusiv grăsimea intramusculară	0,05
	Lapte de vacă crud și smântână	0,05
	Ouă proaspete în coajă, ouă și gălbenuș de ouă	0,05

** Ordin al Ministrului Agriculturii, Alimentației și Pădurilor, M. Of. 812/2001*

Tabel 9: Limite maxime admise ale reziduurilor unor antibiotice în produse de origine animală

Antibiotic	*Produs de analizat*	*Limita maximă admisă** **ppb (µg/kg, ng/ml)**
Benzilpenicilină, ampicilină	Mușchi, grăsime, ficat, rinichi	50
	Lapte	4
Cloxacilină	Mușchi, grăsime, ficat, rinichi	300
	Lapte	30

Antibiotic	*Produs de analizat*	*Limita maximă admisă** **ppb (µg/kg, ng/ml)**
Tetraciclină, oxitetraciclină, clortetraciclină	Mușchi	100
	Ficat	300
	Rinichi	600
	Lapte	100
	Ouă	200
Dihidrostreptomicină	Mușchi, grăsime, ficat	500
	Rinichi	1000
	Lapte	200
Gentamicină	Mușchi, grăsime	50
	Ficat	200
	Rinichi	750
	Lapte	100
Neomicină	Mușchi, grăsime, ficat	500
	Rinichi	5000
	Lapte	1500
	Ouă	500

** Council Regulation 2377/90, 1990; Ordin ANSVSA nr. 82/2005*

2.6 Calcularea dozelor și concentrațiilor letale

Doza este unul dintre principalii factori de toxicitate. Caracterizarea toxicologică a unei substanţe administrate *parenteral* sau *per os* se realizează prin următorii indicatori:

- ✓ ***doza maximă tolerată (DMT)*** – cantitatea cea mai mare de substanţă care este suportată de organism fără să apară fenomene toxice;
- ✓ ***doza letală (DL)*** – cantitatea cea mai mică de substanţă care provoacă moartea unui animal adult;

Datorită variaţiilor dependente de individ, în practica toxicologică au fost introduși și alți indicatori, precum:

- ✓ ***doza letală zero (DL_0)*** – cantitatea de substanţă care determină fenomene toxice grave, dar nu letale;
- ✓ ***doza letală 50 (DL_{50})*** – cantitatea de substanţă care produce efecte letale la 50 din 100 animale de experienţă, în 24-48 ore;
- ✓ ***doza letală 100 (DL_{100})*** – cantitatea de substanţă care produce efecte letale la toate animalele folosite în experimentul acut de toxicitate;
- ✓ ***dozele letale 75 şi 25 (DL_{75}, DL_{25})*** – sunt rar folosite, acestea fac referire la cantitatea de substanţă care produce efecte letale la 75, respectiv 25 din 100 animale de experienţă, în 24-48 ore;
- ✓ ***doza minimă letală (DML)*** – cantitatea cea mai mică de substanţă care omoară un singur animal din lot experimental;
- ✓ ***doza letală certă (DLC)*** – cantitatea de substanţă care produce moartea animalelor în orice situaţie.

Substanţele toxice care pătrund în organism pe cale respiratorie sunt caracterizate prin indicatori oarecum analogi, precum:

- ✓ ***concentraţia letală a toxicului în atmosferă (CL)*** – corespunde aproximativ *dozei letale* şi se exprimă în *ppm (mg/m^3);*
- ✓ ***concentraţia letală 50 (CL_{50})*** – cantitatea de toxic *(mg/m^3 aer)* care produce moartea a 50% dintre animalele de experienţă, în decurs de 4 ore;
- ✓ ***concentraţia letală 100 (CL_{100})*** – cantitatea cea mai mică de toxic *(mg/m^3 aer)* din aerul respirat de animalele de experienţă care provoacă mortalitate în proporție de 100%.

În cazul medicamentelor, ***DL_{50}*** se raportează la ***DE_{50}*** *(doza terapeutică efectivă 50)* şi se obţine ***indicele terapeutic (IT).*** Dacă *indicele terapeutic* este mai mare sau egal cu 10, medicamentul respectiv nu prezintă pericol la doze uzuale, iar dacă este mai mic de 10, se impune a fi folosit cu precauţie.

Datorită diferenţelor mari ale dozelor toxice, cercetătorii *Hodge şi Sterner (citați de Oprea, 2007)* au clasificat substanţele după ***DL_{50}*** *(exprimată în mg/kg)* în administrarea orală la şobolani *(clasificarea este acceptată şi în prezent),* astfel:

- ✓ substanțe extrem de toxice *(DL_{50} sub 1 mg/kg);*
- ✓ substanțe foarte toxice *(DL_{50} cuprinsă între 1 și 50 mg/kg);*
- ✓ substanțe moderat toxice *(DL_{50} cuprinsă între 50 și 100 mg/kg);*
- ✓ substanțe puţin toxice *(DL_{50} cuprinsă între 500 și 5000 mg/kg);*
- ✓ substanțe practic netoxice *(DL_{50} cuprinsă între 5000 și 15000 mg/kg);*
- ✓ substanțe relativ lipsite de toxicitate *(DL_{50} peste 15000 mg/kg).*

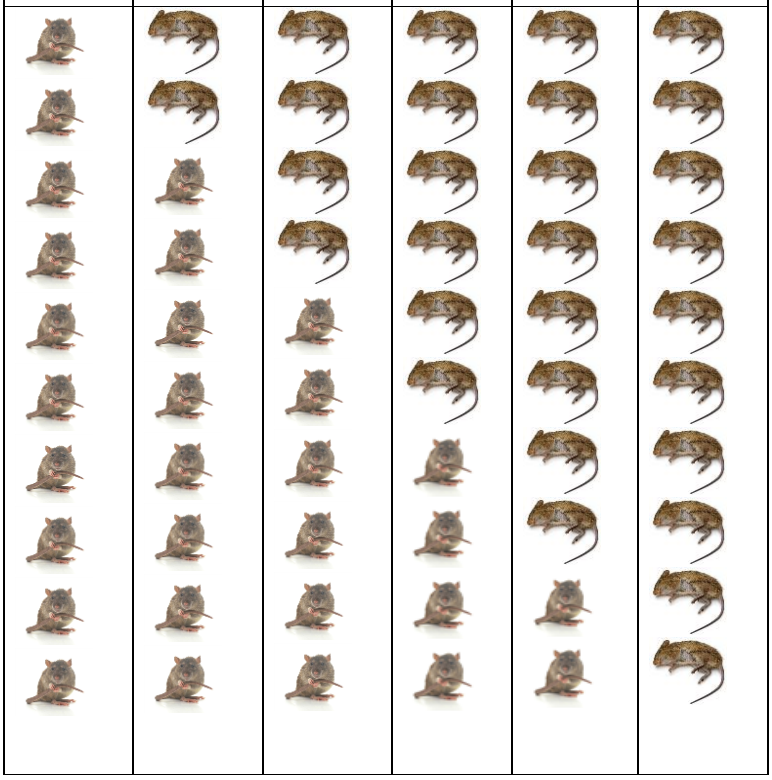
Dozele toxice variază în funcţie de specie *(dacă se consideră doza toxică 1 la câine, aceasta va fi 2-5 la suine, 5 la ovine, 10 la cabaline, 12-*

15 la taurine), vârstă *(la animalele tinere doza scade cu 1/8–1/4 din doza pentru un animal adult).*

EXERCIȚII ȘI PROBLEME:

Problema 1: Unor loturi de șobolani li s-a administrat subcutanat venin de taipan *(lat. „Oxyuranus scutellatus”)* în vederea testării toxicității acestuia, după cum urmează: 5 µg/kc *(lotului 1),* 15 µg/kc *(lotului 2),* 20 µg/kc *(lotului 3),* 30 µg/kc *(lotului 4),* 35 µg/kc *(lotului 5),* 45 µg/kc *(lotului 6).* Rezultatele experimentului sunt prezentate în *tabelul 10.*

Tabel 10: Rezultatele experimentului de testare a toxicității veninului de taipan

Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6
					

Cerințe:

A. Determinați cu aproximație DL_{25}, DL_{50} și DL_{75} la șobolan *(lat. „Ratus norvegicus”)* pentru veninul de taipan *(lat. „Oxyuranus scutellatus).*

B. Dacă greutatea medie a șobolanilor este de 200 g și pornind de la premiza că toxicitatea veninului de taipan la șobolan și om este asemănătoare, calculați cu aproximație cantitatea de venin care, inoculată la om, poate cauza moartea unui individ din doi.

C. DL_{100} este mai mare, egală sau mai mică decât 45 µg/kc?

D. DL_0 este mai mare, egală sau mai mică decat 5 µg/kc?

Observație: pentru calcularea *dozei letale 50* poate fi folosită ***metoda curbei etalon.*** Pentru aceasta, pe o hârtie milimetrică se trasează un grafic *(figura 2),* pe abscisă *(o-x)* fiind notate dozele administrate loturilor de experiență iar pe *ordonată (o-y),* numărul corespunzător de animale moarte. $\boldsymbol{DL_{50}}$ se calculează prin extrapolare pe grafic la curba etalon a valorii medii pentru numărul animalelor loturilor de experiență, și prelungirea ulterioară a dreptei până la axa concentrațiilor folosite în experiment.

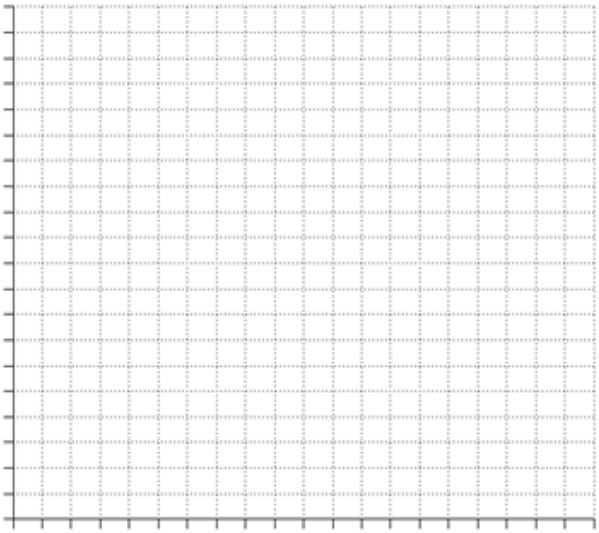


Fig. 2: Graficul metodei curbei etalon pentru calcularea DL_{50}

Problema 2: Unele nevertebrate pot fi extrem de otrăvitoare în caz de mușcături. Acestea produc *(alegeți răspunsul corect):*

a) toxice
b) toxine
c) toxoplasme
d) taxacină

...care cauzează celui mușcat *(alegeți raspunsul corect):*

a) taxonomie
b) toxicoză
c) toxoplasmoză

Problema 3: Stabiliți prin calcul dacă este necesară administrarea/dozarea cu mare precauție[1] a următoarelor medicamente/substanțe *(tabel 11):*

Tabel 11: Valorile DE_{50} și DL_{50} pentru aspirină, ibuprofen și cafeină, în vederea calculării *indicelui terapeutic (IT)*

Medicament / Substanță	DE_{50}	DL_{50}
Aspirină	60 mg/kc	1000 mg/kc
Ibuprofen	22,3 mg/kc	500 mg/kc
Cafeină	2 mg/kc	170 mg/kc

Problema 4: În solurile urbane, cadmiul poate atinge concentrații de *7 ppm.* Cadmiul nu este toxic pentru plante. Concentrația acestui metal în rădăcinile plantelor din respectivele areale urbane contaminate poate

[1] A nu se omite faptul că orice medicament se folosește cu precauție. În acest material, prin *„dozare cu precauție*” se face referire doar la termenii tehnici.

atinge, adeseori, concentrații de aproximativ 3 ori mai mari decât în sol. Ciupercile degradează celuloza rădăcinilor plantelor dar păstrează aceeași concentrație de cadmiu în micelii, precum cea din lemn. O insectă care trăiește în materialul lemnos subteran, hrănindu-se cu lemn și micelii de astfel de ciuperci, face ca *bioacumularea cadmiului* în corpul său să atingă concentrații de cca. 4 ori mai mari decât cele înregistrate în mediul ei natural de viață. O pasăre insectivoră, ulterior consumului de astfel de insecte, dublează în corpul ei concentrația cadmiului din insectele consumate[2] și excretă prin ouăle sale *cca.* un sfert din concentrația cadmiului din corpul adultului. Ouăle sunt consumate de către coțofană, care *bioacumulează cadmiu* de *cca.* 5 ori mai mult decât concentrația de cadmiu din hrana sa *(constituită preponderent din ouă de păsări insectivore).*

Stabiliți următoarele:

A. Concentrația de cadmiu la fiecare nivel trofic:

- sol .....
- rădăcinile plantelor .....
- miceliile fungilor .....
- insectă consumatoare de celuloză și micelii .....
- corpul păsării .....
- ouăle păsării insectivore .....
- corpul coțofenei .....

[2] Important de notat faptul că biomagnificarea cadmiului nu este o certitudine și că valorile prezentate pot să nu fie întotdeauna conforme cu realitatea.

B. Cazul de față este unul specific *bioacumulării* sau *biomagnificării*? Justificați răspunsul dumneavoastră.

C. Cunoașteți un alt metal greu caracterizat prin biomagnificare?

3. RECOLTAREA PROBELOR DE LABORATOR ÎN VEDEREA REALIZĂRII EXAMENELOR ECOTOXICOLOGICE

3.1 Consideraţii generale privind recoltarea probelor de laborator

În vederea efectuării examenelor ecotoxicologice de laborator, pot fi recoltate *probe de aer, apă, sol, probe de origine vegetală*, respectiv, de *origine animală.* Recoltarea probelor de laborator se face respectând principii generale de jurisprudenţă, şi anume: fiecare probă se recoltează în dublu exemplar *(o probă pentru laborator, cea de-a doua fiind contra-probă),* imediat după recoltare fiecare recipient sau pungă de recoltare se sigilează şi etichetează, pe fiecare etichetă fiind notate denumirea probei, numărul curent al acesteia, locul de provenienţă şi data recoltării. Probele reprezentate de produse perisabile vor fi transportate către laborator în cel mai scurt timp cu putinţă, la o temperatură cuprinsă între 0 şi 4^0C, fiind evitată conservarea acestora cu agenţi chimici. Transportul probelor către laborator va fi însoţit de un *proces verbal constatator*, în care se vor regăsi înscrise locul, data şi ora recoltării probelor, denumirea acestora, modul în care s-a realizat recoltarea, numele şi calitatea persoanei care a efectuat

recoltarea, destinaţia probelor şi analizele care se solicită a fi efectuate din partea laboratorului *(Stănescu şi Enache, 1997).*

În general, probele lichide se recoltează în flacoane de sticlă sau polietilenă, curăţate şi sterilizate în prealabil, prevăzute cu dop şi închise ermetic după ce umplerea acestora s-a făcut până la refuz. Cantitatea de probă recoltată este cuprinsă între 0,5 şi 1 litru *(1 kg),* în funcţie de necesităţile laboratorului pentru efectuarea analizelor vizate. Probele de sol se recoltează în cutii din material plastic iar probele de vegetale în saci, săculeţi, pungi de hârtie. Probele biologice reprezentate de sânge şi urină se recoltează în flacoane special constituite în acest sens, organele sărace în lichide în pungi de hârtie cerată iar produsele alimentare gata ambalate se recoltează în ambalajul original, dacă unităţile de desfacere au capacităţi de până la 1 litru sau 1 kilogram *(Solcan şi Beşchea Chiriac, 2005).*

Pentru a fi cât mai reprezentative, unele tipuri de probe *(precum cele de sol de pe o parcelă, de apă dintr-un iaz, de vegetale de pe un areal, de cereale dintr-o remorcă sau oricare tip de probe care fac parte dintr-un lot)* se recoltează randomizat, din mai multe puncte, acestea reprezentând *probele parţiale*. În continuare, *probele parţiale* se amestecă pentru a constitui *proba medie,* din care se extrage ulterior *proba reprezentativă* ce va fi folosită pentru investigaţiile de laborator *(Grădinaru şi col., 2016).*

Analiza ecotoxicologică a probelor de aer poate fi făcută la faţa locului folosind hârtii, creioane sau tuburi ce conţin reactivi speciali care în contact cu atmosfera poluantă indică prezenţa unui anumit toxic printr-o reacţie specifică de culoare. Pentru investigaţii mai complexe în laborator, probele de aer pot fi recoltate folosind dispozitive automatizate de tip aspirator special constituite în acest sens, ori clasic, prin aspirare în flacoane de sticlă prevăzute cu dop străbătut de un tub lung şi altul scurt, ambele prevăzute cu robinete la expremităţile lor pentru a putea face vid, ori în flacoane cu tubulatură în *„T”.* Aspirarea probelor de aer se poate face şi prin dislocuire de lichid între două vase comunicante unite între ele

printr-un tub de cauciuc prevăzut cu o clemă, unul dintre vase fiind umplut cu apă şi aşezat la un nivel superior celui de-al doilea, după care se deschide clema iar datorită diferenţelor de nivel, apa va curge din vasul superior în cel inferior, creându-se astfel vid în vasul superior, fapt ce va permite aspirarea aerului din exterior *(Cotrău şi Proca, 1988).*

3.2 Organisme model utilizate în ecotoxicologie

Un aspect deosebit de important în practica de testare a calității toxicologice ale diverselor substraturi este reprezentat de alegerea unor organisme model capabile să reflecte corect starea de poluare / contaminare a acestora. Astfel de organisme model se mai numesc și ***bioindicatori*** sau ***biomonitori.*** În funcție de mediul studiat, abordările pot include:

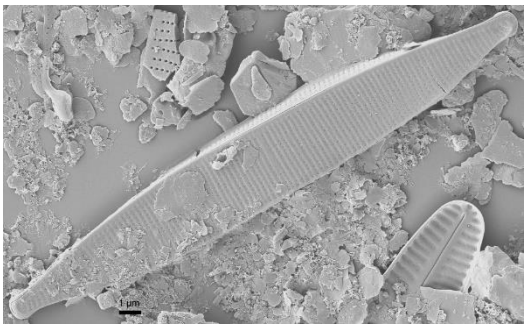
- ✓ Organisme model pentru studiul calității apei;
- ✓ Organisme model pentru studiul calității solului;
- ✓ Organisme model pentru studiul calității aerului;
- ✓ Organisme model pentru studiul calității alimentelor.

3.2.1 Organisme model pentru studiul calității apei

Algele sunt dintre cei mai eficienți bioindicatori ai calității apei, studiul diatomeelor, flagelatelor pigmentate, algelor verzi, precum și celor albastre-verzi, oferind cele mai multe informații în acest sens. Cele mai eficiente opt genuri sunt *Euglena, Oscillatoria, Chlamydomonas, Scenedesmus, Chlorella, Nitzschia, Navicula* și *Stigeoclonium*, iar cele mai eficiente cinci specii sunt *Euglena viridis, Nitzschia palea, Oscillatoria*

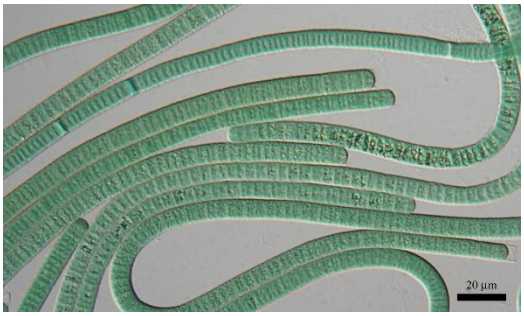
limosa, Scenedesmus quadricauda și *Oscillatoria tennis (Palmer, 1969) (figura 3).*

Euglena viridis[1)]



Nitzschia palea[2)]

Scenedesmus quadricauda[3)]



Oscillatoria limosa[4)]

Fig.3: Alge utilizate în determinarea calității apei

Surse:
[1)] https://www.flickr.com/photos/79173595@N07/7088327651
[2)] https://naturalhistory.museumwales.ac.uk/diatoms/browsespecies.php?-recid=2435
[3)] http://www.dr-ralf-wagner.de/Gruenalgen-englisch.html
[4)] http://ccala.butbn.cas.cz/en/oscillatoria-limosa-c-agardh-0

Nevertebratele acvatice oferă, de asemenea, informații prețioase în aprecierea calității apei, acestea fiind clasificate în trei categorii, astfel:

✓ Nevertebrate de apă curată: larve de efemeroptere, de plecoptere, de trichoptere;

✓ Nevertebrate moderat tolerante la polare: amfipode, larve de odonate;

✓ Nevertebrate acvatice tolerante la poluare: viermi oligocheți *(eronat numiți și tubifex),* larve de chironomide *(figura 4)*.

Ephemeroptera[1)]

Plecoptera[2)]

Amphipoda[3)]

Trichoptera[4)]

Odonata[5)]

Oligochaeta[6)]

Fig.4: Nevertebrate acvatice bioindicatoare utilizate în ecotoxicologie

Chironomidae[7)]

Fig.4 (continuare): Nevertebrate acvatice bioindicatoare utilizate în ecotoxicologie

Surse:
[1)] *https://www.flickr.com/photos/entomopixel/15591666129*
[2)] *Kriska, 2013*
[3)] *http://nathistoc.bio.uci.edu/crustacea/Amphipoda/Amphipod2.htm*
[4)] *http://lakes.chebucto.org/ZOOBENTH/BENTHOS/vii.html*
[5)] *https://6legs2many.wordpress.com/category/insects/odonata/anisoptera/libellulidae/*
[6)] *http://www.polarlife.ca/organisms/inverts/marine_inverts/oligochaetes.htm*
[7)] *https://genent.cals.ncsu.edu/insect-identification/order-diptera/family-chironomidae/*

Peștii. Eforturile depuse în domeniul geneticii moleculare au permis producerea unor linii fluorescente de pești zebră *(engl. „zebrafish”; lat. „Danio rerio”)*, care sunt cele mai ieftine şi dintre cele mai precise instrumente de identificare a unor poluanţi din apă. Aceşti peşti fluorescenţi de diferite culori, ce poartă numele generic de *„Glo-fish”,* au fost produşi iniţial în scop ecologic, mai precis acela al testării calităţii apei, fiecare culoare indicând prezenţa unui anumit poluant. Fluorescenţa este conferită de proteine fluorescente *(FP - engl. „fluorescent proteins”)* codificate de gene transferate de la unele specii de meduze și anemone marine. Sinteza respectivelor proteine se inițiază doar când poluantul atinge o anumită concentrație în mediul acvatic *(figura 5).*

BFP CFP Wild type RFP		GFP YFP RFP+YFP

Fig.5: Pești zebra transgenici fluorescenți, utilizați în detectarea unor poluanți *(RFP- red fluorescent protein, YFP – yellow fluorescent protein, GFP – green fluorescent protein, BFP – blue fluorescent protein, CFP – cyan fluorescent protein)*

Sursa:https://www.liveaquaria.com/product/3680/glofish-danio-assorted-10-pack?pcatid=3680&c=830+3590+3680

Peștii guppy *(lat. „Poecilia reticulata”),* cu numeroasele lor varietăți de formă și culoare sunt, de asemenea, unii dintre cei mai buni bioindicatori pentru detecția unor *distruptori endocrini (figura 6). Disruptorii endocrini* au aproape întotdeauna origine antropică și sunt reprezentați de insecticide, erbicide, fungicide, gaze de eșapament, alte gaze emise de industrii, combinații ale acestora sau metaboliții lor intermediari. *Disruptorii endocrini (ED – engl. „endocrine disruptors),* numiți și *xenoestrogeni,* intervin în dezvoltarea normală a peştilor, perturbând diferenţierea sexuală, coloritul normal, indicele gonopodial, indicele gonosomatic, numărul spermatoforilor, frecvenţa secvenţelor de curtare sau provoacă malformaţii somatice progeniturilor lor. La om,

disruptorii endocrini sunt în relație cu obezitatea, ginecomastia, cancerul de sân, demasculinizarea, perturbări ale procesului de creștere, dereglări hormonale *(prin cuplarea lor cu receptorii membranari).*

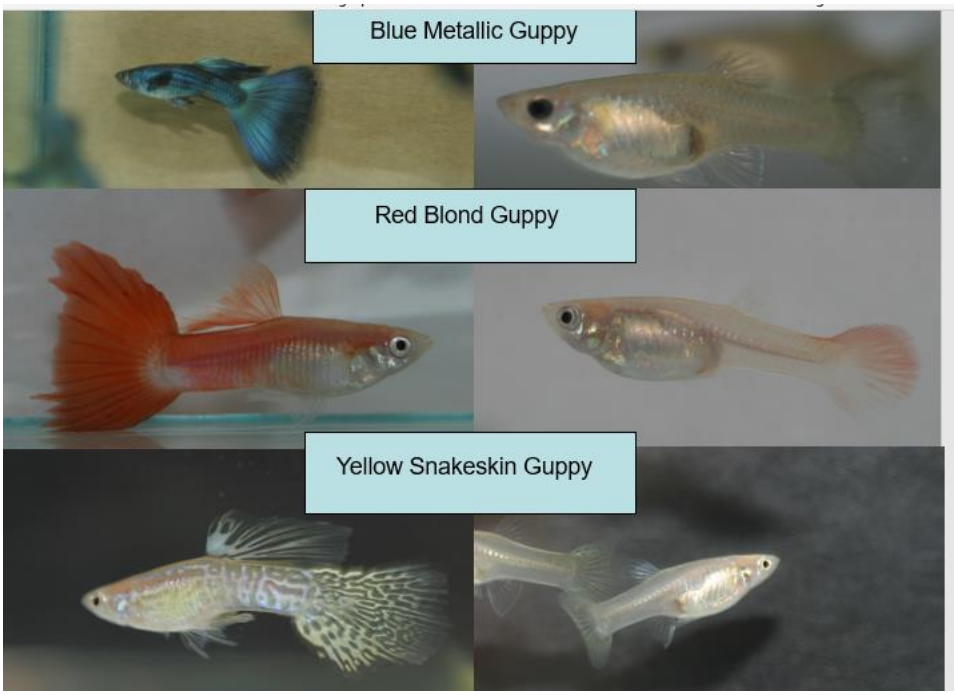


Fig.6: Varietăți coloristice întâlnite la peștii guppy *(original)*

Dimorfismul sexual al peștilor guppy este foarte pronunțat, femelele fiind aproape lipsite de culoare iar masculii mai mici, mai zvelți și viu colorați. Testosteronul este un reglator cheie al sintezei de pigmenți ai pielii precum *pteridina roșie*. În absența testosteronului peștele va crește ca o viitoare femelă. La fel se întâmplă și cu masculii care trăiesc în medii poluate cu xenoestrogeni: fie se feminizează complet, fie nu exprimă un colorit adecvat. Invers, o femelă tratată cu hormoni masculini în stadiile sale timpurii de dezvoltare, se va masculiniza, iar una adultă, va exprima coloritul specific sexului mascul *(figura 7).*

Fig.7: Ipostaza coloristică feminină și, respectiv, masculină, ale aceluiași individ, într-un experiment efectuat în cadrul laboratorului *Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj (original)*

La varietatea *Red Blond* de pești guppy, într-o populație uniformă *(linie pură selecționată)* suprafețele roșii de pe corpul peștelui pot fi asociate statistic cu efectul *disruptor endocrin,* după principiul: mai mult roșu, mai puțin poluant în apă *(mai puțin toxic, mai puțin puternic este disruptorul)* *(figura 8).*

Fig.8: Varietatea *Red Blond* de pești guppy cu un colorit favorabil unor studii legate de efectul unor disruptori xenoestrogeni *(original)*

Peștii guppy sunt considerați adevărate modele umane pentru apariția și evoluția diverselor afecțiuni *(HM – engl. „human models”),* un exemplu în acest sens fiind cel al tulburărilor de tipul scoliozei, cifozei sau lordozei congenitale. La apariția acestor malformații concură factori de mediu, multe toxice determinând malformații somatice precum cea expusă în *figura 9.*

Fig.9: Malformație somatică la peștii guppy *(Petrescu-Mag și col., 2011)*

Unele toxice *(numite teratogene)*, blochează fusul celular de diviziune în timpul dezvoltării pre-embrionare, fapt ce se traduce prin efecte teratogene precum cele expuse în *figurile 10-13.* Tipurile de gemeni concrescuți *(numiți și siamezi)* sunt similare celor întâlnite la om, deoarece au la bază aceleași cauze, putând fi studiate astfel la pești pentru mai buna lor înțelegere.

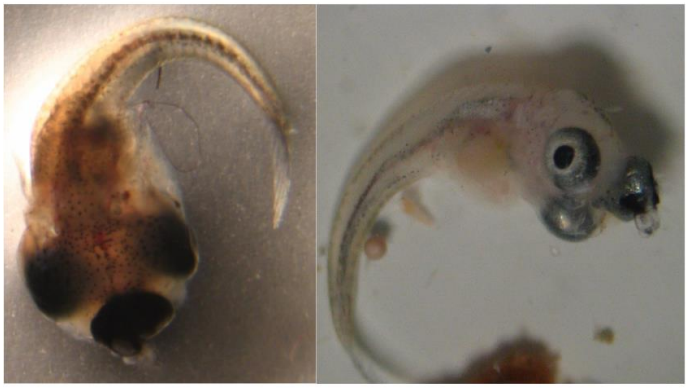


Fig.10: Efecte teratogene la guppy analoage cu *Parapagus diprosopic (un corp, un cap, două fețe) (Petrescu-Mag și col., 2011)*

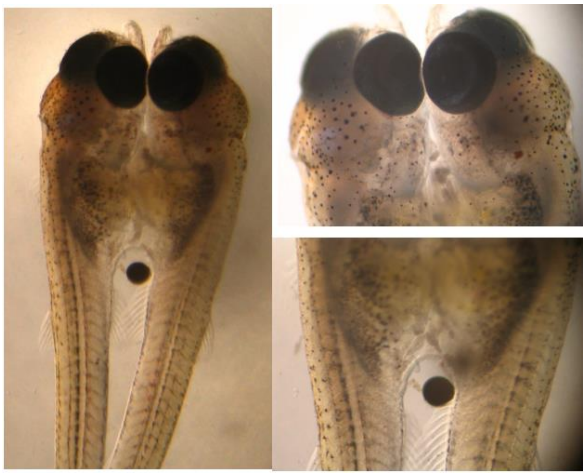


Fig.11: Efecte teratogene la guppy analoage cu *xiphopagus (gemeni uniți la nivelul xifoidului sau sternului) (Petrescu-Mag și col., 2011)*

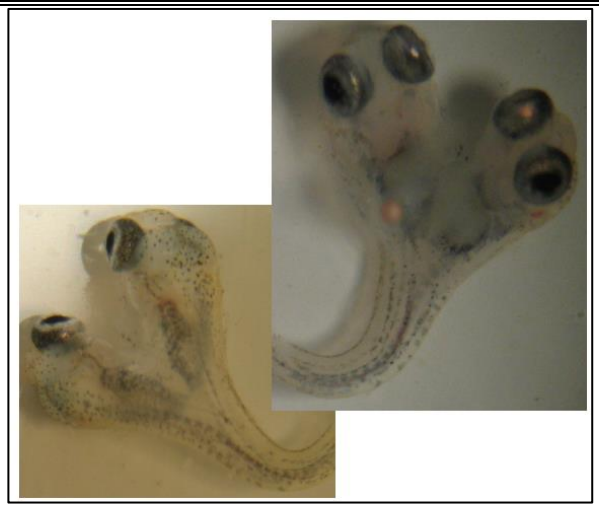


Fig.12: Efecte teratogene la guppy analoage cu *ischiopagus (analog gemenilor uniți la nivelul pelvisului) (Petrescu-Mag și col., 2011)*

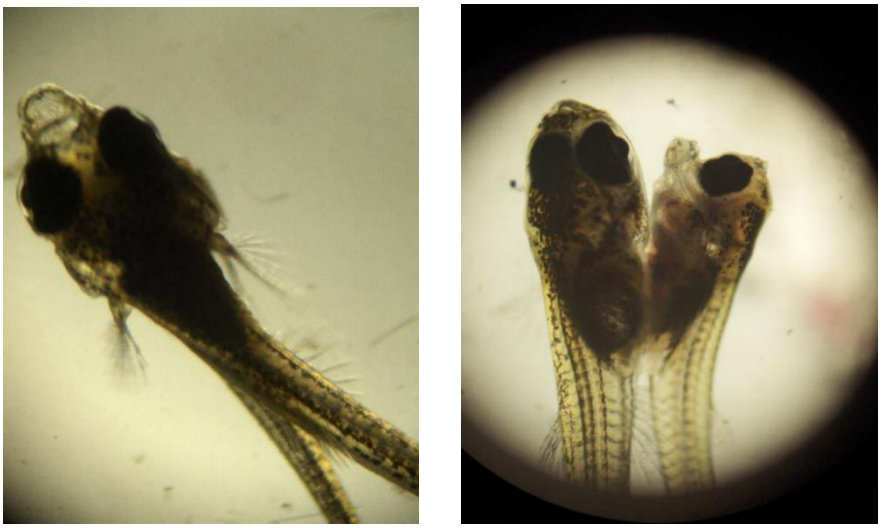


Fig.13: *Xiphopagus* născuți vii și inițial relativ egali ca mărime, cu involuția în timp a geamănului pasiv analog fenomenului *„geamăn parazit” (Petrescu-Mag și col., 2011)*

Amfibienii sunt excelenți bioindicatori ai poluării apei, mai ales stadiile lor larvare. Deși se fac studii de ecotoxicologie pe multe specii de

amfibieni, genul *Xenopus* este frecvent folosit pentru testarea toxicității unor pesticide. Compusul *Triphenyltin (TPT),* de exemplu, poate induce malformații unice la embrionii *Xenopus tropicalis (figura 14)*. Teratogenitatea indusă de acesta este extrem de specifică fazelor de dezvoltare, cele mai frecvente fenotipuri datorate acestui toxic fiind defecte ale înotătoarelor și proctodeum mărit, cu afectarea, mai degrabă, a procesului de formare a înotătoarelor decât cel de dezvoltare a lor *(Yuan și col., 2011).*

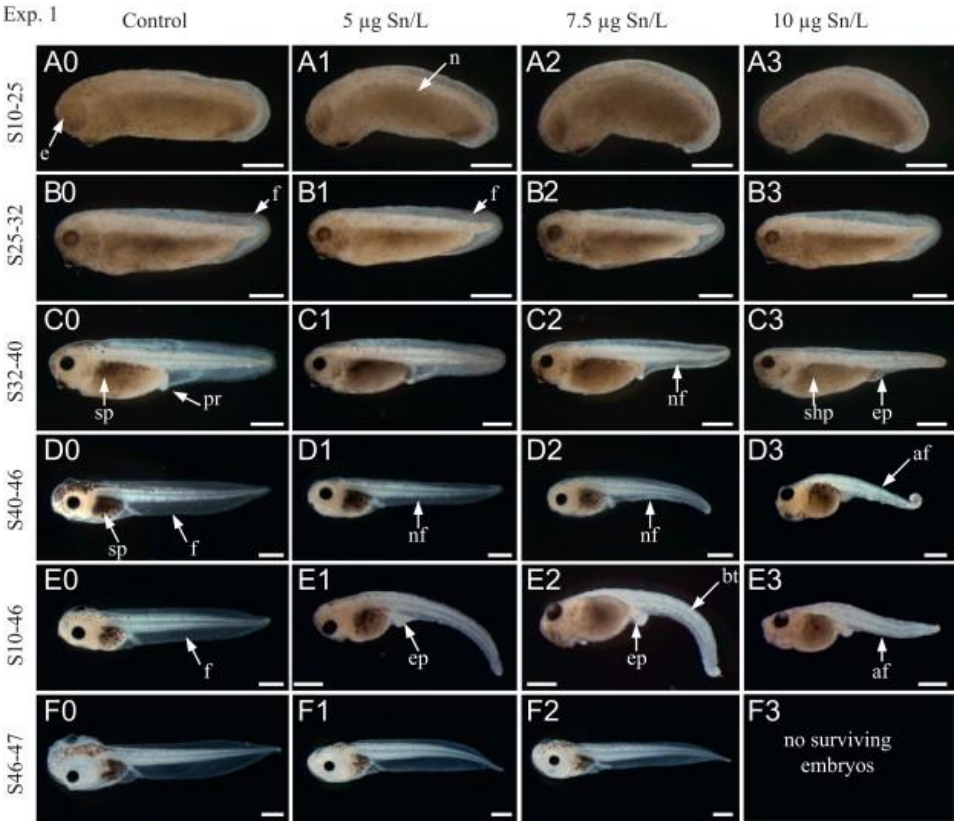


Fig.14: Malformații specifice fiecărui stadiu de dezvoltare produse de toxicul triphenyltin la *Xenopus tropicalis (Yuan și col., 2011)*

3.2.2 Organisme model pentru studiul calității solului

Fauna solului este foarte bogată, fiind extrem de dificilă delimitarea unor organisme model pentru studiile de ecotoxicologie ale acestui substrat. Totuși, *râmele* sunt printre cele mai bune bioindicatoare ale poluării cu metale grele, acestea fiind capabile să acumuleze *mercur* în concentrații de 22 ori mai mari decât cele regăsite în solurile în care trăiesc *(Oprea, 2007).*

3.2.3 Organisme model pentru studiul calității aerului

Prin excelență, lichenii sunt organismele ideale pentru studii de poluare ale aerului *(Todoran și col., 2010),* argumente în acest sens fiind următoarele:

- ✓ au corpul lipsit de cuticulă și de rădăcini, deci absorb particule prin tot corpul lor taloidic *(și nu doar cele din sol)*;
- ✓ au suprafața corpului neregulată, crescând în acest fel suprafața de contact cu aerul;
- ✓ sunt pereni și foarte rezistenți la condițiile vitrege ale mediului ambiant;
- ✓ unele specii de licheni trăiesc în zone urbane *(de exemplu: Xanthoria parietina* și *Physcia stellaris) (figura 15)*;
- ✓ pot fi ușor transplantați în scopul desfășurării cercetărilor;
- ✓ pot fi utilizați atât ca bioindicatori (mai ales *Xanthoria parietina* și *Physcia stellaris*) cât și pentru biomonitorizare -

studiul evoluției concentrației poluanților în *mediu (de exemplu: Pseudevernia furfuracea* și *Cladonia sp.)* (figura 16).

Fig.15: *Xanthoria parietina*[1)] și *Physcia stellaris*[2)]

Surse:
[1)] *http://freebigpictures.com/plants-pictures/xanthoria-parietina/*
[2)] *http://www.stridvall.se/lichens/gallery/Physcia/NIKA7110*

Fig.16: *Pseudevernia furfuracea*[1)] și *Cladonia* sp.[2)]

Surse:
[1)]*http://www.biowin.at/index.htm?/all/systematik/Eucarya/Opisthokonta/Fungi/Ascomycota/Lecanoromycetes/Lecanorales/Parmeliaceae/Pseudevernia%20furfuracea/Pseudevernia%20furfuracea.htm*
[2)] *http://www.britishlichens.co.uk/pictureindexcomplete.html*

Alte organisme folosite frecvent în aprecierea gradului de poluare al aerului sunt mușchii de pământ, prin diferitele specii cosmopolite.

3.2.4 Organisme model pentru studiul calității alimentelor

Calitatea toxicologică a alimentelor este studiată de o ramură a toxicologiei numită *toxicologie alimentară*, majoritatea cercetărilor efectuate fiind în interesul omului *(de unde și nevoia folosirii unor organisme model umane).* Acestea sunt, în general, asemănătoare omului din punct de vedere metabolic, ca regim alimentar, ori prin faptul că sunt mamifere *(șoareci și șobolani de laborator, porci de Guineea, iepuri, porci).* Din considerente practice, animalele de laborator folosite trebuie să fie mici *(pentru a reduce costurile cu întreținerea și pentru a se putea lucra cu un număr corespunzător de indivizi),* ușor de întreținut/reprodus și cât mai prolifice.

EXERCIȚII ȘI PROBLEME:

Problema 1: Recunoașteți din lista următoare de specii de pești utilizate în studiile de ecotoxicologie acea specie care poate semnala prin modificarea coloritului său prezența unor toxice disruptoare endocrine în apă:

- ✓ *Danio rerio*
- ✓ *Rutilus rutilus*
- ✓ *Gasterosteus aculeatus*
- ✓ *Oncorhynchus mykiss*
- ✓ *Parachromis dovii*
- ✓ *Galaxias maculatus*
- ✓ *Hippocampus heptagonus*
- ✓ *Pimephales promelas*
- ✓ *Prochilodus lineatus*
- ✓ *Oryzias latipes*
- ✓ *Poecilia reticulata*

Problema 2: Cele două specii de licheni frecvent întâlnite în mediul urban sunt *(alegeți două răspunsuri corecte)*:

- ✓ *Xanthoria parietina*
- ✓ *Pseudevernia furfuracea*
- ✓ *Cladonia rangiferina*
- ✓ *Evernia prunastri*
- ✓ *Physcia stellaris*

Problema 3: Probele de sol se recoltează și procesează ținând cont de următoarele (*evaluați cu Adevărat sau Fals)*:

- probele parțiale se prelevează randomizat, din mai multe puncte;
- probele parțiale se prelevează cât mai rapid, dintr-un singur punct;
- probele medii se amestecă pentru a constitui proba parțială;
- probele parţiale se amestecă pentru a constitui proba medie;
- din proba medie se extrage ulterior proba reprezentativă;
- din proba reprezentativă se extrage ulterior proba medie;
- doar proba medie este folosită pentru investigaţiile directe de laborator;
- doar proba reprezentativă este folosită pentru investigaţiile directe de laborator.

4. POLUAREA CU METALE GRELE

Categoria metalelor grele este deosebit de vastă, în condițiile în care, în mod clasic, cuprinde toate metalele cu densitatea mai mare de 5 g/cm^3 *(aproximativ 40 de elemente)* *(Rotaru şi Mihaiu, 2002).* Datorită constrângerilor de spațiu, în acest manual va fi discutată ecotoxicologia celor mai importante dintre acestea, şi anume: plumb *(Pb)*, cadmiu *(Cd)*, mercur *(Hg)*, cupru *(Cu)* și zinc *(Zn)*.

4.1 Surse de poluare, mecanisme de acţiune şi efecte

Plumbul este un metal greu cu densitatea de *11,3 g/cm^3*, larg răspândit în natură ca urmare a activităților de minerit și a celor din alte industrii. Sursele de poluare sunt încă importante, deși în ultimii ani au fost făcuți pași importanți către limitarea acestora prin:

- renunțarea la aditivarea benzinei cu amestec de *tetraetil/tetrametil de plumb*, definitiv pentru autovehiculele comerciale. Acest fapt este deosebit de important pentru sănătatea omului şi animalelor, deoarece *tetraetilul de plumb* este un toxic liposolubil care pătrunde

şi se fixează în structura ţesuturilor grase, precum sistemul nervos central *(Mitrănescu şi col., 1998);*

- limitarea folosirii *arseniatului de plumb* în viticultură și pomicultură;
- înlocuirea conductelor de *plumb* din sistemele de aprovizionare cu apă potabilă *(confecţionate dintr-un amestec de* $PbSO_4$ *şi* $PbCO_3$*) (Olinescu şi Greabu, 1990).* În condiţiile apei cu *pH* uşor acid, *plumbul* putea fi uşor dizolvat din conţinutul unor astfel de conducte, concentrația sa în apa transportată ajungând la valori de *25 mg/l (faţă de concentraţia medie stabilită pentru apele de aprovizionare de 0,01 mg/l) (Banu şi col., 1982).* Antrenarea *plumbului* în apă a fost stabilită ca fiind semnificativă mai ales atunci când conductele erau noi, ulterior fiind format un strat insolubil de *carbonat de plumb* pe suprafaţa interioară a acestora. Oricum, şi acesta putea fi corodat de apa cu *pH* acid sau de prezenţa bioxidului de carbon ori a oxigenului în cantităţi crescute *(Zamfir, 1979);*
- înlocuirea operațiunii de cositorire a cutiilor de conserve cu cea de sudură electrică *(aliajele folosite pentru cositorire conțin până la 70-80% plumb ce ar putea fi mobilizat în conținutul alimentelor prin coroziune în prezenţa sării de bucătărie sau a mediului acid) (Enescu, 1986; Rotaru şi Mihaiu, 2002);*
- introducerea unor sisteme moderne de întreținere a animalelor, cu folosirea țevilor zincate pentru diverse compartimentări în adăposturi. În acest fel, utilizarea vopselurilor pe bază de *plumb* a fost mult limitată *(de exemplu: miniul de plumb),* acestea fiind linse cu interes de către rumegătoare datorită gustului lor sărat;
- renunţarea la unele practici din trecut care făceau referire la folosirea sărurilor de *plumb* pentru a conferi un aspect plăcut diverselor produse alimentare. De exemplu, datorită culorii sale galbene, *cromatul de plumb* a fost folosit pentru colorarea untului, *oxidul roşu de plumb* pentru a falsifica boiaua de ardei, *carbonatul bazic de plumb* pentru albirea făinei *(Enescu, 1986; Berilă şi col., 2000).*

Activitățile de extracție minieră, precum și cele din industriile cauciului, linoleumului, a vopselurilor, de obținere a acumulatorilor auto,

a cernelurilor tipografice ori de combustie a cărbunilor, încă contribuie la îmbogățirea permanentă a mediului ambiant cu acest metal greu. Staniolul folosit la ambalarea alimentelor conţine *1% plumb* şi reprezintă o potenţială sursă de contaminare, mai ales în cazul produselor acide ce pot lua contact cu acesta: produse lactate acide, oţet, bere, vin, sucuri de fructe, bulion, marmelade, gemuri, murături *(Enescu, 1986; Tofan, 2001).* Vasele ceramice obţinute artizanal prin topirea amestecului de *dioxid de siliciu* şi *litargă (oxizi de plumb)* şi folosite pentru prepararea alimentelor, au reprezentat încă din antichitate o sursă de contaminare cu acest metal greu *(Popa şi Stănescu, 1981; Popa şi col., 1986; Olinescu şi Greabu, 1990; Rotaru şi Mihaiu, 2002).*

Plumbul este un metal care se regăsește în mod natural în sol în concentraţii de aproximativ *20 ppm*[3] *(Neaţă, 1994).* Diferitele activități industriale mobilizează acest toxic în aer, poluând în acest fel apa, solul și vegetația arealelor învecinate.

Plumbul contaminează, sub formă de particule, stratul superficial al apelor de unde, în timp, sedimentează. În oceane, concentraţia *plumbului* la adâncimi de *2000 – 4000 m* este de *3,5 ori* mai mică decât cea înregistrată la suprafaţă *(Savu şi Georgescu, 2004)*. Prezenţa azotatului şi a sărurilor sale de amoniu sau a dioxidului de carbon duce la creşterea concentraţiei de *plumb* în apele naturale *(Banu şi col., 1982)*.

Solurile necultivate au înregistrat concentraţii de *plumb* de aproximativ *15 ori* mai mici comparativ cu solurile cultivate, şi de aproximativ *500 ori* mai mici comparativ cu cele determinate la analiza probelor de sol provenite din zonele industriale. La suprafaţa solului, concentraţia de *plumb* este mai mare decât în straturile inferioare, nefiind antrenat decât în mică măsură din orizonturile superioare în profunzime

[3] 1 ppm = 1/1000000 = 0,0001%

(cca. 80% din conţinutul de plumb este concentrat pe adâncimea 0-20 cm sub forma compuşilor stabili cu materia organică). Prezenţa humusului în sol *(materia organică a solului)* şi *pH-ul* cuprins între *3* şi *5* favorizează o absorbţie sporită a *plumbului* cu formarea de compuşi organo-minerali stabili și blocarea, astfel, a disponibilităţii sale, cu reducerea concentraţiilor toxice din sol şi plante. Conţinutul ridicat de argilă *(34,3% vs. 18,7%)* în condiţile unui *pH* acid, favorizează, de asemenea, o reducere a solubilizării sale din sol *(disponibilităţii)* *(Neaţă, 1994)*.

Plantele tinere absorb *plumbul* din sol într-un ritm mai lent comparativ cu cele mature, acumularea acestui toxic fiind în cantităţi mai mari în frunze *(Zamfir, 1979; Banu şi col., 1982; Rotaru şi Mihaiu, 2002).* Acidifierea solului, în condiţiile lipsei materiei organice, sporeşte mobilizarea *plumbului*, cu efecte toxice însemnate asupra plantelor *(Neaţă, 1994)*. Prezenţa *plumbului* în sol reduce numărul microorganismelor specifice din conţinutul acestuia iar acumularea sa în frunze afectează procesul de fotosinteză *(Răuţă şi Cârstea, 1983)*.

Animalele și omul se pot contamina cu *plumb* în mod *direct (pe cale respiratorie, transcutanată)* sau *indirect*, prin intermediul apei, furajelor sau alimentelor *(Zamfir, 1979)*. *Plumbul* se elimină prin lapte pentru o perioadă mai mare de *120 zile* de la contaminare, fiind regăsit în concentraţii de *20-40 ori* mai mici decât cele determinate în furaje *(Rotaru şi col., 1997)*.

Dintre speciile animalelor domestice, intoxicaţia cu *plumb* este cel mai frecvent întâlnită la bovine, deoarece acest toxic rămâne mai mult timp în tubul digestiv, cu mărirea posibilităţii sale de absorbţie. O situaţie aparte o reprezintă animalele rănite prin împuşcare cu alice de *plumb* sau păsările care ciugulesc alice de *plumb*, moartea acestora survenind la *5-6 zile* după eveniment, întocmai datorită intoxicaţiei cu acest metal greu *(Răuţă şi Cârstea, 1983; Enescu, 1986)*.

La nivel digestiv, *plumbul* este absorbit între *3* și *10%* din cantitatea ingerată *(restul se elimină prin fecale)* iar respirator, *40-50%*. După

absorbţie, *plumbul* se leagă de proteinele serice sau se fixează pe suprafaţa eritrocitelor *(Enescu, 1986). Plumbul* se depune în cantităţi importante, sub formă de fosfaţi, în oase *(40-90%)*, ulterior, în ficat *(22%)* sau rinichi *(11%) (Rotaru şi col., 1997; Mitrănescu şi col., 1998; Savu şi Georgescu, 2004).* În intoxicaţiile acute, concentraţii mari de *plumb* se înregistrează în ficat, rinichi şi scoarţa cerebrală, cu mobilizare ulterioară din ţesuturile moi în oase *(Enescu, 1986).* În condiţii de stres, variaţii de temperatură, modificarea *pH*-ului sangvin sau diverse afecţiuni care scad rezistenţa organismului, *plumbul* poate fi mobilizat din depozitele osoase, trecând în circulaţie *(Zamfir, 1979; Mitrănescu şi col., 1998).*

Dacă la adulţi se absoarbe până la *10%* din cantitatea ingerată de *plumb*, la copii rata absorbției este mai mare *(25-50%) (Popa şi col., 1986; Berilă şi col., 2000).* Rata de absorbţie pare să fie influenţată de aport, astfel că la un aport mai mare *(3-6 mg plumb pe zi)*, absorbţia acestuia devine mai mare *(20-30% pentru indivizii adulţi) (Banu şi col., 1982)*. La indivizii de sex mascul, *plumbul* este reținut într-o proporție mai mare decât la cei de sex femel *(Rotaru şi col.,1997)*.

Pătruns în organism, *plumbul* este absorbit printr-un mecanism de competiție cu *calciul*, blocând astfel procesele dependente de acesta din urmă. *Plumbul* sporește toxicitatea *zincului*, crește fragilitatea membranelor eritrocitelor și intereferează sinteza hemoglobinei. Deloc de neglijat, *plumbul* are capacitatea de a se încorpora în structura acizilor nucleici *(Banu şi col., 1982; Mitrănescu şi col., 1998; Tofan, 2001)*.

Afectarea biosintezei hemoglobinei este însoţită de o creştere a excreţiei urinare de *acid delta-aminolevulinic* ca urmare a transformării suferite de *acidul aminolevulinic*, primul compus din calea sintezei porfirinei *(componenta colorată – hem).* Această creştere este semnificativă pentru *plumbemii* mai mari de *40 µg %*, fiind însoţită şi de alte efecte precum producerea de peroxizi din reacţia de peroxidare a lipidelor din membrane, oxidarea şi scăderea concentraţiei glutationului *(GSH)* în diferite organe, dar mai ales în ficat şi rinichi *(Olinescu şi*

Greabu, 1990). Afectarea metabolismului hemoglobinei duce la acumularea în hematii de granulaţii bazofile şi *corpusculi Heinz*. Anemia instalată este compensată de hematii tinere şi reticulocite iar la analiza pancreasului se constată o reducere a *celulelor Langerhans (Popa şi col., 1986)*.

În intoxicaţia acută cu *plumb* simptomatologia este, în principal, de tip nervos, asociată cu cea de tip digestiv. *Plumbul* este responsabil de encefalopatii grave, traduse prin tremurături, masticaţii în gol, dromomanie, ataxii, crize convulsive şi gastroenterite cu colici intense, constipaţie urmată de diaree cu fecale negricioase datorită *sulfurii de plumb* care se formează *(PbS) (Tofan, 2001; Solcan şi Beşchea Chiriac, 2005)*. În intoxicaţia cronică se asociază *anemia (ca urmare a blocării sintezei hemoglobinei şi afectării membranei eritrocitare),* un semn clinic caracteristic saturnismului *(intoxicaţiei cronice profesionale)* fiind *dunga lui Burton,* o linie de culoare albastru-gri localizată la marginea gingiilor *(PbS) (Olinescu şi Greabu, 1990)*. Gradul anemiei este în corelaţie cu leziunile nervoase periferice, traduse prin reducerea vitezei conducerii influxului nervos *(Banu şi col., 1982)*.

La om, intoxicaţia cronică se produce la o ingerare zilnică de *0,5 mg Pb*. O creştere a plumbemiei *(concentraţia plumbului în sânge)* cu 10 µl/dl a fost asociată cu o scădere de 5 puncte a coeficientului de inteligenţă al copiilor de şcoală *(Butnariu şi Goian, 2005)*.

Doza letală de *plumb* variază în funcţie de specie, tipul compusului chimic pe bază de *plumb*, vârstă, sex, starea fiziologică şi calea de intoxicare. De exemplu, efectul letal al *zaharatului de plumb* apare la doze cuprinse între *10-200 g* la rumegătoarele mari, *500-750 g* la cabaline, *20-25 g* la rumegătoarele mici, *10-25 g* la porci şi câini, *65 g* la găini *(Rotaru şi Mihaiu, 2002)*. Administrarea în mâncarea şobolanilor şi a câinilor a *plumbului* sub formă de bile metalice *(300 mg/kg aliment)* nu a generat primitorilor nici un efect toxic, pe când administrarea *acetatului de plumb* a determinat o intoxicaţie severă *(Popa şi col., 1986)*. Doza letală pentru

om este variabilă în funcţie de compusul chimic ce include *plumbul (0,6 g pentru acetatul de plumb, 20-50 g pentru carbonatul bazic de plumb),* alcoolul fiind considerat un factor care măreşte toxicitatea *plumbului (Enescu, 1986; Savu şi Georgescu, 2004).* La o doză de *0,15 g acetat de plumb* apar efecte toxice traduse prin vărsături, colici, melenă şi colaps *(Rotaru şi Mihaiu, 2002)*. Fumatul a 30 de ţigări/zi contribuie la o sporire a contaminării individului cu *0,024 mg Pb (Olinescu şi Greabu, 1990).* Copiii au un metabolism mai activ comparativ cu adulţii, motiv pentru care cantitatea de *plumb* preluată prin aerul inhalat poate fi de două – trei ori mai mare comparativ cu cea preluată de adulţi *(Banu şi col., 1982)*.

***

Cadmiul este un metal greu cu densitatea de *8,65 g/cm*^{3}, în natură fiind, de regulă, asociat cu *zincul* și *plumbul (Răuță şi Cârstea, 1983; Popa şi col., 1986).* Se folosește în industria articolelor de menaj, a pigmenților și în metalurgie. Este regăsit în ambalajele confecționate din material plastic și stabilizate cu *cadmiu,* în structura unor coloranți precum *galbenul de cadmiu (CdS)* și *roșul de cadmiu (CdS-CdSe)* folosiți în colorarea emailurilor, a maselor plastice și a sticlei, în compoziția substanțelor de protecție împotriva ruginii folosite pentru acoperirea vaselor confecționate din fier *(cadmiere).* Este folosit la fabricarea acumulatorilor *nichel-cadmiu,* iar în aliaj cu *cuprul,* la confecționarea electrozilor pentru sudură, a cablurilor telefonice etc. *(Banu şi col., 1982; Mitrănescu şi col., 1998; Rotaru şi Mihaiu, 2002)*. Este o componentă a îngrășamintelor de tip superfosfați și fosfați de zinc sau de potasiu *(Banu şi col., 1982; Popa şi col., 1986).*

Cadmiul pătrunde în organism pe cale aerogenă și digestivă. Fumurile *(industriale dar și cel de tutun)* reprezintă o sursă importantă de contaminare a viețuitoarelor terestre, în condițiile în care rata absorției pulmonare este superioară celei digestive. Pentru plante, toxicitatea *cadmiului* este mai mare decât cea a *zincului*. Cel mai rezistent la excesul de *cadmiu* din sol este orezul, urmat de tomate și varză. Mai puțin rezistente

sunt soia, salata și spanacul. Comparativ cu porumbul, fasolea este de *10-15 ori* mai sensibilă la excesul de cadmiu. La nivelul solului, *cadmiul* se pare că blochează procesele microbiologice *(Răuţă şi Cârstea, 1983)*.

Moluștele și crustacelele acumulează cantități sporite de *cadmiu* din apă, comparativ cu peștii *(Popa şi col., 1986)*.

În organismul uman și în cel animal, *cadmiul* are acțiune tioloprivă, de blocare a grupărilor tiol *(-SH)* din structura mai multor enzime, formând mercaptide *(metal tiolați)*. Dintre enzimele afectate pot fi enumerate alcool dehidrogenaza, glutamat dehidrogenaza, glutation reductaza, disulfid reductaza, dehidrogenaza acidului delta-aminolevulinic din eritrocite, fosfataza alcalină, ATP-aza *(Banu şi col., 1982; Răuţă şi Cârstea, 1983; Popa şi col., 1986)*. *Cadmiul* inhibă enzima colinesterază, fiind în felul acesta un hipervagotonic *(Rotaru şi col., 1997)*.

Absorbția intestinală a *cadmiului* este modestă, din cantitatea totală ingerată se absoarbe doar *16%* *(Banu şi col., 1982)*. Absorbția *cadmiului* este slab diminuată de *calciu* și *acidul fitic*. În schimb, *cadmiul* perturbă absorbția *calciului, fierului, zincului* și *cuprului* în organism. De altfel, *cadmiul* crește excreția *fierului*, de unde rezultă efectul său anemiant asupra organismului *(Popa şi col., 1986)*. La acest efect contribuie și blocarea grupărilor tiol din structura hematiilor *(Banu şi col., 1982)*. Paraclinic, efectul anemiant se traduce prin scăderea hemoglobinei, a hematocritului și a sideremiei *(Popa şi col., 1986)*. Intoxicația cu *cadmiu* produce o deficiență în calciu și vitamina D, fapt observat încă din anul 1968 în Japonia cu ocazia bolii *„Itai-Itai" („vai-vai" sau boala înmuierii picioarelor)*, tradusă prin procese de decalcifiere la nivelul oaselor dar și a dinților. Cauza acestei boli a fost reprezentată de intoxicația cronică cu *cadmiu (~600 µg/zi)* prin consumul de orez, pești și moluște contaminate cu acest metal greu, consecutiv poluării fluviului Jintsu. Clinic, osteoporoza precede alterarea renală, aceasta din urmă având loc la concentrații renale de *cadmiu* de aproximativ *200 µg/g* *(Popa şi col., 1986; Olinescu şi Greabu, 1990; Rotaru şi col., 1997)*. Prin înlocuirea *zincului*,

cadmiul afectează negativ spermatogeneza *(Olinescu şi Greabu, 1990)*. *Cadmiul* este un toxic cumulativ, cu efecte mutagene și carcinogene *(Rotaru şi Mihaiu, 2002)*. *Cadmiul* se concentrează, în principal, în ficat, rinichi și testicule *(Enescu, 1986; Olinescu şi Greabu, 1990)*.

***

Mercurul este un metal greu cu densitatea de *13,59 g/cm*^{3}, deosebit de toxic pentru toate vieţuitoarele acvatice şi terestre. Solul conţine în mod obişnuit *mercur* în concentraţii ce variază între *0,01* şi *1 ppm (Răuţă şi Cârstea, 1983)*. Principala sursă naturală de *mercur* este reprezentată de mineralul cinabru *(HgS)*, cu o pondere de *mercurului* de 86,2% *(Banu şi col., 1982)*.

Diferitele condiţii magmatice şi hidrotermice contribuie la aducerea *mercurului* metalic la suprafaţa scoarţei terestre. Acesta are o putere mare de vaporizare *(corelată cu temperatura mediului ambiant)*, emisiile vulcanice contribuind, în acest fel, la eliberarea sa în cantităţi crescute în litosferă, atmosferă şi hidrosferă *(Banu şi col., 1982; Berilă şi col., 2000; Savu şi Georgescu, 2004)*.

Emisiile de *mercur* rezultate din activităţi umane precum extracţia minieră, arderea combustibililor fosili ori industria cimentului, contribuie la îmbogăţirea permanentă a concentraţiei acestui toxic în toate componentele ecosistemului *(Rotaru şi col., 1997; Rotaru şi Mihaiu, 2002)*.

Mercurul este folosit în industria chimică *(pentru producerea clorului gazos şi a clorurilor, a sodei caustice)*, în industria hârtiei, a maselor plastice, a faianţei, de prelucrare a pieilor, în electrotehnică *(pentru producere de baterii, lămpi fluorescente, oscilatoare etc.)*, în industria farmaceutică *(pentru obţinerea unor produse de uz veterinar, de exemplu: clorura mercurică, clorura mercuroasă, cianura, oxicianura, biiodura, oxidul galben sau roşu de mercur)*, dar şi în agricultură, sub forma

diverşilor compuşi organici *(Râpeanu, 1975; Banu şi col., 1982; Olinescu şi Greabu, 1990)*.

Un factor important de risc îl reprezintă deversarea apelor reziduale ale diferitelor industrii în care *mercurul* este folosit, contribuind astfel la poluarea mărilor şi oceanelor.

Combinaţiile *organomercuriale* folosite în agricultură sunt preferate pentru proprietăţile lor fungicide, având o bună remanenţă în timp şi adezivitate la substrat. Cele mai cunoscute dintre acestea sunt: *clorura de etil-mercur, clorura de fenil-mercur, bromura de fenil-mercur, acetatul de fenil-mercur, fosfatul şi iodura de etil-mercur, hidroxidul de metil-mercur, crezolul hidroximercuric, metil-mercur-dicianamida, etil-mercur-toluen-sulfan-anilida (Râpeanu, 1975; Banu şi col., 1982; Popa şi col., 1986)*. Toţi aceşti compuşi au o toxicitate mai mare decât cea a mercurului metalic ori a sărurilor sale anorganice *(doza letală pentru om şi animale este de 10-15 mg/kg greutate corporală)*, motiv pentru care unele măsuri de precauţie sunt necesare în cazul muncitorilor care le manipulează sau în depozitarea lor în ferme spre a nu fi confundate şi administrate în hrana animalelor, ori accidental acestea să aibă acces la locul de depozitare şi să le folosească în scopul hrănirii lor. Seminţele tratate de pe arături pot reprezenta un factor de risc pentru păsările sălbatice; mai mult, apele de şiroire pot mobiliza acest toxic de pe terenurile respective, fiind astfel o sursă de contaminare pentru arealele învecinate *(Râpeanu, 1975)*. La nivelul solului, compuşii organici ai *mercurului* au un grad mic de disociere, fiind astfel mai puţin absorbiţi de argila din sol şi mai uşor absorbiţi de către plante. Ordinea de absorbţie este *metil-mercur > etil-mercur > fenil-mercur, sulfura de mercur* fiind cea mai puţin absorbită *(Răuţă şi Cârstea, 1983)*.

Indiferent de aria lor de folosire, deşeurile şi reziduurile de compuşi anorganici şi organici ai mercurului se depun în nămoluri sau sedimente unde, ca rezultat al diverselor tranformări biochimice, sunt aduşi în stare elementară. Prin participarea numeroaselor bacterii anaerobe *(metanoice)*,

mercurul elementar este convertit în compuşi organici solubili *(metil-mercur* → CH_3Hg^+*)* şi volatili *[dimetil-mercur → $(CH_3)_2Hg$]*, cei din urmă având astfel posibilitatea trecerii în atmosferă *(Râpeanu, 1975; Enescu, 1986; Popa şi col., 1986; Olinescu şi Greabu, 1990)*. Fenomenul metilării *mercurului* este important din prisma sporirii toxicităţii acestui element chimic, fiind cunoscut ca având loc şi în interiorul organismului, în intestin datorită florii microbiene, cu implicarea *vitaminei* B_{12}. Deşi metilarea *mercurului* a fost raportată şi în ficat, aceasta este mai puţin importantă deoarece la acest nivel se produce şi reacţia inversă, de demetilare neenzimatică catalizată de grupările *–SH* ale glutationului şi cisteinei *(Olinescu şi Greabu, 1990)*. De altfel, ca mecanism antitoxic este cunoscută şi capacitatea celulelor macrofage din splină de a converti *metil-mercurul* în *mercur anorganic (Savu şi Georgescu, 2004)*.

La nivelul biotopurilor acvatice, *metil-mercurul* este rapid asimilat de fitoplancton iar apoi se acumulează în zooplancton. Fenomenul cumularii este evident şi în verigile următoare ale lanţului trofic, cei mai afectaţi fiind peştii răpitori, precum păstrăvul sau ştiuca din apele curgătoare, ori tonul, peştele sabie sau rechinul din apele mărilor şi oceanelor. Tonul din Marea Mediterană a fost raportat cu concentraţii mai mari de *mercur* acumulate în organism, comparativ cu tonul din Oceanul Atlantic, aceasta fiind în legătură cu nivelul de poluare al acestor ape *(Popa şi col., 1986)*. Cu cât peştii sunt mai în vârstă, cu atât aceştia vor conţine mai mult *mercur (Rotaru şi col., 1997)*. Scăderea *pH*-ului mediului acvatic favorizează acumularea *metil-mercurului* în organismul peştilor *(Popa şi col., 1986; Rotaru şi Mihaiu, 2002; Savu şi Georgescu, 2004)*. Concentraţia *mercurului* în mări şi oceane scade de la suprafaţă către adâncime *(Banu şi col., 1982)*. Din cantitatea totală de *mercur* determinată în organismul peştilor, *82-94%* reprezintă, în medie, *metil-mercurul (Berilă şi col., 2000)*. Concentraţia *mercurului* în organismul peştilor şi moluştelor a fost determinată la valori de *1400-2800 ori* mai mari faţă de cea regăsită în apa în care aceştia trăiesc *(Banu şi col., 1982)*.

Organismele superioare terestre se pot contamina cu *mercur* pe calea aerului, a tegumentelor, prin intermediul apei sau a alimentelor. În cazul mamiferelor, este importantă calea placentară, prin circulaţia mamă-făt.

Mercurul elementar în stare de vapori este deosebit de periculos prin posibilitatea absorbţiei sale prin tractusul respirator. Compuşii metilici şi cei cu clor pot fi absorbiţi şi prin piele *(Banu şi col., 1982; Rotaru şi Mihaiu, 2002)*. Peste 90% din *metil-mercurul* din alimente se absoarbe la nivel gastroenteral, fiind distribuit ulterior prin circulaţia sangvină către ţesuturi şi organe. Spre deosebire de acesta, *mercurul anorganic* preluat digestiv este eliminat aproape în totalitate prin fecale. Compuşii *alkil* sunt absorbiţi în cantităţi mai mari decât cei *fenil*. Aproximativ 50% din *mercurul* transportat prin intermediul sângelui este legat de eritrocite, în ţesuturi trecând forma nelegată de eritrocite dar legată de proteinele sangvine *(albumine)* prin intermediul grupărilor lor *-SH (Banu şi col., 1982)*. În ficat şi în rinichi se acumulează aproximativ de *200 ori* mai mult *mercur* decât în alte organe şi ţesuturi *(Rotaru şi col., 1997; Savu şi Georgescu, 2004)*. Creierul reţine *10%* din cantitatea totală de *mercur (Popa şi col., 1986)*. Ingerarea a *3-7 µg Hg /kg*[4] greutate corporală a determinat la om efecte la nivelul sistemului nervos central traduse printr-o creştere cu aproximativ 5% a incidenţei paresteziilor *(Savu şi Georgescu, 2004)*, doza săptămânală tolerabilă temporar fiind stabilită la *0,3 mg Hg total* pentru individul adult, din care *metil-mercurul* să fie mai puţin de *0,2 mg (Berilă şi col., 2000)*.

În alimente, *mercurul* se regăseşte sub formă de albuminat, combinaţie pe care o părăseşte în cursul proceselor de digestie. Consumul alimentelor contaminate de către mamele gravide şi, implicit, expunerea

[4] 1 µg = 0,001 mg

prenatală a fetusului la acest toxic, determină inhibarea proceselor de creştere şi dezvoltare a creierului fetal, fiind afectate abilităţile cognitive şi motorii ale nou-născutului *(Rotaru şi Mihaiu, 2002)*. Concentraţile de *metil-mercur* au fost găsite ca fiind cu *20-30%* mai mari în hematiile nou-născuţilor comparativ cu cele determinate în hematiile mamelor lor *(Popa şi col., 1986)*.

Acţiunea toxică a *mercurului* este importantă şi se datorează precipitării albuminelor celulare, blocării numeroaselor sisteme enzimatice şi proteice prin legarea sa de grupările lor tiol *(-SH)*, afectării celulei nervoase *(datorită liposolubilităţii toxicului)* cu producere de convulsii, tremurături, pareze şi paralizii, alterării diviziunilor celulare şi a procesului de clivaj a cromozomilor cu o distribuire inegală a lor în viitoarele celule fiice rezultate, legării la structura acizilor nucleici cu producerea unor mutaţii la nivel molecular *(Râpeanu, 1975; Popa şi col., 1986; Olinescu şi Greabu, 1990; Berilă şi col., 2000; Tofan, 2001)*.

***

Cuprul este un metal greu cu densitatea de *9 g/cm*^{3}, regăsit în mod natural în sol în concentraţii cuprinse între *1* şi *20 ppm*. Mobilitatea sa la acest nivel este limitată de prezenţa în cantităţi sporite a materiei organice şi argilei *(Răuţă şi Cârstea, 1983)*. Industria extractivă a *cuprului*, precum şi alte ramuri industriale care se ocupă cu prelucrarea minereurilor rezultate, contribuie în mod permanent la îmbogăţirea aerului, apei şi solului cu acest metal greu. În apele intens poluate, cantităţi mari de *cupru* au fost determinate în crustacee şi moluşte (stridii), care concentrează în mod particular acest xenobiotic *(Rotaru şi Mihaiu, 2002)*.

Cuprul este considerat un bioelement cu rol esenţial în biochimia oxigenului, hematopoezei, metabolismul ţesutului conjunctiv şi sinteza fosfolipidelor la animale şi om *(Popa şi col., 1986; Savu şi Georgescu, 2004)*. La miei, purcei, mânji şi pui de găină, carenţa în *cupru* este însoţită de deformări osoase cu osteoporoză. Necesarul de *cupru* în nutreţul combinat a fost stabilit la *2-6 ppm (păsări), 20-100 ppm (porci), 10 mg/zi*

(ovine), 100 mg/zi (taurine), iar o eventuală carenţă se poate datora fie unor deficienţe de conţinut ale raţiilor furajere, fie prezenţei unor antagonişti precum *zincul, molibdenul* şi *sulfaţii (Melpomeni, 1985)*.

Prin intermediul alimentelor, omul beneficiază de un aport zilnic de *cupru* cuprins între *1* şi *3 g (Râpeanu, 1975; Popa şi col., 1986; Berilă şi col., 2000; Savu şi Georgescu, 2004)*. Intoxicaţiile cu *cupru* sunt rare, însă pot fi luate în considerare în condiţiile chimizării agriculturii şi a diversificării ramurilor în care acest metal greu este tot mai des folosit.

Cuprul este un foarte bun conducător de electricitate şi căldură, fiind folosit în confecţionarea conductorilor electrici, a ţevilor pentru transportul apei, la fabricarea de cazane, alambicuri pentru distilerii, refrigerente, ustensile de bucătărie *(Banu şi col., 1982; Tofan, 2001)*.

În pomicultură, legumicultură sau viticultură, o serie de substanţe pe bază de *cupru* au înregistrat efecte remarcabile datorită proprietăţilor lor fungicide, mai cunoscute fiind: *zeama bordeleză (3-5% sulfat de cupru), acetoarseniatul de cupru* sau *Verdele de Paris, acetatul de cupru* sau *Cristalele lui Venus, acetatul bazic de cupru* sau *Verdele de Montpellier, oxiclorura, clorura, oxidul, carbonatul bazic de cupru (Rotaru şi col., 1997; Berilă şi col., 2000; Tofan, 2001; Rotaru şi Mihaiu, 2002; Savu şi Georgescu, 2004)*. Folosirea acestor compuşi implică precauţie deoarece concentraţiile ridicate de *cupru* în plante încetinesc procesul de formare a clorofilei şi influenţează negativ activitatea unor fermenţi. De asemenea, transmiterea acestora sub formă de reziduuri afectează omul *în mod direct*, prin consumul vegetalelor contaminate, ori *indirect*, prin consumul produselor de origine animală provenite de la animale hrănite cu cereale contaminate ori pe păşuni tratate (de exemplu, cu *sulfat de cupru* pentru efectul său moluscocid). O cale importantă de contaminare a omului o reprezintă calea respiratorie, prin inhalarea aerosolilor sau a pulberilor în timpul tratamentelor cu preparate pe bază de *cupru* efectuate în viticultură şi pomicultură *(Râpeanu, 1975; Răuţă şi Cârstea, 1983)*.

Conţinutul în *cupru* al mustului din struguri nespălaţi poate ajunge până la *20-40 ppm*. Acest lucru este în relaţie cu tratamentele fitosanitare cu compuşi pe bază de *cupru* ce au fost efectuate înaintea recoltării strugurilor. Oricum, în vin concentraţia ajunge la aproximativ *1 ppm (fără*

a depăşi 5 ppm), deoarece metalul este precipitat sub formă de *tartrat* şi *sulfat de cupru* care sedimentează în cursul procesului de limpezire a vinului *(Popa şi col., 1986; Tofan, 2001)*.

Cuprul este un metal care se oxidează uşor, acest lucru fiind evident în cazul vaselor confecţionate din acesta şi care, din cauza umidităţii aerului se acoperă cu un strat gri-verzui de *carbonat bazic de cupru (hidrocarbonat de cupru),* solubil în acizi *(Râpeanu, 1975; Banu şi col., 1982)*.

În cazul alimentelor sau băuturilor caracterizate prin aciditate mare, şi în condiţiile contactului prelungit dintre acestea şi vasele confecţionate din *cupru*, are loc o solubilizare a acestui metal şi o trecere a sa în conţinut. Efectele acestui proces de coroziune sunt, de obicei, resimţite iniţial la nivel organoleptic *(produsele se colorează într-o nuanţă verzuie şi capătă un gust dezagreabil de coclit),* fiind astfel respinse rapid de către consumator. Oricum, consumul acestora nu este indicat deoarece, sub influenţa unor acizi alimentari precum cel acetic, tartric, citric, malic, şi chiar a grăsimilor, *cuprul* metalic este atacat cu formarea unor combinaţii *(numite generic „emetic de cupru”),* caracterizate printr-o oarecare toxicitate *(Rotaru şi Mihaiu, 2002)*. La o concentraţie în produs alimentar de *1 mg/kg sulfat de cupru*, este favorizată oxidarea acizilor graşi nesaturaţi cu apariţia gustului de rânced ori a celui de peşte sau seu, în cazul untului. Prezenţa *cuprului* face, de altfel, ca vitamina C din produs să se oxideze până la acid dicetogulonic şi acid oxalic, substanţe lipsite de orice acţiune vitaminică *(Popa şi col., 1986)*.

Indiferent de calea de pătrundere în organismul omului şi animalelor, *cuprul* difuzează sub formă legată de albumina serică, acumulându-se cu predilecţie în ficat, dar şi în rinichi şi glandele suprarenale *(Rotaru şi col., 1997; Berilă şi col., 2000; Savu şi Georgescu, 2004)*. Manifestările clinice depind de cantitatea preluată de *cupru* şi variază de la vomismente *(ca urmare a iritării nervului vag),* colici, scaune frecvente, şi până la methemogloinemie şi hemoliză, stare icterică. Excesul de *cupru* a fost însoţit de efecte teratogene *(malformaţii congenitale)* la animalele de laborator *(Popa şi col., 1986; Rotaru şi col., 1997).* Ca şi în cazul altor metale grele, excesul de *cuprul* determină efect dismetabolic –

tiolopriv, prin blocarea grupărilor tiolice ale unor enzime *(Râpeanu, 1975; Berilă şi col., 2000)*.

***

Zincul este un metal greu cu densitatea de *7,14 g/cm*^{3}, regăsit în mod natural în sol şi organismele vii. Concentraţia *zincului* din sol variază între *30* şi *50 ppm (cu limite largi între 10 şi 300 ppm),* excesul fiind asociat cu încetinirea activităţii microorganismelor din sol şi dereglarea proceselor de transformare a materiei organice la acest nivel. Solurile nisipoase favorizează mobilizarea zincului în sol şi translocarea sa din plante *(Răută şi Cârstea, 1983)*.

Diferitele industrii în care *zincul* este folosit ca materie primă *(metalurgică, a coloranţilor, pesticidelor etc.)* contribuie permanent la îmbogăţirea conţinutului în acest metal greu ale diverselor verigi ale ecosistemului. Fumul industrial conţine compuşi de *zinc* ori particule fine de *zinc* ce pot contamina aerul, apa, solul şi vegetalele. Apele reziduale ale uzinelor unde se prelucrează minereurile de *zinc*, deversate fără un management de gestionare și purificare a deşeurilor contribuie, de asemenea, la contaminarea mediului ambiant *(Râpeanu, 1975)*.

Omul şi animalele preiau un conţinut normal de *zinc* prin alimentaţie *(la om variază între 10 și 20 mg/zi),* dar care poate fi îmbogăţit ca urmare a poluării atmosferice *(particule toxice ce sedimentează pe vegetale),* prelucrării ori depozitării alimentelor şi furajelor folosind ustensile, utilaje, rezervoare sau recipiente confecţionate din tablă zincată sau galvanizată. Oricum, înlocuirea treptată a acestora cu cele confecţionate din oţel inoxidabil a redus semnificativ riscul de contaminare prin acţiunea corozivă a substanţelor acide, alcaline sau a clorurii de sodiu din alimente şi furaje. În trecut, au fost raportate cazuri de contaminare cu *zinc* a produselor lactate acide, brânzeturilor în saramură, băuturilor carbogazoase *(zincul este sensibil la acţiunea corozivă a acidului carbonic),* oţetului, vinului sau berii păstrate în recipiente *zincate* ori în cazul merelor sau laptelui fiert în astfel de vase *(lactatul de zinc ce se formează prin mobilizarea zincului împiedică procesul coagulării*

laptelui). Evident, conţinutul în *zinc* al alimentelor contaminate este direct proporţional cu durata păstrării lor în recipientele zincate. Alte surse de contaminare cu *zinc* sunt reprezentate de unele pesticide ce conţin acest xenobiotic *(insecticide, fungicide, rodenticide – fosfura de zinc),* biostimulatorii de creştere folosiţi în zootehnie *(oxidul de zinc),* precum şi diverse antiseptice cu zinc *(peroxidul de zinc, clorura de zinc)* folosite în diverse ramuri ale medicinii sau industriei alimentare *(Râpeanu, 1975; Popa şi Stănescu, 1981; Banu şi col., 1982; Enescu, 1986; Popa şi col., 1986; Tofan, 2001; Savu şi Georgescu, 2004).*

Alături de cupru, *zincul* este un microelement esenţial pentru buna funcţionare a organismelor vii. Organismul unui om adult conţine între *1,5* şi *3 g zinc, 60%* fiind distribuit în masa musculară, *20%* în oase şi *20%* în restul organismului *(Popa şi col., 1986)*. În celule, cea mai mare cantitate de *zinc* se regăseşte la nivelul nucleului, ulterior la nivelul mitocondiilor şi ribozomilor *(Mitrănescu şi col., 1998)*. *Zincul* este cofactor a peste 30 enzime *(dintre cele mai importante, ADN şi ARN polimerazele),* participând la funcţii importante în interiorul organismului precum metabolismul acizilor nucleici, sinteza proteinelor, lipidelor, glucidelor, vitaminei A ori la procesul gametogenezei sau la funcţia endocrină a pancreasului *(Popa şi col., 1986; Rotaru şi Mihaiu, 2002)*.

Expunerea la o concentraţie de *1 mg Zn/kg* greutate corporală a omului adult determină *febra de zinc*, considerată o manifestare benignă a intoxicaţiei cu acest element. Ingestia a *100-150 mg săruri de zinc* la om determină vărsături, colici, diaree, leziuni renale şi tulburări nervoase Dozele mortale ale diferitelor săruri de zinc sunt apreciate la *5-10 g sulfat de zinc, 3-12 g clorură de zinc, ~ 10 g oxid de zinc.* Preluarea *zincului* din diverse surse în cantităţi mici dar pentru un timp îndelungat, determină anemie, slăbire progresivă, dureri articulare. *Zincul* este considerat, de asemenea, un factor cu potenţial cancerigen şi teratogen *(Râpeanu, 1975; Banu şi col., 1982; Enescu, 1986; Popa şi col., 1986; Berilă şi col., 2000; Tofan, 2001; Rotaru şi Mihaiu, 2002)*. *Zincul* intensifică efectele toxice ale *plumbului* şi le reduce pe cele ale excesului de *cadmiu* şi *cupru (Mitrănescu, 1998)*.

4.2 Metode de identificare ale reziduurilor de metale grele în diverse substraturi

Literatura de specialitate cuprinde o gamă largă de metode ce pot fi aplicate pentru determinarea metalelor grele din diverse substraturi. Acestea sunt calitative, *de identificare a prezenței lor,* și cantitative, *de cuantificare sau stabilire a cantității reziduurilor acestora.* În oricare dintre variante se va ține cont de proprietatea metalelor grele de a forma în diverse substraturi *(sol, plante, alimente etc.)* complexe cu substanțele organice, din care vor trebui scoase prin intermediul *etapei de mineralizare*. Ca rezultat, elementele de interes vor fi aduse în stare de soluție, ce va fi ulterior folosită pentru determinări calitative *(reacții de culoare)* sau cantitative *[spectro(foto)metria]*. *Mineralizarea* poate fi realizată *pe cale umedă* sau *uscată*. *Mineralizarea umedă* presupune scoaterea metalelor grele din combinațiile lor organice cu ajutorul amestecurilor ce includ acizi. În *mineralizarea uscată – calcinarea,* matricea organică este inițial degradată la temperaturi ridicate iar apoi reziduul mineral obţinut este solubilizat cu acizi.

Pentru identificarea reziduurilor metalelor grele discutate în această lucrare, proba de analizat *(alta decât proba de aer)* este supusă inițial unui proces de mineralizare în prezența acidului azotic *(HNO_3)* sau a altui *sistem oxidant (HNO_3-H_2O_2, HNO_3-HCl-H_2SO_4, HNO_3-$HClO_4$, HNO_3-$HClO_4$-H_2SO_4)* *(Proca şi col., 1996; Cordoş şi col., 1998; Roman şi col., 1998; Butnariu, 2000)*. *Mineralizarea sulfonitrică* sau *tehnica Dénigès* este frecvent aleasă în laboratoarele de specialitate ca metodă de mineralizare în vederea determinării reziduurilor de metale grele, aceasta bazându-se pe acţiunea deshidratantă şi oxidantă a amestecului de acid sulfuric şi acid azotic, ambii în soluţii concentrate. Modul de lucru a fost descris de către

Cotrău şi Proca, 1988 şi implică următoarele: se ia un balon Kjeldahl, deasupra căruia se aşează o pâlnie simplă prin care se introduce acid azotic aflat într-o pâlnie de siguranţă. În continuare, în balon se introduce proba de analizat reprezentată de 50-100 g material solid fin mărunţit sau 10-20 g material deshidratat, iar dacă proba este lichidă, aceasta se concentrează în prealabil prin evaporare. În balon se adaugă 8-16 ml acid sulfuric concentrat şi câteva perle de sticlă pentru reglarea fierberii, ulterior conţinutul său fiind supus încălzirii pe sită la flacără mică sau pe o baie de nisip sub nişă. După carbonizare, se adaugă picătură cu picătură acid azotic concentrat prin pâlnia de picurare, continuându-se încălzirea. Aceasta etapă continuă până când conţinutul balonului devine clar şi îşi menţine culoarea galben-deschis timp de 10-15 minute de la încetarea adaosului de acid azotic. Pentru a verifica absenţa substanţelor organice din conţinutul probei ce tocmai a fost mineralizată, una-două picături din soluţia din balon se trece pe o sticlă de ceas, se diluează cu 1-2 ml apă distilată şi se adaugă 1-2 picături de permanganat de potasiu 2%. În lipsa substanţelor organice, lichidul de pe sticla de ceas va rămâne roz. Conţinutul balonului este în continuare diluat cu 50 ml apă, în felul acesta vaporii nitroşi aflaţi sub formă de acid nitrozilsulfuric fiind hidrolizaţi la acid sulfuric şi acid azotos. Acidul azotos se distruge prin adaos de uree, sulfamat de amoniu, azidă de sodiu ori prin încălzire timp de 10-15 minute.

Filtratul de probă mineralizată este în continuare tratat diferit, în funcţie de metalul greu ce se doreşte a fi identificat *(Popescu, 1997; Drugă, 2002):*

✓ **Pentru identificarea *plumbului*, soluţia de probă mineralizată poate fi tratată cu:**

- ***Bicromat de potasiu soluție 5%.*** Reacția este pozitivă în apariția unui precipitat galben de *cromat de plumb*, solubil în acid azotic sau în hidroxid de potasiu *(criterii de diferențiere față de precipitatele de bicromat de taliu și, respectiv, de cromat de bariu).* Sensibilitatea metodei este de *10 µg/ml.*

- ***Iodură de potasiu soluție 5%.*** Reacția este pozitivă în apariția unui precipitat galben de *iodură de plumb*, solubil în exces de reactiv. La încălzire, precipitatul se dizolvă iar după răcire cristalizează sub formă de paiete galben-aurii. Sensibilitatea metodei este de *0,3 µg/ml.*
- ***Rodizonat de sodiu soluție 1%.*** Reacția este pozitivă în apariția unei colorații brun-violete. Sensibilitatea metodei este bună *(0,1 µg/ml),* reacțiile fals pozitive fiind date de prezența ionilor de bariu și stronțiu.

✓ **Pentru identificarea *cadmiului*, soluția rezultată în urma etapei de mineralizare poate fi ulterior supusă următoarelor reacţii calitative:**

- ***Reacția cu difenilcarbazidă (3% în etanol).*** O hârtie de filtru impregnată în difenilcarbazidă *(3% în etanol)* este tratată cu una – două picături din soluția de analizat și expusă la vapori de amoniac. În prezența reziduurilor de *cadmiu* în soluția de probă, se formează o pată de culoare violetă.
- ***Reacția cu iodură de potasiu 10% (un volum) și sulfat de brucină (sau chinină) 2% (un volum).*** La soluția de analizat se adaugă câteva picături din reactivul anterior menționat. În prezența *cadmiului,* se formează un precipitat gălbui de *iodocadmiat de brucină (sau chinină).*
- ***Reacția cu 8-hidroxichinolină (oxină) 1,5% în acid acetic.*** La soluția de analizat se adaugă câteva picături din reactivul anterior menționat. În prezența *cadmiului* se formează un precipitat galben-portocaliu de *oxinat de cadmiu.*

✓ **Pentru identificarea *mercurului*, filtratul de probă mineralizată poate fi ulterior tratat cu:**

- ***Soluţie de iodură de potasiu (KI) 1%.*** Apariţia unui precipiat roşu-portocaliu de *iodură de mercur* (HgI_2) solubil în exces de reactiv cu formarea complexului incolor de $(HgI_4)^{2-}$, arată prezenţa *mercurului* în proba de investigat.
- ***Soluţie de clorură stanoasă ($SnCl_2$) 2%.*** Formarea iniţială a unui precipitat alb *(prin reducerea sărurilor de Hg^{2+} la Hg^{+})* şi mai apoi a unui precipitat negru *(prin reducerea în continuare la Hg metalic)*, arată prezenţa *mercurului* în proba de investigat.
- ***Reactiv Cheramy (1 g iodură de potasiu, 0,25 g clorhidrat de chinină la 100 ml de apă).*** Apariţia unei opalescenţe sau a unui precipitat alb-gălbui de *iodomercurat de chinină* indică o reacţie pozitivă pentru prezenţa *mercurului* în proba de analizat. Sensibilitatea reacţiei este de *1 µg/ml.*
- ***Reactiv Caseneuve (soluţie saturată de difenilcarbazidă în benzen, etanol sau eter).*** Apariţia unei coloraţii albastru-violet în mediul de reacţie indică prezenţa *mercurului* în proba de analizat. Sensibilitatea reacţiei este de *0,5 µg/ml.*

✓ **Pentru identificarea *cuprului* din diferite substraturi, soluţia de probă mineralizată poate fi tratată cu:**

- ***Ferocianură de potasiu soluţie 5%.*** Apariţia unui precipitat roşu-brun de *fericianură cuprică* solubil în hidroxid de amoniu *(în care soluţia devine albastră)* indică prezenţa *cuprului* în mediul de analizat. Sensibilitatea reacţiei este de *10 µg/ml.*
- ***Piridină şi sulfocianură de potasiu 20%.*** Apariţia unui complex albastru de $(CuPy_2)^{2+}$care după adaos de *sulfocianură de potasiu* virează în verde, indică prezenţa *cuprului* în mediul de analizat. Sensibilitatea reacţiei este de *10 µg/ml.*
- ***Ditizonă 0,05% în cloroform.*** Apariţia unui complex violet de *ditizonat de cupru* indică prezenţa cuprului în mediul de analizat.

✓ **Pentru identificarea *zincului* din diverse substraturi, soluţia de analizat poate fi tratată cu următorii reactivi:**

- ***Soluţie ferocianură de potasiu 10%.*** Apariţia unui precipiat alb de *ferocianură de zinc* solubil în alcali, arată prezenţa *zincului* în proba de analizat.
- ***Reactiv Montequi A şi reactiv Montequi B.*** Reactivul ***Montequi A*** se prepară din *5 g sulfat de cupru* dizolvat în 100 ml apă, după care se adaugă *0,2 ml acid sulfuric concentrat*. Reactivul ***Montequi B*** se prepară din *8 g clorură mercurică* şi *9 g sulfocianură de amoniu* în 100 ml apă distilată. Pentru desfăşurarea reacţiei de identificare a *zincului,* o picătură de reactiv ***Montequi A*** se aduce în soluţia de analizat şi ulterior se adaugă 2 ml reactiv ***Montequi B.*** Apariţia unui precipiat violet de *tetrasulfocianatomercuriat de cupru şi zinc* arată prezenţa *zincului* în proba de analizat.
- ***Acid rubeanic (soluţie 1% în alcool).*** Apariţia, în prezenţa acetatului de sodiu, a unui precipitat galben-deschis de *rubeniat de zinc,* arată prezenţa *zincului* în proba de analizat.
- ***8-hidroxiquinolină (soluţie 1,5% în acid acetic).*** Apariţia unui precipitat galben-verzui de *oxinat de zinc,* arată o reacţie pozitivă pentru prezenţa *zincului* în proba de analizat.

Determinarea rapidă a unor metale grele din aer *(Pb, Hg)* a fost descrisă ca metodologie de lucru de către *Popescu, 1997* şi face referire la următoarele variante:

- **pentru identificarea *plumbului*** se ia în considerare expunerea în atmosfera poluată a unei hârtii indicatoare impregnată cu tetraoxichinonă *(soluţie 0,2% în alcool 96%)* la *pH* 2,8 realizat de soluţia tampon ce conţine 1,9 g bitartrat de sodiu şi 1,5 g acid tartric în 100 ml de apă. În prezenţa *plumbului* în atmosfera de analizat, culoarea hârtiei indicatoare impregnată cu reactiv specific virează în roz. Rezultatele sunt

fals pozitive atunci când concentraţia cadmiului în probă o depăşeşte pe cea de *plumb*.

- **pentru identificarea *mercurului,*** hârtia indicatoare se pregăteşte astfel: 200 ml soluţie 10% sulfat de cupru se amestecă cu 200 ml soluţie 10% iodură de potasiu. Amestecul se lasă să sedimenteze şi ulterior se decantează lichidul. Precipitatul rămas se spală de două-trei ori cu apă distilată, o dată cu soluţie 1% iodură de potasiu, o dată cu soluţie 1% sulfit de sodiu, apoi din nou, de două ori cu apă distilată, de fiecare dată lichidele de spălare fiind eliminate prin decantare. În continuare, excesul de apă se absoarbe cu o bandă de hârtie de filtru iar precipitatul rezultat se transferă într-un pahar Berzelius. Peste acesta se adaugă o cantitate mică de etanol pentru a-i conferi o consistenţă păstoasă, semilichidă. Pasta astfel preparată se întinde în strat subţire şi uniform pe benzi de hârtie de filtru care se lasă la uscat la temperatura camerei. În prezenţa vaporilor de mercur în atmosfera analizată, banda de hârtie astfel pregătită îşi modifică culoarea de la gălbui la roz. Timpul de virare a culorii se corelează negativ cu concentraţia vaporilor de mercur în atmosfera analizată, la timpi de *15, 20,* respectiv *30 minute* corespunzând concentraţii ale vaporilor de mercur de *0,7 mg/m*^{3}*, 0,3 mg/m*^{3}, respectiv, *0,2 mg/m*^{3}.

4.3 Metode de cuantificare ale reziduurilor de metale grele în diverse substraturi

4.3.1 Spectrometria de absorbție atomică

Dintre toate tehnicile instrumentale de cuantificare ale reziduurilor chimice din diverse substraturi, *spectrometria de absorbție atomică* este utilizată în analiza metalelor grele. Această tehnică este laborioasă, cuprinde o serie de etape premergătoare cuantificării propriu-zise şi

implică dotarea laboratorului cu aparatură costisitoare pentru a cărei operare este nevoie de personal calificat.

Determinarea concentrației de metale grele din proba de analizat se face prin măsurarea absorbanței unei radiații electromagnetice la trecerea acesteia printr-un mediu ce conține atomii liberi ai elementului de investigat. Tehnica *spectrometriei de absorbție atomică* este o tehnică monoelement, pentru fiecare metal greu ce se dorește a fi cuantificat fiind măsurată absorbanța unei radiații cu lungimea de undă specifică, eliberată de o lampă al cărei catod este confecționat din elementul de investigat. Absorbția acestei radiații este direct proporțională cu concentrația atomilor elementului de investigat, așadar, cu concentrația elementului în proba de analizat *(figura 17).*

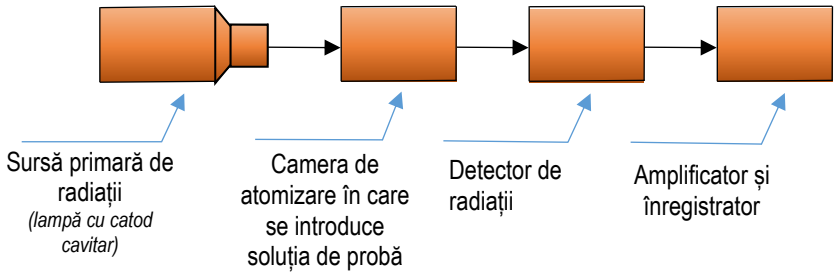


Fig.17: Schema generală a unui spectrometru de absorbţie atomică *(Grădinaru și col., 2016)*

Determinarea concentrației de metal greu în proba de analizat se face prin *metoda curbei etalon*, fiind măsurate pe rând absorbanțele unor soluții cu *concentrații standard* ale metalului de investigat, după care se măsoară absorbanța *soluției de probă* și prin extrapolare pe *abscisă,* concentrația metalului greu în proba de analizat *(figura 18).*

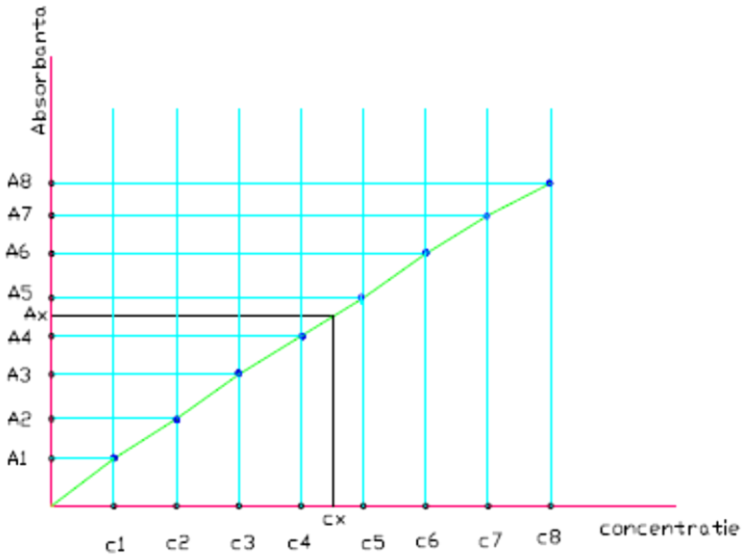


Fig.18: Metoda curbei etalon în stabilirea concentraţiei de metal greu în proba de investigat

Pentru a avea loc interacțiunea dintre radiația electromagnetică și atomii elementului de analizat, proba trebuie adusă în stare de soluție care să poată fi ulterior antrenată în camera de atomizare a spectrometrului. Așadar, două condiții principale trebuiesc îndeplinite pentru a putea cuantifica reziduurile metalelor grele din diverse substraturi, și anume:

- Indiferent de tipul substratului investigat, metalele grele trebuie scoase din combinațiile lor organice. Mobilizarea acestora se face prin tratarea substratului fie direct cu diverși agenți oxidanți, precum HNO_3, H_2SO_4, HCl, $HClO_4$, H_2O_2 *etc. (mineralizare umedă)*, fie indirect, cu amestecuri asemănătoare de agenţi oxidanţi dar după arderea probei în creuzete introduse în cuptoare electrice termoreglabile, la temperaturi cuprinse între *450* și *600* ^0C *(mineralizare uscată* sau *calcinare);*
- Soluția de mineralizat astfel obținută este tratată termic cu scopul disocierii moleculelor componente și generării de atomi. *Mercurul* este singurul metal greu care furnizează atomi

liberi la temperatura obișnuită, în urma unor reacții chimice cu reactivi specifici, precum $SnCl_2$ sau $NaBH_4$ *(Cordoș și col., 1998).* Pentru celelalte metale grele de interes în această lucrare, atomizarea sau aducerea lor din soluție în stare de atomi se face în flacără *(de obicei, amestec aer-acetilenă ce asigură o temperatură cuprinsă între 2125 și 2400* ^0C*)* sau în cuptoare de grafit *(în care atomizarea se face la temperaturi cuprinse între 2500 și 3000* ^0C*) (Cordoş şi col., 1998; Dumitrescu şi col., 2003).*

4.3.2 Spectrofotometria

Comparativ cu *tehnica spectrometriei de absorbție atomică*, *metoda spectrofotometrică* este mai accesibilă ca necesar de aparatură și reactivi. Principiul metodei este asemănător, cu măsurarea absorbanței unui fascicul de lumină transmis la o lungime de undă specifică, la trecerea acestuia printr-un mediu colorat ca urmare a reacției dintre elementul de analizat și un reactiv specific, de exemplu: *ditizonă (difeniltiocarbazonă)* pentru *plumb, cadmiu* și *zinc*, și *2,2'-dichinolil*, pentru *cupru (Drugă, 2002).* Intensitatea cromatică a mediului de reacție este direct proporțională cu concentrația de metal greu în proba investigată și invers proporțională cu cantitatea de lumină recepționată de detectorul fotoelectric plasat la polul opus față de sursa de lumină *(cu cât concentrația de metal greu în proba de investigat este mai mare, cu atât mediul de reacție va fi mai intens colorat, fapt ce va duce la o reținere mai mare a fasciculului luminos în mediu și la recepționarea unei cantități mai mici de radiație luminoasă la nivelul detectorului fotoelectric).*

Interpretarea rezultatelor se face, de asemenea, prin trasarea *curbei etalon*, cu notarea pe ordonata sistemului de coordonate a absorbanțelor *(extincțiilor)* înregistrate pentru probele etalon *(cu concentrații cunoscute ale metalului de analizat)* și pe abscisă, a concentrațiilor acestora. În

continuare, se notează *absorbanța probei* iar prin extrapolare la curba etalon se determină concentrația în metal greu a probei de analizat.

Pentru determinarea colorimetrică a *plumbului, cadmiului* și *zincului* din diverse substraturi se ține cont de proprietatea acestora de a reacționa cu *ditizona (difeniltiocarbazona)* în mediu alcalin *(pH 10-11 pentru Pb, pH 10 pentru Cd, pH 9 pentru Zn),* cu formarea a câte unui complex ce poate varia de la roz la roșu *(ditizonatul de plumb, ditizonatul de cadmiu, ditizonatul de zinc)* și care se poate colorimetra. Înlăturarea metalelor interferente din fiecare mediu de reacție se face, în mod specific, prin extracții succesive și prin adăugare de agenți complexanți, de exemplu *tartrat* sau *cianură. Cuprul* din proba de analizat reacționează cu *2,2'-dichinolil* în alcool izoamilic, după reducerea sa de la *cupru bivalent* la cel *monovalent* prin reacție cu *hidroxilamina* în mediu tampon. În urma acestei reacții, va rezulta un complex roșu-violet *(dichinolatul de cupru)* care poate fi supus colorimetrării *(Mănescu şi col., 1994; Drugă, 2002)*.

EXERCIȚII ȘI PROBLEME:

Problema 1: Care dintre următoarele metale joacă în corpul uman un rol fiziologic important, fiind necesare organismului *(alegeți două răspunsuri corecte)*:

- Cadmiul;
- Plumbul;
- Cuprul;
- Mercurul;
- Zincul.

Problema 2: Copiii au un metabolism mai activ comparativ cu adulţii, motiv pentru care *(alegeți răspunsul corect)*:

- cantitatea de plumb preluată prin aerul inhalat poate fi de două-trei ori mai mare comparativ cu cea preluată de către adulţi;
- cantitatea de plumb preluată prin aerul inhalat poate fi eliminată rapid;
- cantitatea de plumb preluată prin aerul inhalat poate fi metabolizată ușor.

5. POLUAREA CU NITRAȚI / NITRIȚI

5.1 Surse de poluare, mecanisme de acțiune și efecte

Nitrații și *nitriții*, cunoscuți și ca *azotați* și *azotiți*, sunt compuși ce conțin un atom de azot legat de trei atomi de oxigen *(NO_3)*, în structura *nitraților*, respectiv de doi atomi de oxigen *(NO_2)*, în structura *nitriților*.

Nitrații și *nitriții* se regăsesc în mod obișnuit în componentele mediului ambiant reprezentate de sol, apă, plante, fiind parte a unui ciclu existențial în care degradarea produselor vegetale sub acțiunea microorganismelor îmbogățește conținutul solului în *nitrați / nitriți* ce vor fi ulterior folosiți de către viitoarele plante ca sursă de azot pentru sinteza proteinelor și a altor compuși cu azot din componența lor. Adițional, conținutul solului este în mod natural îmbogățit prin dejecțiile animale și procesele de descompunere a cadavrelor *(Popa și col., 1986)*.

Circuitul azotului între aceste componente ale ecosistemului se află într-o stare nativă de echilibru, care poate fi însă perturbată ca rezultat a următoarelor acțiuni:

- folosirea în exces în agricultură a fertilizanților naturali *(gunoiul de grajd)* ori a celor de sinteză *(azotatul de NH_4, Ca, K, Na etc.);*
- poluarea atmosferică cu *oxizi de azot* rezultați din procesele de ardere industrială *(industria metalurgică, a îngrășămintelor*

azotoase, acidului sulfuric, benzenului, naftalinei, vopselurilor și explozivilor, motoarelor cu reacție și celor diesel, după suduri electrice și autogen etc.) (Râpeanu, 1979). Oxizii de azot sunt gaze toxice, cei mai des întâlniți și mai importanți sub aspectul toxicității lor fiind: protoxidul de azot *(N_20)*, oxidul de azot *(NO)*, bioxidul de azot *(NO_2)*, trioxidul de azot *(NO_3)*, tetraoxidul de azot *(NO_4)*, pentaoxidul de azot *(N_2O_5) (Râpeanu, 1983).* Prezența acestora în atmosferă afectează omul, animalele și păsările care, prin procesul inhalării preiau acești toxici și dezvoltă o simptomatologie apropiată celei de intoxicație *cu nitrați / nitriți* pe cale digestivă. De asemenea, sunt afectate și plantele și viețuitoarele acvatice, prin contaminarea sub formă de pulberi fine a frunzelor, solului și apei.

Nitrații determină fenomene de intoxicație la om, animale sau păsări la doze mai mari comparativ cu cele ale *nitriților*. Deși sunt mai puțin toxici ca atare, *nitrații* sunt transformați în organism în *nitriți,* ca urmare a intervenției enzimei reducătoare *nitratreductază,* sintetizată de către bacteriile tubului digestiv, în special *Escherichia coli*. Deși organismul dispune de un mecanism compensator de degradare ulterioară a *nitriților* printr-un proces asemănător de reducere enzimatică, activitatea enzimei implicată în acest fenomen, *nitritreductaza*, este mult mai slabă comparativ cu cea a *nitratreductazei*. În acest fel este favorizată acumularea *nitriților* toxici în organism, descompunerea lor în produși simpli *(oxid de azot, NH_3, N)* nefiind eficientă *(Popa și col., 1986)*.

Un risc major îl constituie posibilitatea formării *nitrozaminelor*, substanțe cu potențial cancerigen. Formarea acestora implică drept precursori, pe de o parte, agenții de nitrozare *(nitrații, nitriții, oxizii de azot)*, iar pe de altă parte, compușii care pot suferi reacții de nitrozare, în speță aminele secundare, dar și cele primare, terțiare sau cuaternare, ce se pot forma în alimente din proteine, aminoacizi și fosfolipide *(Berilă și col., 2000)*.

Prezența *nitraților / nitriților* în produsele de origine vegetală pare să fie infuențată de factori legați de specie *(nitrații se acumulează în cantități mai mari în spanac, sfeclă, ridiche, țelină, morcov, mărar, pătrunjel),* de gradul de însorire *(însorirea slabă din solarii favorizează acumularea nitraților),* ori de carența în unele oligoelemente care sunt parte a enzimelor reducătoare *(de exemplu: molibdenul se regăsește în componența nitratreductazei, iar fierul și cuprul în componența nitritreductazei) (Popa și col., 1986; Bara și Laslo, 1997)*.

Carnea și organele animalelor conțin în mod natural cantități mici de *nitrați / nitriți* ce se transmit sub formă de reziduuri. Conținutul de *nitrați / nitriți* al mezelurilor și altor alimente procesate ce conțin carne, poate fi îmbogățit prin introducerea aditivilor de tipul E_{259} – *nitritul de potasiu*, E_{250} – *nitritul de sodiu*, E_{251} – *nitratul de sodiu*, E_{252} – *nitratul de potasiu*, cu scopul de a conferi produsului fiert sau opărit o culoare roz-roșiatică în schimbul celei gri-cenușii. Mai mult, acești aditivi exercită efecte bacteriostatice asupra bacteriilor anaerobe, inclusiv *clostridiilor*, au proprietăți antioxidante și participă la dezvoltarea aromei produsului finit *(Popa și col., 1986)*.

În mod nornal, laptele nu trebuie să conțină *nitrați (Savu și Petcu, 2002)*. Prezența acestor compuși în lapte poate fi legată de următoarele aspecte:

- falsificarea laptelui prin adaos de apă ce conține reziduuri de *nitrați (atunci când concentrația lor în lapte este mai mică de 1 mg%);*
- falsificarea laptelui prin adaos de apă și ulterior de NH_4NO_3 pentru a masca adaosul de apă prin creșterea densității laptelui *(atunci când concentrația lor în lapte este mai mare de 1 mg%);*
- falsificarea laptelui prin adaos de $NaNO_3$ sau KNO_3 cu scopul îmbunătățirii proprietăților senzoriale și prelungirea duratei de păstrare, mai ales dacă acesta va fi procesat în cașcaval *(Maloș și col., 2002)*.

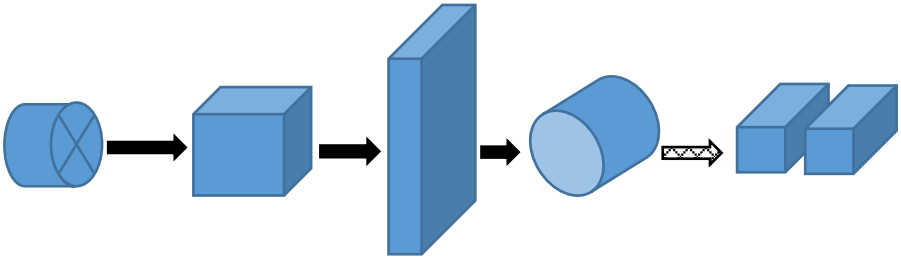
Efectele intoxicației cu *nitrați / nitriți* se datorează acțiunii lor methemoglobinizante, prin transformarea hemoglobinei în

methemoglobină, compus ce și-a pierdut capacitatea de transport a oxigenului. Dintre cele mai importante simptome raportate în intoxicația cu acești toxici, pot fi menționate următoarele: cefalee, amețeli, polipnee și dispnee, tahicardie, culoarea palidă a pielii și mucoaselor, până la cianoză *(Popa și col., 1986; Solcan și Beșchea Chiriac, 2005; Grădinaru și col., 2016).*

5.2 Cuantificarea reziduurilor de nitrați / nitriți prin metoda spectrofotometriei de absorbție în U.V.-VIS

Tehnica *spectrofotometriei de absorbție în U.V.-VIS* funcționează după un principiu relativ asemănător cu cel al *spectrometriei de absorbție atomică* folosită pentru cuantificarea reziduurilor de metale grele, în sensul că se bazează pe măsurarea absorbanței unui fascicul emis la o anumită lungime de undă la trecerea sa printr-un mediu ce include toxicul de analizat *(figura 19),* interpretarea rezultatelor fiind făcută prin metoda *curbei etalon.* Desigur, metoda prezintă anumite particularități definitorii în funcționarea sa, și anume:

- fasciculul este emis de către o sursă de radiații electromagnetice la lungimi de undă ce aparțin atât spectrului *U.V. (200-400 nm),* cât și *VIS (400-800 nm);*
- mediul în care se regăsește compusul de analizat este reprezentat de o soluție a cărei intensitate a culorii depinde de concentrația sa în compusul de analizat. Absorbția fasciculului de lumină este realizată de grupările cromofore ale mediului de analizat. Cu cât mediul de analizat va fi mai intens colorat, cu atât acesta va absorbi o cantitate mai mare din fasciculul de lumină emis de către sursă, iar detectorul dispozitivului va recepționa o cantitate mai mică din acesta *(Butnariu, 2000; Gligor, 2003; Nașcu, 2003; Lujerdean, 2004).*



Semnal

Semnal

S = sursa de radiație;
M = monocromatorul;
C = cuveta cu probă;
D = detectorul;
A = amplificatorul;
Î = înregistratorul.

Fig.19: Schema generală a unui spectrofotometru de absorbție *(Grădinaru și col., 2016)*

Determinarea *nitraților* și *nitriților* din probe de apă prin tehnica spectrofotometriei a fost descrisă de către *Bianu și Nica, 1998 (citat de Solcan și Beșchea Chiriac, 2005).*

Pentru determinarea *nitraților* din probe de apă se are în vedere faptul că ionii de *nitrat* reacționează cu acidul fenoldisulfonic, formând un derivat de culoare galbenă. Intensitatea culorii mediului de analizat se măsoară fotometric, la lungimi de undă de 410 nm, pentru conținuturi mai mici de 10 mg NO_3/l, și la lungimi de undă de 480 nm, pentru conținuturi cuprinse între 10 și 100 mg NO_3/l. Modul de lucru presupune introducerea a 10 ml de probă într-o capsulă de porțelan și evaporarea sa la sec pe o baie de apă. Ulterior, se adaugă 0,5 ml acid fenoldisulfonic iar capsulei i se imprimă mișcări de rotație în așa fel încât reactivul să vină în contact cu tot reziduul din capsulă. După un repaus de 15 minute, mediului de reacție i se adaugă amoniac în reprize de câte 1 ml, până la obținerea intensității maxime a culorii. Amestecul astfel realizat se introduce într-un cilindru gradat, după care se completează cu apă bidistilată până la 10 ml. Soluția

finală se fotometrează în cuve cu grosimea stratului de 1 cm, la lungimi de undă de 410 nm, respectiv 480 nm, în funcție de conținutul probei în *nitrați*. Pentru trasarea curbei de etalonare se pregătesc opt *soluții etalon* de concentrații diferite, extincțiile acestora *(absorbanțele)* fiind citite prin comparație cu *soluția blanc*, ce conține doar apă bidistilată. Soluțiile etalon se prepară prin introducere în opt baloane cotate cu capacități de 100 ml fiecare, a 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 și 100,0 ml soluție etalon pentru *nitrați*, ulterior completându-se cu apă bidistilată până la semn pentru concentrații finale de 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 și, respectiv, 10,0 mg NO_3. Concentrația de *nitrați* în proba de investigat se calculează folosind următoarea formulă:

$$(NO3) = \frac{c}{V} x1000 \text{ (mg/l)}$$

unde,

c = concentrația de *nitrați* pentru proba investigată, citită prin extrapolare pe graficul curbei etalon și exprimată în *mg*;

V = volumul probei de apă luat în lucru, exprimat în *ml* *(adaptare după Bianu și Nica, 1998 citat de Solcan și Beșchea Chiriac, 2005).*

Pentru determinarea *nitriților* din probe de apă se are în vedere faptul că ionii de *nitrit* reacționează cu acidul sulfanilic în mediu puternic acid, formând compuși de diazoniu, care apoi reacționează cu alfa-naftilamina la *pH* 2,0-2,5 pentru a forma un derivat de culoare roșie-purpurie. Intensitatea culorii mediului de analizat se măsoară fotometric la lungimea de undă de 520 nm. Modul de lucru presupune aducerea probei de apă la *pH* 7 prin adăugare de acid acetic sau hidroxid de sodiu. Se extrag 50 ml de probă astfel prelucrată și se adaugă într-un vas Erlenmayer pentru a se amesteca ulterior cu 1 ml acid sulfanilic. Amestecul astfel realizat se agită bine după care se lasă în repaus timp de 5 minute. După acest interval de timp se adaugă 1 ml soluție clorhidrat de alfanaftilamină și 1 ml soluție acetat de sodiu, agitând în mod continuu. Soluția astfel tamponată cu *pH* cuprins între 2,0 și 2,5 se lasă la întuneric timp de 30 minute după care se citește extincția la 520 nm. Pentru trasarea curbei de etalonare se pregătesc

zece *soluții etalon* de concentrații diferite, extincțiile acestora *(absorbanțele)* fiind citite prin comparație cu *soluția blanc*, ce conține doar apă bidistilată. Soluțiile etalon se prepară în așa fel încât concentrațiile finale de *nitriți* să fie de 0,001; 0,002; 0,003; 0,005; 0,007; 0,009; 0,010; 0,020; 0,030 și, respectiv, 0,040 mg NO_2. Concentrația de *nitriții* în proba de investigat se calculează folosind următoarea formulă:

$$(NO2) = \frac{c}{V} x1000 \text{ (mg/l)}$$

unde,

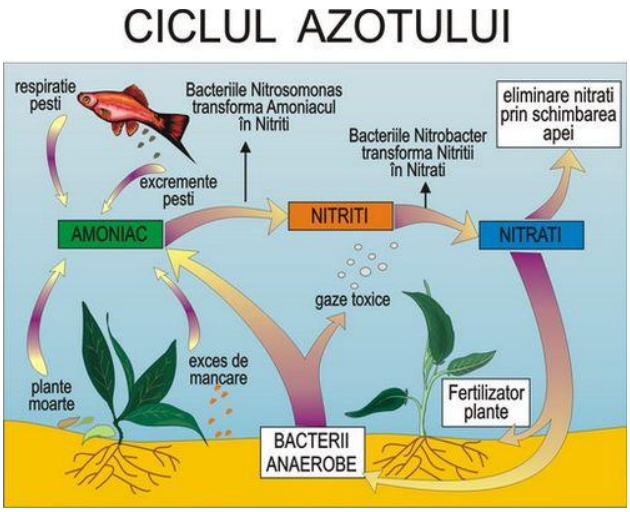
c = concentrația de *nitriți* pentru proba investigată, citită prin extrapolare pe graficul curbei etalon și exprimată în *mg*;

V = volumul inițial al probei de apă luat în lucru, exprimat în *ml* *(adaptare după Bianu și Nica, 1998 citat de Solcan și Beșchea Chiriac, 2005).*

EXERCIȚII ȘI PROBLEME:

Problema 1: Cunoașteți o metodă de cuantificare a reziduurilor de nitrați și nitriți?

Problema 2: Priviți imaginea de mai jos. Explicați importanța microorganismelor și plantelor în păstrarea unui echilibru al calității apei și evitarea creșterii excesive a nivelului nitriților și nitraților.



Sursa: http://www.acvariu.ro/ciclul-azotului

Problema 3: Enumerați cauzele de origine antropică care pot perturba echilibrul ciclului azotului în natură.

6. POLUAREA CU PESTICIDE

6.1 Surse de poluare, mecanisme de acțiune și efecte

Pesticidele sunt substanțe chimice de natură organică, folosite la nivel mondial începând cu anii 1945-1950, în sectoare precum agricultura, silvicultura, zootehnie și sănătate publică, datorită efectelor lor fungicid, insecticid, acaricid, nematocid, moluscid, rodenticid și erbicid *(Rotaru și Mihaiu, 2002)*.

De-a lungul timpului, sinteza și aplicarea *pesticidelor* a cunoscut o dinamică crescândă, dovedindu-și eficiența în prevenirea sau combaterea unor maladii grave la om *(de exemplu: malaria, holera, tifosul exantematic, frigurile galbene),* în sporirea recoltelor, protejarea stocurilor de furaje și alimente împotriva dăunătorilor. Contaminarea furajelor și alimentelor cu reziduuri de *pesticide* și episoadele de intoxicație apărute la doze aparent mici, rezistența lor mare la acțiunile de decontaminare și remanența în timp la niveluri importante datorită caracterului lor cumulativ și a fenomenului de biomagnificare, precum și crearea unor dezechilibre ale ecosistemului prin distrugerea florei și faunei sensibile la acțiunea acestor substanțe, au făcut ca folosirea *pesticidelor* să fie mult limitată și chiar interzisă pentru unii reprezentanți ai clasei, cu interes în a găsi înlocuitori naturali, mai puțin toxici și cu remanență scăzută în substrat

(Solcan și Beșchea Chiriac, 2005). Pentru a compensa eficacitatea modestă a acestora din urmă, este posibilă coroborarea lor cu mijloacele biologice de combatere a dăunătorilor *(Enescu, 1986)*.

Datorită numărului mare de reprezentanți ai clasei *pesticidelor* și diversității lor de utilizare, o clasificare comprehensivă a acestor substanțe este greu de realizat. Dacă se consideră direcția lor de acțiune, pot fi menționate următoarele clase: pesticide insecticide *(reprezentanți ai organocloruratelor, organofosforicelor, piretrinoidelor etc.)*, fungicide *(organomercuriale, derivați ditiocarbamici, clorfenoli, compuși organostanoși)*, acaricide *(amitraz)*, moluscide *(metaldehidă)*, raticide *(derivați cumarinici, alfanaftiltiouree – ANTU, fosfură de zinc, stricnină, crimidină)*, erbicide *(anorganice – derivați de As, Cu, Hg, B, clorați de K și Na, organice – clorfenoxiderivații acizilor grași, compușii triazinici, derivații benzoici, compuși de uree substituită, dinitrofenolii, compuși dipiridilici, tiocarbamații* etc.) *(Popescu, 1996; Solcan și Beșchea Chiriac, 2005)*.

Dintre toți reprezentanții *pesticidelor*, cei aferenți claselor organoclorurate și organofosforice s-au evidențiat prin structuri chimice cu o mare rezistență la acțiunea factorilor de mediu și o simptomatologie agresivă în cazul intoxicațiilor la om și animale. Deși folosirea unora dintre *pesticide* este strict interzisă în multe țări încă de acum 40 de ani, perioada lor mare de remanență în sol și detectarea ulterioară în diverse substraturi încă impun controale oficiale ale reziduurilor acestor substanțe în produsele destinate consumului alimentar.

Pesticidele organoclorurate au fost larg utilizate în agricultură și zootehnie, în principal pentru acțiunea lor insecticidă, obținerea acestora realizându-se prin clorurarea diverselor hidrocarburi, în proporție de 33-67% *(Râpeanu, 1983)*. Diclor-difenil-triclor-etanul *(DDT)* este primul organoclorurat sintetizat, ulterior această clasă de substanțe îmbogățindu-se și cu alți reprezentanți, precum diclor-difenil-diclor-etan *(DDD)*, diclor-difenil-triclor-etenă *(DDE)*, hexaclor-ciclohexan *(izomerul γ fiind cunoscut ca Lindan)*, Aldrin, Dieldrin, Toxofen etc. *(Solcan și Beșchea Chiriac, 2005)*.

Preparatele comerciale cu organoclorurate conțin un procent dat de substanță activă în amestec cu pulberi inerte, utilizarea acestora putând fi făcută prin acțiuni de prăfuit ale diverselor substraturi ori prin stropiri cu soluțiile ori emulsiile realizate din preparatul bază *(Râpeanu, 1983)*.

Organocloruratele au o remanență semnificativă în sol, de unde pot fi absorbite în plante ce se constituie, prin consumul lor, în sursă de contaminare pentru om și animale. După 26 zile, *DDT-ul* pătrunde 20 cm în solul argilos, iar în cernoziom după 137 zile, scăzând cantitativ doar 10-20% *(Râpeanu, 1983)*. Alte modalități de contaminare ale omului și animalelor cu pesticide organoclorurate sunt reprezentate de:

- hrănirea animalelor cu furaje tratate direct cu organoclorurate;
- introducerea accidentală a organocloruratelor în hrana animalelor prin confuzie cu sarea sau creta furajeră;
- dozarea incorectă a organocloruratelor în cursul tratamentelor fitosanitare și sanitar-veterinare;
- consumul de alimente provenite de la animale intoxicate cronic cu organoclorurate *(în doze mici și continue),* ținând cont de proprietatea acestor substanțe de acumulare în grăsimi, inclusiv grăsimea laptelui. Se consideră următoarea ordine descrescătoare a acumulării organocloruratelor în țesutul gras: *țesutul adipos mezenteric, țesutul adipos al maniamentelor, țesutul gras perirenal, țesutul gras din musculatură.* La rumegătoare se constată o acumulare mai pregnantă a acestor toxice, comparativ cu porcinele, posibil în relație cu volumul mai mare de furaje ingerate de aceste animale. În produsele lactate, cea mai mare cantitate de reziduuri trece în smântână și se concentrează în unt, laptele smântânit și zara înregistrând cantități nesemnificative *(Enescu, 1986; Rotaru și col., 1997; Rotaru și Mihaiu, 2002; Solcan și Beșchea Chiriac, 2005; Grădinaru și col., 2016)*.

Fenomenul de biomagnificare, demonstrat pentru diferite toxice inclusiv pentru *pesticidele organoclorurate*, este de o importanță deosebită pentru speciile aflate către vârful piramidei trofice, printre care se află și

omul. Acest fenomen constă în sporirea biologică a concentrației unui toxic prin creșterea progresivă a conținutului său de la un nivel dat în mediul ambiant, la niveluri mai mari în plante și în viețuitoarele aflate la baza piramidei trofice, până la niveluri mult amplificate în organismul viețuitoarelor aflate în vârful piramidei. Cel mai elocvent exemplu în acest sens este cel care face referire la utilizarea *DDT-ului* pentru combaterea unor insecte asociate unui lac din Statele Unite ale Americii *(Clear Lake, California)* și care a avut drept consecință moartea păsărilor ihtiofage *(care se hrănesc cu pește)* ca rezultat al acumulării progresive a toxicului pe filiera apă, plancton, pești planctonofagi, pești ihtiofagi *(în concentrații de 0,02 ppm; 0,5 ppm; 5-8 ppm, respectiv 190 ppm)* *(Enescu, 1983; Popescu, 1996; Solcan și Beșchea Chiriac, 2005)*.

Efectele reziduurilor de organoclorurate asupra omului și animalelor se încadrează în tabloul clinic cu simptomatologie nervoasă *(contracții tonice și clonice, agitație și ulterior deprimare)*, digestivă *(greață, vărsături, diaree)* și respiratorie *(insuficiență respiratorie)*. Efectului toxic al *DDT-ului* și *HCH-ului* i se asociază cel antinutritiv datorat interferențelor acestora în metabolismul unor vitamine. Ambele substanțe afectează absorbția beta-carotenului și a retinolului, iar *DDT-ul* influențează sinteza acidului ascorbic la animale, în timp ce la om sporește eliminarea vitaminei C prin urină *(Berilă și col., 2000)*. Intoxicația pe cale orală cu *DDT* apare după ingerarea unei doze de *10 mg/kg*. În cazul *HCH*, doza medie letală la om este de 400 mg/kg produs ingerat, iar în cazul Lindanului, de 125 mg/kg produs ingerat *(Enescu, 1983)*.

Pesticidele organofosforice sunt esteri ai acidului fosforic sau ai derivaților săi *(acidul tiofosforic, de exemplu)*, fiind folosite în tratamentul parazitozelor interne și externe la animale, în fitoterapeutică și igienă. Primul organofosforic sintetizat a fost tetraetil-pirofosfatul *(TEPP)*, urmat de parathion *(denumit impropriu „verde de Paris”)*. Alți reprezentanți ai clasei sunt diclofosul, triclorfosul, malathion etc. Toți acești compuși sunt liposolubili, motiv pentru care au fost raportate cazuri de intoxicație pe cale transcutanată la personalul care a manipulat astfel de substanțe în dezacord cu normele de securitate a muncii. Nu sunt la fel de intens cumulative

precum organocloruratele, însă în organism, unele organofosforice se pot transforma în metaboliți cu toxicitate mai mare față de cea a compusului inițial *(de exemplu: parathionul este transformat în paraxon, metabolit mult mai toxic) (Enescu, 1983; Solcan și Beșchea Chiriac, 2005)*.

Simptomatologia intoxicațiilor cu organofosforice este predominant de tip nervos, în contextul acțiunii inhibitoare a acestor compuși asupra enzimelor *acetilcolinesterază* și *pseudocolinesterază.* Pe cale de consecință, va avea loc o acumulare în exces de acetilcolină la nivelul terminațiilor nervoase colinergice și al joncțiunilor neuromusculare, cu alterarea echilibrului dintre excitația și inhibiția neuronală *(Popescu, 1996)*. Doza mortală pentru om, în cazul parathionului, este cuprinsă între 0,2-0,5 g *(Enescu, 1983)*.

6.2 Decelarea reziduurilor de pesticide organoclorurate și organofosforice prin tehnica cromatografiei în strat subțire

Numărul mare de compuși aferenți clasei *pesticidelor* a determinat dezvoltarea în timp a unor tehnici variate pentru determinarea concentrației lor în diferite substraturi. Dintre acestea, *tehnica gaz cromatografică* prezintă o sensibilitate sporită, însă necesită aparatură costisitoare, importante resurse materiale și personal bine calificat. În acest context, în cadrul acestui manual practic s-a preferat prezentarea *tehnicii de cromatografie în strat subțire* pentru decelarea reziduurilor de pesticide, fiind considerată mai potrivită sub aspect didactic ca necesar de materiale și timp alocat desfășurării sale.

Cromatografia în strat subţire (CSS) este o metodă care permite decelarea unor toxice pe baza diferenţei lor de deplasare de-a lungul unui strat adsorbant, precum *silicagelul, celuloza, kiselgurul etc.* Stratul adsorbant este dispus pe un suport rigid reprezentat de o placă de sticlă,

metal sau polimer, această asociere *material adsobant – suport rigid (placă)* fiind numită în continuare *cromatoplacă.* Migrarea toxicului de decelat în structura stratului adsorbant se face sub acţiunea unui *sistem de solvenţi* numit și *sistem developant,* dintre cele mai cunoscute amestecuri amintind cele dintre *hexan – acetat de etil, hexan – acetonă, benzen – cloroform etc. (Baloescu și Curea, 1983; Duşa și col., 1994; Lujerdean, 2004).*

Depunerea probelor pe placa cromatografică se face în spoturi ce respectă o linie de start situată la distanță față de marginea inferioară și lateralele cromatoplăcii *(figura 20).*

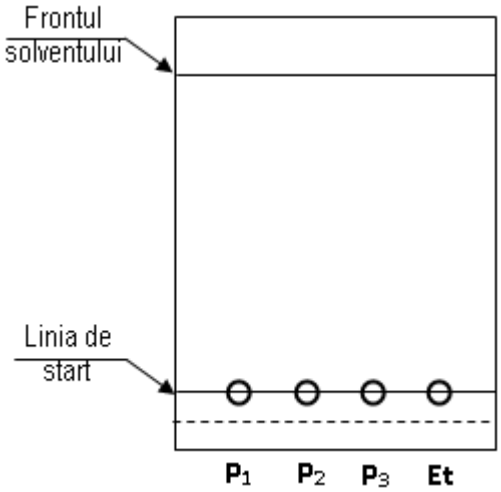


Fig. 20: Mod de aranjare pe cromatoplacă a spoturilor de probe şi etalon *(Grădinaru și col., 2016)*

Developarea cromatoplăcilor se face prin introducerea lor *(cu probele spotate plasate în partea lor inferioară)* într-un vas de sticlă acoperit cu capac, numit *cameră* sau *tanc de developare (figura 21),* în care, în prealabil, a fost depus *sistemul developant* într-un strat inferior liniei de start marcată pe cromatoplacă.

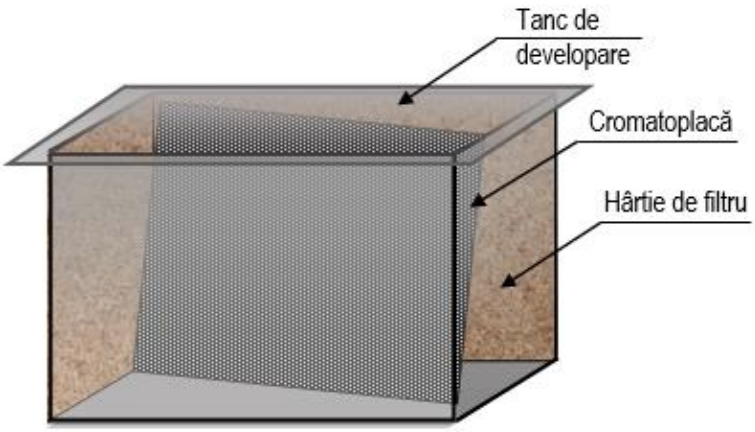


Fig.21: Aspectul unui tanc de developare folosit în cromatografia în strat subțire *(Grădinaru și col., 2016)*

Finalizarea developării este marcată de parcurgerea cromatoplăcii de către sistemul developant, pe baza principiului de absorbție a acestuia de către stratul adsorbant depus pe suportul rigid. În continuare, cromatoplăcile sunt uscate la temperatura camerei, cu un curent de aer cald sau în etuvă iar vizualizarea spoturilor se face după pulverizarea unor reactivi specifici *(operațiunea de șpreiere a plăcilor)*, rezultând pete vizibile în lumina ultravioletă de lungimi de undă caracteristice compușilor ce au fost investigați.

Particularizat pesticidelor organoclorurate și organofosforice, tehnica cromatografiei în strat subțire implică următoarele etape ale modului de lucru *(adaptare după Popescu, 1997)*:

- ***Pregătirea cromatoplăcilor***

Pentru decelarea reziduurilor de *pesticide organoclorurate* se pregătesc două tipuri de cromatoplăci, un tip în care stratul adsorbant este reprezentat de *florisil 6%* și un al doilea tip în care stratul adsorbant este

reprezentat de *florisil 15%*. Pentru *pesticidele organofosforice*, se pregătesc cromatoplăci cu *silicagel*. Înainte de dispunerea materialului adsorbant, plăcile sunt pregătite prin spălare cu detergent și apă, clătire cu apă distilată și ștergere ulterioară cu câțiva ml de alcool etilic. Cromatoplăcile astfel pregătite se lasă în poziție orizontală timp de 15 minute pentru a se usca, după care se introduc în etuvă la 80^0C timp de 30 minute pentru a se definitiva procesul uscării. În continuare, pentru fiecare cromatoplacă se îndepărtează cu o lamă stratul de adsobant pe o distanță de 1 cm de la marginea plăcii, corespunzătoare locului unde vor fi plasate probele și standardele *(etaloanele).*

Cromatoplăcile *„se activează”* prin introducere pe rând în tancul cromatografic ce conține 15 ml acetonă soluție apoasă 50% *(pentru o cromatoplacă cu partea inferioară de 20 cm).* Pentru a eficientiza absorbția acetonei, la partea inferioară a fiecărei cromatoplăci se atașează o fâșie de hârtie de filtru *(2x20 cm),* umectată în prealabil în solvent, în așa fel încât să acopere porțiunea răzuită și să se suprapună cca. 6 mm pe stratul absorbant. Procesul developării se desfășoară timp de 70-90 minute, până când frontul solventului ajunge la 4 cm de marginea superioară a cromatoplăcii. În acest moment, cromatoplaca se scoate din tanc, se usucă în nișă timp de 5 minute și apoi în etuvă la 80^0C, putând fi folosită în decurs de o săptămână de la pregătirea sa în acest fel.

- ***Spotarea probelor***

Pentru fiecare cromatoplacă se trasează cu creionul sau se imaginează o linie de start la 4 cm de la latura sa inferioară. Începând de la 2 cm față de latura stângă a cromatoplăcii și păstrând linia de start, se fac 18 semne punctiforme cu creionul, la câte 1 cm distanță unul față de celălalt, care vor servi ca repere pentru aplicarea probelor și a standardelor *(etaloanelor).* La o distanță de 14 cm față de marginea inferioară a cromatoplăcii se trasează cu un vârf ascuțit o linie transversală cu scopul de a întrerupe stratul absorbant și de a limita astfel migrarea probelor și

standardelor. Fiecare probă sau standard depuse se identifică prin marcare directă pe stratul adsorbant, în partea superioară a cromatoplăcii, după linia transversală realizată cu scopul limitării deplasării probelor.

Această tehnică folosește la determinarea semicantitativă a reziduurilor de *pesticide,* pe baza comparării distanței de migrare și a fluorescenței spoturilor cu *soluții standard* sau *etalon* ce conțin concentrații cunoscute de *pesticide.* În cazul *pesticidelor organoclorurate,* intervalul concentrațiilor lor în soluțiile standard este situat între 0,002 și 0,2 µg, cu următoarea distribuție: 0,002 µg, 0,005 µg, 0,01 µg, 0,02 µg, 0,05 µg, 0,1 µg și 0,2 µg. Soluțiile cu o încărcătură mai mare de 0,2 µg *pesticide organoclorurate* vor migra greu în stratul adsorbant, iar cele cu o încărcătură de 0,002 µg și mai mică sunt mai dificil de distins. În cazul *pesticidelor organofosforice*, intervalul concentrațiilor soluțiilor standard este situat între 0,1 și 0,5 µg, cu posibilitatea alegerii unui interval egal de variație între concentrațiile soluțiilor etalon în *pesticide organofosforice*. Volumul extractului de probă trebuie să fie de maximum 10 µg. Pentru rezultate bune se recomandă ca diametrul spotului să fie cât mai mic.

- ***Developarea cromatoplăcilor***

Developarea cromatoplăcilor se realizează prin introducerea lor în tancul de developare, presaturat datorită introducerii cu 30 de minute înainte a solventului de developare și acoperirii tancului cu un capac de sticlă. Pentru reziduurile de *pesticide organoclorurate* spotate pe cromatoplăci *florisil 6%,* solventul de developare este reprezentat de *n-heptan,* iar pentru *organocloruratele* spotate pe cromatoplăci *florisil 15%* se folosește amestecul *acetonă : n-heptan (2:98).* Pentru reziduurile de *organofosforice,* se folosește ca solvent de developare *metilciclohexanul.* Se va avea în vedere ca volumul de solvent depus la baza tancului de developare să aibă o înălțime care să nu depășească 0,5 cm de la baza cromatoplăcii.

- ***Șpreierea cromatoplăcilor***

Developarea cromatoplăcilor se consideră încheiată atunci când frontul solventului de developare depășește limita de 14 cm de la baza plăcii. În continuare, cromatoplăcile se scot din tanc, se sprijină în poziție aproape verticală și se spreiază uniform cu agenți cromogenici.

Pentru *pesticidele organoclorurate,* agentul cromogenic se prepară astfel: 0,1 g $AgNO_3$ se dizolvă în 1 ml H_2O, după care se adaugă 20 ml 2-fenoxietanol. Amestecul astfel realizat se diluează până la 200 ml cu acetonă, după care se adaugă o picătura H_2O_2 30% și se agită. Se păstrează la întuneric peste noapte și se decantează într-o sticlă de pulverizare. Amestecul cromogenic astfel realizat nu se păstrează mai mult de 4 zile.

În cazul *pesticidelor organofosforice,* cromatoplaca se spreiază inițial cu soluție colorantă[5], apoi cu soluție de azotat de argint[6]. Cromatoplaca se lasă în repaus două minute, după care se spreiază din nou cu acid citric[7].

- ***Vizualizarea spoturilor***

Cromatoplăcile developate și șpreiate cu soluție colorantă se expun la lumină ultravioletă cu $\lambda = 254$ nm. Plasarea cromatoplăcilor se va realiza

---

[5] Soluția colorantă se prepară prin diluarea cu acetonă a 10 ml soluție colorantă stoc până la un volum final de 50 ml. Soluția colorantă stoc se pregătește prin dizolvarea a 1 g ester etilic al tetrabromofenolftaleinei în 100 ml acetonă.

[6] Soluția de azotat de argint se prepară prin dizolvarea a 0,5 g $AgNO_3$ în 25 ml apă, și apoi diluare cu acetonă până la 100 ml.

[7] Soluția de acid citric se prepară prin dizolvarea a 5 g acid citric granular în 50 ml H_2O, și apoi diluare cu acetonă până la 100 ml.

la o distanță optimă de 8 cm față de sursa de radiație. Perioada expunerii este variabilă în funcție de concentrația toxicului; spoturile care aparțin unui conținut de 0,005 µg *pesticide organoclorurate* ar trebui să fie vizibile după 15-20 minute perioadă de expunere.

EXERCIȚII ȘI PROBLEME:

Problema 1: Asociați pesticidele din prima coloană cu sinonimele lor din coloana a doua.

Hexaclor-ciclohexan *(izomerul γ)* Parathion Diclor-difenil-triclor-etan Tetraetil-pirofosfat Diclor-difenil-triclor-etenă γHCH diclor-difenil-diclor-etan	Verde de Paris Lindan TEPP DDE DDT DDD Hexaclor-ciclohexan *(izomerul γ)*

Problema 2: Dați 5 exemple de pesticide organoclorurate.

Problema 3: Dați 5 exemple de pesticide organofosforice.

Problema 4: Alegeți o singură frază corectă:

A. În organism, parathionul este transformat în paraxon, metabolit netoxic.

B. În organism, parathionul este transformat în paraxon, metabolit mult mai toxic decât parathionul.

C. În organism, parathionul nu poate fi metabolizat.

7. POLUAREA CU ANTIBIOTICE

7.1 Surse de poluare și efecte asupra biocenozei

Antibioticele sunt substanțe medicamentoase cu o largă utilizare în medicina omului și cea veterinară datorită efectelor lor bacteriostatice și bactericide. Inițial produse în cantități mici în mod natural în mediile de cultură ale fungilor *Penicillium notatum, Penicillium chrysogenum, Cephalosporium acremonium,* în ultimele decenii au cunoscut o diversificare semnificativă ca urmare a perfecționării căilor lor de obținere. Clasificarea *antibioticelor* este făcută în acord cu mai multe criterii care țin de structura lor chimică, spectru de acțiune, mecanism de acțiune ori cale de administrare, cele mai populare fiind betalactamicele *(penicilinele, cefalosporinele),* macrolidele *(eritromicina, spiramicina, oleandomicina, tilozina),* falsele macrolide *(rifamicinele),* aminoglicozidele *(streptomicina, neomicina, kanamicina, gentamicina),* tetraciclicele *(tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina) (Grădinaru, 2010).*

Substanțe de tip antibiotic pot fi regăsite în mod natural în sol datorită proceselor de biosinteză ale microbiotei de la acest nivel. Concentrația acestora la nivelul solului și a structurilor adiacente *(apă freatică, râuri, lacuri etc.)* este în mod constant îmbogățită ca rezultat al următoarelor acțiuni:

- deversarea necontrolată a apelor reziduale rezultate în urma proceselor de fabricare a *antibioticelor*;
- gestionarea incorectă a medicamentelor ce conțin *antibiotice,* cu perioadă de valabilitate expirată sau care nu au fost consumate complet în actul terapeutic, de multe ori acestea fiind aruncate direct în canalizare, contaminând astfel apele de suprafață și pe cele subterane;
- aplicarea pe sol a îngrășămintelor naturale provenite și de la animale aflate în tratamente cu *antibiotice* sau care au fost hrănite cu furaje ce conțineau *antibiotice* pentru rolul lor de biostimulatori ai creșterii. Se consideră că prin urina animalelor tratate cu *antibiotice* se elimină 50-80% din compușii parentali antibiotici; eliminarea prin fecale este în pondere mai mică, adeseori în amestecuri cu metaboliții lor. *Antibiotice* precum tetraciclinele și macrolidele au fost identificate frecvent în compoziția gunoiului de grajd. Acest lucru justifică de ce solurile tratate cu gunoi de grajd astfel contaminat au un conținut mai mare de antibiotice decât cele tratate cu îngrășământ sintetic;
- folosirea *antibioticelor* în piscicultură și deversarea necontrolată a apelor din bazine ce conțin aceste substanțe chimice;

Prezența *antibioticelor* în sol este importantă datorită faptului că reprezintă o sursă de contaminare ulterioară a plantelor, organismelor terestre și acvatice. Solul concentrează *antibioticele* datorită faptului că la acest nivel mobilitatea lor este redusă. *Antibioticele* sunt absorbite de către plante, în structurile acestora fiind distribuite în concentrații descrescătoare în frunze, tulpină și rădăcină. Se pare că sezonul de iarnă este mai favorabil bioacumulării *antibioticelor* în sol decât cel de vară *(Popowska și col., 2010; Gothwaal și Shashidhar, 2014).*

Prezența *antibioticelor* în diferitele componente ale mediului ambiant este importantă prin expunerea biotopului următoarelor riscuri:

- producerea unor dezechilibre ale microbiotei solului și apei, cu distrugerea unor specii bacteriene nepatogene și proliferarea ulterioară, prin lipsa competiției, a speciilor patogene;

- afectarea proceselor de dezvoltare a plantelor și a unor specii acvatice sensibile la acțiunea *antibioticelor (algele, de exemplu);*
- dezvoltarea unor fenomene de antibiorezistență prin mutații în structura *ADN-ului* bacterian, selecția mutantelor rezistente și transferul genelor asociate rezistenței din structura bacteriilor nepatogene în structura celor patogene *(Pikkemaat și col., 2016).*

Consumatorii umani și animali de produse alimentare și furaje contaminate cu reziduuri de *antibiotice* pot manifesta dezechilibre în ecosistemul intestinal, fenomene de *imunoreactivitate (alergii medicamentoase)* și chiar efecte toxice atunci când au loc asocieri cu antibiotice administrate în scop terapeutic. Prezența reziduurilor de *antibiotice* în laptele materie primă are implicații de ordin tehnologic prin inactivarea bacteriilor din maielele folosite la prepararea iaurtului, laptelui bătut, smântânei fermentate, unelor tipuri de brânzeturi *(Grădinaru, 2017).*

7.2 Identificarea clor- și oxi-tetraciclinelor cu reactiv Sachaguchi

Antibioticele tetraciclice sunt larg utilizate în medicină datorită spectrului lor larg de acțiune, activității predominant bacteriostatice, ce poate deveni bactericidă la doze mari *(Grădinaru, 2010). Clortetraciclina* poate fi folosită drept conservant, prin introducerea sa în gheața destinată păstrării peștelui, în timp ce *oxitetraciclina* poate fi utilizată în conservarea cărnii de pasăre *(Drugă, 2002).*

Atât *clortetraciclina* cât și *oxitetraciclina* pot fi identificate prin reacția cu *reactivul Sachaguchi*[8], modul de lucru fiind următorul *(adaptare după Drugă, 2002):* într-o cutie Petri de 9 cm se introduc 19 ml *reactiv Sachaguchi* și se acoperă cu o sită nr. 60. Se presară proba de analizat *(de exemplu, 0,5 g carne tocată)* pe suprafața sitei și ulterior se presează cu spatula în așa fel încât proba distribuită uniform să intre în contact cu suprafața lichidului. Se examinează conținutul cutiei Petri la microscopul stereoscopic la o putere de mărire de 150 ori, în prezența *clortetraciclinei* observându-se o colorație purpurie iar în prezența *oxitetraciclinei*, o colorație roșie.

7.3 Identificarea penicilinei cu hidroxid de potasiu și clorură ferică

Deasupra a 5 pahare de laborator, fiecare cu capacitatea de 250 ml, se așează câte o rondelă de hârtie de filtru în centrul căreia se depun două picături de soluție de hidroxid de potasiu 1% în metanol anhidru și apoi 10 picături de clorură ferică 1% în metanol anhidru, saturat cu clorhidrat de hidroxilamină. Proba de analizat se presară deasupra hârtiei de filtru *(probe solide, de exemplu lapte praf)* sau se toarnă pe suprafața hârtiei de filtru *(probe lichide, de exemplu lapte).* Apariția unor spoturi trandafirii, pentru probele solide, sau colorarea în trandafiriu a hârtiei de filtru pe zone mai largi, în cazul probelor lichide, arată prezența *penicilinei* în proba de investigat *(adaptare după Butnariu, 2000).*

[8] Reactivul Sachaguchi se prepară prin dizolvarea a 5 g H_3BO_3 în 150 ml apă și adăugarea ulterioară a 350 ml H_2SO_4.

EXERCIȚII ȘI PROBLEME:

Problema 1: Grupați antibioticele din rândul 3 al tabelului pe coloanele rândului 2, conform clasificării învățate.

Betalactamice	Macrolide	False macrolide	Aminoglicozide	Tetracicline
Streptomicină, neomicină, kanamicină, gentamicină, tetraciclină, oxitetraciclină, clortetraciclină, peniciline, cefalosporine, eritromicină, spiramicină, oleandomicină, tilozină, rifamicine.				

Problema 2: Explicați de ce solul poate conține antibiotice în lipsa acțiunii antropice.

Problema 3: Enumerați cauzele de natură antropică ale îmbogățirii cu antibiotice a apelor și solurilor.

BIBLIOGRAFIE

1. Badea P., Georgescu D., 2003 – *Introducere în biostatistică,* Editura Medicală Universitară, Craiova;
2. Baloescu C., Curea E., 1983 – *Controlul medicamentelor,* Editura Didactică și Pedagogică, București;
3. Banu C., Bărascu E., Stoica A., Nicolau A., 2007 – *Suveranitate, securitate și siguranță alimentară,* Editura ASAB, București;
4. Banu C., Preda N., Vasu S.S., 1982 – *Produsele alimentare şi inocuitatea lor,* Editura Tehnică, Bucureşti;
5. Bara V., Laslo C., 1997 – *Elemente de ecotoxicologie și protecția mediului înconjurător,* Editura Universității, Oradea;
6. Berilă I., Prejbea I., Olteanu I., 2000 – *Inocuitatea alimentelor – promovare şi protecţie,* Editura Universitaria, Craiova;
7. Butnariu M., 2000 – *Metode de analiză a poluanţilor organici,* Editura Solness, Timişoara;
8. Butnariu M., Goian M., 2005 – *Metalele grele din solurile Banatului şi biomonitorizarea lor,* Editura Orizonturi Universitare, Timişoara;
9. Cordoș E., Frențiu T., Ponta M., Rusu A.M., Fodor A., 1998 – *Analiza prin spectrometrie atomică,* Institutul Național de Optoelectronică, București;
10. Cotrău M., Proca M., 1988 – *Toxicologie analitică,* Editura Medicală, Bucureşti;
11. Drugă M., 2002 – *Ghid practic de toxicologie agroalimentară,* Editura Mirton, Timişoara;

12. Dumitrescu V.Gh., Dumitrescu N., Varduca I., 2003 – *Analiza instrumentală. Aspecte teoretice și practice ale spectrometriei de absorbție atomică,* Editura Universității, București;
13. Duşa S., Foris I., László F., 1994 – *Analize instrumentale – lucrări practice,* Editura Universităţii de Medicină şi Farmacie, Târgu Mureş;
14. Enescu I., 1986 – *Intoxicaţii cu alimente de origine animală şi prevenirea lor,* Editura Ceres, Bucureşti;
15. Gothwal R., Shashidhar T., 2014 – *Antibiotic pollution in the environment: a review,* Clean – Soil, Air, Water, 42(9999):1-11;
16. Grădinaru A.C., 2010 – *Evaluarea reziduurilor de antibiotice și xenobiotice elementare în lapte și produse de lapte și a riscului lor pentru consumatori,* Teză de doctorat, UȘAMV Iași;
17. Grădinaru A.C., 2017 – *Antibiotics – between usefulness and factors of environmental pressure due to their residues in milk,* în: *Resilient society: Multidisciplinary contributions from economic, law, policy, engineering, agricultural and life sciences fields,* Editori: Ozunu A., Nistor I.A., Petrescu D.C., Burny P., Petrescu-Mag R.M., Les Presses Agronomiques de Gembloux, Belgium & Bioflux, România;
18. Grădinaru A.C., Solcan Gh., Guguianu E., Beşchea Chiriac S.I., 2016 – *Toxicologie şi toxiinfecţii alimentare,* Editura *„Ion Ionescu de la Brad”*, Iaşi;
19. Ivas E., Trincă L., Cura F., 2003 – *Tehnici de laborator în biochimia animală,* Editura Pim, Iaşi;
20. Jaba E., 2006 – *Bazele statisticii*, Editura Universităţii *„Al.I.Cuza”,* Iaşi;
21. Kriska G., 2013 – *Stoneflies – Plecoptera,* în: *Freshwater invertebrates in Central Europe,* Springer, Viena;
22. Maloș G., Maloș I.G., Diaconescu A., Ianițchi D., 2002 – *Procesarea laptelui și brânzeturile,* Editura UȘAMV, București;
23. Mănescu S., Cucu M., Diaconescu M.L., 1994 – *Chimia sanitară a mediului,* Editura Medicală, Bucureşti;
24. Melpomeni G., 1985 – *Premixurile în alimentaţia animalelor,* Editura Ceres, Bucureşti;

25. Mitrănescu E., Savu C., Porârlan N., Lupescu C., 1998 – *Din riscurile poluării mediului şi alimentelor,* Editura M.A.S.T., Bucureşti;
26. Neaţă G., 1994 – *Cercetări asupra poluării cu metale grele a arealelor agricole,* Teză de doctorat, Facultatea de Chimie Industrială, Universitatea Politehnică, Bucureşti;
27. Olinescu R., Greabu M., 1990 – *Mecanisme de apărare a organismului împotriva poluării chimice,* Editura Tehnică, Bucureşti;
28. Oprea L., 2007 – *Ecotoxicologie - Note de curs pentru studenţii de la specializarea Ingineria şi Protecţia Mediului în Industrie,* Editura Universității Dunărea de Jos, Galați;
29. Palmer C.M., 1969 – *A composite rating of algae tolerating organic pollution,* Journal of Phycology, 5(1):78-82;
30. Petrescu-Mag I.V., Oroian I.G., 2015 – *Elemente de ecotoxicologie, Manual didactic – Curs pentru studenţii de la specializarea Ingineria şi Protecţia Mediului,* Editura Bioflux, Cluj-Napoca, România;
31. Petrescu-Mag I.V., Păsărin B., Hoha G., Hărșan R., Odagiu A. M., 2011 – *New contributions to knowledge of embryonic malformations in guppies,* AACL Bioflux, 4(2):216-228;
32. Pikkmaat M.G., Yassin H., van der Fels-Klerx H.J., Berendsen B.J.A., 2016 – *Antibiotic residues and resistance in the environment,* Wageningen, RIKILT Wageningen UR (University & Research Centre), RIKILT report 2016.009;
33. Popa G., Segal B., Dumitrache S., Segal R., Apostol C., Teodoru V., 1986 – *Toxicologia produselor alimentare,* Editura Academiei, Bucureşti;
34. Popa G., Stănescu V., 1981 – *Controlul sanitar veterinar al produselor de origine animală,* Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti;
35. Popescu O., 1996 – *Toxicologia clinică veterinară și de diagnostic*, în: *Medicină Legală Veterinară,* vol. II, Enache T., Popescu O., Editura All, Bucureşti;
36. Popescu O., 1997 – *Toxicologie analitică medico legală veterinară,* în: *Medicină Legală Veterinară,* vol. I, Enache T., Paul I., Popescu O., Stănescu V., Iordache I, Editura All, Bucureşti;

37. Popowska M., Miernik A., Rzeczycka M., Lopaciuk A., 2010 – *The impact of environmental contamination with antibiotics on levels of resistance in soil bacteria,* J. Environ. Qual., 39:1679-1687;
38. Proca M., Butnaru E., Agoroaei L., 1996 – *Lucrări practice de toxicologie,* Fascicola I, Centrul de multiplicare al Universităţii de Medicină şi Farmacie, Iaşi;
39. Răuţă C., Cârstea S., 1983 – *Prevenirea şi combaterea poluării solului,* Editura Ceres, Bucureşti;
40. Râpeanu M.D., 1975 – *Toxice și toxine din alimente și furaje,* Editura Ceres, București;
41. Râpeanu M.D., 1979 – *Prevenirea acțiunii factorilor poluanți asupra animalelor și produselor de origine animală,* Editura Ceres, București;
42. Râpeanu M.D., 1983 – *Toxicologie sanitară veterinară,* Editura Ceres, București;
43. Roman L., Bojiță M., Săndulescu R., 1998 – *Validarea metodelor de analiză și control*, Editura Medicală, București;
44. Rotaru O., Guş C., Mihaiu M., 1997 – *Introducere în controlul sanitar veterinar al igienei produselor de origine animală,* Editura Genesis, Cluj-Napoca;
45. Rotaru O., Mihaiu M., 2002 – *Igiena veterinară a produselor alimentare – patologie prin alimente,* Editura Todesco, Cluj-Napoca;
46. Savu C., Georgescu N., 2004 – *Siguranţa alimentelor: riscuri şi beneficii,* Editura Semne, Bucureşti;
47. Savu C., Petcu C., 2002 – *Igiena și controlul produselor de origine animală,* Editura Semne, București;
48. Solcan Gh., Beşchea Chiriac I.S., 2005 – *Toxicologie veterinară – manual practic,* Editura Tehnopress, Iaşi;
49. Stănescu V., Enache T., 1997 – *Expertiza și contraexpertiza medicolegală veterinară a alimentelor de origine animală suspecte de fraudare sau depreciere,* în: *Medicină legală veterinară,* Vol.I, Enache T., Paul I., Popescu O., Stănescu V., Iordache I., Editura All, București;
50. Todoran F.C., Petrescu-Mag I.V., Todea A.D., 2010 – *Two ways of environmental monitoring of heavy metals from air: native and*

transplanted lichens, Metalurgia International, 15 (Special Issue 9):49-51;

51. Tofan C., 2001 – *Igiena şi securitatea produselor alimentare,* Editura Agir, Bucureşti;
52. Winter-Sorkina R., Bakker M.I., van Donkersgoed G., van Klaveren J.D., 2003 – *Dietary intake of heavy metals (cadmium, lead and mercury) by the Dutch population,* RIVM report 320103001;
53. Yuan J., Zhang X., Yu L.C., Sun Z.Q., Zhu P., Wang X., Shi, H., 2011 – *Stage-specific malformations and phenotypic changes induced in embryos of amphibian (Xenopus tropicalis) by triphenyltin,* Ecotoxicology and Environmental Safety, 74(7):1960-1966;
54. Zamfir Gh., 1979 – *Efectele unor poluanţi şi prevenirea lor,* Editura Academiei, Bucureşti;
55. *** Commission Regulation (EC) no. 1881/2006 of 19 December 2006 *setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs,* Official Journal of European Union, L364, 5-24;
56. *** Council Regulation 2377/90, 1990 – *Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin,* Official Journal of the European Communities, L 224, p.1-8;
57. *** Ordin al Ministrului Agriculturii, Alimentației și Pădurilor pentru *aprobarea Normei sanitară veterinară privind limitele maxime stabilite pentru reziduuri de pesticide, reziduuri de medicamente de uz veterinar și pentru alți contaminanți în produsele de origine animală,* Monitorul Oficial 812/18.12.2001;
58. *** Ordin ANSVSA nr. 82, 2005 – *Aprobarea normei sanitare veterinare privind măsurile de supraveghere şi control al unor substanţe şi al reziduurilor acestora la animalele vii şi la produsele lor, precum şi al reziduurilor de medicamente de uz veterinar în produsele de origine animală,* Monitorul Oficial, Partea I, nr. 832;
59. *** Ordin M.S. nr. 611, 1995 – *Aprobarea normelor de igienă privind alimentele şi protecţia sanitară a acestora*, Monitorul Oficial, nr. 59 bis/1996;
60. *** Ordin M.S. nr. 975, 1998 – *Aprobarea normelor igienico-sanitare pentru alimente*, Monitorul Oficial, Partea I, nr. 268/1999;

61. https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/170615-0 [Accesat în data de 27.08.2018];
62. http://www.foodstandards.gov.au/consumer/chemicals/maxresidue/pages/default.aspx [Accesat în data de 27.08.2018];
63. *https://www.flickr.com/photos/79173595@N07/7088327651*
64. *https://naturalhistory.museumwales.ac.uk/diatoms/browsespecies.php?-recid=2435*
65. *http://www.dr-ralf-wagner.de/Gruenalgen-englisch.html*
66. *http://ccala.butbn.cas.cz/en/oscillatoria-limosa-c-agardh-0*
67. *https://www.flickr.com/photos/entomopixel/15591666129*
68. *http://nathistoc.bio.uci.edu/crustacea/Amphipoda/Amphipod2.htm*
69. *http://lakes.chebucto.org/ZOOBENTH/BENTHOS/vii.html*
70. *https://6legs2many.wordpress.com/category/insects/odonata/anisoptera/libellulidae/*
71. *http://www.polarlife.ca/organisms/inverts/marine_inverts/oligochaetes.htm*
72. *https://genent.cals.ncsu.edu/insect-identification/order-diptera/family-chironomidae/*
73. *https://www.liveaquaria.com/product/3680/glofish-danio-assorted-10-pack?pcatid=3680&c=830+3590+3680*
74. *http://freebigpictures.com/plants-pictures/xanthoria-parietina/*
75. *http://www.stridvall.se/lichens/gallery/Physcia/NIKA7110*
76. *http://www.biowin.at/index.htm?/all/systematik/Eucarya/Opisthokonta/Fungi/Ascomycota/Lecanoromycetes/Lecanorales/Parmeliaceae/Pseudevernia%20furfuracea/Pseudevernia%20furfuracea.htm*
77. *http://www.britishlichens.co.uk/pictureindexcomplete.html*
78. *http://www.acvariu.ro/ciclul-azotului*

ACTE NORMATIVE CARE REGLEMENTEAZĂ ACTIVITATEA DE PROTECŢIE A MUNCII ÎN ÎNVĂŢĂMÂNT

1. Legea Protecţiei Muncii nr. 90/1996, Emitent: Parlamentul României, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 157 din 23 iulie 1996, republicată în Monitorul Oficial nr 47 din 29 ianuarie 2001.

2. Hotărârea nr. 1425/2006 pentru aprobarea Normelor metodologice de aplicare a prevederilor Legii securității și sănătății în muncă nr. 319/2006, publicată în Monitorul Oficial, Partea I, nr. 882/2006 din 30 octombrie 2006.

3. Norme Specifice de Securitate a Muncii nr. 36 pentru laboratoare de analize fizico chimice si mecanice, aprobate prin Ordin nr. 339/16.08.1996 al Ministerului Muncii și Protecției Sociale, publicate în Monitorul Oficial, nr. 200/27.08.1996.

4. Norme Specifice de Securitate a Muncii nr. 37 pentru prelucrarea automată a datelor, aprobate prin Ordin nr. 310/07.08.1996 al Ministerului Muncii și Protecției Sociale, Publicate în Monitorul Oficial, nr.188/13.08.1996.

5. Norme Specifice de Securitate a Muncii nr. 57 pentru manipularea, transportul prin purtare şi cu mijloace mecanizate şi depozitarea materialelor, aprobate prin Ordin nr. 719/7.10.1997 al Ministerului Muncii și Protecției Sociale, Publicate în Monitorul Oficial, nr. 280/16.10.1997.

6. Norme Specifice de Securitate a Muncii nr. 111 pentru utilizarea energiei în medii normale, aprobate prin Ordin nr. 463/12.07.2001 al Ministerului Muncii și Protecției Sociale, Publicate în Monitorul Oficial, nr. 557/07.09.2001.

7. Norme Specifice de Securitate a Muncii pentru diverse activităţi specifice din agricultură, construcţii, transporturi, sectorul sanitar etc

8. Hotărârea de Guvern nr. 971 din 26 iulie 2006 privind cerinţele minime pentru semnalizarea de securitate și/sau de sănătate la locul de muncă, publicată în Mnitorul Oficial nr. 683 din 9 august 2006

INDEX FIGURI

Fig.1: Reprezentarea schematică a procesului biomagnificării în ecosistemul marin..... 12
Fig. 2: Graficul metodei curbei etalon pentru calcularea DL_{50} 36
Fig.3: Alge utilizate în determinarea calității apei..... 43
Fig.4: Nevertebrate acvatice bioindicatoare utilizate în ecotoxicologie 44
Fig.5: Pești zebra transgenici fluorescenți, utilizați în detectarea unor poluanți 46
Fig.6: Varietăți coloristice întâlnite la peștii guppy..... 47
Fig.7: Ipostaza coloristică feminină și, respectiv, masculină, ale aceluiași individ, într-un experiment efectuat în cadrul laboratorului *Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj* 48
Fig.8: Varietatea *Red Blond* de pești guppy cu un colorit favorabil unor studii legate de efectul unor disruptori xenoestrogeni..... 49
Fig.9: Malformație somatică la peștii guppy 49
Fig.10: Efecte teratogene la guppy analoage cu *Parapagus diprosopic (un corp, un cap, două fețe)* 50
Fig.12: Efecte teratogene la guppy analoage cu *ischiopagus (analog gemenilor uniți la nivelul pelvisului)*..... 51
Fig.13: *Xiphopagus* născuți vii și inițial relativ egali ca mărime, cu involuția în timp a geamănului pasiv analog fenomenului *„geamăn parazit”*..... 51
Fig.14: Malformații specifice fiecărui stadiu de dezvoltare produse de toxicul triphenyltin la *Xenopus tropicalis* 52
Fig.15: *Xanthoria parietina* și *Physcia stellari)* 54
Fig.16: *Pseudevernia furfuracea* și *Cladonia* sp. 54
Fig.19: Schema generală a unui spectrofotometru de absorbție 90
Fig.20: Mod de aranjare pe cromatoplacă a spoturilor de probe și etalon 99
Fig.21: Aspectul unui tanc de developare folosit în cromatografia în strat subțire 100

INDEX TABELE

Tabel 1: Multipli zecimali ai unităţii de masă – *gram* 15
Tabel 2: Multipli zecimali ai unităţii de masă – *litru* 16
Tabel 3: Conversia *ppm* în *concentraţie procentuală (%)* pentru soluţii cu $\rho=1$ 17
Tabel 4. Niveluri de reprezentativitate ale mediei aritmetice prin calcularea coeficientului de variație 20
Tabel 5: Valorile critice ale distribuţiei *t – Student* cu V grade de libertate 22
Tabel 6: Limitele maxime admise şi dozele zilnice acceptabile ale reziduurilor de metale grele 25
Tabel 7: Limitele maxime admise şi dozele zilnice acceptabile ale reziduurilor de nitraţi (NO_3^-) şi nitriţi (NO_2^-) 28
Tabel 8: Limite maxime admise ale reziduurilor unor pesticide în produse de origine animală 29
Tabel 9: Limite maxime admise ale reziduurilor unor antibiotice în produse de origine animală 31
Tabel 10: Rezultatele experimentului de testare a toxicității veninului de taipan 35
Tabel 11: Valorile DE_{50} și DL_{50} pentru aspirină, ibuprofen și cafeină, în vederea calculării *indicelui terapeutic (IT)* 37

Director editură: Ioan Valentin PETRESCU-MAG
Consilier editorial: Ruxandra Mălina PETRESCU-MAG
Tehnoredactor: Andrei Cristian GRĂDINARU, Ioan Valentin PETRESCU-MAG
Corector: Bogdan GEORGESCU, Antonia ODAGIU
Grafică și desene: Cătălina Mihaela GRĂDINARU
Coperta: Cătălina Mihaela GRĂDINARU

Bun de tipar: decembrie 2018
Apărut: decembrie 2018
Editura: „Bioflux" Cluj-Napoca
Strada Ceahlău, nr. 54, 400488
Tel.: +40 744 470794
E-mail: zoobiomag2004@yahoo.com

ISBN 978-606-8887-41-8