

**UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE
Departamentul de Biologie Moleculară și Biotehnologie**

**STUDII ASUPRA MICORIZELOR
LA ORHIDEE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Crina Claudia MOCAN

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:
Prof. univ. dr. MIHAIL DRĂGAN-BULARDA**

**CLUJ-NAPOCA
2013**

CUPRINS

INTRODUCERE	5(6)
Cap.I. SIMBIOZA MICORIZANTĂ	11(7)
I.1. Morfologia noțiunii, definiția și caracteristicile micorizelor	11
I.2. Aspecte ale evoluției și istoricul studiului micorizelor	11
I.3. Clasificarea micorizelor	14
I.3.1. Ectomicorizele	15
I.3.2. Endomicorizele	15
I.3.2.1. Endomicorizele vezicular-arbusculare	16
I.3.2.2. Endomicorizele ericoide	17
I.3.2.3. Endomicorizele orhidoide	17
I.3.3. Ectoendomicorizele	18
I.3.4. Micoriza peritrofă	19
I.4. Particularitățile micorizelor la <i>Orhidaceae</i>	19
I.5. Distribuția și habitatele orhideelor	27
I.6. Incidența grupului <i>Rhizoctonia</i> în micoriza la orhidee	28
I.7. Rolul micorizelor în viața plantelor	30
I.7.1. Beneficii pentru plante	30
I.7.2. Rol în ecosistem	31
I.7.3. Importanța pentru oameni	32
I.8. Studii efectuate asupra micorizelor în România	33
Cap.II. ELEMENTE DE ECOLOGIE MICROBIANĂ	34(7)
II.1. Interacțiunea fungilor de micorize cu bacteriile din sol	34
II.2. Stimularea creșterii plantelor prin prezența bacteriilor	36
II.3. Interacțiunile fizice dintre bacterii și fungii de micorize	37(7)
II.4. Îmbunătățirea disponibilității azotului prin relația fungi-bacterii	38
II.5. Îmbunătățirea disponibilității fosforului prin relația fungi-bacterii	40
II.6. Bacterii endosimbionte în fungi micorizanți	40
II.7. Impactul relației fungi de micorize-activități enzimatică asupra Solurilor	42

II.8. Perspective de viitor asupra relației fungi-bacterii	46(8)
Cap.III. MATERIALE ȘI METODE	49
III.1. Materiale și metode utilizate în studiul identificării prezenței micorizelor la Orhidee.....	49(8)
III.1.1. Microscopie electronică de transmisie (TEM).....	55
III.1.2. Microscopie electronică de baleaj (SEM).....	55
III. 2.Materiale și metode utilizate în studiile de microbiologia solului.....	56(9)
III.2.1. Prelevarea și prelucrarea probelor.....	56
III.2.1.1.Prelevarea probelor.....	56(9)
III.2.1.2. Prelucrarea probelor pentru analize.....	57
III.2.1.3. Tehnica efectuării diluțiilor.....	57
III.2.2. Metode de analiză chimică a probelor de sol.....	58(9)
III.2.2.1. Metoda potențimetrică de măsurare a reacției solului	58
III.2.2.2. Metoda de măsurare a conductivității.....	60
III.2.2.3. Metoda Walkley-Black de determinare a cantității de humus din sol.....	61
III.2.2.4. Metoda Kjeldahl de măsurare a azotului total.....	64
III.2.2.5. Metoda de măsurare a cantității de fosfor mobil	66
III.2.3. Metode enzimologice	68(10)
III.2.3.1. Metode enzimatic cantitative.....	68(10)
III.2.3.1.1. Determinarea activității dehidrogenazice actuale și potențiale	68(10)
III.2.3.1.2. Determinarea activității fosfatazice.....	70(10)
III.2.3.1.3. Determinarea activității catalazice	72(10)
III.2.3.2. Metode enzimatic calitative	73
III.2.3.2.1. Evidențierea activității unor oligaze și poliaze(polizaharidaze)	73
III.2.3.2.2. Determinarea indicatorului enzimatic al calității solului	77(10)
III.2.4. Metode microbiologice.....	78
III.2.4.1. Medii de cultură	78
III.2.4.2. Metode de cultivare a speciilor microbiene implicate în ciclul azotului în natură.....	82
III.2.4.3. Determinarea bacteriilor mezofile, heterotrofe aerobe	82
III 2.4.4. Determinarea bacteriilor amonificatoare	83

III 2.4.5. Determinarea bacteriilor nitrificatoare (nitrit- și nitratbacterii).....	84
III 2.4.6. Determinarea bacteriilor denitrificatoare	85
III.2.4.7. Determinarea indicatorului bacterian al calității solului	85
III 2.4.8. Metode de izolare a tulpinilor de <i>Azotobacter</i> din probele de sol	86
III.2.4.9. Calculul rezultatelor	87
III.3. Metode statistice	88(11)
Cap.IV. ASPECTE ALE PREZENȚEI MICORIZELOR LA ORHIDEE	91(11)
IV.1. Evidențierea micorizelor la orhideele luate în studiu	91(11)
IV.1.1. Concluzii parțiale.....	126
Cap.V. DATE MICROBIOLOGICE ASUPRA SOLURILOR CU	
ORHIDEE	127
V.1. Analiza chimică a probelor de sol.....	127
V.1.1. Stabilirea reacției solului și a conductivității.....	127
V. 1.2. Date privind cantitatea de humus din sol, a materiei organice, a cantității de azot total și fosfor din sol	128
V.2. Date referitoare la analizele enzimologice ale solurilor cu orhidee.....	130(14)
V.2.1. Determinarea activităților enzimatic cantitative.....	131
V.2.1.1. Evoluția activității dehidrogenazice actuale și potențiale	138(15)
V.2.1.2. Evoluția activității fosfatazice	140(16)
V.2.1.3. Evoluția activității catalazice	141
V.2.1.4. Stabilirea indicatorului enzimatic al calității solului (IECS).....	142(17)
V.2.2. Analizele enzimatic calitative	144(18)
V.2.2.1. Evidențierea activității unor oligaze și poliaze (polizaharidaze) din solurile studiate.....	144(18)
V.3. Analizele microbiologice.....	149(19)
V.3.1. Date privind abundența populațiilor microbiene implicate în ciclul biologic al azotului	150
V.3.1.1. Evoluția bacteriilor, mezofile heterotrofe aerobe	152
V.3.1.2. Evoluția bacteriilor amonificatoare	153
V.3.1.3. Evoluția bacteriilor nitrificatoare (nitrit- și nitratbacterii)	154
V.3.1.4. Evoluția bacteriilor denitrificatoare.....	156
V.3.2. Distribuția procentuală a grupelor de bacterii implicate în ciclul	

azotului după zonele de prelevare	158(21)
V.3.3. Stabilirea indicatorului bacterian al calității solului (IBCS)	162(24)
V.4. Izolarea tulpinilor de <i>Azotobacter</i> din probele de sol.....	164(24)
V.5. Izolarea și determinarea numărului fungilor din sol.....	168(25)
V.6. Concluzii parțiale	173
V.7. Interpretarea statistică a rezultatelor	176(26)
V.7.1. Testul Mann-Whitney.....	176(26)
V.7.2. Regresia logistică.....	190(29)
V.7.3. Concluzii parțiale	194
CONCLUZII.....	195(31)
BIBLIOGRAFIE.....	198(33)

INTRODUCERE

Fenomenul de simbioză, constituie un proces general și generalizat la nivelul întregii biosfere, care constă într-o relație de interdependență între indivizi din aceeași specie, între specii din același regn precum și între specii din regnuri diferite.

Pe parcursul evoluției lumii vii, viețuitoarele au intrat în legătură unele cu altele, reușind astfel să stabilească și să perfecționeze relații condiționate de factorii de mediu precum și de particularitățile morfo-fiziologice și biochimice ale fiecăruia.

În funcționarea ecosistemelor naturale și a celor modificate de om, un rol cheie îl joacă stabilirea de simbioze între plantele fotosintetizante și microorganismele din sol, în special cele situate în zona rizosferei.

Având în vedere faptul că studii asupra genurilor și speciilor de orhidee native sau cultivate nu sunt numeroase la noi în țară, cu atât mai mult nici studii asupra simbiozei care o realizează aceste plante cu fungi specifici de micorize, am fost motivată să studiez prezența acestei relații între cele două tipuri de organisme unul considerat inferior (fungii), iar celălalt superior, dintre plantele cele mai evaluate (angiosperme, monocotiledonate).

De asemenea ne-am propus să clarificăm, cel puțin în parte, microbiota unor soluri în care se dezvoltă orhidee. Pentru aceasta am ales 5 zone de prelevare a probelor, trei dintre ele fiind zone unde sunt prezente orhidee iar alte două reprezintă soluri în care orhideele lipsesc.

Tema a fost aleasă deoarece nu există date privind corelația dintre fungi de micorize-orhidee și natura solurilor specifice diverselor zone populate de aceste plante. Până în prezent nu au fost studiate nici procesele enzimatică din aceste soluri care fac posibilă aprecierea evoluției acestor tipuri de sol.

În acest context principalele obiective au fost următoarele:

Caracterizarea chimică a solurilor provenite din diverse zone populate de orhidee;

Evaluarea activităților enzimatică din solurile respective (prin evidențierea cantitativă și calitativă a unor activități enzimatică) cu scopul de a aprecia evoluția solurilor respective;

Stabilirea abundenței, densității, diversității și semnificației ecologice a bacteriilor implicate în ciclul biogeochimic al azotului (heterotrofe aerobe, amonificatoare, nitrificatoare, denitrificatoare, fixatoare de azot) din probele de sol în raport cu factorii de mediu;

Determinarea indicatorului enzimatic al calității solului (IECS) și a indicatorului bacterian al calității solului (IBCS), aceștia permițând compararea și ierarhizarea probelor analizate;

Determinarea principalelor grupe de fungi în solurile cu orhidee comparativ cu cele lipsite de orhidee;

Relația dintre IECS și IBCS în solurile cu orhidee

Analiza statistică a parametrilor enzimologici studiați, pentru a observa modalitatea în care aceștia pot influența prezența orhideelor în solurile analizate.

Prin studiile întreprinse de noi pentru prima dată în țară noastră, am dorit să evidențiem prezența micorizelor la orhidee și de asemenea să efectuăm studii de ecologie microbiană a solurilor în care se dezvoltă aceste micorize. Aceste microorganisme aplicate pe soluri sărace în substanțe organice sporesc aprovizionarea plantelor cu substanțele nutritive de care au nevoie, astfel încât, sunt considerate adevărați biofertilizatori ai solului.

I. SIMBIOZA MICORIZANTĂ.

Micorizele sunt rezultatul unor asociații simbiotice, care se realizează între rădăcinile majorității plantelor și fungi specifici, pe parcursul perioadelor lor de creștere.

Acest tip de asociații sunt relații mutuale complexe care servesc la optimizarea rezervei de substanțe minerale pentru planta gazdă și oferă compuși organici și adăpost ecologic pentru fungi.

Simbioza micorizantă ca relație mutuală aduce avantaje ambelor organisme implicate în această relație.

Micorizele diferă, în funcție de morfologia, fiziologia, ecologia și taxonomia partenerilor, care manifestă un înalt grad de specificitate, astfel existând: ectomicorize, endomicorize, ectendomicorize și micorize peritrofe [Zamfirache și Toma, 2000].

Endomicorizele sunt caracterizate de faptul că fungii sunt capabili de penetrarea celulelor radiculare ale plantei gazdă fără ca aceasta să reacționeze în vreun fel la invazia ciupercii [Zamfirache și Toma, 2000].

Grupul endomicorizelor se divide în trei subgrupe, acele ale micorizelor ericoide, micorizele orhideelor și micorizele vezicular - arbusculare.

II. ELEMENTE DE ECOLOGIE MICROBIANĂ.

II.3. Interacțiunile fizice dintre bacterii și fungii de micorize.

Numeroase rizobacterii s-au dovedit a fi excelenți colonizatori ai rădăcinilor [Lugtenberg și Dekkers, 1999; Barea și colab.,2002], proces influențat de o serie de factori externi care joacă un rol

important în interacțiunile fizice dintre aceste bacterii și rădăcinile plantelor [Bianciotto și Bonfante, 2002]. Mai multe bacterii s-au dovedit a fi buni colonizatori ai rădăcinilor, spre exemplu, unele specii de *Pseudomonas*, care sunt capabile să adere de suprafețele hifelor fungice.

Un beneficiu al acestei legături bacterii-hife fungice micorizante este faptul că se facilitează unele interacțiuni metabolice, precum schimbul de nutrienți și de carbon, aceasta datorită contactului strâns între bacterii și partenerii lor fungici.

II.8. Perspective de viitor asupra relației fungi-bacterii.

Rizobacteriile pot îmbunătăți creșterea plantelor, fixarea azotului, producerea de hormoni, nutriția plantelor și, de asemenea, controlul bolilor la plante. Diferite rizobacterii precum *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* și *Enterobacter* au fost folosite pentru efectele lor benefice asupra creșterii plantelor [Kloepper și colab., 1992, Hoßlich și colab., 1994]. Mulți biofertilizatori se bazează în principal pe rizobacterii, care exercită efecte benefice asupra dezvoltării plantelor, de multe ori legate de creșterea disponibilității nutrienților pentru plante [Vessay, 2003].

Interacțiunile sinergice dintre fungi de micorize și bacterii fixatoare de azot, cum ar fi *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum* spp. și *Acetobacter diazotrophicus* au fost studiate de către Suresh și Bagyaraj, [2002]. Atât fungii de micorize cât și rizobacteriile se completează reciproc în rolul lor de fixare a azotului, producției de fitohormoni, solubilizarea fosforului și creșterea suprafeței de absorbție.

III. MATERIALE ȘI METODE.

III.1. Materiale și metode utilizate în studiul identificării prezenței micorizelor la orhidee.

Materialul vegetal utilizat în realizarea cercetărilor a fost reprezentat de rădăcinile a 6 specii de orhidee, din care 3 aparțin florei țării noastre iar alte 3 sunt plante care se cultivă de mulți ani în serele Grădinii botanice „Al.Borza” din Cluj-Napoca.

Toate speciile de orhidee din lume, la ora actuală se bucură de un statut special, statut protectiv conferit de prezența lor pe lista CITES, sau care împiedică comerțul cu plante luate din natură, din locul de origine și limitează chiar și schimburile de semințe pentru unele specii foarte rare sau pe cale de dispariție [Convention on International Trade in Endangered Species of wild fauna and flora – on line, conventions.coe.int. – on line, O.G., 2000].

Dintre orhideele din flora României am luat în studiu următoarele trei specii: *Cypripedium calceolus* L., *Dactylorhiza fuchsii* (Druce)Soó și *Epipactis palustris* (L.)Crantz. Specii din serele Grădinii botanice au fost reprezentate de *Paphiopedilum insignae*, *Anoectochilus regalis* și *Epidendrum radicans*. Probele luate în studiu au fost supuse atât observațiilor la microscopul optic cât și unor analize la microscopul electronic.

III. 2. Materiale și metode utilizate în studiile de microbiologia solului.

Zonele de prelevare a probelor de lucru au fost următoarele: Valea Morii, sol Grădina botanică cultivat cu *Cypripedium*, sol sere cultivat cu orhidee, sol pajiște de la Chinteni și sol sere necultivat cu orhidee. Ultimele două soluri au servit ca probe martor, în acestea nefiind prezente orhideele.

III. 2.1.1. Prelevarea probelor.

Prelevarea probelor de sol destinate diverselor analize s-a realizat conform normelor metodologice prevăzute în "Ghidul pentru prelevare a probelor de sol" (SR ISO 10381-2/2002) și au fost prelucrate în conformitate cu normele standardului SR ISO 10381-6/1993.

Probele au fost prelevate cu ajutorul unui probator și cu o spatulă sterilă și au fost puse în pungi sterile cu închidere ermetică. Pe fiecare pungă care cuprindea proba de sol s-a atașat câte o etichetă pe care s-a notat locul de unde s-a făcut prelevarea, ziua și ora prelevării, adâncimea de la care s-a efectuat prelevarea.

III.2.2. Metode de analiză chimică a probelor de sol.

Analiza agrochimică a solului se face în scopul caracterizării (aprecierii) stării de fertilitate a solurilor, a stabilirii necesarului de elemente nutritive și chiar pentru stabilirea gradului de poluare al solului. Se apreciază că humusul și formele mobile (accesibile) ale macro- și microelementelor din sol pot da o imagine satisfăcătoare a stării generale a solurilor.

III.2.3. Metode enzimologice.

III.2.3.1. Metode enzimatică cantitative au constat în desfășurarea următoarelor etape:

III.2.3.1.1. Determinarea activității dehidrogenazice actuale și potențiale, utilizată ca indicator global al activității biologice a organismelor dar a fost folosită și ca test ecotoxicologic pentru a evalua efectele poluanților asupra microbiotei solului.

III.2.3.1.2. Determinarea activității fosfatazice.

Fosforul este unul dintre nutrienții esențiali pentru creșterea plantelor. În circuitul acestui element, formele anorganice și organice sunt asociate prin procese de mineralizare și imobilizare, mediate de activități abiotice și biotice. În procesele de mineralizare, fracțiunile organice de fosfor, care reprezintă o cantitate mare a fosforului în sol și sedimente, sunt transformate în forme anorganice ce sunt utilizate de obicei de plante, ca rezultat al acțiunii fosfatazelor [Gianfreda și Bollag, 1996].

III.2.3.1.3. Determinarea activității catalazice.

Activitatea catalazică se determină exprimând intensitatea de descompunere a apei oxigenate care se formează în procesul respirației microorganismelor aerobe. Catalazele se găsesc în aproape toate celulele animale și în cantități mai mici la plantele superioare. În cazul microorganismelor, catalazele se regăsesc numai în cele aerobe [Regelsberger și colab., 2002].

III.2.3.2.2. Determinarea indicatorului enzimatic al calității solului.

Determinarea activităților enzimatică în sol constituie un instrument de cercetare pentru a evalua procesele biochimice din aceste medii naturale și pentru găsirea unor indicatori ai calității solurilor [Drăgan-Bularda și colab., 2004].

Cu cât indicatorul enzimatic este mai mare, cu atât mai mare este potențialul enzimatic al solului. Indicatorul enzimatic al calității solului (IECS) oferă o imagine de ansamblu asupra potențialului enzimatic al acestuia, fiind calculată pe baza unei formule de calcul elaborată de Muntean și colab.[1996]:

$$IECS = \frac{I}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \frac{V_r(i)}{V_{\max}(i)}$$

unde: IECS = indicatorul enzimatic al calității solului;

n = numărul activităților;

$V_r(i)$ = valoarea reală individuală;

$V_{\max}(i)$ = valoarea teoretică maximă individuală.

III.2.4.7. Determinarea indicatorului bacterian al calității solului.

Indicatorul bacterian al calității solului permite stabilirea globală a abundenței microorganismelor din sol, aprecierea potențialului microbial al solurilor, stabilirea variațiilor sezoniere ale microorganismelor, estimarea calității biologice a unor habitate terestre.

Determinarea indicatorului bacterian al calității solului (IBCS) se realizează pe baza formulei de calcul propusă de Muntean [1995-1996]:

$$IBCS = \frac{1}{n} \cdot \sum \log_{10} N$$

unde: IBCS – indicatorul bacterian al calității solului;

n – numărul grupelor ecofiziologice de bacterii;

N – numărul de bacterii aparținând fiecărui grup ecofiziologic.

III.3. Metode utilizate în interpretarea statistică a rezultatelor: au fost folosite două teste și anume Testul Mann-Whitney și Regresia logistică [Wilcox, 2009].

IV. REZULTATE ȘI DISCUȚII.

IV.1. Evidențierea micorizelor la orhideele luate în studiu.

În figura 23 observăm cum hifele fungice străbat perișorii absorbanți ai rădăcinii speciei *Anoectochilus regalis*. Stratul rizodermei nu este foarte bine definit în această imagine deoarece există numeroase resturi de sol care aderă foarte bine de celulele rizodermale. Imaginea demonstrează și faptul că principala cale de intrare în contact a hifelor de funghi cu cortexul radicular îl reprezintă perișorii absorbanți.



Fig.23. Secțiune transversală prin rădăcina de *Anoctochilus regalis* (40x), necolorată
(foto C. Mocan)

În figura 25 secțiunea fiind realizată prin rădăcina unei orhidee terestre, lipsește velamen radicum (tipic pentru cele cu rădăcinile aeriene), se poate observa rizoderma nestratificată care se continuă cu exoderma, se văd celulele alungite cu multe îngroșări de suberină. În primele straturi ale scoarței se observă incluziuni ce par a fi de natură lipidică după culoarea maronie, dar care sunt resturi ale hifelor miceliene digerate prin fenomenul de talyphopagie (fig. 26, 38) [Zamfirache și Toma, 2000].

Ceea ce se vede excelent aici este endoderma, se văd pereții tangențiali externi care rămân celulozici, iar ceilalți se impregnează cu lignină (îngroșările sub formă de potcoavă). Din loc în loc, de regulă în dreptul fasciculelor lemnoase, se văd celulele de pasaj (celule care rămân cu pereți celulozici, iar seva elaborată circulă și prin difuziune spre celulele scoarței). Se văd excepțional fasciculele lemnoase cu metaxilemul spre centrul cilindrului central iar razele medulare sunt puternic lignificate spre exterior, dar măduva din centrul cilindrului central rămâne celulozică.

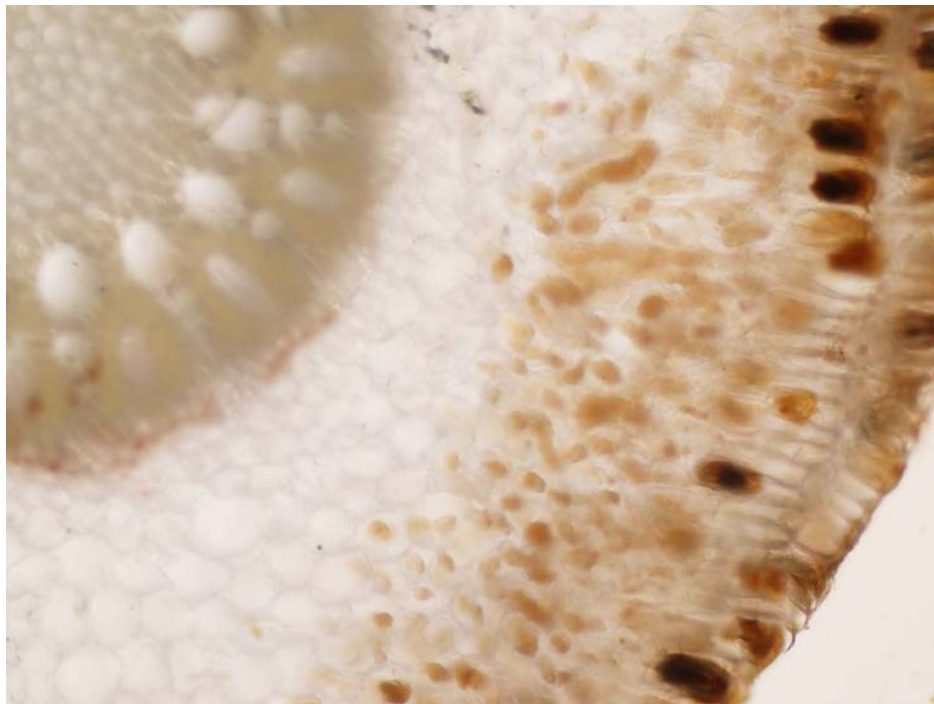


Fig.25. Secțiune transversală prin rădăcina de *Cypripedium calceolus* (20x), necolorată
(foto C. Mocan);

săgeata galbenă- pelotoni în celule corticale

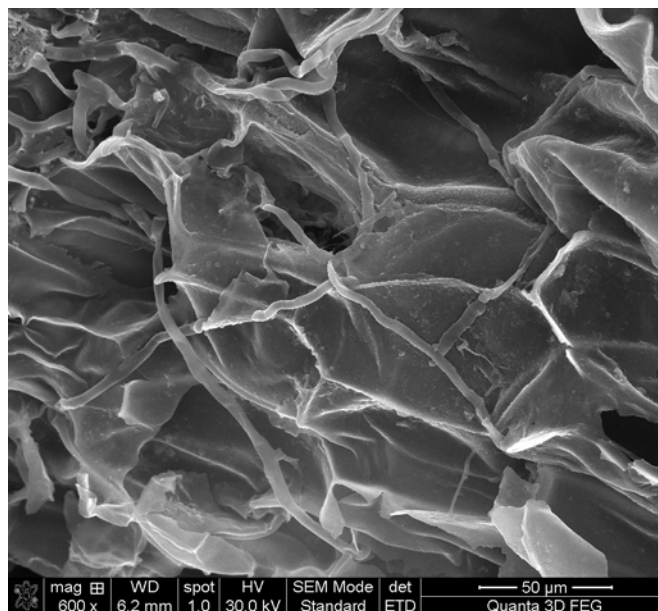


Fig.53. Hife septate pe suprafața externă a celulelor radiculare (foto C. Mocan)

Observațiile făcute asupra micorizelor la microscopul electronic de tip SEM sunt prezentate în figurile 50, 51, 52 și 53.

În ultimele două figuri se observă cum hifele pătrund în celulele radiculare (fig.52), precum și faptul că prezintă ramificații la 90° (fig.53).

Analizarea preparatelor la microscopul electronic de transmisie a pus în evidență prezența hifelor miceliene micorizante în interiorul celulelor corticale, hife aflate în diverse faze de dezvoltare. Tot imaginile TEM au relevat și prezența de bacterii endofite în interiorul celulelor radiculare, bacterii care au pătruns aici odată cu fungii micorizanți.

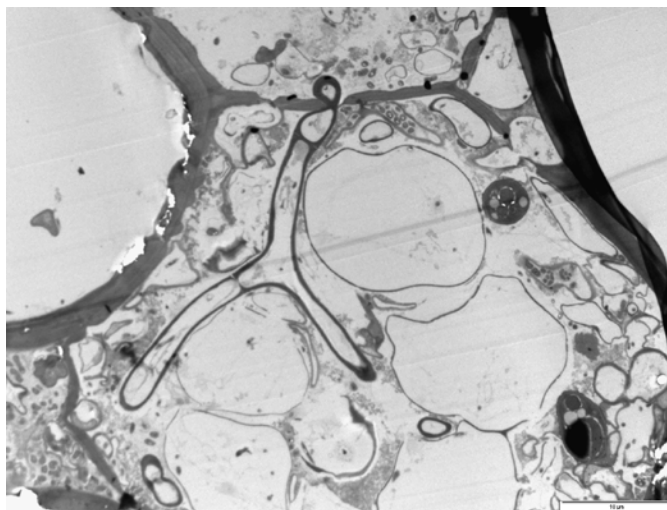


Fig. 54. Hifă septată în interiorul celulelor corticale (foto C. Mocan)

Celula scoarței radiculare din imaginea prezentată în figura 54 este invadată de hife fungice de mărimi diferite, la unele putându-se observa septarea acestora. De asemenea, se observă peretele celular care prezintă punctuațiuni.

V.2. Date microbiologice asupra solurilor cu orhidee.

În cele 5 probe de sol au fost determinate cantitativ următoarele activități enzimatiche: activitatea dehidrogenazică actuală (ADA) (reducerea clorurii de 2,3,5-trifeniltetrazoliu-TTC în probe fără adaos de glucoză) și potențială (ADP) (cu adaos de glucoză), activitatea fosfatazică (AF) și activitatea catalazică (AC). Datorită faptului că diversele probe de sol pot avea un conținut variabil de apă, care ar influența exprimarea activităților enzimatiche raportate la greutatea solului, s-a procedat la determinarea umidității și la stabilirea substanței uscate în paralel cu pregătirea probelor pentru analize [Atlas, 2004, Cușa, 1996].

V.2.1.1. Evoluția activității dehidrogenazice actuale și potențiale.

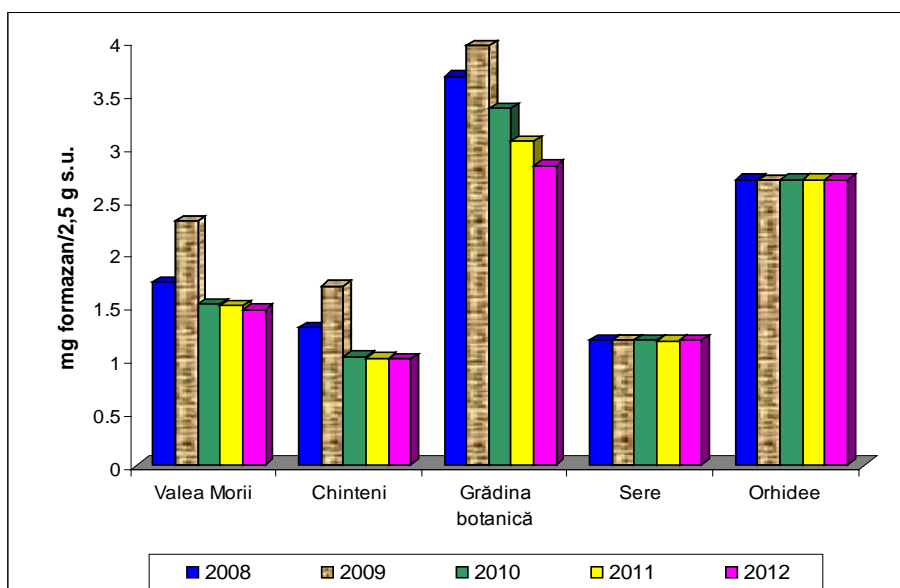


Fig.66. Evoluția activității dehidrogenazice actuale (ADA) (mg formazan/g s.u.) înregistrată în solurile analizate, în perioada 2008-2012.

Per ansamblu, activitatea dehidrogenazică potențială s-a dovedit a fi mult mai intensă decât activitatea dehidrogenazică actuală. Acest fapt reflectă acțiunea stimuloare a sursei de carbon (glucoza adăugată) asupra sintezei de enzime de către microorganisme.

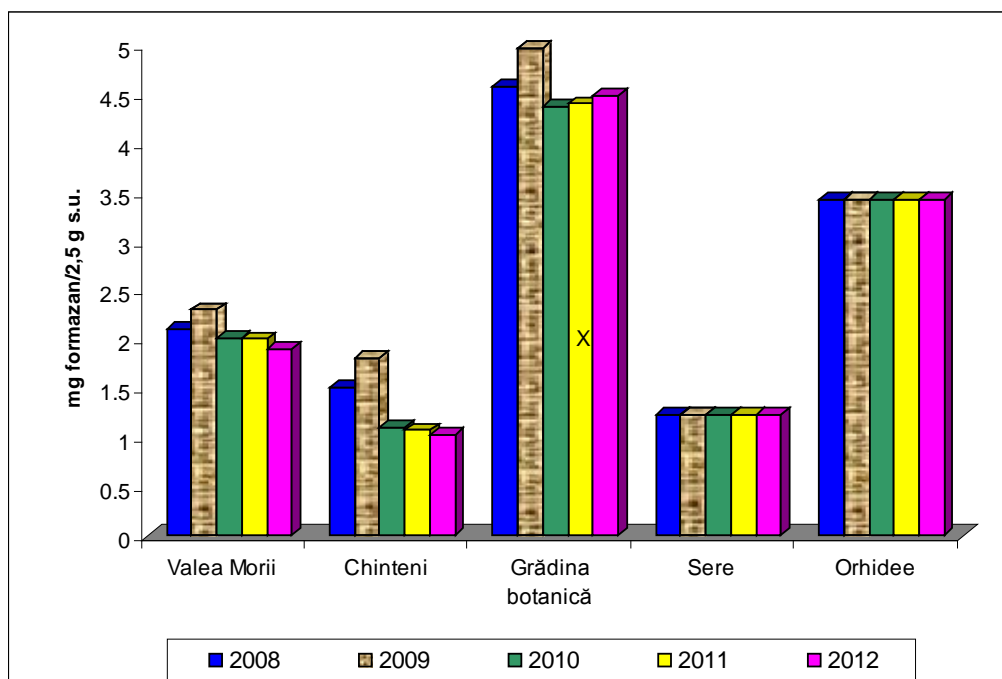


Fig. 67. Evoluția activității dehidrogenazice potențiale (ADP) (mg formazan/g s.u.) înregistrată în solurile analizate

La fel ca și în cazul activității dehidrogenazice actuale, activitatea dehidrogenazică potențială a prezentat valori mari în probele de sol cultivate cu orhidee, comparativ cu celelalte probe analizate.

Și de această dată cele mai ridicate valori s-au înregistrat în probele de sol cultivat cu orhidee, solul din Grădina botanică și cel din Valea Morii.

Totuși este de remarcat faptul că valorile activității dehidrogenazice toată înregistrate sunt relativ mai scăzute comparativ cu solurile agricole, ceea ce demonstrează existența unui potențial microbial mai scăzut în solurile analizate nesupuse unor fertilizări organice și/sau minerale.

V.2.1.2. Evoluția activității fosfatazice.

Activitatea fosfatazică a fost detectată în toate cele 5 probe de sol analizate, distribuțiile valorilor medii fiind ilustrate în tabelele 8, 9, 10, 11, 12 precum și în fig. 68. În ansamblu, activitatea fosfatazică a fost mai intensă în probele de sol de la Chinteni comparativ cu probele de sol din Valea Morii și solul cultivat cu orhidee în sere, înregistrându-se valori numerice crescute. Valorile maxime înregistrate în solul de la Chinteni se datorează acumulării în sol a resturilor vegetale, la sfârșitul perioadei de vegetație [Reis și colab., 2001], fiind vorba și de un sol de pajiște neperturbat. Este explicabil, întrucât activitatea biologică a unui sol este mult mai intensă în sezonul cald. O altă explicație este dată și de creșterea cantității de materie organică depusă în sol.

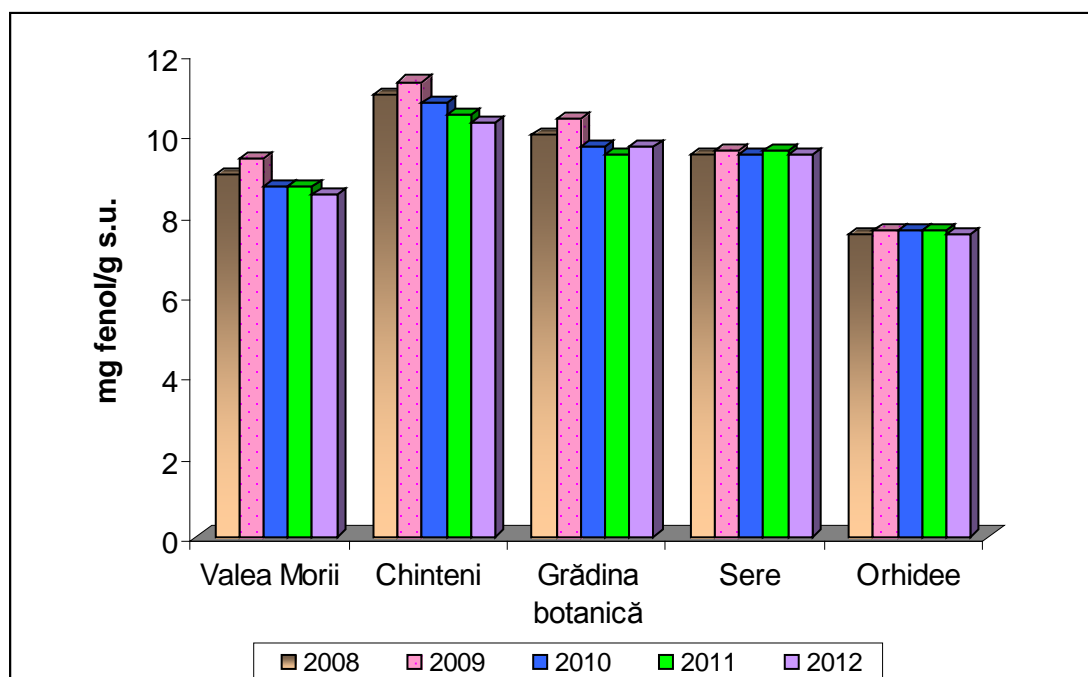


Fig. 68. Evoluția activității fosfatazice (mg fenol/g.s.u.) înregistrată în solurile analizate

În figura 68 redăm evoluția activității fosfatazice în cei cinci ani de studiu la cele cinci soluri studiate. Se poate constata că solul de pășiște de la Chinteni a prezentat în toți cei cinci ani urmăriți de noi cele mai ridicate valori privind activitatea fosfatazică, fiind urmat de solul de la Grădina Botanică. Este cunoscut faptul că solurile necultivate pot prezenta activități enzimatică însemnate, nefiind afectate de intervenția omului [Kiss și colab., 1975].

V.2.1.4. Stabilirea indicatorului enzimatic al calității solului (IECS).

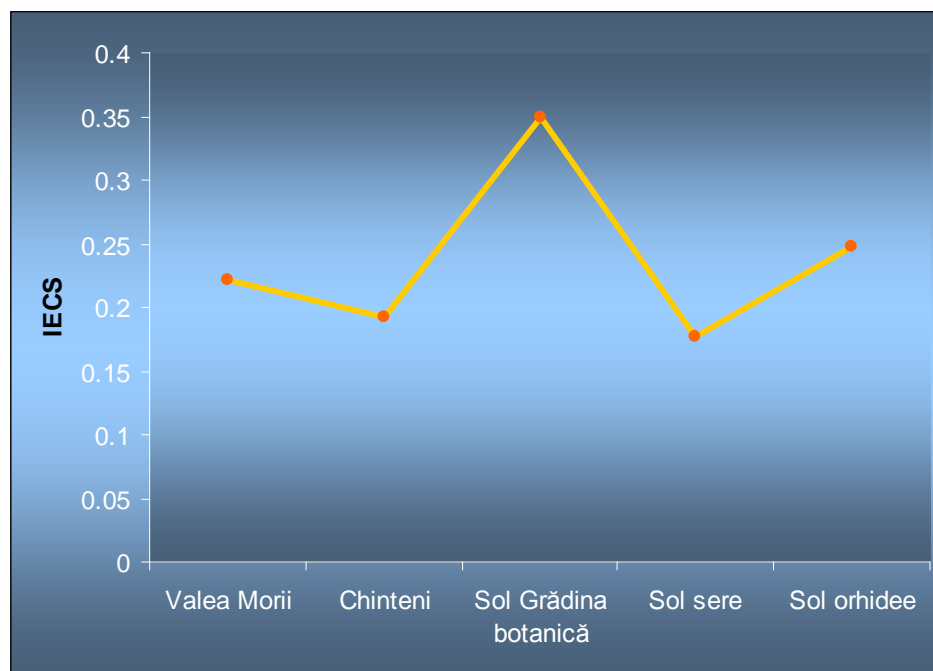


Fig. 70. Valorile indicatorului enzimatic al calității solului

Determinarea activităților enzimatică în soluri constituie un instrument de cercetare pentru a evalua diversitatea funcțională a microbiotei și a proceselor biochimice din aceste habitate.

Pe baza rezultatelor obținute și comparativ cu datele din literatura de specialitate [Pașca și colab., 1993; Drăgan-Bularda și colab., 1995] putem considera că unele soluri analizate dispun de un potențial biologic apreciabil.

Comparativ cu datele din literatură [Zborovschi și colab., 1989; Drăgan-Bularda, și colab., 1995], se poate afirma pe baza datelor noastre, că activitatea fosfatazică și în special activitatea catalazică prezintă valori mai ridicate comparativ cu cea dehidrogenazică. Acest rezultat poate fi explicat și prin aceea că enzimele acumulate sunt rezultatul unei activități desfășurate de microbiota solului timp de zeci de ani, pe când enzimele datorate microbiotei proliferante sunt mai mult afectate de factorii climatici manifestați în cei cinci ani de studiu.

Calitatea unui sol este cu atât mai bună cu cât IECS este mai mare [Muntean și colab., 2004].

V.2.2. Analizele enzimatiche calitative.

V.2.2.1. Evidențierea activității unor oligaze și poliaze (polizaharidaze).

În cele cinci probe de sol provenite din cele cinci zone au fost determinate calitativ următoarele activități enzimatiche: două activități oligazice – zaharazică (invertazică) (AZ), lactazică (β -galactozidazică) (AL) și trei activități poliazice: - amilazică(AA) și dextranazică (AD) și celulazică (ACel) Determinarea acestor activități enzimatiche s-a efectuat prin cromatografie pe hârtie, tehnica circulară [Drăgan-Bularda, 2000]. Producții hidrolitici reducători se evidențiază prin metoda cromatografiei pe hârtie. Cu cât este mai intens spotul produșilor hidrolitici, cu atât este mai ridicată activitatea oligazelor și poliazelor. În cursul examinării se compară spoturile de la probele testate cu cele de la proba martor.

Activitățile oligazice (AZ, AL) au fost prezente în toate probele de sol analizate.

Activitățile polizaharidazice (= poliazice) ale solurilor constituie o componentă principală a potențialului enzimatic al unui sol, deoarece polizaharidele reprezintă substanțele cele mai importante din resturile vegetale care ajung în sol. Desigur la sinteza enzimelor din sol contribuie și zaharurile ajunse în sol în urma secreției radiculare [Kiss și colab., 1975].

Dintre activitățile polizaharidazice analizate importante s-au dovedit a fi două activități – cea amilazică și cea celulazică (Fig. 73 și 74). Activitatea amilazică (AA) este direct proporțională cu cantitatea de humus și cu capacitatea de schimb cationic [Eliade și colab., 1975]. Este interesant că din analiza cromatogramei din Fig. 64 se poate observa că activitatea amilazică a fost foarte intensă în toate probele de sol fără a se diferenția calitativ în funcție de cantitatea de humus care a variat mult în funcție de zona de prelevare.

Activitatea celulazică a celor cinci soluri luate în studiu releva că aceasta este prezentă în probele 1- 5 de sol, prin formarea din substratul enzimatic (celuloza pulvis) a produsului final de hidroliză, glucoza. Spotul de glucoză este destul de asemănător la solul din Valea Morii, cu cel din solul de la Chinteni, respectiv solul din Grădina botanică și cel din sere de orhidee. Este mai puțin intensă la solul din sere. Pe baza intensității spotului putem aprecia că celuloza acumulată este apreciabilă, având în vedere că enzima a fost detectată într-o cantitate foarte mică de amestec de reacție.

Activitatea dextranazică a fost prezentă mai cu seama în primele patru probe de sol, cea mai intensă înregistrându-se la Grădina botanică și la solul din sere cultivat cu orhidee, fiind slabă în

proba de sol din sere, acest fenomen putând fi pus, de asemenea, pe prezența ei în cantități mici nedetectabile în lichidul analizat. Se constată că în urma hidrolizei dextranului a rezultat ca produs final glucoza.

V.3. Analizele microbiologice.

Acest studiu privind dinamica populațiilor microbiene implicate în circuitul azotului din soluri cultivate cu orhidee se impune ca o necesitate în condițiile în care date privind rolul, funcția și dinamica acestor bacterii în aceste soluri nu există. Deci acest studiu analizează pentru prima dată evoluția și diversitatea acestor populații bacteriene din soluri cu orhidee comparativ cu soluri fără orhidee. Analizele microbiologice prin care s-a determinat distribuția spațială a densității bacteriilor heterotrofe aerobe și a bacteriilor implicate în ciclul biogeochimic al azotului s-au realizat în cele 5 tipuri de sol analizate.

În probele de sol analizate, bacteriile implicate în circuitul biologic al azotului au fost prezente în cantități destul de reduse (tabelele 13, 13a, 13b) în 3 cazuri cele mai mari valori ridicându-se la ordinul zecilor de mii. Dintre bacteriile studiate BAM au prezentat valori mai ridicate, în timp ce NiB au prezentat valori mai scăzute în toate solurile.

Bacteriile heterotrofe aerobe sunt prezente în număr mare comparativ cu celelalte grupe, și constatam faptul că în solurile unde activitatea dehidrogenazică și cea catalazică este mai ridicată acolo avem și cele mai numeroase bacterii heterotrofe aerobe (Sol Grădină botanică, Sol orhidee și solul din Valea Morii).

În anul 2009, numărul tuturor grupelor de bacterii studiate crește ușor, așa cum crește și valoarea activităților enzimatic studiate, cu excepția întâlnită la solurile de la sere unde condițiile de mediu se mențin oarecum constante și astfel nu există variații semnificative ale numărului de bacterii din sol.

Grupele de bacterii studiate în anul 2010 au înregistrat valori mai scăzute față de primul an (2008) și mai ales cel de al doilea (2009). Această scădere este în concordanță cu scăderea activităților enzimatic, datorate în principal condițiilor meteorologice mai puțin favorabile.

În anul 2011 se menține situația înregistrată în anii anteriori, însă valorile numerice se micșorează puțin. Aceeași imagine este înregistrată și în tabelul 13d, cu rezultatele obținute în anul 2012, însă valorile găsite s-au menținut apropiate de cele din ultimii trei ani de studiu.

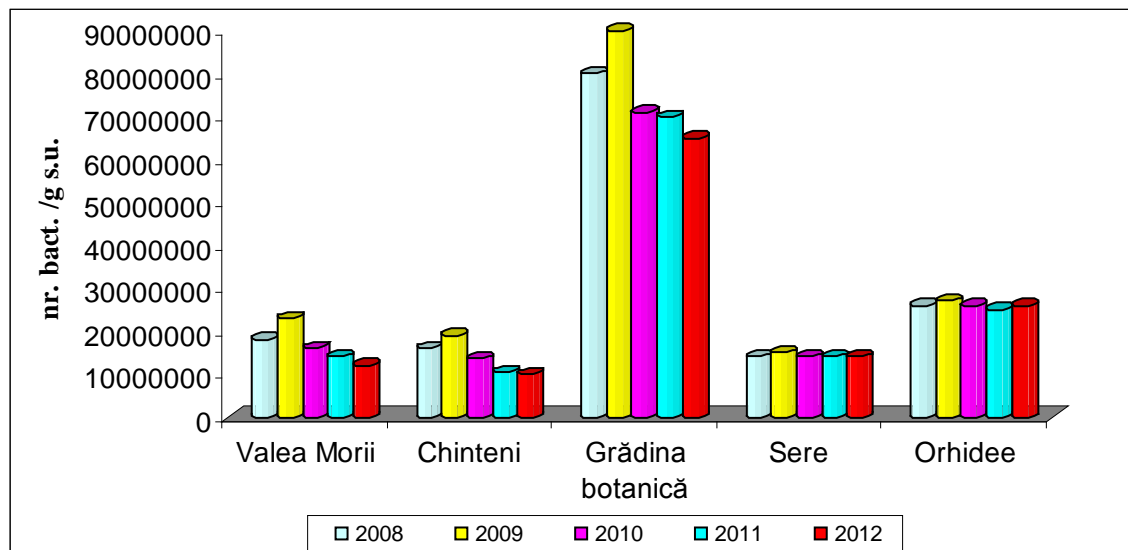


Fig. 76. Distribuția numerică a bacteriilor heterotrofe aerobe (BHA) în solurile analizate

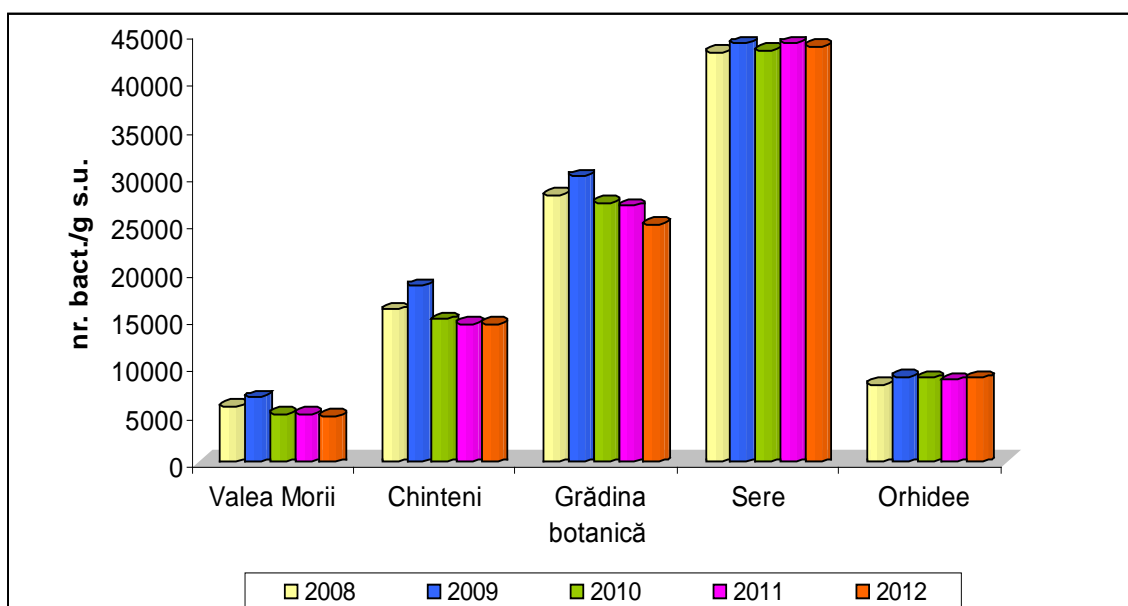


Fig. 77. Distribuția numerică a bacteriilor amonificatoare (BAM) în solurile prelevate

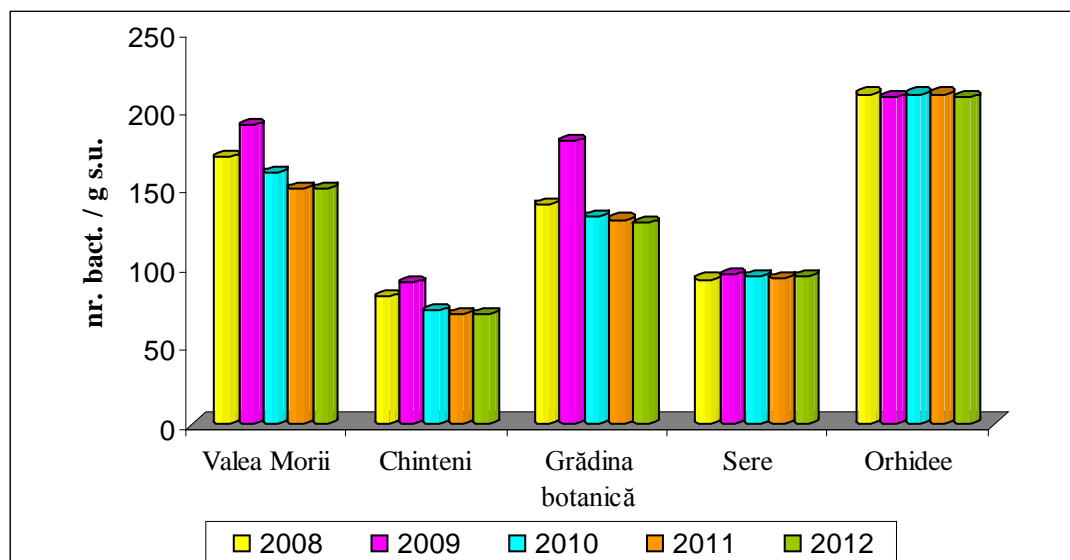


Fig. 79. Distribuția numerică a nitratbacteriilor (NaB) în solurile analizate

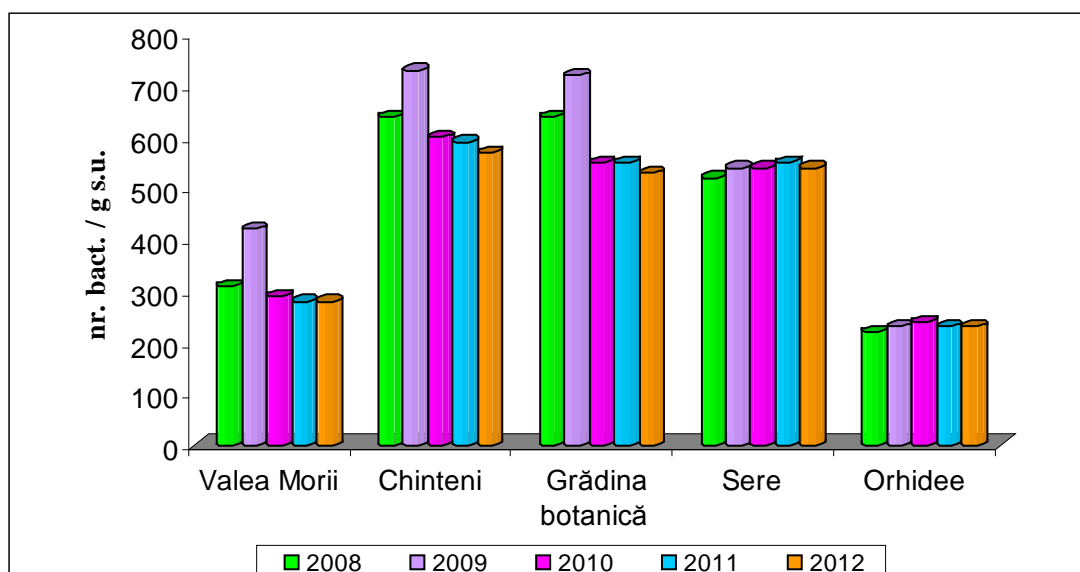


Fig. 80. Distribuția numerică a bacteriilor denitrificatoare (BDN) în solurile analizate

V.3.2. Distribuția procentuală a grupelor de bacterii implicate în ciclul azotului după zonele de prelevare.

În Valea Morii bacteriile amonificatoare au fost prezente în procentul cel mai mare, (90%), urmat de bacteriile denitrificatoare, nitratbacterii și nitritbacterii.

Este cunoscut faptul că în solurile mlăștinoase și turbatoase procesele microbiene din ciclul azotului sunt mai reduse.

Pentru solul de la Chinteni, situația este similară cu cea din Valea Morii, bacteriile amonificatoare fiind cele mai numeroase, urmate de cele denitrificatoare, iar cele nitrificatoare având un procent scăzut sub 1% (fig.82).

Solul din Grădina botanică (fig.83), prezintă în procentul cel mai ridicat de 98% bacteriile amonificatoare, celelalte fiind în procent destul de scăzut de doar 2%.

La probele de sol prelevate din sere, sol necultivat cu orhidee (fig.84), predominante sunt bacteriile amonificatoare, celelalte grupe de bacterii fiind prezente într-un procent foarte scăzut.

La probele de sol prelevate din sere, sol cultivat cu orhidee (fig.85), constatăm prezența în număr mai ridicat a bacteriilor denitrificatoare și nitrificatoare față de solurile de la Chinteni, Grădina botanică și sol sere necultivat cu orhidee.

Explicația acestei distribuții neuniforme a grupelor de bacterii implicate în ciclul azotului ar putea fi pusă pe seama faptului că solurile de la Valea Morii, respectiv sol sere cultivat cu orhidee prezintă o structură care crează mediu propice pentru dezvoltarea acestor bacterii. Aceste soluri sunt mai umede și au un conținut mai mare de turbă. În aceste două soluri procentul bacteriilor nitrificatoare și denitrificatoare este mai ridicat.

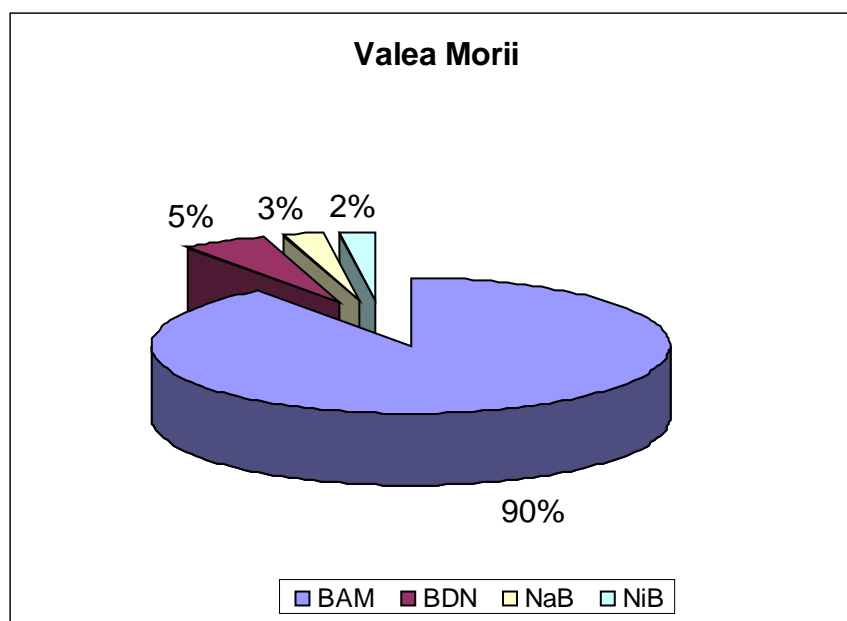


Fig. 81. Variația cantitativă (%) a bacteriilor din ciclul azotului la solul de la Valea Morii

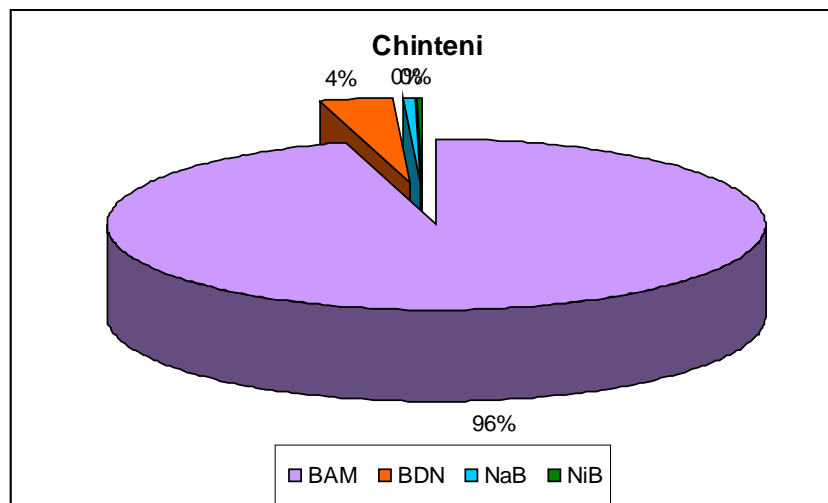


Fig. 82. Variația cantitativă (%) a bacteriilor din ciclul azotului la solul de la Chinteni

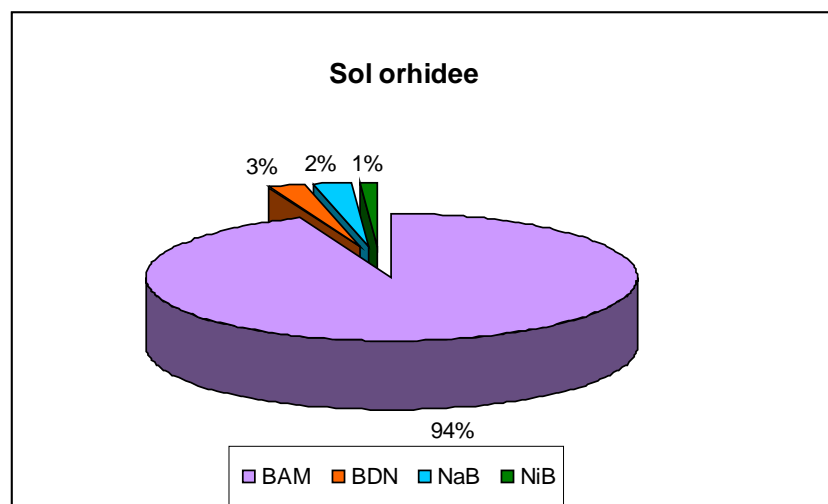


Fig. 85. Variația cantitativă (%) a bacteriilor din ciclul azotului la solul de la sere cu orhidee

V.3.3. Stabilirea indicatorului bacterian al calității solului (IBCS).

Pentru estimarea calității solului provenit din diverse zone de studiu, am utilizat cele cinci grupe ecofiziologice de bacterii și anume: bacteriile heterotrofe aerobe (BHA), bacteriile amonificatoare (BAM), bacteriile nitrificatoare (nitritbacterii-NiB și nitratbacterii-NaB) și bacteriile denitrificatoare (BDN). Potențialul microbial al solurilor analizate este moderat cu valori cuprinse între 3,8 – 3,5. Astfel solul din Grădina Botanică s-a dovedit a avea un potențial bacteriologic relativ însemnat, fiind urmat de solul din sere și solul cultivat cu orhidee în sere, cel mai redus potențial fiind întâlnit în solul de la Chinteni (pajiște parțial degradată) și la cel din Valea Morii, un sol turbos și înmlăștinit.

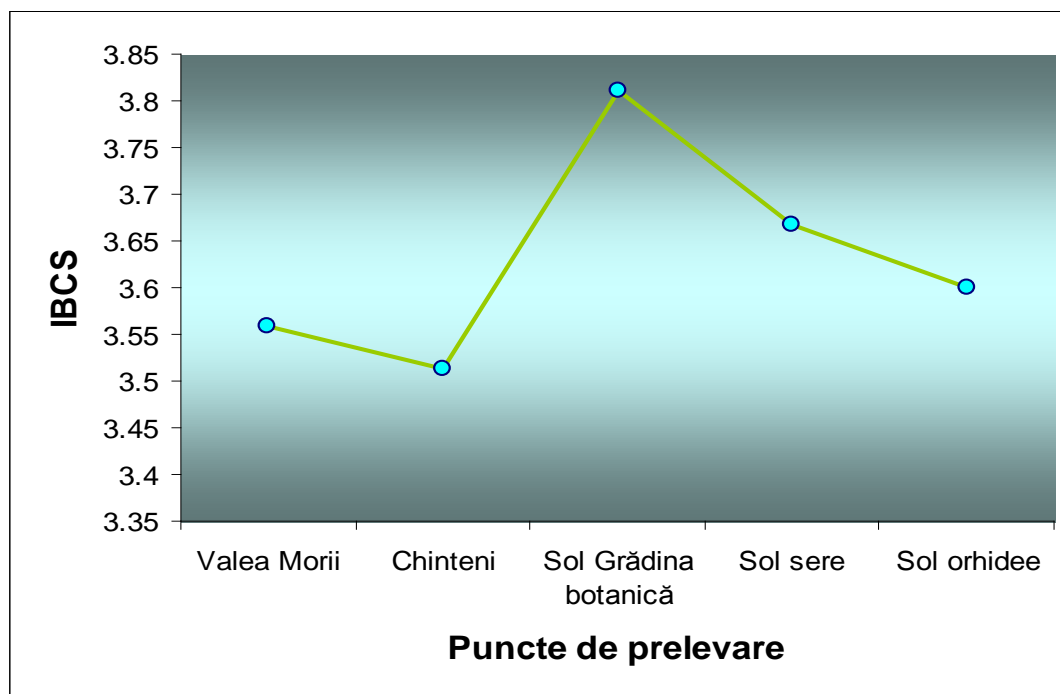


Fig. 86. Distribuția valorilor IBCS pentru diversele soluri analizate

Între valorile IBCS și cele ale IECS s-a stabilit existența unei corelații pozitive, semnificative la $p < 0,05$, ceea ce atestă paralelismul dintre potențialul bacterian și cel enzimatic al solurilor, indiferent de punctul de prelevare.

V.4. Izolarea tulpinilor de *Azotobacter* din probele de sol.

Pentru izolarea bacteriilor din genul *Azotobacter*, s-a utilizat un mediu electiv, mediul de cultură Ashby, bogat în substanțe organice și lipsit de azot legat. Pe acest mediu solid, s-au realizat însămânțări prin procedeul grăuncioarelor de sol, din toate probele de sol luate în studiu. Cu ajutorul unei pipete Pasteur sterile s-au introdus pe suprafața mediului grăuncioare de sol cu diametrul de 1- 3 mm. În fiecare cutie s-au însămânțat 25 de granule de sol (Fig. 87a).

După însămânțare, cutiile Petri s-au incubat la 28° C, timp de 10-14 zile. În perioada de incubare în jurul grăuncioarelor de sol au apărut colonii mucilaginoase, care apoi s-au brunificat (Fig. 87b), acestea fiind tipice pentru bacteriile din genul *Azotobacter*.

Din aceste colonii s-au trecut pe medii proaspete prin metode de subcultivare până când s-au obținut culturi pure din care s-au putut evidenția microscopic bacterii fixatoare de azot din genul *Azotobacter*. Aceste bacterii au fost puse în evidență și la nivelul celulelor scoartei radiculare la orhidee prin analize efectuate la microscopul electronic de transmisie (fig. 88).



Fig. 88. Bacterii fixatoare de azot din genul *Azotobacter* în celule radiculare, imagini obținute prin microscopia electronică de transmisie

V.5. Izolarea fungilor din sol.

Pentru a determina prezența ciupercilor (micromicete) în cele 5 tipuri de sol analizate, s-au folosit două tipuri de medii, mediul Martin și mediul Csapek-Dox care este pentru izolarea ciupercilor parazite și saprofite [Hulea, 1969, Drăgan-Bularda, 2000].

Din fiecare tip de sol (2g.) analizat s-au efectuat diluții de sol, utilizându-se tehnica diluțiilor, și apoi s-au realizat însămânțări pe mediile de cultură. Diluțiile folosite au fost de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , pentru toate cele 5 probe. Numărul de hife a fost calculat înmulțind numărul de colonii care s-au dezvoltat cu valoarea inversă a diluției, în acest caz cu 10^{-5} .

După dezvoltarea ciupercilor în mediul de cultură, s-a trecut la identificarea lor, iar analiza macroscopică și microscopică a relevat faptul că în solul de la Grădina botanică (fig.89) există cu precădere genul *Penicillium*, dar și *Fusarium*, în solul de la sere (fig.90) *Penicillium* și *Rhizopus*, la Chinteni (fig.91) *Penicillium*, iar în celelalte două soluri (Valea Morii și sol orhidee) s-au evidențiat genurile *Penicillium* și *Fusarium* (fig. 93, 94). Din figurile prezentate reiese faptul că sunt mai bine dezvoltate și mai numeroase micromicetele din solurile care aparțin perimetrului Grădinii botanice, deci putem spune că aceste soluri prezintă o microbiotă mai complexă decât cele din natură (Valea Morii și Chinteni).

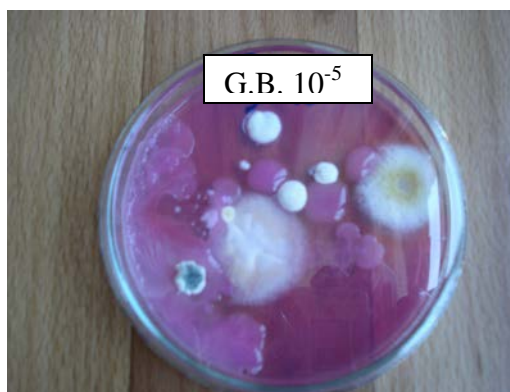


Fig. 89. Micromicete din solul Grădinii botanice (foto C. Mocan)

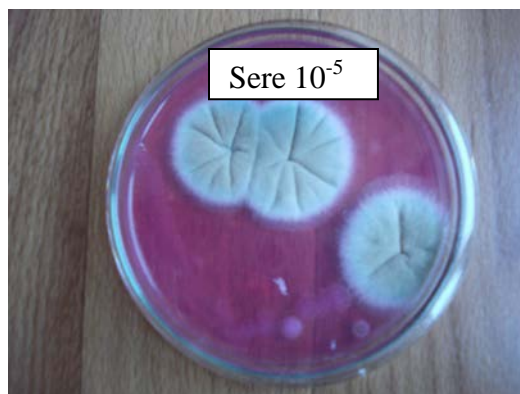


Fig. 90. Micromicete din sol Sere (foto C. Mocan)

V.7. Interpretarea statistică a rezultatelor.

V.7.1. Testul Mann-Whitney.

Este unul din cele mai puternice probe neparametrice. Poate fi utilizat atât cu eşantioane mici de subiecți, cât și cu eşantioane mari și necesită numai măsurători de tip rang sau când nu îndeplinesc condițiile aplicării testului t independent. Acest test operează cu numere ordinale. Testul este util pentru a determina dacă media a două grupuri este diferită una de alta.

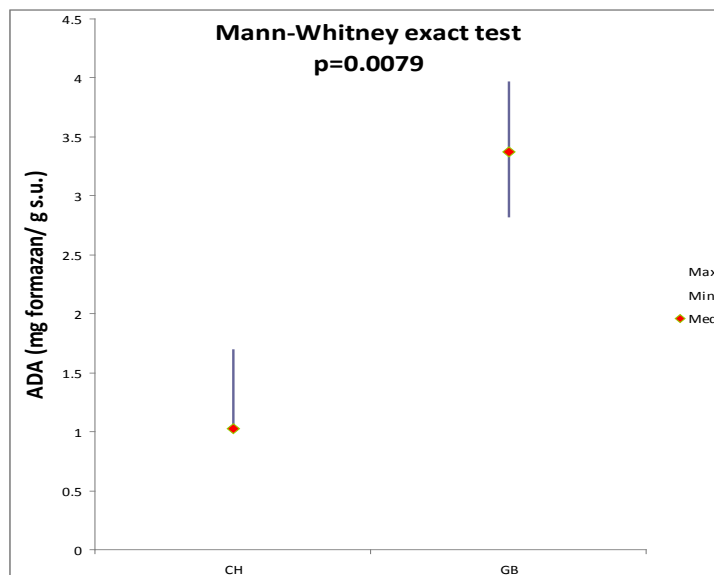


Fig. 95. Distribuția ADA exprimată prin valorile maximă, minimă și mediană, pentru eșantioanele de sol provenite de la Chinteni și Grădina botanică

Testul Mann-Whitney pentru valorile activității dehidrogenazice actuale înregistrate la solurile naturale din Chinteni și Valea Morii pe baza valorii $p=0,0079$ este semnificativ (valoarea este sub 0,05), existând diferențe semnificative de locație între distribuțiile variabilei de răspuns (activitatea dehidrogenazică actuală) pentru cele două grupe comparate (Chinteni și Grădina Botanică), (vezi fig 95 și 96).

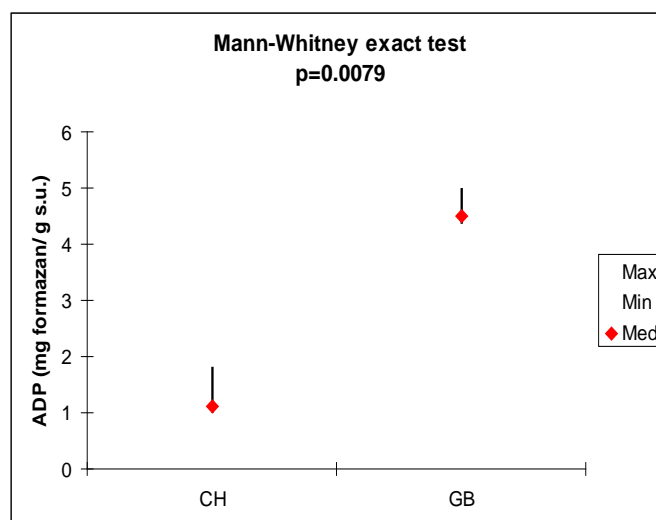


Fig. 96. Distribuția ADP exprimată prin valorile maximă, minimă și mediană, pentru eșantioanele de sol provenite de la Chinteni și Grădina botanică

Pentru valorile activității dehidrogenazice potențiale înregistrate în solurile de la Chinteni și Grădina botanică, testul Mann-Whitney este, de asemenea, semnificativ, rezultat pe care îl preconizăm pe baza valorilor activității dehidrogenazice actuale.

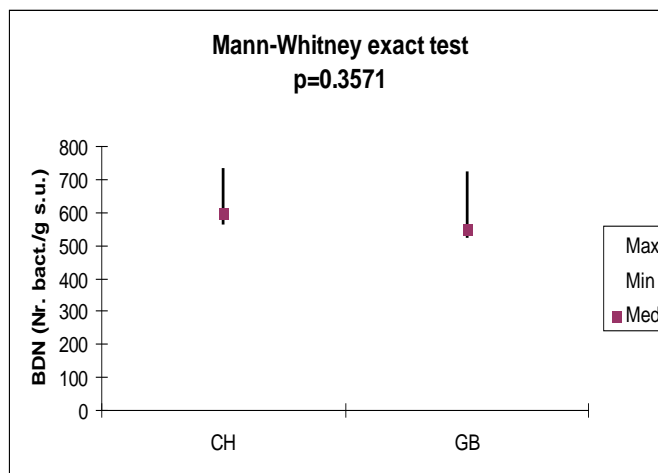


Fig. 101. Distribuția BDN exprimată prin valorile maximă, minimă și mediană, pentru eșantioanele de sol provenite de la Chinteni și Grădina botanică.

În cazul variabilei de răspuns a bacteriilor denitrificatoare, pentru grupele comparate (Chinteni și Grădina botanică), valoarea $p=0,3571$ dată de testul aplicat, relevă faptul că nu sunt diferențe semnificative de locație între distribuțiile valorilor bacteriilor denitrificatoare, deci testul este ne semnificativ (vezi fig. 101).

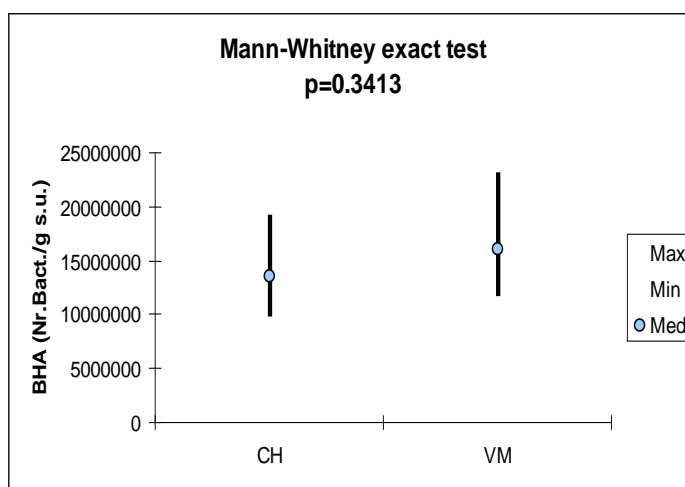


Fig. 108. Distribuția BHA exprimată prin valorile maximă, minimă și mediană, pentru eșantioanele de sol provenite de la Chinteni și Valea Morii

În ceea ce privește distribuția bacteriilor heterotrofe aerobe, testul Mann-Whitney prin valoarea calculată $p=0,3413$, arată că nu există diferențe semnificative între cele două grupe comparate, Chinteni și Valea Morii, testul fiind în acest caz ne semnificativ (vezi fig. 108).

V.7.2. Regresia logistică.

În științele experimentale, deci și în biologie, sunt studiate variațiile a doi parametri, adică a două mărimi cantitative în cadrul aceleiași populații statistice. Am utilizat acest test pentru a putea constata care dintre parametrii enzimologici sau bacterieni au influență asupra prezenței orhideelor în sol.

Se constată faptul că la valori ale activității dehidrogenazice actuale peste 2, șansele de apariție a orhideelor cresc semnificativ. În ceea ce privește activitatea fosfatazică, la o creștere a valorilor acestei activități peste 7,5 șansele de apariție a orhideelor scad progresiv.

Valori ale bacteriilor amonificatoare, la un număr mai mic decât cel înregistrat în toate probele analizate, sub 5000, scad șansele de apariție a orhideelor.

Bacteriile denitrificatoare la valori înregistrate peste 200 bact./ 2,5g s.u., scad șansele de apariție a orhideelor.

Atunci când numărul de bacterii heterotrofe aerobe este în creștere, cresc și șansele de apariție a orhideelor. La valori înregistrate ale nitrit bacteriilor peste 125 bact./2,5g s.u., cresc șansele de apariție a orhideelor.

Pentru ceilalți parametri: ADP, AC, NaB, putem spune că nu există nici o relație între valorile obținute în urma analizelor și șansele de apariție, testul fiind nesemnificativ.

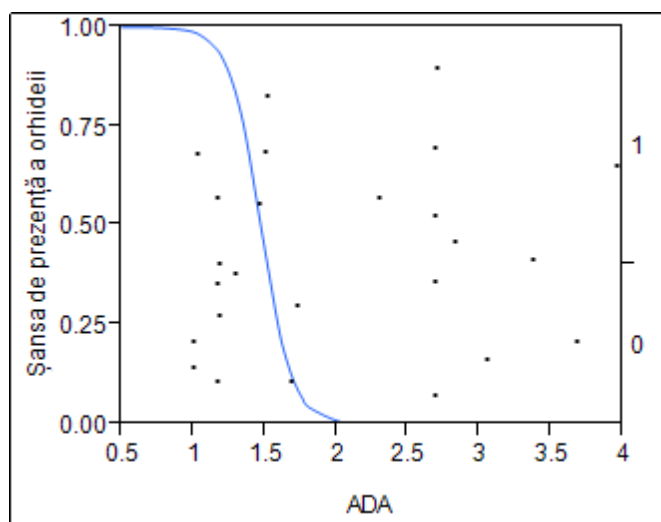


Fig. 122. Estimarea efectului variabilei ADA asupra probabilității de apariție a orhideelor și indicatori ai calității ajustării

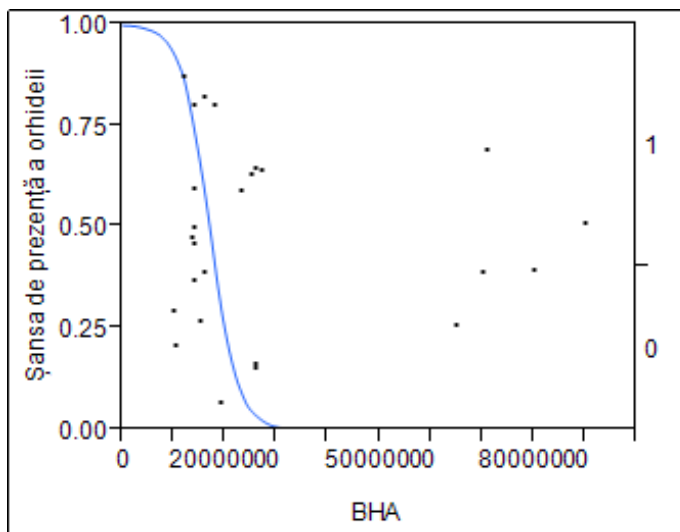


Fig. 126 Estimarea efectului variabilei BHA asupra probabilității de apariție a orhideelor și indicatori ai calității ajustării

Din graficul de mai sus (fig.126), observăm faptul că atunci când numărul de bacterii heterotrofe aerobe este în creștere, cresc și șansele de apariție a orhideelor.

CONCLUZII GENERALE

Prin prezenta teză s-a început studiul la noi în țară asupra simbiozei de tip micorizant la câteva specii de orhidee (trei din flora spontană a țării noastre și trei specii cultivate în serele Grădinii botanice „Al.Borza” din Cluj-Napoca), precum și studiul microbiologiei solurilor provenite din diverse zone populate cu orhidee. Lucrarea analizează pentru prima dată rezultatele unei abordări complexe de ecologie microbiană a solurilor cu orhidee în care au fost studiate bacteriile implicate în ciclul azotului.

Astfel, din datele acumulate până în prezent în aceste studii efectuate, putem afirma că:

Dintre orhideele studiate cinci specii prezintă micorize (*Dactylorhiza fucsii*, *Epipactis palustris*, *Cypripedium calceolus*, *Anoectochilus regalis*, *Paphiopedilum insigne*), pe parcursul întregului ciclului biologic, excepție făcând doar specia epifită – *Epidendrum radicans* care nu a prezentat micorize în nici una din etapele ciclului biologic..

Calea de pătrundere la nivelul celulelor corticale s-a demonstrat a fi în proporția cea mai mare perișorii absorbantă, atunci când sunt prezenți.

Fungi de micorize s-au dovedit a fi prezenți în număr mare înainte și în momentul înfloririi orhideelor.

Rezultatele noastre au demonstrat că fungii prezenți în interiorul celulelor radiculare trec prin toate etapele evoluției intracelulare dezvoltând pelotoni în celulele corticale și manifestând fenomenul de talyphopagie.

Fungii de micorize s-a dovedit ca nu afectează niciodată endoderma și cilindrul central al rădăcinii orhideelor.

La speciile native, prezența numeroasă a fungilor de micorize concordă cu existența a numeroase rădăcini laterale ramnificate.

Fungi de micorize în toate cazurile studiate corespund descrierii celor care aparțin grupului *Rhizoctonia*.

Solurile cultivate cu orhidee prezintă un pH alcalin și o conductivitate ridicată, iar cel de la Chinteni lipsit de orhidee prezintă conductivitatea cea mai scăzută (45,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$) și pH-ul cel mai scăzut (5,95), fiind cel mai acid sol dintre toate cele cinci soluri studiate.

Cantitatea de azot în solurile cu orhidee nu a variat comparativ cu cea din solurile necultivate cu orhidee, rezultând faptul că micorizele îmbunătățesc nutriția cu azot a orhideelor.

Cantitatea de fosfor determinată de noi a fost cea mai mare în solurile din spațiul Grădinii botanice, iar în celelalte nivelul fosforului a fost mult mai redus.

Activitățile enzimatic determinate de noi au fost prezente în toate probele de sol studiate, existând doar diferențieri în funcție de tipul de sol.

Activitatea dehidrogenazică actuală, activitatea dehidrogenazică potențială și activitatea catalazică au fost mai intense în solurile în care se dezvoltă orhidee.

Activitatea fosfatazică, în schimb în mod interesant a fost mai intensă în solurile studiate de noi în care nu există orhidee (Chinteni, sol sere).

Indicatorul enzimatic al calității solului prin valorile înregistrate în cercetările noastre arată că solurile cu orhidee sunt calitativ mai bune, privind potențialul microbial al acestora.

Cele cinci activități enzimatic calitative au fost prezente în toate probele de sol, intensitatea lor diferind în funcție de tipul acestora, demonstrând prezența unui potențial enzimatic complex.

Bacteriile heterotrofe aerobe, nitrat-bacteriile și nitrit-bacteriile, au fost prezente în numărul cel mai mare la solurile cu orhidee pe când bacteriile denitrificatoare s-au dovedit a fi în număr mai mic.

Conform rezultatelor indicatorului bacterian al calității solului, s-a demonstrat a fi mai ridicat în solurile cu orhidee ceea ce dovedește o încărcătură bacteriană mai mare a acestora.

Bacteriile din genul *Azotobacter* s-au pus în evidență atât în solurile cu orhidee cât și în celelalte două soluri, dar procentul cel mai mare în ceea ce privește prezența acestor bacterii în sol a fost înregistrată în solul din Grădina botanică, urmat de cel din Valea Morii și apoi în solul cu orhidee.

Datele noastre de microscopie electronică au demonstrat că bacteriile din genul *Azotobacter* sunt prezente nu doar în solul din rizosferă ci și în interiorul celulelor radiculare la orhidee.

Analizele de determinare a micromicetelor din solurile studiate au relevat prezența acestora în număr mare în toate cele cinci soluri studiate, înregistrându-se valori mai ridicate în solurile în care vegetează orhidee și anume solul din Grădina botanică și cel de la sere cu orhidee. Dintre genurile de micromicetele evidențiate cele mai frecvent întâlnite în solurile analizate au fost genurile *Penicillium* și *Fusarium*.

Analizele statistice efectuate arată faptul că cel mai bun predictor pentru apariția orhideelor într-un sol este reprezentat de variabila activitate dehidrogenazică actuală (ADA), dovedind faptul că această activitate enzimatică a solului prin valorile sale înregistrate are cea mai mare importanță în predicția apariției și prezenței orhideelor într-un anumit sol, putând fi luată ca etalon în această situație.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Atlas, R.M., 2004. Handbook of Microbiological Media. 3rd edition, CRC Press, New York.
2. Azcón-Aguilar, C. Barea, J.M., 1992. Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms, în *Mycorrhizal Functioning: An Integrative Plant– Fungal Process*, Allen, M.J., New York, Routledge, Chapman & Hall, 163–198.
3. Barea, J.M., Azcon, R., Azcon-Aguilar, C., 2002. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **81**: 343–351.
4. Bianciotto, V., Bonfante, P., 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi: a specialised niche for rhizospheric and endocellular bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **81**: 365–371.
6. Blaga, G., Filipov, F., Udrescu, S., Rusu, I., Vasile, D., 2005. Pedologie, Editura AcademicPres, Cluj-Napoca.
7. Chou, Ling-Chin, Chang, Doris Chi-Ning, 2004. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Anoectochilus formosanus* and *Haemaria discolor* and their F₁ hybrids, *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, **45**: 143-147.
8. Cușa, V., 1996. *Instrucțiuni metodologice pentru analiza microbiologică a sedimentelor acvatice*, Institutul de Cercetări și Ingineria Mediului, București, **4**: 2-30.
9. Drăgan-Bularda, M., Kiss, Ș., 1972. Dextranase Activity in Soil, *Soil Biology and Biochemistry*, **4**: 413-416.
10. Drăgan-Bularda, M., Kiss, S., Pașca, D., Manolache, E., Crișan, R., Marin, G., 1995. Microbial communities in soils of the Danube Delta Biosphere Reserve, *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Biologia*, **40** (1-2): 130-139.
11. Drăgan-Bularda, M., 2000. Microbiologie generală - Lucrări practice, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca.
12. Drăgan-Bularda, M., Grigore, C.E., Tura, D., 2004. The use of enzymatic indicator of soli quality for saline lakes capitaliyation and protection, *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Biologia*, **49**(1): 129-140.
13. Drăgan-Bularda, M., Samuel, A.D., 2006. Microbiologie generală, Editura Universității din Oradea.
14. Dunca, S., Ailiesei, O., Nimițan, E., Ștefan, M., 2004. Microbiologie aplicată, Editura Tehnopress, Iași, 147-158.
15. Eliade, G., Ghinea, L., Ștefanic, G., 1975. Microbiologia Solului, Editura Ceres, București.

16. Garbaye, J., 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis, *New Phytologist*, **128**: 197–210.
17. Gattai, G.S., Pereira, S.V., Costa, C.M.C., Lima, C.E.P., Maia, L.C., 2011. Microbial activity, arbuscular mycorrhizal fungi and inoculation of woody plants in lead contaminated soil, *Brazilian Journal of Microbiology*, **42**(3): 859-867.
18. Gianfreda, L., Bollag, J-M., 1996. Influence of natural and anthropogenic factors on enzyme activity in soil. *Soil Biochemistry*, Stotzky, G., Bollag, J-M., (Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, **9**:123-193.
19. Grönberg, H., Kaparakis, G., Sen ,R., 2006. Binucleate *Rhizoctonia* (*Ceratorhiza* spp.) as non-mycorrhizal endophytes alter *Pinus Sylvestris* L. seedling root architecture and affect growth of rooted cuttings, *Scandinavian Journal of Forest Research*, **21**: 450-457.
20. Hoßflich, G., Wiehe, W., Kuhn, G., 1994. Plant growth stimulation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms, *Experientia*, **50**: 897-905.
21. Hulea, A., 1969. Ghid pentru laboratoarele de micologie și bacteriologie, Editura Agro- Silvică, București.
22. Jezek, Z., 2003. The complete encyclopedia of orchids, REBO Publisher, Praga, 118-119.
23. Kiss, Ș., Ștefanic, G., Drăgan-Bularda, M., 1975. Soil enzymology in Romania, *Contribuții Botanice*, Cluj-Napoca, 197-207.
24. Kiss, Ș., Drăgan-Bularda, M., Pașca, D., 1996. Enzymology of tehnogenic soils, *Studia Univesitatis Babeș-Bolyai, Biologia*, **1-2**: 3-20.
25. Kloepper, J.W., Zablotowick, R.M., Tipping, E.M., Lifshitz, R., 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers în: *The Rhizosphere and Plant Growth*, Keister, D.L., Cregan, P.B., Kluwer Academic Press.
26. Kottke, I., Hang, I., Setaro, S., Suarez, J.P., Weiss, M., Preusing, M., Nebel, M., Oberwinkler, F., 2008. Guilds of mycorrhizal fungi and their relation to trees, ericads, orchids and liverworts in a neotropical mountain rain forest, *Basic and Applied Ecology*, **9**:13-23.
27. Látr, A., Čuříková, M., Baláž, M., Jurčák, J., 2008. Mycorrhizas of *Cephalanthera longifolia* and *Dactylorhiza majalis*, two terrestrial orchids, *Annales Botanici Fennici*, **45**: 281-289
28. Manashi, Kalita, Sarma, C. M., 2006. *In vitro* propagation of a terrestrial endangered orchid *Paphiopedilum insigne* (Wall. ex. Lindl) Pfitz., *Journal of Phytological Research*, 26.

29. McKendrics, S., Grahame, D., Heywood, N. The use of some native orchids in landscaping and habitat creation. (on line- www.raellywildflowers.co.uk)
30. Lugtenberg, B.J., Dekkers, L.C., 1999. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent?, *Environmental Microbiology*, **1**: 9–13.
31. Miller, R.M., 2005. The nonmycorrhizal root - a strategy for survival in nutrient-impoverished soils, *New Phytologist*, **165**: 655-658.
32. Muntean, V., 1995-1996. Bacterial indicator of mud quality, *Contribuții Botanice*, 73-76.
33. Norris, J.R., Read, D.J., Varma, A.K., 1992. Methods in microbiology: Techniques for the study of mycorrhiza, **24**, Academic Press, Ltd. London.
34. O.G. nr. 236 din 24 noiembrie 2000 privind regimul ariilor naturale protejate, conservarea habitatelor naturale, a Florei și Faunei sălbatice, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 625 din 4 Decembrie 2000.
35. Rasmussen, H. N., 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza, *Plant and Soil*, **244**: 149–163.
36. Regelsberger, G., Jakopitsch, C., Plasser, L., Schwaiger, H., Furtmüller, P.G., Peschek, G.A., Zamocky, M., Obinger, C., 2002. Occurance and biochemistry of hydroperoxidases in oxygenic phototrophic prokaryotes (*Cyanobacteria*), *Plant Physiology and Biochemistry*, **40**: 479-490.
37. Reis, V.M., dos Reis Jr., Quesada, D.M., Oliveira, O.C.A., Alves, B.J.R., Urquiada, S., Boddey, R.M., 2001. Biological nitrogen fixation associated with tropical pasture grasses, *Australian Journal of Plant Physiology*, **28**: 837-844.
38. Pașca, D., Crișan, R., Muntean, V., Drăgan-Bularda, M., Kiss, S., 1993. Activitatea enzimatică a solurilor din Parcul Național Retezat, ICB Cluj-Napoca, Parcul Național Retezat, 117-129.
39. Scannerini, S., Bonfante, P., 1991. Bacteria and bacteria like objects in endomycorrhizal fungi (*Glomaceae*), în *Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation: Speciation and Morphogenesis*, Margulis, L., Fester, R., Cambridge, MIT Press, 273–287.
40. Sârbu, A., Coldea, Gh., Cristea, V., Negrean, G., Cristurean, I., Sârbu, I., Oprea, A., Popescu, Gh., 2003. Ghid pentru identificarea importantelor arii de protecție și conservare a plantelor din România, Editura Alo, București.
41. Smith, S.E., Read, D.J., 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*, San Diego, Academic Press.
42. Stanley, M.R., Koide, R.T., Shumway, D.L., 1993. Mycorrhizal symbiosis increases growth, reproduction and recruitment of *Abutilon theophrasti* Medic. in the field, *Oecologia*, **94**: 30-35.

43. Suresh, C.K., Bagyaraj, D.J., 2002. Mycorrhiza-microbe Interface: Effect on Rhizosphere în *Arbuscular Mycorrhizae*, Sharma, A.K., Johri, B.N., New Hampshire, Scientific Publishers, 7-28.
44. Sylvia, D. M., 2002. Mycorrhizal Symbioses în *Principles and applications of soil microbiology*, Sylvia, D. M., Fuhrmann, J.J., Hartel, Peter G., Zuberer, David A., Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ 07458, 73-158.
45. Trasar-Cepeda, C., Leiros, M .C., Seoane, S., Gil-Sotres, F., 2000. Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution, *Soil Biology and Biochemistry*, **32**: 1867–1875.
46. Trouvelot, A., Kough, J.L., Gianinazzi-Pearson, V., 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle în *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*, Gianinazzi-Pearson V. and Gianinazzi S., INRA Press, Paris, 217-221.
47. Vessay, J.K., 2003. Plant Growth Promoting *Rhizobacteria* as Biofertilizers, *Plant and Soil*, **255**: 571-586
48. Zamfirache, M-M., Toma C., 2000. Simbioza în lumea vie, Editura Universității Alexandru Ioan Cuza, Iași, 226-237.
49. Zborovschi, E., Crișan, R., Muntean, V., 1989. Analiza enzimologică a unor soluri alpine din Parcul Național Retezat, Publicațiile Societății Naționale Române pentru Știința Solului, București, **26A**: 219-225.
50. Wilcox, R., R., 2009. Basic Statistics, Oxford University Press.