



UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI DIN CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE ȘTIINȚA ȘI INGINERIA MEDIULUI
ȘCOALA DOCTORALĂ ȘTIINȚA MEDIULUI



TEZĂ DE DOCTORAT - REZUMAT

RĂSPUNSUL DIATOMEELOR BENTONICE LA CONTAMINAREA CU APE ACIDE DE MINĂ ÎN ZONA MINIERĂ ROȘIA MONTANĂ (ROMÂNIA)

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT
Prof. Univ. Dr. CĂLIN BACIU

STUDENT-DOCTORAND
ADRIANA OLENICI

Cluj-Napoca, Septembrie 2019

Această teză de doctorat ar trebui citată ca:

Olenici, A., 2019. Benthic Diatom Response to Acid Mine Drainage Pollution in Roșia Montană Mining Area (Romania). Doctoral Thesis. Babeș-Bolyai University, Cluj-Napoca, Romania.

Toate fotografiile îi aparțin Adrianei Olenici.

Ilustrațiile de pe copertă și separatoarele capitolelor nr. 1, 3.1., 3.3., 3.6. îi aparțin lui Luis Terrones.

Design-ul copertii și a separatoarelor de capitole îi aparține Adrianei Olenici.

MULȚUMIRI

Studiul prezentat în această teză nu ar fi fost posibil fără ajutorul multor persoane. Profit de această ocazie pentru a-mi exprima sincera recunoștință și apreciere față de toți cei care au făcut posibilă această teză de doctorat.

Sunt recunoscătoare tuturor celor cu care am avut ocazia să colaborez de-a lungul studiilor de doctorat și în cadrul altor proiecte conexe. Fiecare dintre aceștia mi-a oferit o coordonare profesională extinsă și m-au învățat multe atât despre cercetare, cât și despre viață.

În primul rând, aș dori să-mi exprim recunoașterea sinceră față de coordonatorul meu de doctorat, Prof. Univ. Dr. Călin Baciu, pentru susținerea continuă din timpul studiilor de doctorat, pentru îndrumarea, răbdarea, cooperarea și motivația sa constantă și pentru că a crezut în potențialul meu și în acest studiu. Îi datorez mulțumiri pentru tot ce am învățat de la el și pentru toate sfaturile pe care mi le-a dat în acești ani.

Adresez mulțumiri deosebite doamnei Conf. Univ. Dr. Laura Momeu, pentru faptul că m-a inițiat în acest interesant domeniu al științei și pentru ajutorul dedicat, sfaturi și sprijinul continuu oferit timp de mulți ani. Mă îndrept către dumneaei cu mulțumiri și cuvinte de apreciere pentru că mi-a arătat această cale a cercetării și că a fost acolo pentru mine oricând.

Doresc să adresez cuvinte speciale de mulțumire către Dr. Saúl Blanco din cadrul Laboratorului de Diatomologie, de la Institutul de Mediu (IMA) al Universității din León, Spania, pentru că m-a primit în laboratorul său de-a lungul mobilităților mele de doctorat și mi-a permis să folosesc facilitățile disponibile. Datorită lui, studiile de doctorat au fost pentru mine o experiență care mi-a schimbat viața și nu ar fi fost posibil să realizez această teză fără sprijinul și îndrumarea sa. Sprijinul său constant, colaborarea, motivația și disponibilitatea sa de a ajuta m-au încurajat mereu. Iar pasiunea sa pentru cercetare a avut întotdeauna o impresie profundă asupra mea. Munca realizată alături de el m-a învățat cum poate cineva să reușească să atingă ceea ce părea imposibil înainte. Pentru toate acestea, îl consider mentorul acestei teze de doctorat și mă simt privilegiată să fiu asociată cu o persoană ca el.

Voi fi întotdeauna recunoscătoare lui Dr. Francisco Jiménez Gómez, de la Universitatea din Jaén, Spania, pentru că a fost alături de mine în această perioadă și pentru

că mi-a oferit sprijinul, îndrumarea, motivația și entuziasmul său necondiționat. Mulțumesc pentru toată înțelegerea și răbdarea și pentru că nu m-ai lăsat să renunț!

De asemenea, simt recunoștința pentru Dr. Francisco Guerrero de la Universitatea din Jaén, Spania pentru cooperarea și încurajarea pe care mi-a oferit-o în tot acest timp. Îi datorez apreciere pentru disponibilitatea sa de a ajuta și pentru sfaturile sale.

Cu o mențiune specială de mulțumirilor mă îndrept către Dr. Sergi Sabater și Dr. Elisabet Tornés, de la Institutul Catalan de Cercetare a Apei (ICRA), Girona, Spania, pentru că m-au primit în laboratorul lor în timpul mobilității de doctorat și mi-au permis să folosesc facilitățile disponibile, și pentru ajutorul și îndrumarea lor.

Aș dori să menționez și ajutorul lui Dr. Eloy Bécares Mantecón în timpul mobilităților mele la Institutul de Mediu din León , Spania.

Adresez mulțumiri și comisiei de îndrumare de doctorat formată din D-na. Conf. Univ. Dr. Laura Momeu, D-na. Prof. Univ. Dr. Cristina Roșu și Dl. Lect. Univ. Dr. Dan Costin pentru sfaturile și încurajările oferite de-a lungul anilor studiilor de doctorat. Și, de asemenea, sunt foarte recunoscătoare referenților acestei teze de doctorat: Conf. Univ. Dr. Habil. Delia Maria Gligor, Conf. Univ. Dr. Laura Momeu, Conf. Univ. Dr. Angela Maria Bănăduc și Prof. Dr. Eloy Bécares Mantecón pentru că mi-au făcut onoarea de a citi lucrarea mea și de a o evalua.

Simt un profund sentiment de recunoștință pentru colega și prietena mea Maria Borrego-Ramos de la Institutul de Mediu din León , Spania, pentru tot ajutorul, încurajarea și motivația de a continua, pentru prietenia ei și toate momentele petrecute în León , momente pe care nu le voi uita niciodată.

Aș dori să-mi exprim recunoștința și față de colegii mei de la Facultatea de Știința și Ingineria Mediului, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, Alexandra Cozma - Colcer, Pop Cristian, Dragoș Luntraru, Maria Bizău, Gabriela Popița, Carmen Roba, Ionescu Artur, Nicoleta Pop, Laura Lazăr-Stoica, Dorian Brahaiță, Dan Petaca, Nicu Frunzeti, George Ispas, Alin Necula, Sandra Nistea pentru tot ajutorul și sprijinul lor. În mod deosebit vreau să le mulțumesc Alexandrei Cozma - Colcer și lui Pop Cristian pentru că m-au ajutat în timpul campaniilor de teren și în timpul activităților de laborator. De asemenea, datorez mulțumiri lui Dragoș Luntraru pentru că m-a ajutat să realizez hărțile pe care le-am folosit în această lucrare.

Adresez mulțumiri și lui Amparo Martínez Morales de la Serviciile Centrale pentru Cercetare pentru ajutorul acordat în realizarea fotografiilor la microscopul electronic ale acestei teze de doctorat.

Și, de asemenea, îi datorez mulțumiri Danei Man pentru ajutorul acordat în realizarea copertei tezei și a separatoarelor de capitole.

Aș dori să îi mulțumesc și lui Luis Terrones pentru realizarea picturilor care oferă o viziune specială acestei teze și pentru generozitatea sa.

Doresc să adresez cuvinte speciale de recunoștință părinților mei și surorii mele pentru afecțiunea și înțelegerea lor și pentru că mi-au dat puterea să continui cu această lucrare și să completez ceea ce am făcut și să devin cine sunt. Răbdarea și sacrificiul lor sunt o inspirație în viața mea și de aceea le dedic această teză de doctorat.

Nu pot uita nici sprijinul pe care mi l-a oferit întotdeauna Feli, cumnatul meu și bucuria care mi-a adus-o Ania, nepoțica mea în ultimii doi ani ai acestui studiu. Acest lucru mi-a oferit motivație și sprijin moral.

Aș dori să le mulțumesc și tuturor membrilor familiei pentru încurajarea lor constantă.

Este imposibil să-i menționez pe toți cei care au avut un impact asupra acestei lucrări, totuși există multe persoane care mi-au oferit sprijin moral și aceasta a fost foarte important.

Mulțumesc și Centrului de Cooperare Internațională de la Universitatea Babeș-Bolyai, pentru că mi-a oferit sprijin financiar, oferindu-mi burse Erasmus+ Plasament.

Doresc să mai menționez și faptul că, în perioada studiilor de doctorat, coordonatorul meu mi-a oferit ocazia să beneficiaz și de sprijin financiar prin intermediul unui grant al Autorității Naționale Române pentru Cercetări Științifice, CCCDI - UEFISCDI, proiectul 3-005 Instrumente pentru mineritul durabil al aurului în UE (SUSMIN).

Cuprins

LISTA ABREVIERILOR.....	2
REZUMATE.....	3
1. INTRODUCERE.....	11
1.1. Ipoteza și obiective studiului.....	13
1.2. Scurt istoric al cercetărilor algologice cu referire la diatomeele bentonice din bazinul hidrografic al râului Abruș.....	14
1.3. Scurtă caracterizare a clasei Bacillariophyceae.....	15
1.4. Valoarea bioindicatorilor a diatomeelor.....	22
1.5. Diatomee teratologice - instrument pentru monitorizarea metalelor/contaminarea cu ape acide de mină.....	24
2. MATERIALE ȘI METODE.....	28
2.1. Area de studiu.....	29
2.2. Punctele de colectare.....	30
2.3. Prelevarea probelor de diatomee bentonice.....	38
2.4. Prelucrarea și pregătirea materialelor algologice pentru examinarea microscopică.....	39
2.5. Măsurarea parametrilor fizico-chimici și determinarea concentrației unor ioni și metale grele.....	43
3. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	49
3.1. DIATOMEE TERATOLOGICE DIN APE POLUATE CU APE ACIDE DE MINĂ.....	49
3.2. O NOUĂ FORMĂ DE TERATOLOGIE IDENTIFICATĂ ÎNTR-UN RÂU CONTAMINAT CU METALE GRELE ÎN ZONA MINIERĂ ROȘIA MONTANĂ (ROMÂNIA)	79
3.3. EXPLORAREA TERATOLOGIEI DIATOMEELOR UTILIZÂND GEOMETRIA MORFOMETRICĂ	84
3.4. VARIAȚII ÎN MORFOLOGIA DIATOMEELOR: IMPLICAȚII PENTRU INDICII AI CALITĂȚII APEI BAZATE PE DIATOMEE.....	98
3.5. MONITORIZAREA NIVELULUI DE Zn FOLOSIND DIATOMEELE.....	105
3.6. CONTRIBUȚIA LA FLORA ROMÂNIEI.....	111
4. CONCLUZII.....	131
5. BIBLIOGRAFIE.....	135
6. LISTA PUBLICAȚIILOR.....	159
7. LINII VIITOARE DE CERCETARE.....	167
8. ANEXE.....	169

Cuvinte cheie:

Bacillariophyta, diatomee teratologice, valvocopulă deformată, ape de mină, metale grele, perturbări ambientale, geometrie morfometrică, biomonitorizarea calității apei, bioindicatori, indici bazat pe diatomee, bazinul hidrografic al râului Abrud.

INTRODUCERE

1.1. Ipoteza și obiectivele studiului

În studiul de față, ipoteza principală este aceea că perturbațiile din apele curgătoare joacă un rol cheie în structura comunităților de diatomee care, la rândul lor, ar putea fi utilizate ca buni indicatori, de ex., ai poluării cu ape acide de mină.

Pentru a testa această ipoteză, obiectivul principal al acestei teze de doctorat a fost analizarea răspunsului comunităților de diatomee dintr-o zonă afectată de prezența unei exploatare miniere istorice, și anume, bazinul râului Abrud.

Obiectivele specifice au fost:

- Analizarea tipologiei deformațiilor diatomeelor observate în zona de studiu;
- Descrierea unui nou tip de teratologie care afectează partea valvară a diatomeelor;
- Determinarea principalilor parametri fizico-chimici ai apei în zona de studiu, evidențiind pe cei cu efecte majore asupra compoziției, structurii și dinamicii comunităților de diatomee;
- Explorarea relației dintre concentrația poluanților din apă și apariția formelor teratologice la diatomeele epilitice;
- Observarea efectele cauzate de concentrații mari de metale grele asupra comunităților de diatomee bentonice colectate din zona de studiu;
- Investigarea răspunsul a doi taxoni dominanți, *Achnanthydium minutissimum* (Kützing) Czarnecki și *Achnanthydium macrocephalum* (Hustedt) Round & Bukhtiyarova la efectele contaminării cu ape acide de mină din zona de studiu;
- Identificarea setului de predictorii de mediu care duc la apariția diatomeelor anormale în zona de studiu și evaluarea relației dintre gradul de deformare a conturul valvei și poluarea cu ape acide de mediu;

- Observarea consecințelor teratologiei diatomeelor asupra protocoalelor de evaluare a calității apei bazate pe diatomee;
- Generarea unei funcții de transfer referitoare la abundența celulelor anormale și a nivelurilor de metale din ape, în vederea utilizării acesteia ca metrică de biomonitorizare;
- Evaluarea calității apei în zona de studiu, pe baza structurii comunităților de diatomee;
- Identificarea principalului metal greu care afectează comunitățile de diatomee din zona de studiu
- Noi contribuții la flora României.

1.2. Scurt istoric al cercetărilor algologice cu referire la diatomeele bentonice din bazinul hidrografic al râului Abrud

Deși lucrări de cercetare cu referire la comunitățile de diatomee din bazinul râului Arieș (cursul râului și afluenții principali) sunt destul de multe, lucrări care să abordeze aceste comunități în bazinul râului Abrud sunt puține.

Astfel, în 2007 a fost publicat un studiu care tratează atât comunitățile algale, cât și cele de nevertebrate și pești din bazinul Arieșului, studiu care a luat în considerare și un punct de colectare din bazinul râului Abrud (chiar pe cursul râului). Această lucrare a fost publicată în revista Studia Univ. Babeș-Bolyai, Biologia (Momeu et al., 2007).

O altă lucrare similară a apărut în 2009, studiul tratând de asemenea comunitățile algale, de macronevertebrate și pești din bazinul hidrografic al râului Arieș cuprinzând din nou același punct de colectare de pe cursul râului Abrud menționat mai sus (Momeu et al., 2009).

În 2011 a apărut o altă lucrare ce face referire doar la comunitățile de diatomee din bazinul Arieșului și, și de această dată, punctele de prelevare a probelor a cuprins un punct de pe râul Abrud (Szekely-Andorko et al., 2011).

Un alt studiu limnologic cu referire la comunitățile algale și a celor de nevertebrate, a fost publicat în 2012, dar de data aceasta probele au fost prelevate din cinci tăuri din zona Roșia Montană (Battes et al., 2012).

1.3. Scurtă caracterizare a clasei Bacillariophyceae

Diatomeele (Bacillariophyceae) constituie un grup de alge unicelulare, prezente în aproape toate tipurile de apă de suprafață, chiar și în condiții extreme. Caracterul deosebit al acestui grup constă atât în particularitățile structurale ale celulei, în special ale frustulei de siliciu, cât și în importanța lor majoră și multilaterală în ecosistemele acvatice. De asemenea, ele sunt printre cele mai studiate organisme vegetale acvatice pe planul aplicativ al evaluării și monitorizării calității ecosistemelor acvatice, datorită proprietăților indicatoare ale multor specii (Hustedt, 1957; Zelinka și Marvan, 1961).

1.4. Valoarea bioindicatoare a diatomeelor

Diatomeele sunt organisme cu un success enorm, judecând după adaptabilitatea lor, distribuția și vechimea relativă. Acest grup de alge prezintă numeroase avantaje datorită cărora a fost consacrat ca biondicator în studiile de monitorizare ale ecosistemelor acvatice (Cholnoky, 1968; Lowe, 1974).

Particularitățile ecologice ale diatomeelor au condus la o largă utilizare a lor ca bioindicatori și sunt organismele algale cele mai utilizate și în monitoringul calității apelor, la noi în țară chiar de instituțiile guvernamentale responsabile de evaluarea calității apelor (Momeu & Péterfi, 2007, 2009; Szigyarto & Bakos, 2015). Este evident că pentru rezultate cât mai concludente evaluarea calității apelor se realizează la nivelul comunităților algale, ceea ce a stimulat dezvoltarea cunoștințelor în acest domeniu, standardizarea metodelor de lucru și extinderea aplicării acestor metode la nivel european (Kolkwitz & Marsson, 1908; Patrick, 1949).

Metodele de estimare a calității apei bazate pe utilizarea diatomeelor sunt bine dezvoltate, valoarea lor fiind dovedită la nivel internațional, pentru diverse tipuri de habitate acvatice – ape dulci, ape salmastre și estuare, medii lentice și lotice, zone umede. Folosirea diatomeelor nu este destinată a fi o metodă „rapidă”, fiind necesară o perioadă pentru prepararea probelor și analiza speciei.

Procedurile de monitoring bazate pe organisme vii cuantifică starea de „sănătate” a unui râu, contrar simplei caracterizări a componentelor chimice și fizice (Karr, 1991; Rocha, 1992). Chiar și prin monitorizarea chimică continuă se pot omite evenimente cu mare impact asupra organismelor – cheie a comunității biologice. Este, de asemenea, dificil a interpreta

influențele sinergice ale substanțelor chimice asupra biocenozelor acvatice, viața fiind ultimul monitor al calității mediului.

În prezent, diatomeele sunt folosite ca indicatori ai eutrofizării lacurilor, deoarece sunt o componentă abundentă, diversificată și importantă în ecosistemele lotice. Răspunsurile diatomeelor la eutrofizarea lacurilor pot avea implicații importante pentru alte componente acvatice ale ecosistemelor. În timp ce diatomeele în mod colectiv arată toleranță față de productivitatea lacului, speciile individuale au habitat specific și chimismul apei diferit.

Cu ajutorul diatomeelor se evaluează și condițiile ambientului râurilor și pâraurilor. Folosirea indicilor de diatomee ale condițiilor ambientale în râuri și pârauri e importantă pentru trei motive principale: importanța lor în ecosisteme, utilitatea lor ca indicatori de condiții ambientale și ușurința cu care sunt folosiți. Sunt indicatori ai condițiilor ambientale, deoarece ele răspund direct și sensibil la multe schimbări fizice, chimice și biologice în ecosistemele râurilor și pâraurilor. Diatomeele pot fi găsite în aproape toate habitatele acvatice, astfel încât același grup de organisme poate fi folosit pentru compararea pâraurilor, lacurilor, mlaștinilor, oceanelor, estuarelor și chiar a câtorva habitate acvatice efemere (Stoermer & Smol, 1999; Smol & Stoermer, 2010).

Caracteristicile comunităților diatomeelor au fost folosite pentru a evalua integritatea ecologică a râurilor și pâraurilor și pentru a diagnostica cauzele degradării (Patrick & Strawbridge, 1963). Integritatea ecologică, include mai mult decât integritatea biotică; include integritatea fizică și chimică a habitatului. În practică, integritatea biotică a fost definită ca diferența dintre caracteristicile comunității în habitatele evaluate și raportarea habitatelor.

Comunitățile alge semnaleză schimbarea proprietăților fizico-chimice și biologice ale ecosistemelor acvatice prin prezența/absența speciilor, creșterea sau diminuarea populațiilor și prin alte reacții față de schimbările mediului. În practică o serie de alge bentonice sunt des folosite ca bioindicatori în evaluarea calității apelor naturale (Potapova și Charles, 2002; McCormick și Cairns, 1997; Potapova & Charles, 2002), în special în aprecierea gradului de saprobitate și salinitate (Kiss, 1998; Barinova, 2017; Brabcová et al., 2017; Nautiyal & Nautiyal, 2018). În cazul în care calitatea apei este alterată din cauza unor activități umane și schimbarea depășește limitele de toleranță a unei specii, populația acesteia se va reduce sau va dispărea. Identificarea surselor care au cauzat acest declin de obicei nu este ușoară și necesită investigații suplimentare complexe, dar “răspunsul” dat de comunitatea de alge va indica o anumită calitate a apei și va direcționa spre o sursă de poluare.

Comunitățile bentonice de diatomee sunt utilizate pe scară largă în monitorizarea calității apelor, datorită unor aspecte și calități (Lowe și Pan, 1996; Bellinger & Sigee, 2015; Kale & Karthick, 2015; Morin et al., 2016), cum ar fi:

- În general, algele autotrofe bentonice, ca producători primari ocupă o poziție importantă și critică între factorii fizico-chimici ai mediului și celelalte organisme ale lanțurilor trofice. Astfel, perturbările la nivelul algelor bentonice pot influența grav celelalte nivele ale ecosistemelor acvatice. Unele studii arată că indicii calculați pe baza comunităților de diatomee bentonice permit evaluarea mai precisă a calității și integrității biotice a ecosistemelor acvatice, decât cele bazate pe studiul protozoarelor sau nevertebratelor (Beyene et al., 2009).
- Atât speciile atașate de substrat, cât și speciile mobile au potențial indicator ridicat, datorită faptului că nu pot evita poluarea prin migrare și astfel ori se adaptează, ori pur și simplu dispar (Blanco et al., 2011).
- Diatomeele bentonice au un ciclu de viață relativ scurt, ceea ce permite interceptarea unui răspuns rapid la schimbările mediului. De obicei, comunitățile algale bentonice sunt primele care reacționează la perturbările mediului și sunt primele care “își revin” după restaurarea condițiilor optime.
- Comunitățile de diatomee bentonice au în general o diversitate specifică mai mare decât alte grupe de organisme acvatice. Pe o suprafață de cm^2 a substratului pot exista simultan peste 100 de specii și pentru că fiecare are un interval optim și de toleranță propriu față de factorii de mediu, comunitatea va funcționa ca un întreg, ca un sistem complex de monitorizare biologic.
- Deoarece comunitățile bentonice au o structură compactă din punct de vedere al spațiului ocupat, pentru prelevarea unor probe reprezentative sunt de ajuns câțiva cm^2 suprafață de substrat.
- Probele prelevate sunt ușor de manipulat și necesită spațiu de depozitare redus, ceea ce poate fi un mare avantaj pe termen lung, iar probele conservate și preparatele microscopice fixate pot fi oricând reexamine pentru investigații ulterioare.
- Un avantaj îl constituie, de asemenea, și posibilitatea identificării taxonilor prin metoda clasică bazată pe morfologia frustulelor, relative ușor de studiat la microscopul optic.

Toate aceste avantaje ale diatomeelor, ca bioindicatori ai calității apelor, sunt recunoscute de cercetători, iar evaluarea și monitorizarea apelor naturale pe baza acestora ia amploare în tot mai multe țări.

Cercetările din domeniul ecologiei acvatice, împreună cu practica monitorizării apelor și cu rezultatele studiilor din alte domenii trebuie să ducă, în cele din urmă, spre o abordare integrată multidisciplinară, care cuprinde nu doar diatomeele, ci și toate celelalte grupe de organisme acvatice (Jonge De et al., 2008).

1.5. Diatomee teratologice - instrument pentru monitorizarea metalelor/contaminarea cu ape acide de mină

Modificările morfologice ale diatomeelor sunt anomalii fenotipice neadaptive cauzate de stresul din mediu care afectează, în general, conturul frustulei sau forma striurilor (Falasco et al. 2009a). Conform literaturii actuale, prezența deformărilor în medii contaminate este considerată un indiciu al stresului; cu toate acestea, mecanismele care induc deformări și cuantifică teratologiile rămân puțin înțelese (Lavoie et al., 2017).

Malformațiile sunt de obicei detectate în comunitățile naturale de diatomee, dar frecvența lor este în general scăzută ($<0,5\%$ în conformitate cu Morin et al., 2008a; Arini et al., 2012). Cu toate acestea, proporțiile valvelor anormale pot crește odată cu prezența mai multor factori de stres (Lavoie et al., 2017).

Mai multe studii au arătat o corelație pozitivă semnificativă între abundența celulelor deformate și stresul din mediu, cum ar fi condițiile de secetă, viteza mică și debitul apei, creșterea temperaturii și intensitatea luminii (Antoine și Benson-Evans, 1986), contaminarea cu pesticide (Debenest et al., 2010) sau scăderea calității apei (Gómez și Licursi, 2003). Cu toate acestea, cele mai cunoscute cauze care determină apariția formelor teratologice sunt condițiile de creștere artificială (Falasco et al., 2009b) și contaminarea cu metale grele (Cantonati et al., 2014). Malformațiile pot fi, de asemenea, induse de alți factori independenți, cum ar fi proasta funcționare a proteinelor responsabile pentru transportul și depunerea siliciului (Kröger et al., 1994, 1996, 1997; Kröger și Poulsen, 2007; Knight et al., 2016) sau pentru structura și integritatea mecanică a valvei (Kröger și Poulsen, 2007; Santos et al., 2013).

Deformitățile cel mai des întâlnite pot fi clasificate în funcție de tipul lor astfel: conturul valvei deformat/forma aberantă a valvelor, sternul/rafa deformată, striuri/areole deformate, deformări mixte (Falasco et al., 2009a).

Mulți autori consideră că modificările morfologice ale diatomeelor ar putea fi instrumente utile pentru a monitoriza schimbările de mediu din râuri (Cattaneo et al., 2004; Cantonati et al., 2014), inclusiv cele cauzate de prezența apelor acide de mină (AMD), care în ultimele decenii a fost considerată o sursă importantă de contaminare a mediului (Letterman și Mitsch, 1978). S-a raportat că AMD induce de asemenea teratologii, iar unii autori au luat inclusiv în considerare raportul indivizilor deformați pentru a detecta consecințele drenării apelor acide de mină (Cattaneo et al., 2004; Lavoie et al., 2012).

Prezența frustulelor deformate în ecosistemele poluate este adesea o reacție la substanțele chimice nocive. Din acest motiv, a apărut un mare interes în utilizarea anomaliilor morfologice în studiile de biomonitorizare. Teratologiile pot fi considerate instrumente pentru a evalua calitatea ecosistemului acvatic și este foarte posibil ca apariția și severitatea lor să fie legate de gradul de stres din mediu (Lavoie et al., 2017).

În acest context, morfologia celulară poate răspunde la relația dintre contaminarea metalelor și adaptarea organismelor (Morin & Coste, 2006; Ancion et al., 2010). S-a raportat adesea că diatomeele răspund la stresul chimic, prin modificări în distribuția speciilor, schimbând volumul celular și generarea de teratologii (Morin et al., 2008b; Falasco et al., 2009b). Multe studii au subliniat că forma deformată a valvelor diatomeelor apare ca răspuns la contaminarea cu metale și sunt markeri ai acestui tip de poluare (Dickman, 1998; Torres et al., 2000; Gómez și Licursi, 2003). Numeroase presiuni de mediu pot fi rădăcina dezvoltării diatomeelor teratologice, iar apariția celulelor deformate ne poate spune despre efectele variațiilor de mediu (Falasco et al., 2009b). Deformitățile morfologice au fost raportate în comunitățile supuse presiunii metalelor (Falasco et al., 2009b), iar analiza cantitativă a frusturilor anormale ar putea fi un instrument pentru monitorizarea poluării metalelor (Morin et al., 2012).

Poluarea cu metale a habitatelor acvatice datorită drenării apelor acide de mină are efecte remarcabile asupra teratologiei diatomeelor (Olenici et al., 2017). Nu este ușor de măsurat gradul de deformare, dar Olenici et al., (2017) au găsit o metodă bazată pe geometria morfometrică care a permis diferențierea între indivizi normali și anormali. Astfel de teratologii sunt diverse, nu sunt încă foarte bine studiate și uneori dificil de apreciat folosind microscopie optică (Olenici et al., 2019). De fapt, una dintre problemele observării diatomeelor la microscop este natura acestui material (transparent și incolor). În acest sens,

publicația lui Sánchez et al. (2018) ce evaluează tehnici de iluminare oblică, demonstrează că aceste metode permit diferențierea detaliilor cu o mare performanță. În orice caz, o acuratețe precisă din punct de vedere taxonomic în cazul microscopiei optice este foarte importantă în studiile de biomonitorizare (Blanco et al., 2017), care indică necesitatea de noi instrumente tehnice pentru identificarea corectă la nivel de specie, abordări mecanice (cum ar fi morfometria pură-determinarea bazată pe diatomee) fiind descurajată (Blanco et al., 2017). Cu toate acestea, detectarea și identificarea automată a diatomeelor a fost o provocare pentru informaticieni (Pedraza et al., 2018) și s-a lucrat în acest sens cu perspective excelente (Pedraza et al., Op. Cit.). Cu toate acestea, trebuie să luăm în considerare variațiile naturale de mediu ce determină morfologia diatomeelor (Olenici et al., trimis), care constituie un adevărat punct de referință pentru aceste tehnologii. În ciuda importanței ecologice și a marii lor diversități în ecosistemele acvatice, diatomele din multe regiuni ale lumii sunt încă necunoscute (Blanco et al., în presă a; Blanco et al., trimis). Astfel, noile specii de diatomee sunt descrise continuu în cele mai diverse ecosisteme (Borrego-Ramos et al., 2018; Blanco et al., 2019a; Blanco et al., 2019b; Blanco et al., în presă b), dar este important de avut în vedere și comunitatea în ansamblu în studiile de mediu și de analizat compoziția lor ca o consecință a interacțiunilor biologice (Borrego-Ramos et al., 2019) sau a prezenței metalelor și a altor poluanți (Baciu et al., 2018).

2. MATERIALE ȘI METODE

2.1. Area de studiu

Râul Abrud este un afluent al râului Arieș (cel mai important afluent din partea dreaptă a râului Mureș, Forray & Hallbauer, 2000) și este situat în județul Alba, în nord-vestul României, în Munții Apuseni.

Acești munți aparțin sistemului balcanic al Carpaților Alpini, care se află în interiorul arcului carpatic formând un bloc izolat (Ianovici et al., 1976; Balintoni, 1994). Acest arc este alcătuit dintr-un nucleu vulcanic calcar-alkalin terțiar care cuprinde diverse episoade de activitate magmatică în ultimii 14,7 milioane de ani (Roșu et al., 2004).

Zona minieră Roșia Montană se află în Munții Apuseni de Sud, într-o zonă a Munților Metaliferi. Structura geologică este constituită din roci metamorfice, magmatite cretacice, ofiolite mezozoice (paleogene superioare), roci igogene neogene (Tămaș, 2007), roci

sedimentare mezozoice și miocene și sedimente cuaternare (Duma, 2008). Roșia Montană este cel mai mare depozit de aur din Europa, cu o rezervă mare în Au (500-1000 Mt) și Ag (6 Gt). Un complex extrem de vârstă miocenă este amplasat în roci sedimentare cretacice de tip flysch, cu preponderența șisturilor negre intercalate cu gresie și conglomerate și dacite. Alterarea hidrotermică a modificat dacitul, care este sursa principală a mineralizării Au-Ag (Lazăr et al., 2014).

Caracteristici hidrologice

Roșia Montană este situată în bazinul râului Abrud, drenând apele râului Corna, Săliște și Roșia, afluenți ai râului Abrud. Valea Corna curge în amonte de orașul Abrud și Săliște. Bazinul hidrografic al văii Roșiei este orientat în direcția vest și curge în aval de orașul Abrud. Zona corespunde unei topografii montane abrupte moderate (de la 700 la 1000 m a.s.l.). Datorită permeabilității scăzute a rocilor și convergenței fluxului crește debitul râurilor. Debitul mediu pe Valea Roșiei a fost de 0,16 m³ / s; pe Valea Corna a fost de 0,07 m³ / s și 0,16 m³ / s pe Valea Săliște în perioada 2001-2003 (RMCG, 2006).

AMD produs din depozitele de deșeuri acumulate în iazuri prin acțiuni miniere contaminează toate fluxurile din zona Roșia Montană. Aceste râuri se devarsă în afluenții Dunării (Forray, 2002; Florea et al., 2005; Bird et al., 2005; Manske et al. 2006; Lăcătușu et al., 2007; Baciș et al., 2012; Papp et al., 2018) și constituie o provocare în gestionarea problemei (Gray, 1997).

Clima regiunii este temperat – continentală, afectată de altitudine, cu temperaturi medii cuprinse între -4,7 și 16,9° C. Ploile sunt între 700 și 800 mm / an ploi (75%) și zăpada (24%) (Azzali et al., 2014).

2.2. Puncte de prelevare

Pentru acest studiu am ales doar ape curgătoare de suprafață. Astfel, zona aleasă cuprinde cursul râului Abrud și principalii afluenți de dreapta între localitățile Cărpiniș și Bucium-Sat. Pentru a obține o imagine în ansamblu asupra comunităților bentonice de diatomee din pâraiele studiate, am ales 16 puncte de colectare, prezentate figura 2.2.1.

Din totalul de 16 puncte de colectare alese, 2 se situează pe valea pâraului Abruzel, 2 pe pâraul Corna, 2 pe Valea Săliște (unul în amonte de iazul de decantare și celălalt în aval),

3 pe Valea Roșia (unul situat în amonte și celalate două în aval de stația de epurare), 1 pe pârâul Vârtop și 6 pe râul Abrud (în amonte și în aval de confluența cu fiecare din afluenții mai sus menționați).

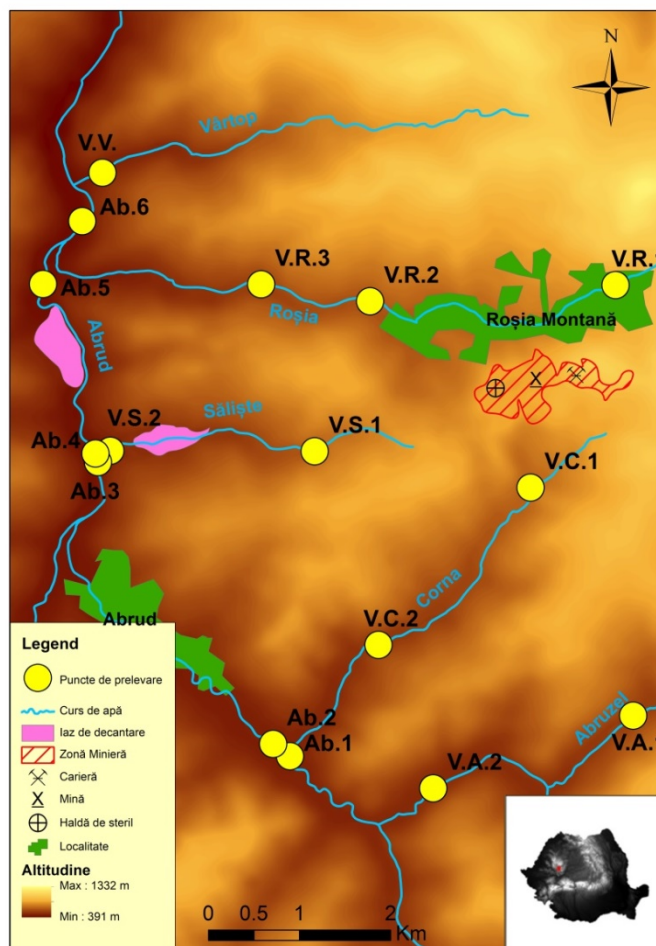


Figure 2.2.1. Harta punctelor de colectare în zona de studiu (V.V.= Valea Vârtop, V.R.1=Valea Roșia1, V.R.2= Valea Roșia2, V.R.3= Valea Roșia3, V.S.1= Valea Săliște1, V.S.2= Valea Săliște2, V.C.1= Valea Corna1, V.C.2= Valea Corna2, V.A.1= Valea Abruzel1, V.A.2= Valea Abruzel2, Ab.1=Abrud1, Ab.2=Abrud2, Ab.3=Abrud3, Ab.4=Abrud4, Ab.5=Abrud5, Ab.6=Abrud6)

2.3. Prelevarea probelor, prelucrarea materialului algologic și pregătirea pentru examinarea microscopică

Scopul prioritar al studiului fiind determinarea compoziției și a unor particularități structurale ale comunităților de diatomee bentonice, prelevările în perioada vegetativă (din

primăvară până în toamnă) au fost cele mai indicate. Astfel, colectarea s-a realizat de-a lungul anilor 2013 și 2014, în trei sezoane, primăvară, vară și toamnă, în total prelevându-se 96 de probe. Prelevarea s-a făcut de pe același tip de substrat (natural) în toate punctele de colectare, mai exact de pe pietre, conform standardelor europene (European Standards EN 13946/2003 și EN 14407/2004). Probele colectate s-au fixat în teren în soluție de formol de concentrație 4%. Acest lucru s-a făcut pentru a opri diviziunile celulare ce ar putea continua în probele vii după prelevare și ar putea conduce la modificări ale valorilor abundențelor relative, apărând astfel erori în studiul structurii cantitative a comunităților de diatomee.

Prima fază de prelucrare a probelor constă în îndepărtarea conținutului anorganic și organic (pentru a vizualiza mai bine ornamentațiile frustului în timpul examinării microscopice ulterioare), urmată de elaborarea lamelor microscopice permanente într-o a doua fază (fig. 2.3.1.).

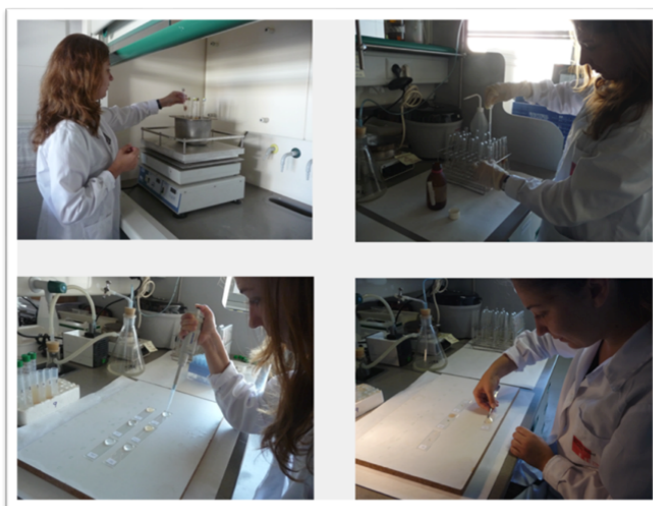


Figure 2.3.1. Prelucrarea probelor în laborator

2.4. Măsurarea parametrilor fizico-chimici și determinarea concentrațiilor unor ioni și metale grele

Simultan cu prelevarea probelor bentonice sau măsurat *in situ* și principalii parametrii fizico-chimici ai apei (pH, temperatura, salinitatea, conductivitatea, TDS, O₂, turbiditatea) cu un multiparametru portabil (350i/SET WTW) și un turbidimetru portabil (WTW). De asemenea s-a colectat apă pentru determinarea concentrației unor anioni și cationi în laborator cu ajutorul unui Ion Cromatograf Dionex ICS – 1500 și a unor metale grele folodind un spectometru de absorbție atomică ZEE nit 700.

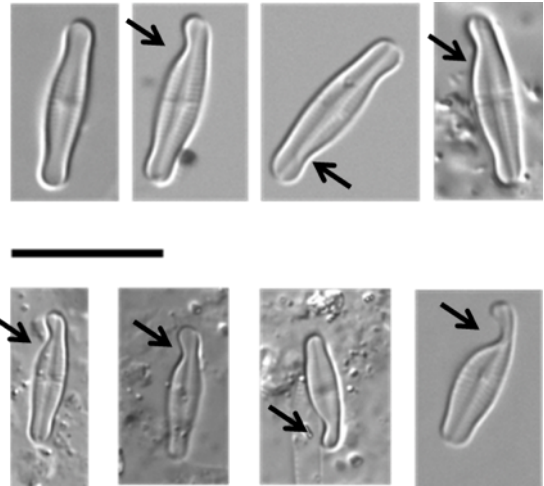
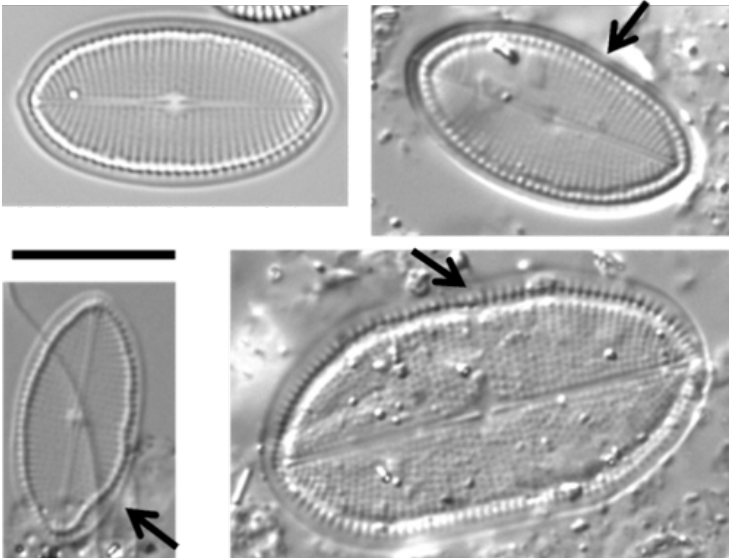
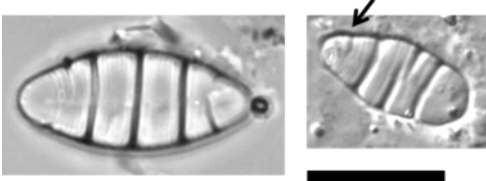
3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

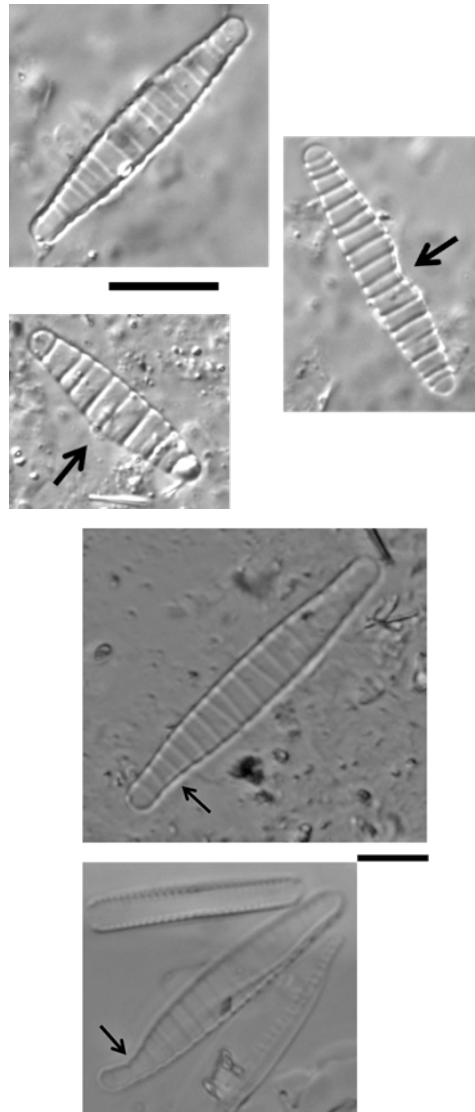
3.1. *Forme teratologice ale diatomeelor în zone poluate cu ape acide de mină*

De-a lungul perioadei de studiu, au fost observate o serie de forme anormale acestea fiind rezumate în tabelul 3.1.1. În total, au fost detectate cinci categorii de teratologie și au fost ilustrate câteva imagini ale fiecărui tip. A fost observată o dinamică sezonieră a comunităților de diatomee, nu numai în ceea ce privește numărul de specii sau abundența lor relativă, ci și în ceea ce privește tipul de teratologie identificată. Cel mai repetat tip anormal a fost deformarea conturului valvei, lucru care este în concordanță cu lucrările anterioare (Cattaneo et al., 2004; Falasco et al., 2009a, b; Lavoie et al., 2012; Cantonati et al., 2014; Tornés et al., 2014). Într-o măsură mai mică, s-au observat modificări ale sistemului canalului rafei (ex.: fibule deplasate) în timpul verii și toamnei 2013 și în primăvara și toamna 2014, precum și a striurilor deformate în toamna anului 2013 și în primăvara și toamna 2014. Teratologiile mixte au fost observate doar în primăvara anului 2014 și o singură dată, în vara anului 2013, s-a identificat o deformare a valvocopulei.

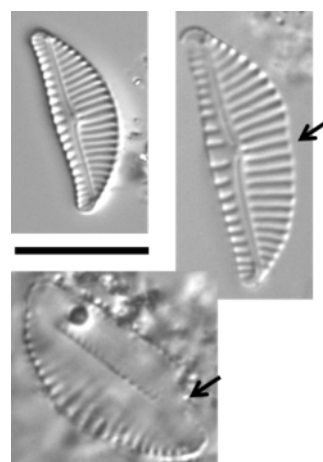
Tabelul 3.1.1. Deformități ale diatomeelor identificate în zona de studiu (scara: 10 μ m).

Săgețile indică deformitățile

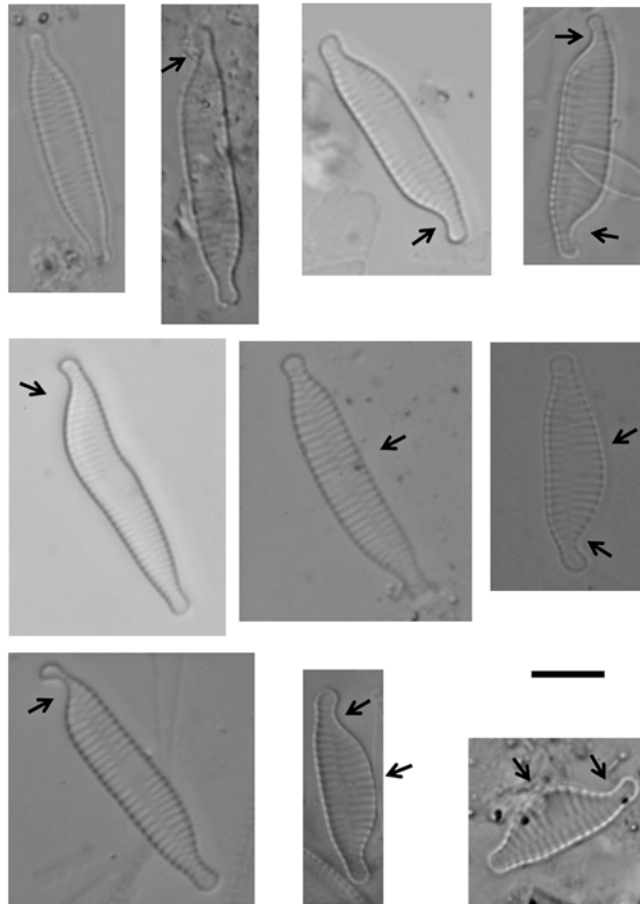
Teratologia descrisă	Indivizi normali vs. deformați
Tipul 1: Deformare a conturului valvei (diferite grade de deformare)	 <i>Achnanthidium minutissimum</i> (Kützing) Czarnecki  <i>Cocconeis euglypta</i> Ehrenberg  <i>Diatoma mesodon</i> (Ehrenberg) Kützing



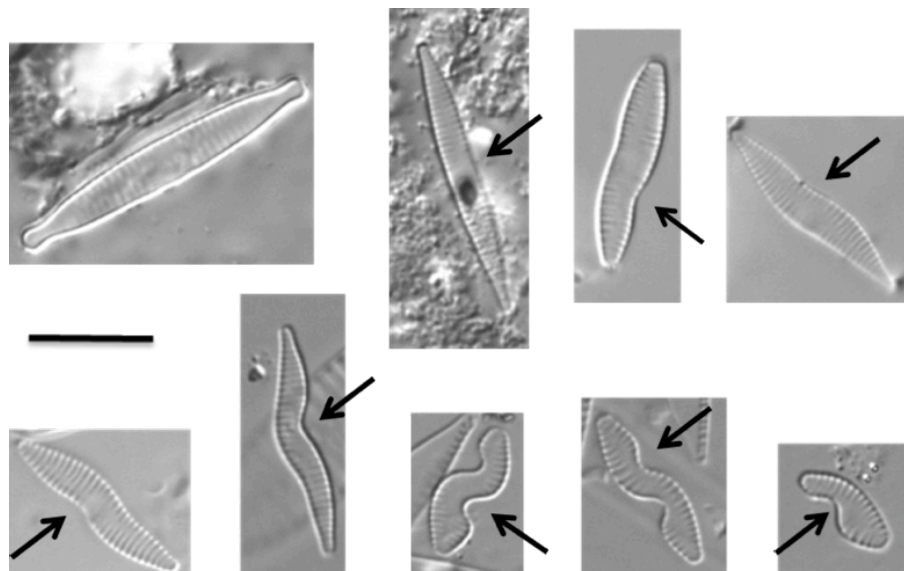
Diatoma moniliformis Kützing



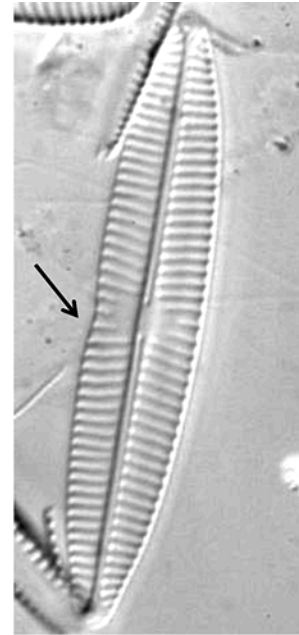
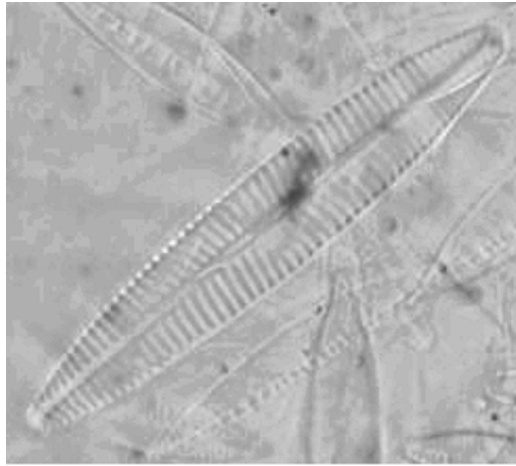
Encyonema minutum (Hilse) D.G. Mann



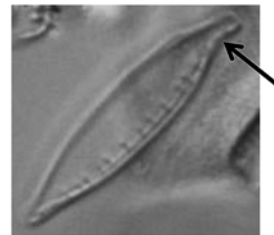
Fragilaria recapitellata Lange-Bertalot et Metzeltin



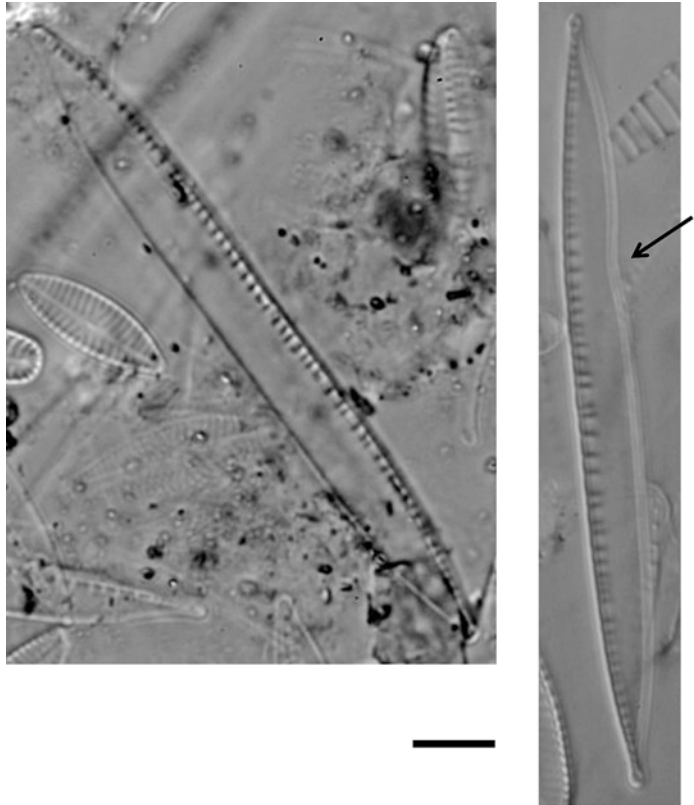
Fragilaria rumpens (Kützing) Carlson



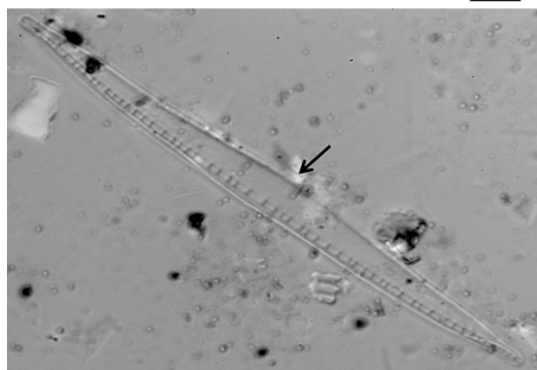
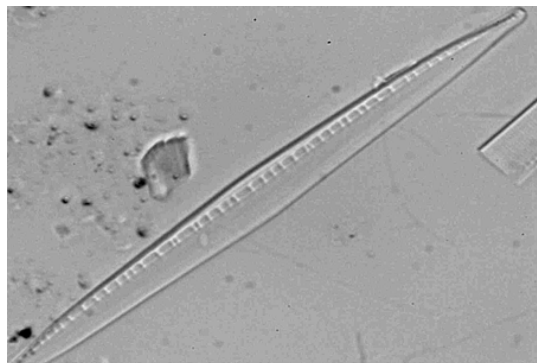
***Navicula tripunctata* (O.F. Müller) Bory**



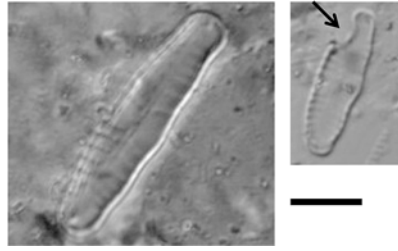
***Nitzschia dissipata* (Kützinger) Grunow**



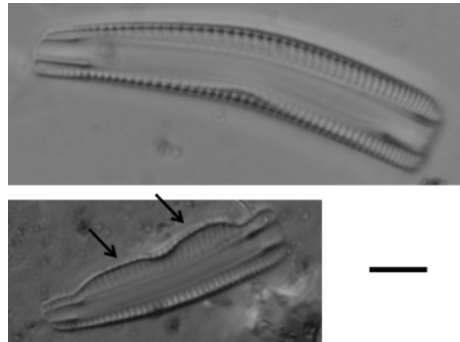
Nitzschia linearis (Agardh) W.M. Smith



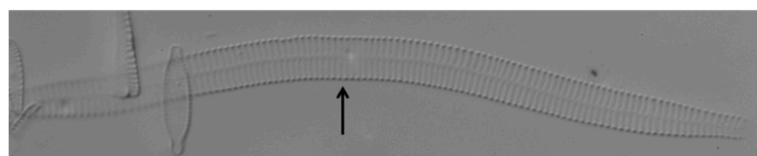
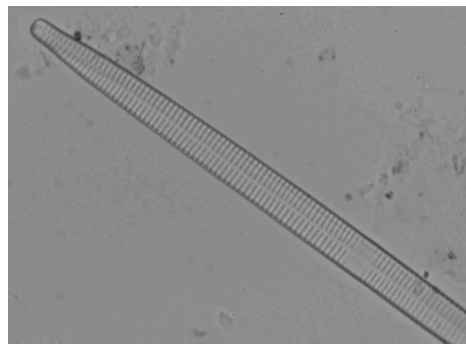
Nitzschia media Hantzsch.



***Reimeria sinuata* (Gregory) Kociolek et Stoermer**

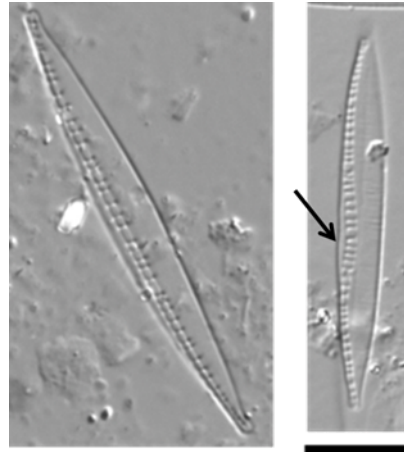


***Rhoicosphenia abbreviata* (C.Agardh) Lange Bertalot**

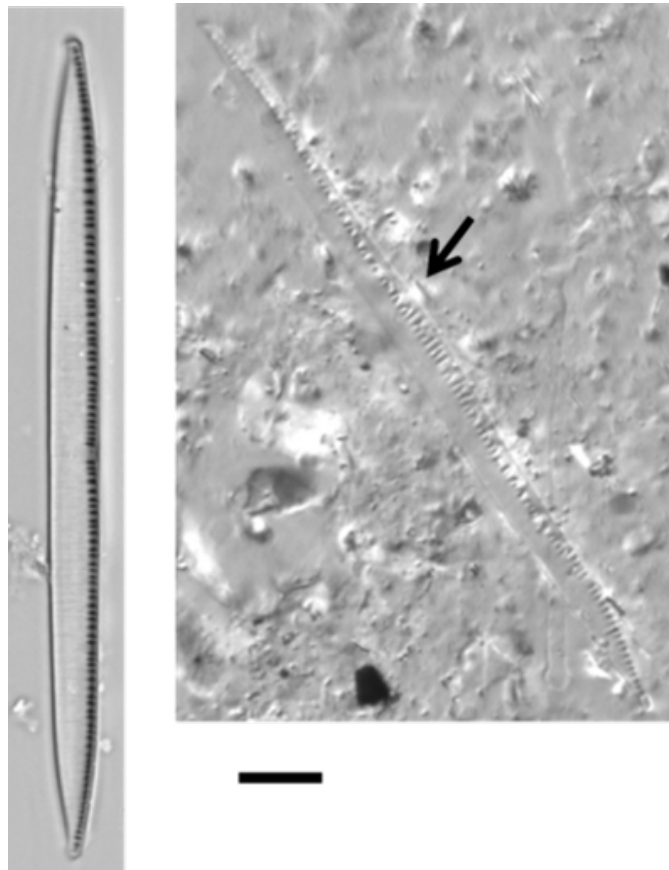


***Ulnaria ulna* (Nitzsch.) Compère**

Tipul 2:
Modificări ale
rafei
(ex.: fibule
deplasate)

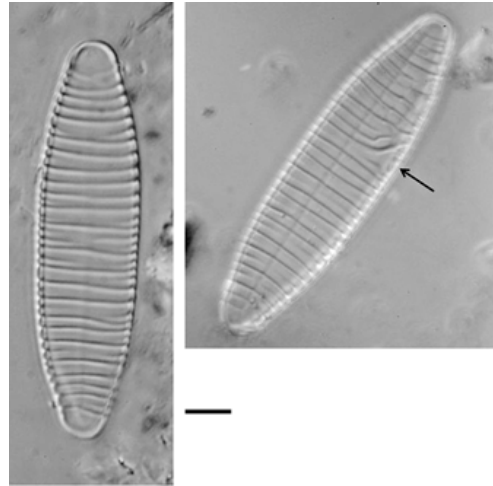


Nitzschia dissipata (Kützing) Grunow

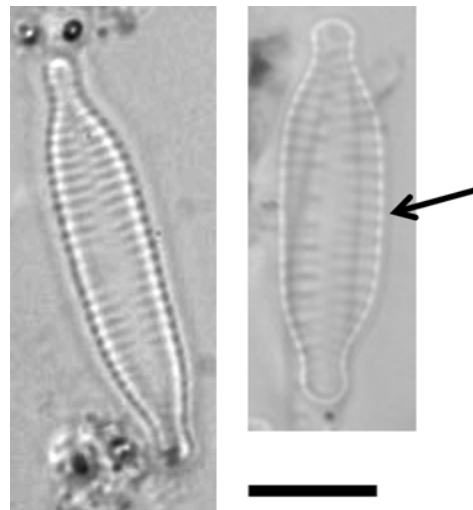


Nitzschia linearis (Agardh) W.M. Smith

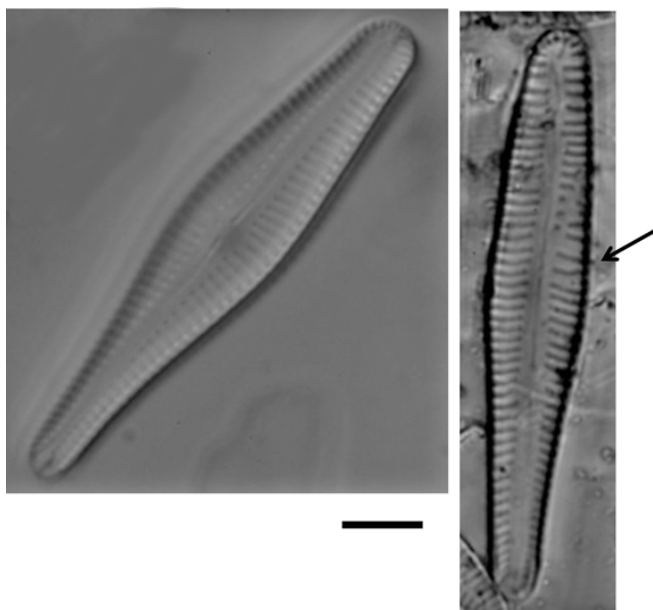
**Tipul 3: Striuri
deformate**



Diatoma vulgaris Bory

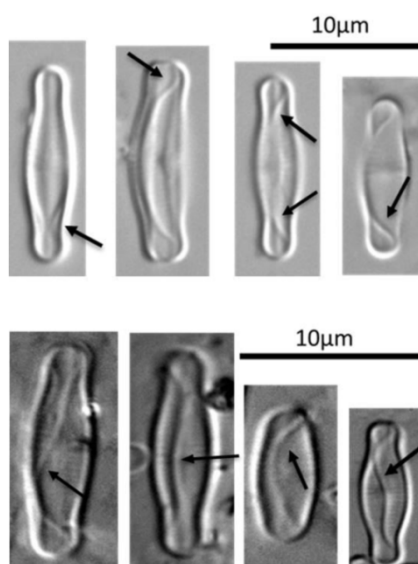


Fragilaria recapitellata Lange-Bertalot et Metzeltin



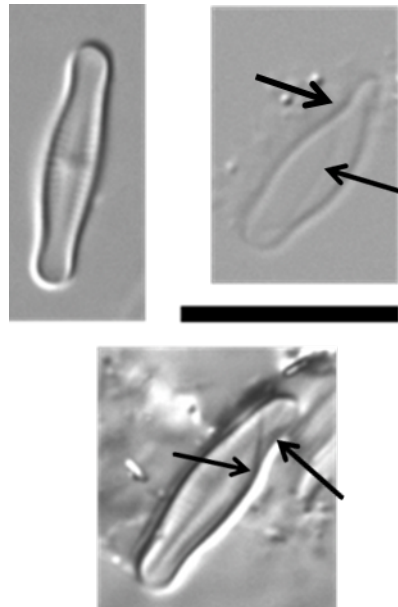
Gomphonema subclavatum Grunow

Tipul 4:
Valvocopulă
deformată



Achnantheidium minutissimum
(Kützing) Czarnecki s.l. (Olenici et al., 2019)

Tipul 5:
Teratologie
mixtă



Achnanthidium minutissimum s.l. (Kützing) Czarnecki

În urma analizei compoziției taxonomice a comunităților de diatomee afectate s-a observat că 37 de specii de diatomee au prezentat anomalii care ar putea fi considerate teratologii. Speciile numărate (30) au aparținut unui număr de 14 genuri (fig. 3.1.1.); *Diatoma* sp., *Fragilaria* sp. și *Nitzschia* sp. au fost cele mai reprezentate cu 4 specii fiecare, fiind urmate de genul *Gomphonema* sp. reprezentat de 3 specii.

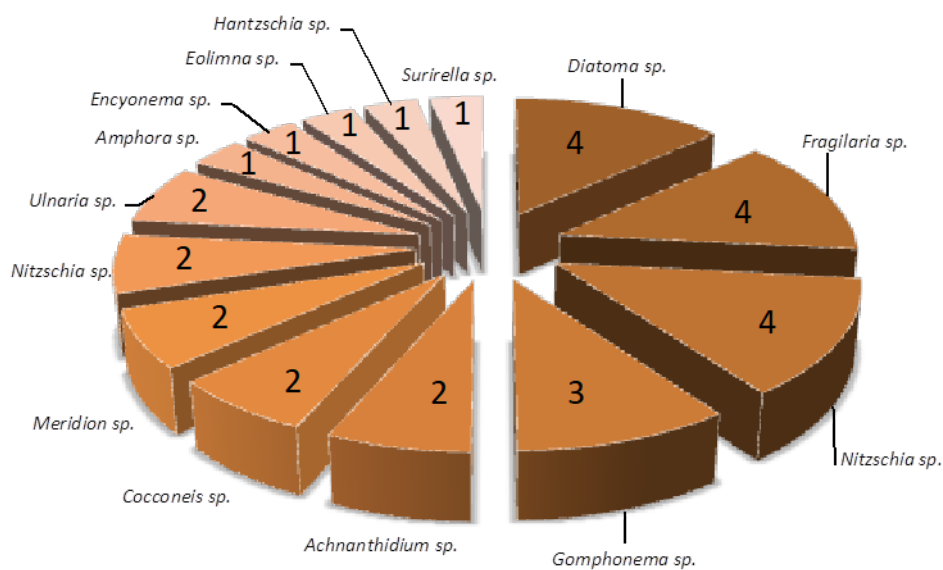


Figura 3.1.1. Numărul speciilor numărate ce au prezentat deformități în cadrul genurilor

Pentru a determina prezența metalelor grele în frustulele diatomeelor teratologice, s-a efectuat o analiză bazată pe o tehnică de spectroscopie cu raze X cu dispersie energetică cuplată la microscopul electronic (SEM). În fiecare probă folosită, au fost alese de la 1 până la 4 spectre în diferite părți ale frustulelor deformate și în materialul alăturat (fig. 3.1.2. și 3.1.3.).

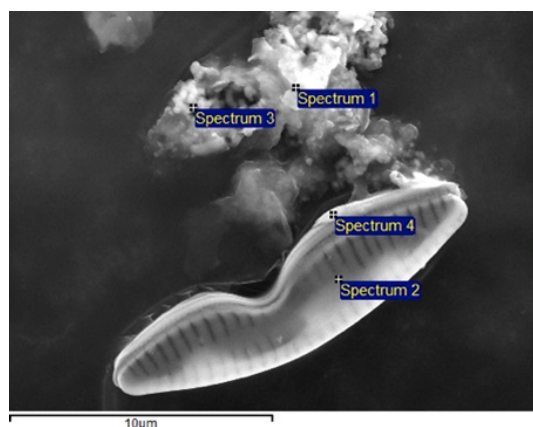


Figura 3.1.2. Microfotografia SEM a *Fragilaria rumpens* prelucrată cu tehnica de spectroscopie cu raze X cu dispersie energetică

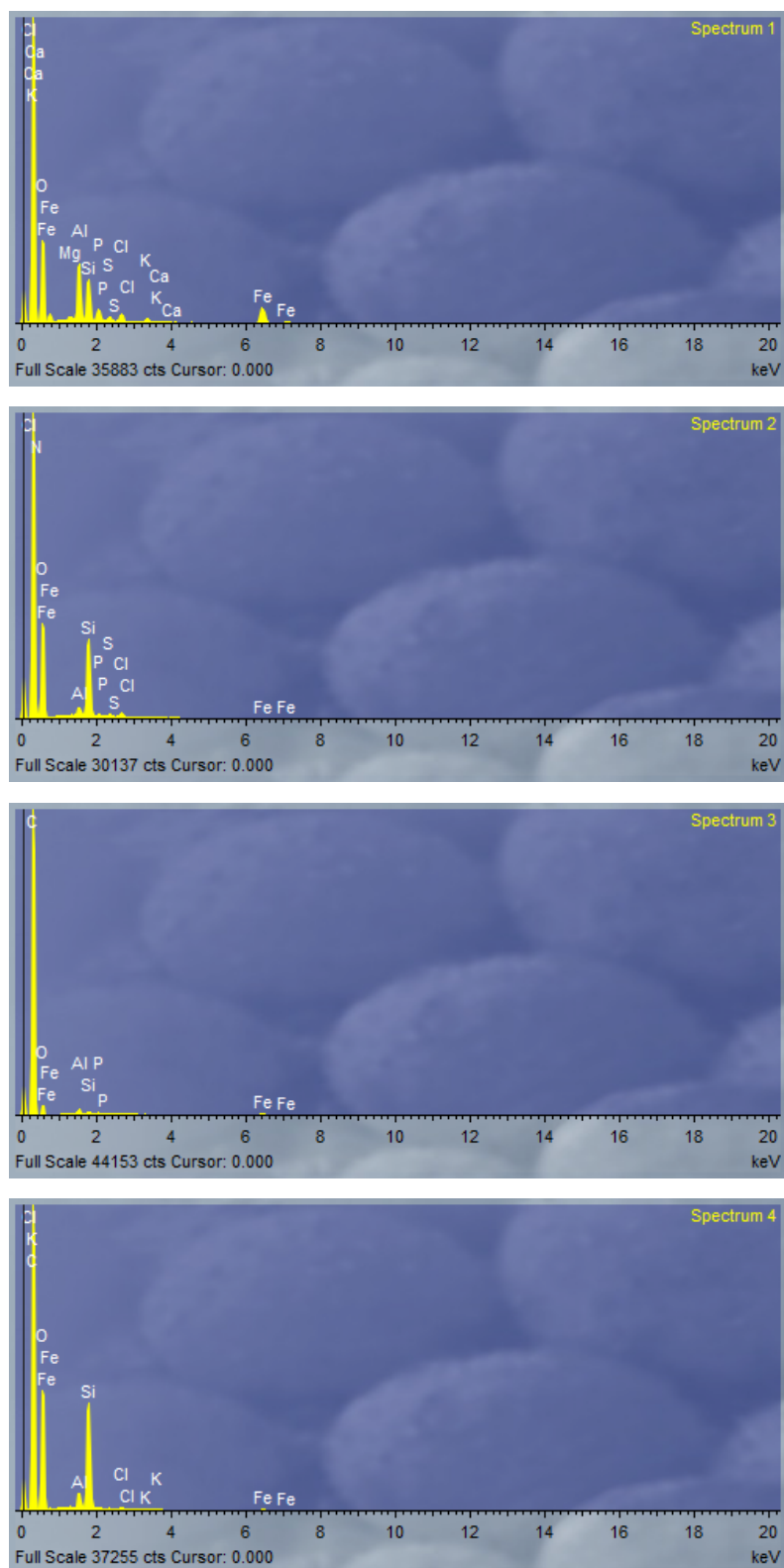


Figure 3.1.3. Spectrul chimic al punctelor analizate în figura 3.1.2.

3.2. O nouă formă de teratologie identificată într-un râu contaminat cu metale grele în zona minieră Roșia Montană

În zona de studiu unde *Achnanthidium macrocephalum* s. str. și *Achnanthidium minutissimum* s. str. au fost descrise ca specii dominante, 20,53% dintre celule au prezentat un tip de deformare care nu a fost descrisă anterior, cu o abundență de 70% și, respectiv, 30% din totalul indivizilor cu acest tip de deformare (Olenici et al., 2019). Această teratologie afectează partea valvară, în special valvocopula, care se modifică sub o formă marcant ondulată (fig. 3.2.1. și 3.2.2.).

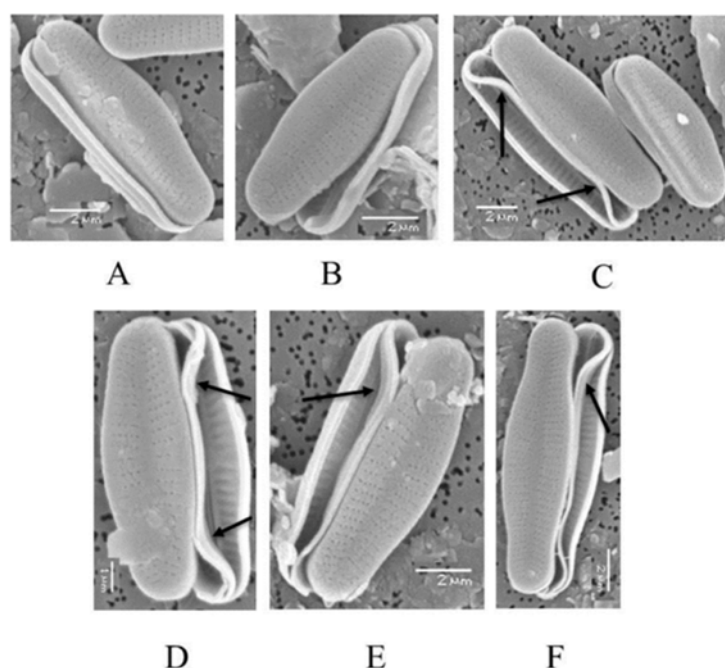


Figura 3.2.1. Valvocopulă deformată observată la SEM comparată cu una normală (A și B = frustulă normală; C, D, E and F = frustule deformate observate într-o probă procesată) (Olenici et al., 2019)

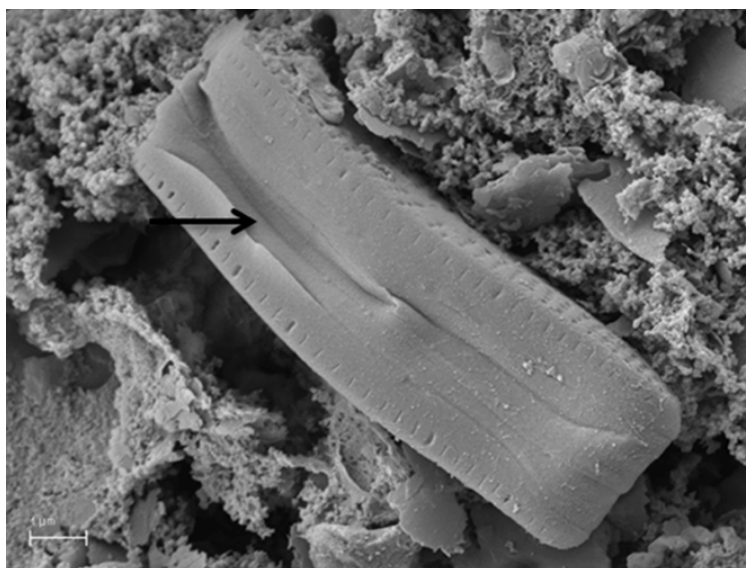


Figura 3.2.2. Valvocopulă deformată observată la SEM (frustulă deformată identificată într-o probă neprocesată) (Olenici et al., 2019)

Potrivit Olenici et al. (2019), două ipoteze diferite pot fi sugerate pentru a explica acest tip nou de teratologie:

- 1) Contaminarea cu metale crește rata de diminuare a dimensiunii valvei (Falasco et al., 2009a). Santos (2010) subliniază faptul că creșterea frustulei este posibilă numai prin separarea valvelor, în același timp, producându-se noi benzi pleurale, astfel încât noile benzi formate s-ar putea să nu se potrivească noilor valve, adoptând o formă aberantă.
- 2) După Jaccard et al., 2009, există la nivel celular un sistem dependent de Zn ce mediază absorbția acidului silicic cu ajutorul cingulinelor. Un exces de Zn afectează metabolismul siliciului (Martin-Jézéquel et al., 2003) și, în special, induce modificarea cingulinelor, ceea ce poate afecta funcționarea valvocopulei (Karp-Boss et al., 2014).

3.3. Explorarea teratologiei diatomeelor folosind geometria morfometrică

Pentru a evalua gradul de deformare a valvelor, s-a utilizat geometria morfometrică în analizarea populațiilor de *Achnantheidium*. Au fost fotografiați 543 de indivizi (348 *A. macrocephalum* și 195 *A. minutissimum*, atât celule normale, cât și celule teratologice) cu ajutorul unui microscop optic (LM). Aproximativ 40 de pseudolandmark-uri au fost stabilite în puncte constant dispersate de-a lungul conturului valvei (fig. 3.3.1.) și digitalizate utilizând programul CLIC (Dujardin et al., 2010). Coordonatele carteziene ale pseudolandmark-urilor au fost ajustate (traduse, rotite și scalate) prin metoda de suprapunere ortogonală Procrustes (Rohlf și Slice, 1990).

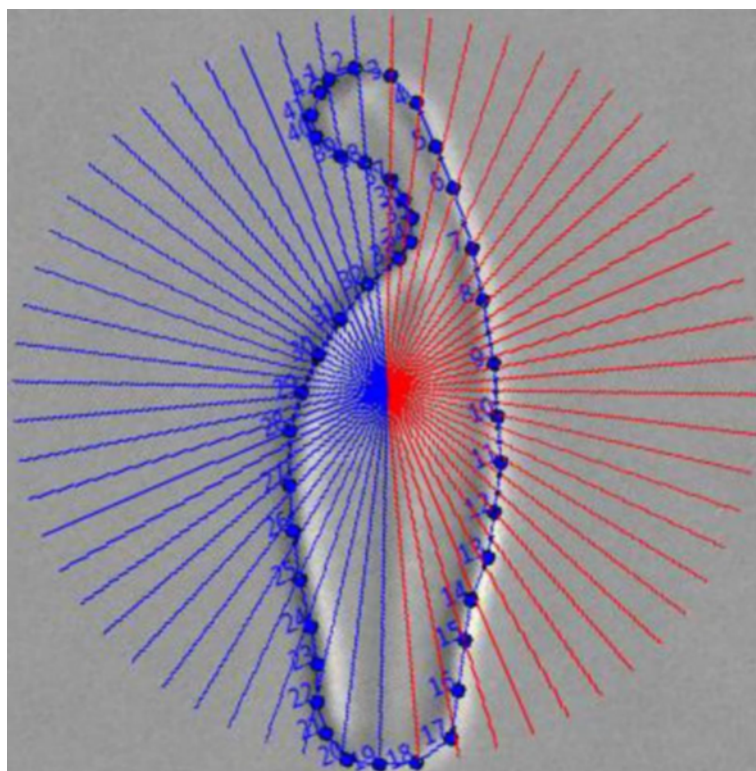


Figura 3.3.1. Poziția pseudolandmark-urilor de-a lungul conturului unei valve teratologice de *A. minutissimum* (Olenici et al., 2017)

Datele rezultate au fost apoi analizate prin metode multivariate pentru a testa diferențe semnificative între grupurile prestabilite, prin utilizarea unei analize de scalare multimetrickă

(NMDS) în software-ul Past v. 2.17 (Hammer et al., 2001). Pentru a vizualiza diagramele de dispersie rezultate pentru fiecare grup predefinit, au fost incluse în grafic elipse (fig. 3.3.2.a. și fig. 3.3.2.b.) (Olenici et al., 2017).

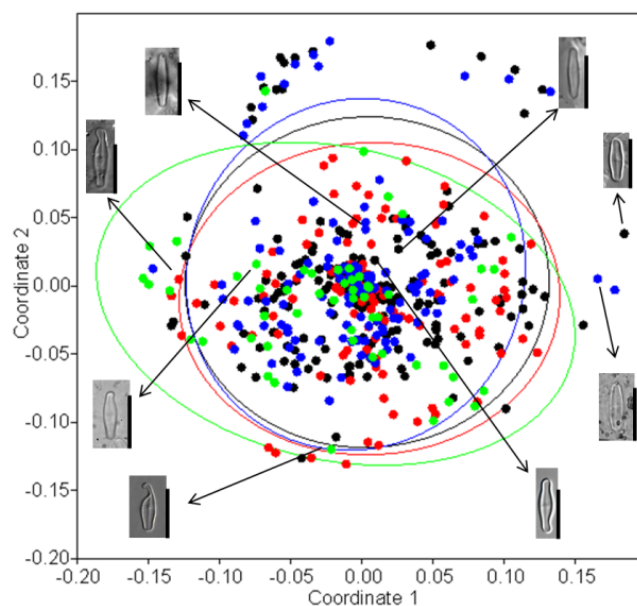


Figura 3.3.2.a. Forma nonparametrică de scalare multidimensională a coordonatelor normalizate pentru pseudolandmark-urile digitizate pe imaginile LM ale populațiilor selectate de *Achnanthidium macrocephalum* și *A. minutissimum* (Olenici et al., 2017)

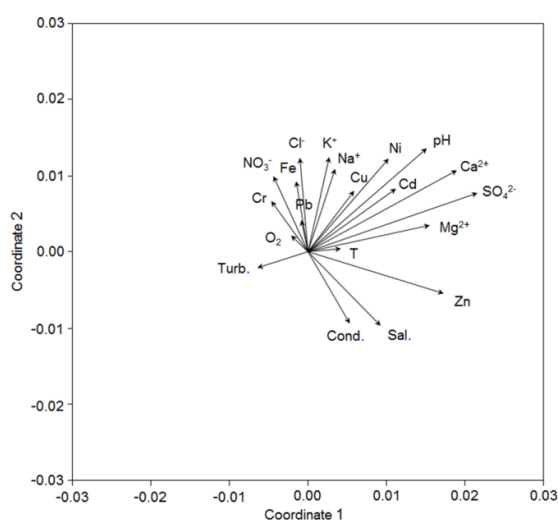


Figura 3.3.2.b. Graficul NMDS al variabilelor de mediu din locurile de prelevare analizate (Olenici et al., 2017)

Analiza NMDS indică faptul că parametrii fizico-chimici, în principal nivelul de Zn, sunt relaționați cu formele valvelor ale speciilor *Achnantheidium*. Aceasta este în concordanță cu analiza parțială a pătratelor cu două blocuri (PLS) care arată relația dintre contururile valvelor și variabilele ecologice. Conform acestei analize, conductivitate, concentrația de Zn și cea de Cu sunt parametrii care determină cel mai mult în apariția deformărilor valvelor (fig. 3.3.3.).

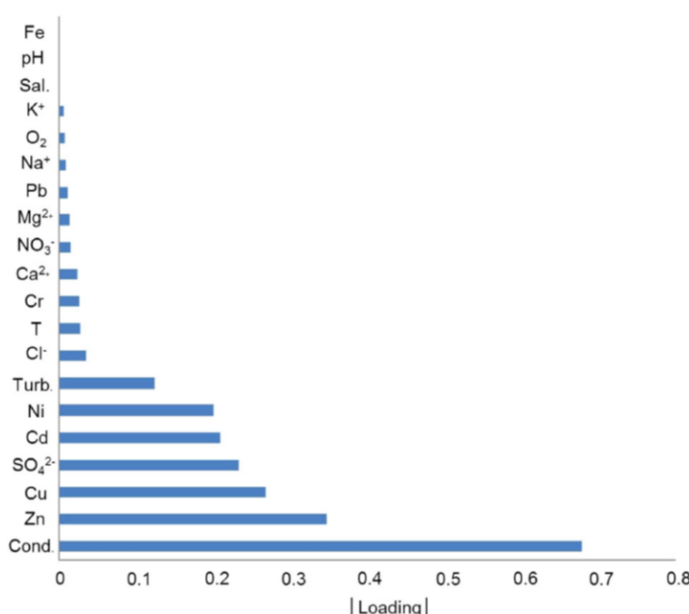


Figura 3.3.3. Importanța relativă a variabilelor limnologice în concordanță cu rezultatele PLS-ului (two-block partial least squares) (Olenici et al., 2017)

Rezultatele publicate în Olenici et al., (2017) au demonstrat eficiența metodologiei geometriei morfometrice corelată cu analize multivariate, în cuantificarea gradului de deformare a valvele diatomeelor.

3.4. Variații în morfologia diatomeelor: implicații pentru indicii calității apei bazate pe diatomee

Indicii de diatomee se bazează atât pe cantitatea de taxoni analizați pentru calcularea lor, cât și pe caracteristicile ecologice atribuite fiecărui taxon (Blanco et al., 2007). Indicele de poluare specific (IPS) este singura metrică bazată pe profilurile ecologice ale tuturor taxonilor cunoscuți la cel mai fin nivel taxonomic, incluzând formele teratologice ca taxoni distinși a căror apariție scade scorul final al acestei valori. Cu toate acestea, trebuie luat în

considerare faptul că (i) protocoalele standard (CEN, 2004) nu avertizează asupra necesității înregistrării acestor valve deformate în numărarea obișnuită și (ii) doar cca. 1% din taxonii considerați pentru calculul IPS-ului sunt forme teratologice (Lecointe et al., 1993). Prin urmare, se poate presupune că ignorarea prezenței diatomeelor deformate poate produce diagnostice eșuate ale calității apei (Olenici et al., trimis).

Valorile IPS-ului calculat ținând cont de valvele deformate au fost semnificativ mai mici, după cum se poate observa în figura 3.4.1. (Test Wilcoxon, $W = 210$, $p < 0,001$). În eșantioanele în care diatomeele teratologice au fost deosebit de abundente (mai mult de 30% din indivizii numărați), supraestimarea IPS-ului poate ajunge până la 8 unități (fig. 3.4.2.), Astfel încât calitatea scăzută a apei din aceste locuri poate rămâne ascunsă. Se poate dovedi că formele normale și cele modificate ale aceleiași specii au profiluri ecologice diferite în ceea ce privește variabilele limnologice. Acest lucru este în conformitate cu Coste et al. (2009) și Fernandez et al. (2018) care au observat că formele teratologice au profiluri ecologice diferite decât cele normale. Așa cum era de așteptat, graficul CCA (fig. 3.4.3.) evidențiază că aparițiile teratologice ale ambilor taxoni de *Achnanthes* sunt corelate pozitiv cu aciditate și nivelurile concentrațiilor de Cd și Cu. Aceasta subliniază necesitatea de a aloca diferiți parametri ecologici unor forme teratologice, pentru a reflecta mai bine condițiile calității apei din zonele poluate (Olenici et al., trimis).

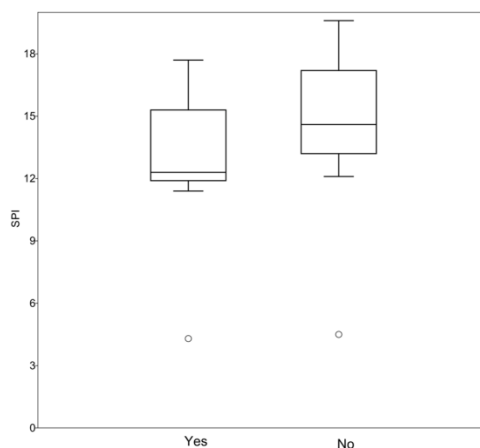


Figura 3.4.1. Boxplot-ul de valori IPS calculat luând în calcul indivizi teratologici (stânga) sau fără a îi lua în calcul (dreapta) în zona de studiu (Olenici et al., trimis)

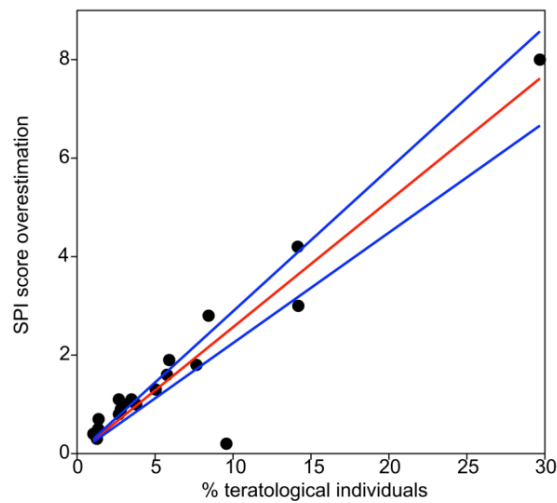


Figura 3.4.2. Supraestimarea IPS-ului ca urmare a neglijării teratologiei în numărarea obișnuită a diatomeelor (Olenici et al., trimis)

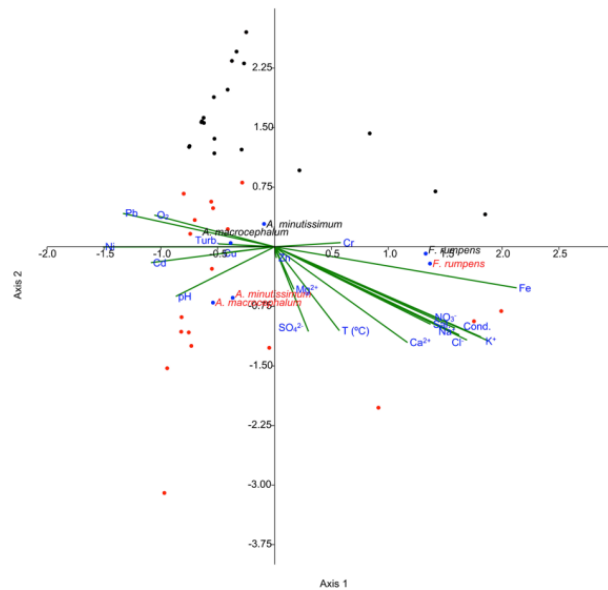


Figura 3.4.3. CCA-ul care prezintă diferențele ecologice dintre taxonii normali (negru) și cei teratologici (roșu) ale celor trei specii de diatomee luate în considerare – *Achnantheidium minutissimum*, *Achnantheidium macrocephalum* și *Fragilaria rumpens* (Olenici et al., trimis)

3.5. *Monitorizarea nivelului de Zn folosind diatomeele*

Crearea unei funcții de transfer, a unei formule predictive, dintr-un set de date relativ ridicat ar putea fi foarte utilă și, de exemplu, ar putea oferi informații cu privire la condiții chimice trecute, permițând reconstrucția evenimentelor din trecut (Bennion et al., 2004). Din acest punct de vedere, rezultatele acestui capitol permit generarea unei funcții de transfer care ar putea fi aplicată înregistrărilor paleolimnologice pentru a obține informații despre modificările gradului de expunere a acestor comunități algale la metale grele.

Aceasta înseamnă că pot fi deduse condiții de mediu pentru un anumit habitat, fără a fi necesară măsurarea pe teren. Astfel, indicii biotici prezintă un interes deosebit pentru aplicațiile de mediu.

Pentru a proiecta un indice biotic pentru regiunea eșantionată, au fost urmați trei pași:

1. Selectarea variabilei de răspuns. În acest caz, concentrația de Zn a fost selectată ca variabilă de mediu, considerând că a fost cel mai relevant parametru în acest caz (Olenici et al., 2017). Acest metal greu este un poluant provenit din activitatea minelor și este tolerat în mod variabil de unele specii de diatomee.

2. S-a colectat comunitatea algală pentru a fi utilizată ca bioindicator și s-a măsurat simultan variabila de interes.

3. Optimul și toleranța fiecărei specii au fost calculate cu privire la această variabilă (fig. 3.5.1.).

Atunci când optimul și toleranța au fost calculate pentru toți taxonii prezenți în comunitate, este, prin urmare, posibil să se calculeze din nou valori variabile care ar corespunde fiecărui loc de eșantionare, având în vedere abundențele relative ale speciilor. Aceasta se poate face folosind formula mediilor ponderate, cunoscută și sub denumirea de formula Zelinka-Marvan (1961): $[Zn] = \sum_{j=1}^n A_j \cdot S_j \cdot V_j / \sum_{j=1}^n A_j \cdot V_j$, unde A_j , S_j și V_j sunt, respectiv, abundența, optimul și toleranța taxonului j din eșantion.

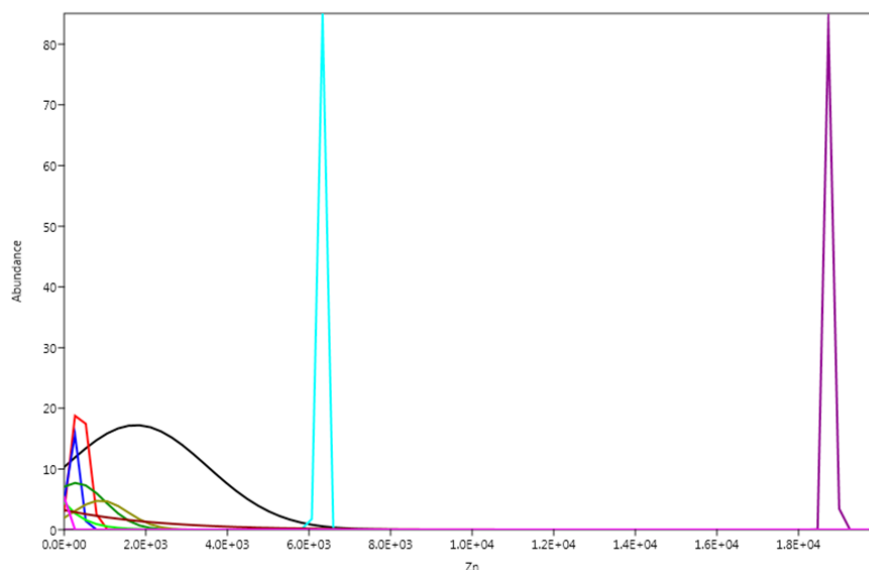


Figura 3.5.1. Species Packing (model Gaussian) pentru 9 cele mai abundente specii. Fiecare linie este o curbă normală "cea mai potrivită", definind relația dintre abundența fiecărui taxon și concentrațiile de Zn

3.6. Contribuții la flora României

În total, în zona de studiu a fost identificat un număr de 274 de taxoni de diatomee. Acești 274 de taxoni aparțin unui număr de 63 de genuri și au reprezentat 264 de specii diferite, plus 8 varietăți, 1 subspecie și 1 formă. Cele mai reprezentate genuri au fost *Nitzschia* sp. și *Gomphonema* sp. cu 31 și, respectiv, 27 de specii. Au fost, de asemenea, 24 de genuri identificate care au fost reprezentate doar de o singură specie. În figura 3.6.1. se poate observa distribuția speciilor în cadrul genurilor dominante.

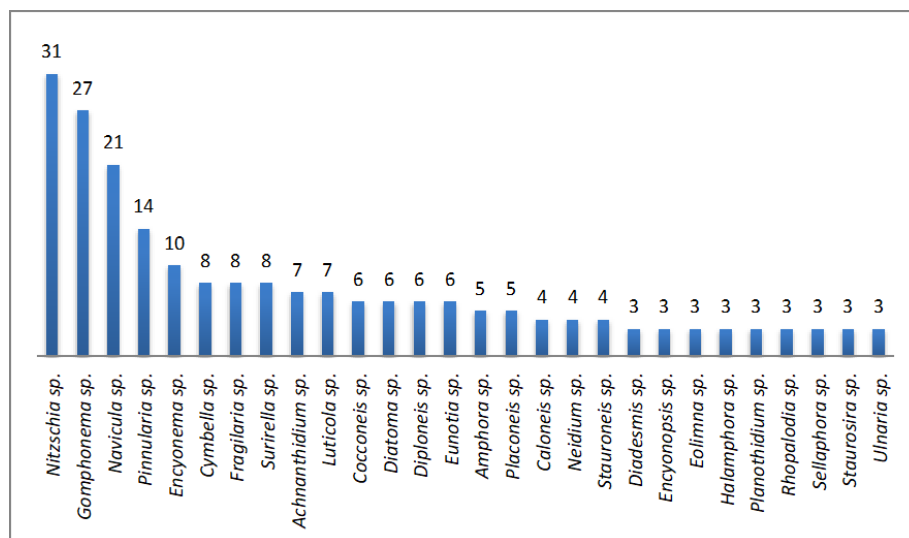


Figura 3.6.1. Principalele genuri de diatomee pe baza numărului de specii

17 taxoni au prezentat dificultăți de identificare și astfel au fost identificați doar la nivel de gen. Conform literaturii (Căraș, 2012; Momeu et al., 2012; Butiuc-Keul et al., 2012; Florescu et al., 2015; Szigartyo și Bakos, 2015; Buczko, 2016; Szigartyo et al., 2017), un total de 35 de taxoni nu au fost menționați în studiile anterioare pentru România. De asemenea s-au observat șapte varietăți noi și o nouă formă. Astfel, noile specii înregistrate reprezintă aproape 13% din totalul speciilor identificate.

Ca o consecință a mediului poluat din zona de studiu, au fost observate schimbări în ceea ce privește dinamica sezonieră, anuală și spațială a comunităților de diatomee din bazinul râului Abrud, atât în ceea ce privește numărul speciilor, cât și în ceea ce privește abundențele relative individuale. Bogăția speciilor variază între un număr extrem de scăzut în punctele de colectare afectate de prezența apelor de mină pe toată perioada studiului și un număr ridicat în punctele cu apă de calitate bună (fig. 3.6.2a. și 3.6.2b.).

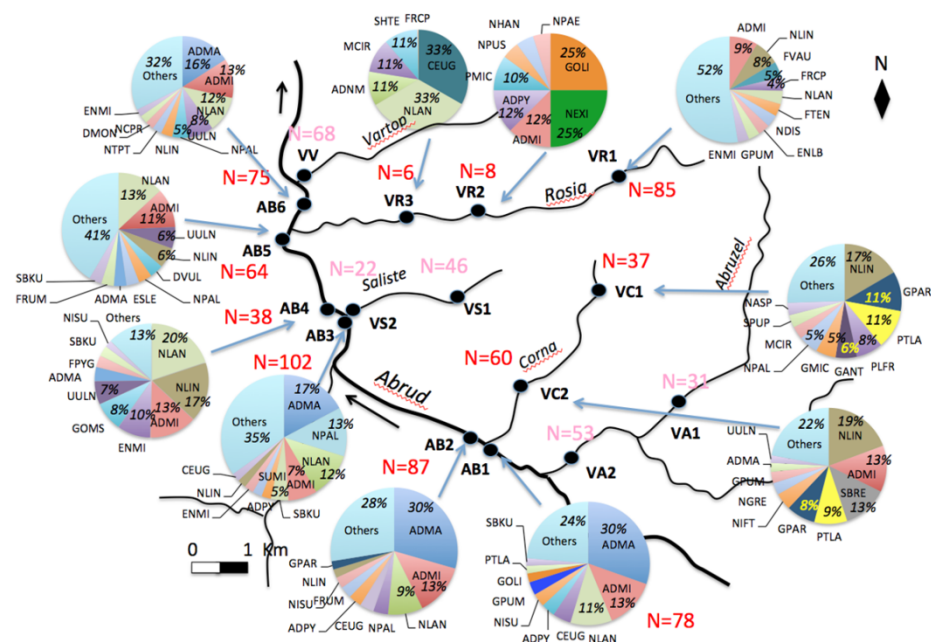


Figura 3.6.2a. Abundența sezonieră medie a speciilor în punctele de prelevare din zona de studiu. Cu roșu sau cu roz, numărul de taxoni din fiecare stație cu abundența relativă $> 0,25\%$

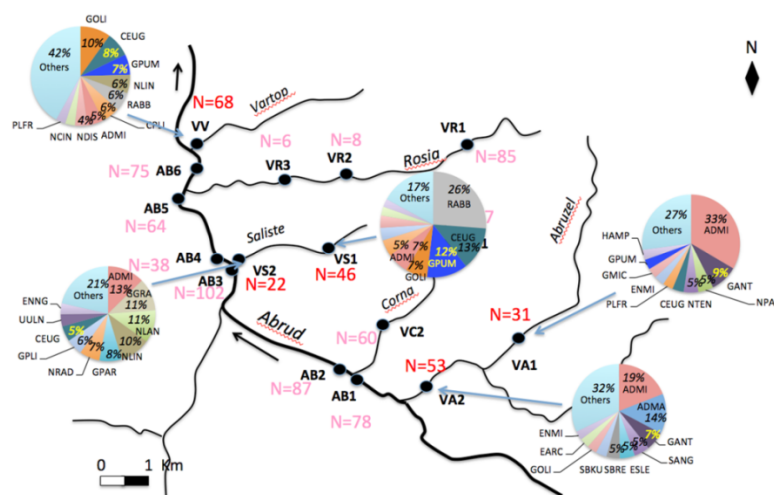


Figura 3.6.2b. Abundența sezonieră medie a speciilor în punctele de prelevare din zona de studiu. Cu roșu sau cu roz, numărul de taxoni din fiecare stație cu abundența relativă $> 0,25\%$

În aval de orașul Abrud, au fost observați și câțiva taxoni dominanți β -mezosaprobici, ceea ce sugerează niveluri moderate de materie organică din apa provenită din canalizarea urbană netratată, care împreună cu concentrațiile mari de NO_3^- atrag atenția asupra calității scăzute a apei. Efectul a fost mai evident în vara anului 2013. Spectrul saprobic al taxonilor (fig. 3.6.3.) a fost realizat după Rott et al. (1997), relevând o prezență mai mare a taxonilor β -mezosaprobici (68%) și $\beta\alpha$ -mezosaprobici (19%), comparativ cu speciile oligosaprobice (6%). Prezența speciilor polisaprobice, care necesită o cantitate mai mare de compuși organici, a fost foarte mică (6%). Se poate observa că nivelul de saprobitate din studiu este unul moderat. De asemenea, rezultatele au evidențiat faptul că majoritatea speciilor dominante din zona de studiu au indicat un nivel ridicat de troficitate în apă, fiind specii eutrofe (van Dam et al., 1994). În același timp, s-au observat câțiva taxoni dominanți care sugerează un nivel de troficitate de la oligotrofic la mezo-eutrofic și unul, *Nitzschia palea* (Kützinger) Smith, care a indicat un nivel critic de troficitate, fiind hipereutrofic. Au fost observate și două specii dominante, cum ar fi *Achnanthes minutissimum* și *Gomphonema pumilum* (Grunow) Reichardt, care tolerează un nivel de nutrienți de la scăzut până la foarte ridicat (van Dam et al., 1994).

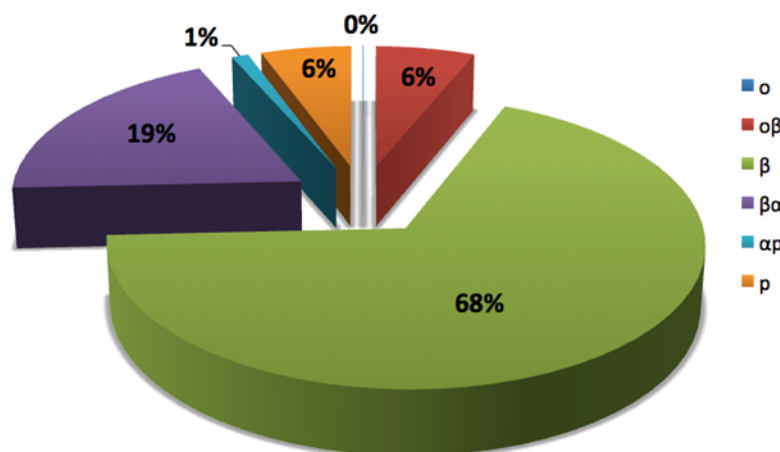


Figura 3.6.3. Clasele de saprobitate indicate de cele 18 specii dominante în probele colectate (o = oligosaprobice, $o\beta$ = $o\beta$ -mezosaprobice, β = β -mezosaprobice, $\beta\alpha$ = $\beta\alpha$ -mezosaprobice, α = α -mezosaprobice; p = polisaprobice)

4. CONCLUZII

Diatomele sunt indicatori buni ai caracteristicilor apei datorită sensibilității acestora la variațiile variabilele de mediu. Acestea sunt ușor de colectat și identificate la nivel de specie, iar profilul ecologic al mai multor specii este cunoscut, astfel încât mulți indici calculați pe baza diatomeelor sunt utilizați. Cu toate acestea, diagnosticul bazat doar pe un număr redus de specii indicatoare nu reflectă neapărat starea reală a ecosistemelor acvatice, astfel încât monitorizarea întregii comunități, inclusiv a formelor teratologice, este foarte importantă.

Drenajul apelor acide de mină (AMD) afectează ecosistemele lotice din întreaga lume, fiind o problemă predominantă în ceea ce privește calitatea apei în zona minieră Roșia Montană (România). În consecință, prima preocupare a acestei teze de doctorat a fost de a evalua răspunsurile ecologice ale comunităților de diatomee din bazinul hidrografic al râului Abrud, iar cea de a doua, cea de a găsi predictorii de mediu care duc la apariția unor formelor anormale ale frustulelor diatomeelor.

În primul rând, rezultatele analizei diatomeelor teratologice care se dezvoltă în apele poluate de AMD au arătat că prezența unor alge deformate poate fi atribuită faptului că acestea au fost afectate de acest tip de poluare eliberată din lucrările miniere și depozitele de roci sterile. Perturbările moderate sunt responsabile de apariția unor proporții mari de frustule anormale, cu o tipologie variabilă de malformații, ajungând la aproape 58% în cazul speciei *Fragilaria rumpens* (Kützing) Carlson. De asemenea, a fost raportat un nou tip de teratologie în cazul speciilor *Achnantheidium minutissimum* (Kützing) Czarnecki și *Achnantheidium macrocephalum* (Hustedt) Round & Bukhtiyarova care afectează forma valvocopulei frustulei.

Măsurătorile automate utilizând geometria morfometrică au evidențiat diferențe morfologice între indivizii normali și anormali ce aparțin speciilor *Achnantheidium minutissimum* și *Achnantheidium macrocephalum*. Analizele statistice au separat cele patru populații ale acestor specii și au arătat principalele variabile

fizico-chimice care au determinat deformarea valvelor în acest context, și anume conductivitatea, Zn și Cu.

În al doilea rând, au fost testate implicațiile pentru biomonitorizarea bazată pe diatomee a variațiilor morfologiei acestora. Această lucrare evidențiază o supraestimare a condițiilor de calitate a apei cauzate de ignorarea indivizilor deformați în studiile de biomonitorizare pe baza diatomeelor. Se poate demonstra că formele normale și teratologice ale aceleiași specii prezintă profilurile ecologice diferite.

Pentru a evalua gradul unuia dintre elementele cheie ale poluării râului Abrud, adică Zn, s-a dezvoltat o funcție de transfer folosind comunitățile de diatomee ca bioindicatori. S-a calculat optimul și toleranța fiecărei specii, funcția rezultată putând fi utilizată pentru a obține date referitoare la condițiile chimice trecute și prezente ale apei, permițând și reconstrucția nivelului concentrației de Zn în apele dulci.

La final, contribuția la flora României a acestei lucrări poate fi rezumată prin identificarea a 274 de taxoni de diatomee în bazinul hidrografic al râului Abrud, 35 dintre acestea fiind identificate pentru prima dată în apele din această țară. Schimbările de tip spațial și temporal ale diversității speciilor în aria de studiu evidențiază efectele poluării apei asupra comunităților de diatomee și diferențele dintre râul Abrud și afluenții săi, privind bogăția speciilor ce variază între 38 și 102 taxoni de-a lungul râului principal și care este reprezentată de puține specii sau chiar de nici una în anumite puncte de colectare de pe celelalte pâraie. În același timp, pe Valea Roșia în amonte s-a identificat un număr ridicat de diatomee (85 de taxoni).

5. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Ancion, P-Y., Lear, G., Lewis, G.D., 2010, *Three common metal contaminants of urban runoff (Zn, Cu and Pb) accumulate in freshwater biofilm and modify embedded bacterial communities*. Elsevier 158: 2738-2745.
2. Antoine, S. E., Benson-Evans, K., 1986, Spatial and Temporal Distribution of Some Interesting Diatom Species in the River Wye System, Wales, U. K. *Limnologia LMNOA* 8: 17(1).
3. Arini, A., Feurtet-Mazel, A., Maury-Brachet, R., Pokrovsky, O. S., Coste, M., & Delmas, F., 2012, Recovery potential of periphytic biofilms translocated in artificial streams after industrial contamination (Cd and Zn). *Ecotoxicology*, 21(5): 1403-1414.
4. Azzali, E., Marescotti, P., Frau, F., Dinelli, E., Carbone, C., Capitani, G., Lucchetti, G., 2014, Mineralogical and chemical variations of ochreous precipitates from acid sulphate waters (asw) at the Roşia Montană gold mine (Romania). *Environmental Earth Sciences*, 72: 3567–3584
5. Baci, C., Goossens, M., Reusen, I., Tote, C., Delalieux, S., Raymaekers, D., Dobrota, C., Pop, C., Varga, I., Roba, C., Costin, D., Smailbegovic, A., 2012, Report on Roşia Montană Case Study Investigations, IMPACTMIN WP7.3 Project, 164 p.
6. Baci, C., Lazăr, L., Cozma, A., **Olenici, A.**, Pop, I.C., Roba, C. Costin, D., 2018, Environmental risk assessment practices and applications for gold mines in EU. Assessing environmental risks at three mine sites: Kittilä mine in Finland and Roşia Montană and Zlatna mines in Romania. ERA-MIN – SUSMIN Project Deliverable D5.4.
7. Balintoni, I., 1994, Structure of the Apuseni Mountains. *Romanian Journal of Tectonics and Regional Geology*, 72: 51–58.
8. Barinova, S., 2017, Essential and practical bioindication methods and systems for the water quality assessment. *International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources*, 2(3): 1-11.
9. Batts, K.P, Cîmpean, M., Jurcă, A., Fara, M., Momeu, L., 2012, Limnological Study of Several Freshwater Lakes from Roşia Montană Region (Transylvania, Romania), *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Biologia*, LVII: 67-82.

10. Bellinger, E. G., Sigee, D. C., 2015. Freshwater algae: identification and use as bioindicators. John Wiley and Sons. 296 p.
11. Bennion, H., Fluin, J. Simpson, G.L., 2004, Assessing eutrophication and reference conditions for Scottish freshwater lochs using subfossil diatoms. *Journal of Applied Phycology*, 41: 124–138.
12. Beyene, A., Addis, T., Kifle, D., Legesse, W., Kloos, H., Triest, L., 2009, Comparative study of diatoms and macroinvertebrates as indicators of severe water pollution: Case study of the Kebena and Akaki rivers in Addis Ababa, Ethiopia, *Ecological Indicators*, 9:381-392.
13. Bird, G., Brewer, P.A., Macklin, M.G., Serban, M., Balteanu, D., Driga, B., 2005, Heavy metal contamination in the Aries, river catchment, western Romania: Implications for development of the Roşia Montană gold deposit. *Journal of Geochemical Exploration*, 86: 26–48.
14. Blanco, S., Bécares, E., Cauchie, H. M., Hoffmann, L., Ector, L., 2007, Comparison of biotic indices for water quality diagnosis in the Duero Basin (Spain). *Archiv für Hydrobiologie Supplement Large Rivers* 17: 267-286.
15. Blanco, S., Álvarez-Blanco, I., Cejudo-Figueiras, C., Bécares, E., 2011, Guía de las diatomeas de la cuenca del Duero. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino / Confederación Hidrográfica del Duero, 212 p. NIPO 771-10-005-1
16. Blanco, S., Borrego-Ramos, M. and **Olenici, A.**, in press_a, Las diatomeas de Ceuta, *Instituto de Estudios Ceutíes*.
17. Blanco, S., Borrego-Ramos, M. **Olenici, A.** 2017, Disentangling diatom species complexes: does morphometry suffice? - *PeerJ* 5: e4159. <https://doi.org/10.7717/peerj.4159>.
18. Blanco, S., **Olenici, A.**, de Vicente, I., Guerrero, F., in press_b, Contribución al inventario de diatomeas ibéricas: *Encyonema nevadense* sp. nov. (Cymbellales, Gomphonemataceae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* .
19. Blanco, S., **Olenici, A.**, Jiménez- Gómez, F., Ortega, F., Guerrero, F., 2019b, Una nueva especie del género *Hantzschia* (Bacillariaceae) en Almería, España. *Caldasia*, 41(2): 343-348 .
20. Blanco, S., **Olenici, A.**, Ortega, F., Jiménez-Gómez, F., Francisco Guerrero, F., (Submitted to *Scientific Reports*) Identifying environmental drivers of benthic diatom diversity: the case of Mediterranean mountain ponds.

21. Blanco, S., **Olenici, A.**, Ortega, F., Jiménez-Gómez, F., Guerrero, F., 2019a, Taxonomía y morfología de *Craticula gadorensis* sp. nov. (Bacillariophyta, Stauroneidaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 54: 5-11.
22. Borrego-Ramos, M., Blanco, S. **Olenici, A.**, 2018, Diatoms from the Valporquero Cave (León, NW Spain), with the description of *Germainiella legionensis* sp. nov. *Journal of Cave and Karst Studies*, 80(4):181-189.
23. Borrego-Ramos, M., **Olenici, A.**, Blanco, S., 2019, Are dead stems suitable substrata for diatom-based monitoring in Mediterranean shallow ponds? *Fundamental and Applied Limnology*, 192/3 (2019): 215–224.
24. Brabcová, B., Marvan, P., Opatřilová, L., Brabec, K., Fránková, M., Heteša, J. , 2017, Diatoms in water quality assessment: to count or not to count them? *Hydrobiologia*, 795(1): 113-127.
25. Buczko, K., 2016, Guide to diatoms in mountain lakes in the Retezat mountains, South Carpathians, Romania. *Studia Botanica Hungarica*, 47 (Suppl.): 9–214.
26. Butiuc-Keul, A., Momeu, L., Craciunas, C., Dobrota, C., Cuna, S., Balas, G., 2012, Physico-chemical and biological studies on water from Aries River (Romania). *Journal of Environmental Management*, 95: S3eS8.
27. Cantonati, M., Angeli, N., Virtanen, L., Wojtal, A.Z., Gabrieli, J., Falasco, E., Lavoie, I., Morin, S., Marchetto, A., Claude, F., Smirnova, S., 2014, *Achnantheidium minutissimum* (Bacillariophyta) valve deformities as indicators of metal enrichment in diverse widely-distributed freshwater habitats. *Science of the Total Environment*, 475: 201-215.
28. Cărauş, I., 2012, *Algae of Romania. A distributional checklist of actual algae. Version 2.3. Third revision*. Bacau: Univ. Bacău.
29. Cattaneo, A., Couillard, Y., Wunsam, S., Courcelles, M., 2004, Diatom taxonomic and morphological changes as indicators of metal pollution and recovery in Lac Dufault (Québec, Canada). *Journal of Paleolimnology*, 32: 163–175.
30. CEN, *Water Quality–Guidance Standard for the Identification, Enumeration and Interpretation of Benthic Diatom Samples from Running Waters. EN 14407: 2004*, Comité Européen de Normalisation Geneva.
31. Cholnoky, B. J., 1968, Die "Ökologie der Diatomeen in Binnengewässern. Verlag von J. Cramer: Lehere.

32. Coste, M., Bountry, S., Tison-Rosebery, J., Delmas, F., 2009, Improvement of the Biological Diatom Index (BDI): Description and efficiency of the new version (BDI-2006), *Ecological Indicators*, 9: 621-650.
33. De Jonge, M., Vijverb Van de, B., Blusta, R., Bervoetsa, L., 2008, Response of aquatic organisms to metal pollution in a lowland river in Flanders: A comparison of diatoms and macroinvertebrates, *Science of the Total Environment*, 407: 615-629.
34. Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., & Pinelli, E., 2010, Effects of pesticides on freshwater diatoms. In Reviews of environmental contamination and toxicology (p. 87-103). Springer, New York, NY.
35. Dickman, M.D., 1998, Benthic marine diatom deformities associated with contaminated sediments in Hong Kong. *Environment International*, 24: 749–759.
36. Dujardin, J. P.A., Kaba, D., Henry, A.B., 2010, The exchangeability of shape. *BMC Research Notes*, 3, 266.
37. Duma, S., 2008, Impact of Mining Activity upon Environment in Roşia Montană. *Romanian Review of Regional Studies*, 4: 87–96
38. European Standard EN 13946, 2003, *Water quality - Guidance standard for the routine sampling and pretreatment of benthic diatoms from rivers*. European Committee for Standardization, Brussels.
39. European Standard EN 14407, 2004, *Water quality - Guidance standard for the identification, enumeration and interpretation of benthic diatom samples from running waters*. European Committee for Standardization, Brussels.
40. Falasco, E., Bona, F., Badino, G., Hoffmann, L., Ector, L., 2009a, Diatom teratological forms and environmental alterations: a review. *Hydrobiologia*, 623: 1-35.
41. Falasco, E., Bona, F., Ginepro, M., Hoffmann, L., Ector, L., 2009b, Morphological abnormalities of diatom silica walls in relation to heavy metal contamination and artificial growth conditions. *Water SA*, 35(5): 595-606.
42. Fernández, M., G. Martín, J. Corzo, et al., 2018, “Design and testing of a new diatom-based index for heavy metal pollution”, *Archives of environmental contamination and toxicology*, 74(1): 170–192.
43. Florea, R., et al., 2005, Water pollution in gold mining industry: a case study in Roşia Montană district, Romania. *Environmental Geology*, 48: 1132-1136

44. Florescu, H.M., Cîmpean, M., Momeu, L., Leonte, L., Bodea, D., Battes, K.P., 2015, Ecological analyses on benthic diatom and invertebrate communities. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Biologia*, LX, 1: 69-87.
45. Forray, F., 2002, Environmental Pollution in the Aries River Catchment Basin. Case study: Roşia Montană Mining Exploitation. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Geologia*, 1, 189-198.
46. Forray F.L., Hallbauer D.K., 2000, A study of the pollution of the Aries River (Romania) using capillary electrophoresis as analytical technique, *Environmental Geology*, 39: 1372-1384.
47. Gómez, N., Licursi, M., 2003, Abnormal forms in *Pinnularia gibba* (Bacillariophyceae) in a polluted lowland stream from Argentina. *Nova Hedwigia*, 77: 389–398.
48. Gray, N.F., 1997, Environmental impact and remediation of acid mine drainage: a management problem. *Environmental Geology*, 30: 62–71.
49. Hammer, Ø., Harper, D., Ryan, P., 2001, PAST-PAlaeontological STatistics, ver. 2.17. *Palaeontology Electronics*, 4: 1–9.
50. Hustedt, F., 1957, Die Diatomeen flora des Flusssystemes der Weser im Gebiet der Hansestadt Bremen. *Abhandlungen naturwissenschaftlichen Verein zu Bremen*, 34: 181–440.
51. Ianovici, V., Borcoş, M., Bleahu, M., Patrulius, D., Lupu, M., Dimitrescu, R., Savu, H., 1976, *Geologia Munţilor Apuseni*, Edit. Academiei Republicii Socialiste România, Bucureşti, 22-29.
52. Jaccard, T., Ariztegui, D., Wilkinson, K.J., 2009, Incorporation of zinc into the frustule of the freshwater diatom *Stephanodiscus hantzschii*. *Chemical Geology*, 265(3): 381-386.
53. Kale, A., Karthick, B., 2015, The diatoms. *Resonance*, 20(10): 919-930
54. Karp-Boss, L., Gueta, R., Rousso, I., 2014, Judging diatoms by their cover: variability in local elasticity of *Lithodesmium undulatum* undergoing cell division. *PloS one*, 9(10). e109089.
55. Karr, J. R., 1991, Biological integrity: a long-neglected aspect of water resource management. *Ecological Applications*, 1(1): 66-84.
56. Kiss, K.T., 1998, Bevezetés az algológiába, Elméleti és gyakorlati ismeretek, ELTE Eötvös Kiadó, Budapest.

57. Kolkwitz, G.R., Marsson, M., 1908, Ökologie der pflanzlichen Saprobien. Bericht der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 26a: 505-519.
58. Kröger, N., Poulsen N., 2007, *Biochemistry and Molecular Genetics of Silica Biomineralization*, in: *Diatoms. Handbook of Biomineralization: Biological Aspects and Structure Formation*: 43-58.
59. Kröger, N., Bergsdorf, C., Sumper, M. , 1994, A new calciumbinding glycoprotein family constitutes a major diatom cellwall component. *The EMBO Journal*, 13:4676–80.
60. Kröger, N., Bergsdorf, C., Sumper, M. , 1996, Frustulins: domain conservation in a protein family associated with diatom cell walls. *European Journal of Biochemistry*, 239: 259–64.
61. Kröger, N., Lehmann, G., Rachel, R. & Sumper, M., 1997, Characterization of a 200-kDa diatom protein that is specifically associated with a silica-based substructure of the cell wall. *European Journal of Biochemistry*, 250: 99–105.
62. Lăcătușu, R., Cătu, G., Lungu, M., Rizea, N., Lazăr, R., 2007, Possible impact of mining and processing the Roșia Montană gold-bearing ore upon soil, *Present Environment and Sustainable Development*, 1: 107-114.
63. Lavoie, I., Hamilton, P.B., S., Tiam, S.K., Kahlert, M., Gonçalves, S., Falasco E., Fortin, C., Gontero, B., Heudre, D., Kojadinovic-Sirinelli, M., Manoylov, K., Pandey, L.K., Taylor, J.C., 2017, Diatom teratologies as biomarkers of contamination: Are all deformities ecologically meaningful? *Ecological Indicators*, 82: 539-550.
64. Lavoie, I., Lavoie, M., Fortin, C., 2012, A mine of information: benthic algal communities as biomonitors of metal pollution leaching from abandoned tailings. *Science of the Total Environment*, 425: 231-241.
65. Lazăr, A. L., Băciu, C., Roba, C., Dicu, T., Pop, C., Rogozan, C., Dobrotă, C., 2014, Impact of the past mining activity in Roșia Montană (Romania) on soil and vegetation. *Environmental earth sciences*, 72(11): 4653-4666.
66. Lecoq, C., M. Coste, and J. Prygiel, 1993, “Omnidia’: software for taxonomy, calculation of diatom indices and inventories management”. *Hydrobiologia*, 269(1): 509–513.
67. Letterman, R.D., Mitsch, W.J., 1978, Impact of mine drainage on a mountain stream in Pennsylvania. *Environmental Pollution* (1970), 17(1): 53–73.

68. Lowe, R. L., 1974, Environmental requirements and pollution tolerance of freshwater diatoms. EPA-670/4-74-005. Cincinnati, OH: US Environmental Protection Agency
69. Lowe, R. L., Pan, Y., 1996, Use of Benthic Algae in Water Quality Monitoring. In Stevenson, R. J., M. L. Bothwell & R. L. Lowe (eds), *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*. Academic Press, San Diego: 705-733.
70. Manske, S.L., Hedenquist, J.W., O'Connor, G., Tamas, C., Cauuet, B., Leary, S., Minut, A., 2006, Roșia Montană, Romania: Europe's Largest Gold Deposit [WWW Document]. *Adv. Sci. Discov. SEG Newsl.* No 64. URL <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.466.8591&rep=rep1&type=pdf>
71. Martin-Jézéquel, V., Lopez, P.J., 2003, Silicon—a central metabolite for diatom growth and morphogenesis. *Progress in molecular and subcellular biology*, 33: 99-124.
72. McCormick, P.V., Cairns, J., 1997, Algal indicators of aquatic ecosystem condition and change, In Wang, W., Gorsuch, J. (red.), *Plants for environmental studies*, Lewis Publishers, Boca Raton.
73. Momeu, L., Battes, K.W., Battes, K.P., Stoica, I., Avram, A., Cîmpean, M., Pricope, F., Ureche, D., 2009, Algae, Macroinvertebrate and Fish Communities from the Arieș River Catchment Area (Transylvania, Romania), *Transylvanian Review of Systematical and Ecological Research. The Arieș River Basin*, 7: 149-180.
74. Momeu, L., Battes, K.W., Pricope, F., Avram, A., Battes, K.P., Cîmpean, M., Ureche, D., Stoica, I., 2007, Preliminary Data on Algal, Macroinvertebrate and Fish Communities from the Arieș River Catchment Area, Transylvania, Romania, *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Biologia*, LII, 1: 25-39.
75. Momeu, L., Péterfi, L. Ș. 2007, Evaluarea calității apei din bazinul de drenaj al râului Arieș folosind diatomeele epilitice ca bioindicatori, *Contribuții Botanice, Cluj-Napoca*, XLII, (2): 57-65.
76. Momeu, L., Péterfi, L. Ș., 2009, Assessment of the ecological state of rivers based on benthic algae especially diatoms, *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Biologia*, 54: 7-19.
77. Momeu, L., Peterfi, L.S., Blaga, L., 2012, Planktonic algal communities occurring in the wetlands of the Cefa Nature Park (Crișana, Romania).

Transylvanian Review of Systematical and Ecological Research. The Cefa Nature Park. 13: 11.

78. Morin, S., Cordonier, A., Lavoie, I., Arini, A., Blanco, S., Duong, T.T., Tornés, E., Bonet, B., Corcoll, N., Faggiano, L., Laviale, M., Pérès, F., Becares, E., Coste, M., Feurtet-Mazel, A., Fortin, C., Guasch, H., Sabater, S., 2012, *Consistency in Diatom Response to Metal-Contaminated Environments*, In: Guasch, H., Ginebreda, A., Geiszinger, A. (Eds.), *Emerging and Priority Pollutants in Rivers*, The Handbook of Environmental Chemistry. Springer Berlin Heidelberg, 117–146.

79. Morin, S., Coste, M., 2006, Metal-induced shifts in the morphology of diatoms from the Riou Mort and Riou Viou streams (South West France). Use of algae for monitoring rivers VI. Hungarian Algological Society, Göd, Hungary, Balatonfüred, 91-106.

80. Morin, S., Coste, M., Hamilton, P.B., 2008a, Scanning electron microscopy observations of deformities in small pennate diatoms exposed to high cadmium concentrations. *Journal of Phycology*, 44: 1512-1518.

81. Morin, S., Duong, T.T., Dabrin, A., Coynel, A., Herlory, O., Baudrimont, M., Delmas, F., Durrieu, G., Schäfer, J., Winterton, P., Blanc, G. Coste, M., 2008b, Long-term survey of heavy-metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the Riou Mort watershed, South- West France. *Environmental Pollution*, 115: 532–542.

82. Morin, S., Gómez, N., Tornés, E., Licursi, M., Rosebery, J., 2016, Benthic diatom monitoring and assessment of freshwater environments: standard methods and future challenges. *Aquatic Biofilms*, 111-124.

83. Nautiyal, R., Nautiyal, P., 2018, Health Assessment of Loktak Lake Using Diatoms as Biological Indicators. In *Advances in Health and Environment Safety* (p. 1-10). Springer, Singapore.

84. **Olenici, A.**, Baciú, C., Blanco, S., Morin, S., Submitted, Naturally and environmentally-driven variations in diatom morphology; implications for diatom-based assessment of water quality. In: Cristóbal, G., Blanco, S., Bueno, G. (eds.) *Modern Trends in Diatom Identification. Fundamentals and Applications*. Springer.

85. **Olenici, A.**, Blanco, S., Borrego-Ramos, M., Jiménez-Gómez, F., Guerrero, F. Momeu, L. Baciú, C., 2019, A new diatom teretology driven by metal pollution in a temperate river (Roşia Montană, Romania). *Annali di Botanica*, 9: 113–118.

86. **Olenici, A.**, Blanco, S., Borrego-Ramos, M., Momeu, L., Baci, C., 2017, "Exploring the effects of acid mine drainage on diatom teratology using geometric morphometry", *Ecotoxicology*, 26 (8): 1018–1030.
87. Papp, D. C., Larkins, C., Turunen, K., Cociuba, I. Baci, C., Cozma, A., Lazăr, L., Pop, I.C., Roba, C., Mänttari, I., Nieminen, S., Lahaye, Y., Hendriksson, N., Forsman, P., 2018, Geochemical and Isotope Methods for Assessing Contaminant Transport at Three Mine Sites: Kittilä mine in Finland and Roșia Montană and Zlatna mines in Romania. Report /ERA-MIN -SUSMIN-D5.1, 128 p.
88. Patrick, R., 1949, A proposed biological measure of stream conditions, based on a survey of the Conestoga Basin, Lancaster County, Pennsylvania. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 101: 277-341.
89. Patrick, R., Strawbridge, D., 1963, Variation in the structure of natural diatom communities. *The American Naturalist*, 97(892): 51-57.
90. Pedraza, A., Bueno, G., Deniz, O., Ruiz-Santaquiteria, J., Sanchez, C., Blanco, S., Borrego-Ramos, M., **Olenici, A.** Cristobal, G., 2018, Lights and pitfalls of convolutional neural networks for diatom identification. In *Optics, Photonics, and Digital Technologies for Imaging Applications V* (Vol. 10679, p. 106790G). International Society for Optics and Photonics.
91. Potapova, M., Charles, D.F., 2002, Benthic diatoms in USA rivers: distribution along spatial and environmental gradients, *Journal of Biogeography*, 29:167-187.
92. Rocha, A. A., 1992, Algae as biological indicators of water pollution., In Cordeiro Marino, M., Azevedo, M.T.P., Santana, C.L., Tomita, N.Y., Pastino, E.M. (Eds.). *Algae and environment: a general approach*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Ficologia; CETESB. p. 34-5534-52.
93. Rohlf, F.J., Slice, D., 1990, *Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks*. Oxf. Univ. Press 39: 40–59.
94. Roșia Montană Gold Corporation, 2006, Report on Environmental Impact Assessment study.
95. Roșu, E., Udubasa, G., Pecskey, Z., Panaiotu, C., Panaiotu, C.E., 2004, Timing of Miocene-Quaternary magmatism and metallogeny in the south Apuseni mountains, Romania. *Romanian Journal of Mineral Deposits*. Spec. Issue *Gold Met. Mt.* 81: 33–38.

96. Rott, E., Hofmann, G., Pall, K. et al., 1997, Indikationslisten für Aufwuschalgen in Österreichischen Fließgewässern. Teil 1: Saprobielle Indikation. Bundesministerium für Land und Forstwirtschaft, Wasserwirtschaftskataster.
97. Sánchez, C., Cristóbal, G., Bueno, G., Blanco, S., Borrego-Ramos, M., **Olenici, A.**, Pedraza, A., Ruiz-Santaquiteria, J., 2018, Oblique illumination in microscopy: A quantitative evaluation. *Micron*, 105: 47–54.
98. Santos, J., 2010, Cadmium effects in *Nitzschia palea* frustule proteins. *Master's thesis. Universidade de Aveiro*.
99. Santos, J., Almeida, S. F., Figueira, E., 2013, Cadmium chelation by frustulins: a novel metal tolerance mechanism in *Nitzschia palea* (Kützinger) W. Smith. *Ecotoxicology*, 22(1): 166-173.
100. Smol, J.P., Stoermer, E.F., 2010, The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences. Second Edition, University Press, Cambridge, UK, 667 p.
101. Stoermer, E.F., Smol, J.P., 1999, The diatoms: application for the environmental and earth sciences, Cambridge University Press.
102. Szekely-Andorko, J., Momeu, L., Péterfi, L. Şt., 2011, Structure of the benthic diatom communities from Arieş river catchment area (Transylvania, Romania), *Contribuții Botanice*, XLVI: 93-106, Grădina Botanică “Alexandru Borza”, Cluj-Napoca.
103. Szigyarto, I.L. Bakos, A., 2015, Diatoms and water quality of the Zetea and surrounding river courses (Harghita County, Romania). *Contribuții Botanice*, L: 151-164
104. Szigyarto, I.L., Buczkó, K., Rákossy, I., May, Z., Urak, I., Zsigmond, A.R., 2017, Contrasting diatom diversity in lentic and lotic habitats of Romanian peat bogs and the relation to environmental variables. *Fundamental and Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie*, 189: 137–151.
105. Tămaş, C. G., 2007, *Endogenous breccias structures (breccia pipe–breccia dyke) and the petrometallogeny of Roşia Montană ore deposit (Metaliferi Mountains, Romania)*. Cluj-Napoca: Book of Science House.
106. Tornés, E., Mor, J. R., Mandaric, L., Sabater, S. , 2018, Diatom responses to sewage inputs and hydrological alteration in Mediterranean streams. *Environmental Pollution*, 238: 369–378.

107. Torres, E., Cid, A., Herrero, C., Abalde, J., 2000, Effect of Cadmium on Growth, ATP Content, Carbon Fixation and Ultrastructure in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Water, Air, & Soil Pollution*, 117: 1–14.
108. Van Dam, H., Mertens, A., Sinkeldam, J., 1994, A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from the Netherlands, *Netherlands Journal of Aquatic Ecology*, 28, 1: 117-133.
109. Zelinka, M. Marvan, P., 1961, Zur Präzisierung der biologischen klassifikation der Reinheit fließender Gewässer. *Archiv für Hydrobiologie*, 57: 389-407.