



UNIVERSITÉ BABEŞ-BOLYAI CLUJ-NAPOCA
ROUMANIE
L'INSTITUTE D'ETUDES DOCTORALES CLUJ - NAPOCA



UNIVERSITÉ FRANÇOIS RABELAIS – TOURS
FRANCE
ÉCOLE DOCTORALE : SANTÉ, SCIENCES,
TECHOLOGIES
ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2007 - 2008

Thèse pour obtenir le grade de Docteur
de l'Université de Tours et de l'Université de Cluj-Napoca

présentée par **Vasile – Daniel Gherman**
soutenue publiquement le 17 mars 2008

Discipline : **Sciences de la Terre, Biologie**
Spécialité : **Géologie de la Surface, Microbiologie**

RECHERCHES SUR LES RELATIONS ENTRE POPULATIONS
MICROBIENNES ET MINÉRALISATIONS DES SPÉLÉOTHÈMES
DANS LES MINES D'ORAVITA (ROUMANIE). LE PROBLEME
DES TRANSFORMATIONS DU SOUFRE ET DU FER

Directeurs de thèse : **Mihail Dragan – Bularda**
Jean – Gabriel Bréheret

Membres du Jury

Jean – Gabriel Bréheret	Professeur, directeur de thèse	Université François Rabelais de Tours
Constantin Cocirta	Maître de conférence	Université François Rabelais de Tours
Jean – Robert Disnar	Directeur de Recherches au CNRS,	Université d'Orleans, Rapporteur
Mihail Dragan – Bularda,	Professeur, directeur de thèse	Université Babes – Bolyai, Cluj-Napoca
Simona – Isabela Dunca	Maître de conférence	Université Alexandru Ioan Cuza, Iasi, Rapporteur
Daniela Pasca	Maître de conférence	Université Technique Cluj - Napoca

Cuvânt înainte

Cercetările din cadrul acestei teze de doctorat au început în anul 2001 la Institutul de Biologie din cadrul Academiei Române, București sub atenta îndrumare a conducătorului științific, domnul Acad. Prof. Dr. Gheorghe Zarnea. În echipa de coordonatori de la Institutul de Biologie București, o deosebită contribuție au avut-o Doamna Dr. Lucia Dumitru și Domnul Prof. Dr. Lucian Ghinea.

Din anul 2004 până astăzi, cercetările au continuat împreună cu Laboratoire de Géologie des Environnements Aquatiques Continentaux (GÉEAC) din cadrul Universității François Rabelais din Tours, Franța sub forma unei conduceri în cotutelă sub deosebita îndrumare și contribuție a conducătorului științific, Domnul Prof. Dr. Jean-Gabriel Bréhéret. În cadrul acestei cotutele, *teza a beneficiat de o Bursă a Guvernului Francez.*

În 2007 din cauza unor motive de sănătate, domnul Acad. Prof. Dr. Gheorghe Zarnea a fost nevoit să se retragă din funcțiile deținute la Institutul de Biologie București, astfel conducerea acestei teze, din partea română, a fost preluată cu deosebit interes și profesionalism de domnul Prof. Dr. Mihail Drăgan Bularda de la Universitatea Babeș-Bolyai din Cluj Napoca.

La început aș dori să mulțumesc domnișoarei Simona – Isabela Dunca (Universitatea Alexandru Ioan Cuza, Iași), doamnei Daniela Pașca (Universitatea Tehnică Cluj – Napoca) și domnilor: Jean – Gabriel Bréhéret (Universitatea François Rabelais, Tours), Constantin Cocirta (Universitatea François Rabelais, Tours), Jean – Robert Disnar (Universitatea, Orleans), Mihail Drăgan – Bularda (Universitatea Babeș – Bolyai, Cluj-Napoca), care au acceptat să evalueze această teză.

În primul rând aș dori să adresezi mulțumiri deosebite conducătorului meu, domnului Prof. Dr. Jean-Gabriel Bréhéret care de la început mi-a acordat o deosebită încredere și a participat cu o pasiune deosebită atât în teren la recoltarea eșantioanelor, cât și la examinarea acestora în M.E.B. și la interpretarea rezultatelor. De asemenea mulțumesc în mod deosebit și conducătorilor mei, domnul Acad. Prof. Dr. Gheorghe Zarnea pentru ajutorul și încrederea acordată cât și domnului Prof. Dr. Mihail Drăgan Bularda de la Universitatea Babeș-Bolyai din Cluj Napoca, care a contribuit foarte mult cu sfaturi și precizări la finalizarea acestei lucrări.

Deosebite mulțumiri aș dori să aduc domnului Conf. Dr. Constantin Cocirta de la Laboratorul GÉEAC al Universității François Rabelais din Tours, care cu o deosebită încredere m-a recomandat conducătorului meu de doctorat și colectivului laboratorului condus de domnul Prof. Dr. Jean Jaque Macaire și fără ajutorul căroră această colaborare nu s-ar fi realizat.

Calde mulțumiri de asemenea adresezi echipei deosebite de specialiști de la Laboratorul de microscopie electronică Tours, condusă de Brigitte Arbeille și Philippe Roingard. Astfel: Pierre-Yves Sizaret, Pierre-Ivan Raynal, Christophe Hourieux, Emannelle Blanchard-Laumonier, Claude Lebos, Monique Lemesle, Sylvie Trassard, Fabienne Arcanger, Marie-Paule Regner și Iabelle Saussereau, cu deosebită răbdare, mi-au fost profesori deosebiți în tehnicile de microscopie electronică și în limba franceză, între noi legându-se o durabilă prietenie.

Pentru realizare analizelor microbiologice adresezi mulțumiri pentru ajutorul care mi-a fost acordat de echipa de la Departamentul de Microbiologie de la Institutul de Biologie București coordonată de doamna Dr. Lucia Dumitru și de echipa de la Departamentul de Bacteriologie a Spitalului Bretonneau din Tours, condusă de domnul Laurent Mereghetti. De asemenea calde mulțumiri adresezi și echipei de la Laboratorul de Analiza apei de la Regia Apele Române, coordonată de doamna Dana Muntean pentru sprijinul acordat la analizele chimice ale eșantioanelor din mina Kiesberg.

Ajutoare deosebite pentru care le aduc calde mulțumiri mi-au fost acordate de către:

- domnișoara Dr. Carmen Cișmașiu, în realizarea unor determinări microbiologice;
- domnișoara Ing. Angelica Crișan, în problemele de geologie a zonei studiate;

- domnul Dr. Ionel Bota în probleme legate de istoricul mineritului din zona Oravița;
- domnul Dr. Ing. Cristian Stăniloiu, în experimentul de deferizare și demanganizare;
- colegii de la Asociația Speologică Prusik Timișoara în cartarea minei Kiesberg;
- domnul Dr. Marcel Török de la Facultatea de Geografie Timișoara, în definitivarea hărților geologice și topografice ale zonei studiate.
- colegii Virgil Jumanca, Dan Bogdan, Florin Horak care nu mi-au refuzat niciodată invitațiile la explorarea minei sau la recoltarea probelor, indiferent de vreme.

Nu în ultimul rând mulțumiri deosebite adresez familiei care m-a înțeles și m-a sprijinit întotdeauna în acest demers și căreia îmi cer scuze pentru emoțiile trăite în timpul nenumăratelor ture de explorare întreprinse în mina studiată.

CUPRINS

Introducere.....	1
1. Medii extreme de viață. Obiectul de studiu și importanța cercetărilor tezei	1
2. Organizarea tezei	2
Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfului	
Capitolul 1. Fiziologia și activitatea biochimică a ferobacteriilor....	3
1.1. Distribuția fierului în scoarța terestră	3
1.2. Proprietăți importante din punct de vedere geochimic	3
1.3. Importanța biologică a fierului	3
1.3.1. Funcțiile fierului în celule	3
1.3.2. Asimilarea fierului de către microorganisme	4
1.4. Fierul ca sursă de energie pentru bacterii	4
Acidofilele (<i>A. ferrooxidans</i>) și alte bacterii acidofile oxidatoare de fier	4
1.5. Fe(III) ca acceptor final de electroni în respirația bacteriană	11
1.5.1. Reducerea bacteriană a Fe ³⁺ însoțind fermentația	12
1.5.2. Respirația Fe ³⁺	12
1.5.3. Bioenergetica reducerii dezasimilatorii a Fe	13
1.5.4. Reducerea Fe ³⁺ de către Fungi	14
1.5.5. Tipuri de compuși ferici atacați via reducerea dezasimilatorie a Fe	14
1.5.6. Oxidarea nonenzimatică și reducerea Fe ³⁺ de către microorganisme	15
1.5.7. Precipitarea microbială a fierului	16
1.6. Conceptul de ferobacterii	17
1.7. Depozite sedimentare de fier de origine biogenă	17
1.8. Mobilizarea microbială a fierului din mineralele aflate în minereu, sol și sedimente	19
1.9. Microorganismele și ciclul fierului	20
1.10. Coroziunea bacteriană a metalelor	22
1.10.1. Coroziunea bacteriană anaerobă	22
1.10.2. Producerea aerării diferențiale sub acțiunea biomasei bacteriene și a precipitatelor de hidroxid feric	23
1.10.3. Coroziunea oxidativă	23
Capitolul 2. Bazele teoretice ale acțiunii microorganismelor în circuitul sulfului.....	25
2.1. Prezența sulfului în scoarța terestră	25
2.2. Proprietăți ale sulfului importante geomicrobiologic	25
2.3. Importanța biologică a sulfului	26
2.4. Mineralizarea compușilor organici ai sulfului	26
2.5. Asimilarea sulfului	27
2.6. Tipuri de bacterii care reacționează cu sulful și compușii sulfului	28
2.7. Oxidarea microbială a formelor reduse de sulf	32
2.8. Creșterea autotrofă și mixotrofă pe forme reduse de sulf	39
2.9. Respirația anaerobă cu forme oxidate ale sulfului ca acceptori finali de electroni	41
2.10. Metabolismul autotrof, mixotrof, heterotrof, la bacteriile sulfatoreducătoare	44
2.11. Biodepozitarea sulfului nativ	44
2.12. Microorganismele și circuitul sulfului	48
2.13. Biogeneza și biodegradarea mineralelor sulfuroase	49
2.13.1. Originea sulfurilor metalice	50

2.13.2. Principiile formării sulfurilor metalice	
2.13.3. Probe de laborator pentru susținerea biogenezei sulfurilor metalice	52
2.13.4. Biooxidarea sulfurilor metalice	52

Partea a-II-a. Zona minieră Oravița. Mina Kiesberg

Capitolul 3. Caracteristicile fizico-geografice și climatice ale zonei cercetate.....	56
3.1. Caracteristicile fizico-geografice	56
3.2. Caracteristicile climatice ale zonei Oravița	57
3.2.1. Temperatura aerului	58
3.2.2. Umiditatea	58
3.2.3. Mișcările aerului	59
Capitolul 4. Istoricul mineritului în zona Oravița.....	60
Istoricul mineritului din zona Oravița	60
4.1. Istoricul minelor de aur din zona Oravița	60
Capitolul 5. Caracteristicile geologice ale zonei cercetate.....	63
5.1. Contextul geologic regional al zonei Oravița	63
5.1.1. Cristalinul Domeniului Getic	63
5.1.2. Cristalinul Domeniului Supragetic	63
5.1.3. Formațiuni paleozoice	65
5.1.4. Formațiuni post-tectonice	66
5.1.4.1. Magmatite paleogene	66
5.1.4.2. Rocile de contact	67
5.1.5. Substanțele minerale utile	67
5.1.6. Elemente structurale	69
5.2. Zăcămintul Policarpus. Mina Kiesberg	69
Capitolul 6. Siturile stabilite pentru analize.....	71
6.1. Prezentarea generală a minei Kiesberg	71
6.1.1. Morfologia cavității Kiesberg	71
6.1.2. Caracteristicile speoclimatice ale cavității	72
6.2. Prezentarea macroscopică a siturilor	73
6.2.1. „Stalactitele policrome”	73
6.2.2. Stalactitele mucilaginoase. Scurgeri parietale mucilaginoase. Scurgeri de planșeu mucilaginoase	75
6.2.3. Balta cu depuneri: A. Depunere roșie, B. Depunere albă	78
6.2.4. Formațiuni din materiale de alterare	79

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite

Capitolul 7. Analize chimice efectuate.....	81
7.1. Tehnici folosite pentru analizele cantitative și calitative	81
7.2. Rezultatele analizelor chimice	82
Capitolul 8. Determinări microbiologice	84
8.1. Metode folosite	84
8.1.1. Metode de izolare a microorganismelor	85

8.1.1.1. Bacterii chemolitotrofe acidofile din genul <i>Acidithiobacillus</i>	85
8.1.1.2. Bacterii heterotrofe acidofile aerobe și facultativ anaerobe	86
8.1.1.3. Actinomicete	87
8.1.1.4. Fungi	87
8.1.2. Metode de evaluare cantitativă	88
8.1.2.1. Metoda „serial and-point dilution”	88
8.1.2.2. Metoda numărării coloniilor bacteriene	88
8.1.3. Metode de evaluare calitativă	89
8.1.3.1. Determinarea indirectă a speciilor de <i>Acidithiobacillus</i> prin măsurarea pH-ului culturilor. Determinări și analize numerice	89
8.1.3.2. Determinările genetice	90
8.1.4. Metode pentru analize statistice	92
8.2. Datele obținute. Interpretarea rezultatelor	94
8.2.1. Stalactitele policrome	94
8.2.2. Formațiunile mucilaginoase	106
8.2.3. Balta cu depuneri	123

Partea a-IV-a. Cercetarea electronomicroscopică a siturilor

Capitolul 9. Metodele de lucru folosite pentru prepararea eșantioanelor.....145

9.1. Prepararea eșantioanelor pentru microscopia electronică de transmisie (M.E.T.)	145
9.2. Prepararea eșantioanelor pentru microscopia electronică de baleiaj (M.E.B.)	148
9.3. Prepararea eșantioanelor pentru crio-M.E.B	149

Capitolul 10. Aspecte electronomicroscopice, analize E.D.S.....151

10.1. Arhitectura electronomicroscopică a stalactitelor policrome	151
10.2. Arhitectura electronomicroscopică a formațiunilor mucilaginoase (stalactite, scurgeri parietale și scurgeri de planșeu)	160
10.3. Arhitectura electronomicroscopică a bălții cu depuneri (depunere roșie și depunere albă)	183
10.4. Arhitectura electronomicroscopică a formațiunilor constituite din materiale de alterare	186

Partea a-V-a. Mecanisme metabolice care stau la baza apariției formațiunilor studiate

Capitolul 11. Procese și mecanisme metabolice.....190

11.1. Mecanismele metabolice care stau la baza formării stalactitelor policrome	189
11.2. Procese ce se desfășoară în formațiunile mucilaginoase	201
11.3. Procese ce se desfășoară în balta cu depuneri	218
11.4. Procese ce se desfășoară în formațiunile din materiale de alterare	221

Partea a-VI-a. Utilizarea practică a consorțiilor în deferizarea și demanganizarea apelor de foraj

Capitolul 12. Experimentarea în coloane aerate.....223

12.1. Alcătuirea coloanelor	224
12.2. Inocularea și amorsarea coloanelor	225
12.3. Experimentarea și măsurarea parametrilor	225
12.4. Arhitectura electronomicroscopică a biofilmului	228

12.5. Concluziile experimentului	229
Concluzii	231
Bibliografie	234
Anexe	250

Introducere

1. Medii extreme de viață. Obiectul de studiu și importanța cercetărilor tezei

Mediile de viață, în care una sau mai multe caracteristici fizice și/sau chimice se situează la limite foarte scăzute sau foarte ridicate față de un optim pentru reacțiile biochimice, necesitând deci o adaptare drastică a organismelor prin modificări structurale și genetice, limitând accesul organismelor incapabile să se adapteze la acest factor, sunt denumite “medii extreme de viață” (Goldsmith, 1997).

În categoria mediilor extreme de viață putem considera: zonele deșertice, zonele arctice, zonele calde datorate vulcanismului și apele termale, sistemele cavernicole profunde, medii cu presiuni ridicate sau scăzute, mediile cu concentrații mari de sare, medii cu pH acid etc.

În ultimele decenii, studiile acestor medii de viață s-au dezvoltat din ce în ce mai mult scoțând la iveală adaptări deosebit de interesante a organismelor vii “extremofile” (Goldsmith, 1997).

Diferitele medii cu microorganisme extremofile de pe Terra, au intrat și în atenția exobiologilor care studiază posibilitatea de a exista forme de viață în afara Pământului.

Mediile extraterestre fiind medii cu valori ale unor factori mult exagerate, comunitățile de microorganisme extremofile de pe Terra reprezintă modele de adaptare la valori extreme ale unor organisme la acești factori, sau modele de funcționare a unor ecosisteme în condiții extreme mergând până la probleme legate de apariția vieții pe Pământ sau în afara lui.

Din punct de vedere ecologic și evoluționist, mediile extreme de viață sunt medii simple, cu un număr mic de specii, dar cu un număr relativ mare de celule pe unitatea de volum. Din cauza faptului că multe microorganisme nu se pot dezvolta în mediile extreme, pot fi ridicate două categorii de întrebări: a. În ce fel, condițiile extreme de mediu afectează microorganismele, astfel încât acestea nu pot fi tolerante?, b. Cum este posibil ca organismele care sunt adaptate, să suporte acțiunea factorilor de mediu (Brock, 1988)?

Există trei modalități prin care un microorganism se poate adapta la condiții de mediu extreme: dezvoltă un mecanism care să excludă influența factorului respectiv asupra structurii sale; dezvoltă un mecanism prin care să anihileze factorul respectiv; învață să trăiască cu factorul respectiv (Brock, 1988).

Cercetarea mediile acide extreme, a căpătat și o importanță practică din ce în ce mai mare deoarece studiul ecologiei microorganismelor din mediile bogate în metale, spre exemplu, oferă baza pe care s-au dezvoltat tehnologiile biologice de procesare a minereurilor (Johnson, 1999).

Producătorii primari în mediile acide sunt reprezentați de bacteriile chemolitotrofe fier și sulf oxidante și microorganismele acidofile fototrofe, cum sunt termofilele moderate *Galdieria sulphuraria*, care pot contribui la asimilarea carbonului în zonele expuse luminii solare.

Carbonul fixat, provenit de la producătorii primari vii sau morți este utilizat de către bacteriile acidofile heterotrofe (ex. *Acidiphilium*), fapt care poate stimula dezvoltarea bacteriilor chemolitotrofe deoarece unele dintre acestea (*Leptospirillum ferrooxidans*) au afinitate mare pentru compușii organici solubili. Astfel populațiile mixte de acidofile tind să fie mai rezistente și mai eficiente decât culturile pure corespunzătoare. De asemenea, în cadrul consorțiilor de microorganisme acidofile, compușii produși de unele populații microbiene pot servi drept donori sau acceptori de electroni (bacteriile fier-oxidante și fier-reducătoare) etc (Rawlings, 1997).

În urma oxidării microbiene a diversilor compuși metalici reduși, care este de câteva ori mai accelerată decât cea chimică, rezultă compuși metalici oxidați care se pot depune fie activ fie pasiv în diversele structuri extracelulare electronegative, în general sintetizate abundant de către microorganismele extremofile. În urma unor astfel de depuneri, în aceste medii apar formațiuni

minerale care sunt de origine biogenă. Astfel de formațiuni minerale de origine biogenă au reprezentat și obiectul de studiu al acestei teze.

Cercetările din cadrul acestei teze, s-au desfășurat într-o mină dezafectată (Mina Kiesberg) din S-V-tul României, Județul Caraș-Severin, din vecinătatea Orașului Oravița și au o importanță teoretică cât și practică.

Importanța teoretică rezultă din faptul că mediul extrem de particular determină prezența în această cavitate a unor asociații de microorganisme foarte interesante din punct de vedere fiziologic și ecologic cu implicații în microbiologia, geologia și geomicrobiologia teoretică.

Importanța practică constă pe de o parte în conceperea unor filtre biologice pentru îndepărtarea unor compuși chimici din apele de foraj de adâncime destinate alimentației umane, din apele uzate ce rezultă din procesele tehnologice din industrie, sau din efluenții unor exploatări miniere. Unul din obiectivele noastre importante, în cadrul acestei teze, a fost și testarea eficienței unei comunități de microorganisme studiate de noi în mina Kiesberg, în eliminarea fierului și manganului din apele freatice de adâncime exploatate prin foraje și destinate alimentării cu apă a orașului Timișoara. Pe de altă parte, observarea modului de depunere a hidroxidului feric în biofilmele bacteriene are implicații deosebite în înțelegerea modului de colmatare a filtrelor longitudinale de nisip, folosite în tehnologia clasică de deferizare a apelor de foraj de adâncime, sau în colmatarea straturilor în subteran în tehnologia de deferizare subterană.

2. Organizarea tezei

Teza a fost organizată pe 6 părți și 12 capitole.

Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfului, este structurată pe 2 capitole și reprezintă o parte teoretică. Aceasta are rolul de a clarifica și stabili rolul microorganismelor în circuitul sulfului și fierului în natură, având în vedere faptul că obiectul de studiu al acestei teze îl reprezintă comunități microbiene dintr-un mediu foarte bogat în fier și sulf.

Partea a-II-a Zona minieră Oravița. Mina Kiesberg, este structurată pe 4 capitole și cuprinde o caracterizare a zonei în care s-au desfășurat cercetările noastre. Astfel, această parte cuprinde: o caracterizare fizico-geografică și climatică a zonei miniere Oravița, istoricul exploatărilor miniere din această zonă, caracteristicile geologice ale zonei cât și a minei luate în studiu și respectiv caracterizarea minei Kiesberg și a siturilor sau stațiilor de recoltare a probelor.

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite, structurată pe 2 capitole, cuprinde analizele chimice realizate pe apele recoltate din Galeria Kiesberg Superioară și tehnicile utilizate pentru analize, cât și determinările microbiologice cu tehnicile utilizate în determinări.

Partea a-IV-a. Cercetarea electronomicroscopică a siturilor, cuprinde 2 capitole care tratează pe de o parte tehnicile utilizate în realizarea preparatelor de microscopie electronică, iar pe de altă parte observațiile efectuate și datele obținute.

Partea a-V-a. Mecanisme metabolice care stau la baza apariției formațiunilor studiate, cuprinde 1 capitol în care se încearcă explicarea mecanismelor fizice, chimice, biologice și biochimice care stau la baza apariției și dezvoltării formațiunilor studiate.

Partea a-VI-a. Utilizarea practică a consorțiilor în deferizarea și demanganizarea apelor de foraj, cuprinde 1 capitol care tratează experimentul realizat de noi cu scopul de a testa eficiența consorțiilor de microorganisme studiate în eliminarea fierului și manganului din apele freatice de adâncime exploatate prin foraje în orașul Timișoara.

La cele 6 părți și 12 capitole se adaugă **concluziile, bibliografia și anexele.**

Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfului

Capitolul 1. Fiziologia și activitatea biochimică a ferobacteriilor

1.1. Distribuția fierului în scoarța terestră

Fierul este cel mai abundent element chimic de pe Pământ, concentrația sa medie în crustă fiind estimată la 5%. În scoarța terestră este al patrulea element ca abundență găsindu-se într-un număr mare de minerale din roci, sol și sedimente (Rankama și Sahama, 1950).

Sursa primară de fier de la suprafața Pământului, este activitatea vulcanică. Alterarea rocilor și mineralelor primare care conțin fier este deseori o fază importantă în formarea acumulărilor locale de fier, acestea incluzând depozitele de minereu sedimentar (Ehrlich, 1995).

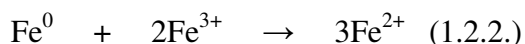
1.2. Proprietăți importante din punct de vedere geochemic

Fierul este un element chimic foarte reactiv. Stările sale obișnuite de oxidare sunt: 0, +2, +3. Într-un mediu hidratat expus la aer sau într-o soluție aerată la pH > 5, forma sa feroasă (Fe^{2+}) se autooxidează rapid la forma ferică (Fe^{3+}). În prezența unui agent reducător potrivit (în condiții reducătoare) Fe^{3+} este rapid redus la Fe^{2+} . Într-o soluție acidă diluată, fierul metalic oxidează rapid la Fe^{2+} cu producere de hidrogen (Ehrlich, 1995).

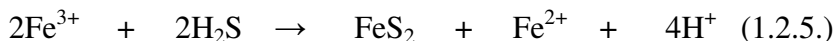
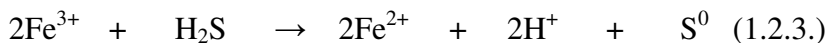


Fe^{3+} precipită ca un hidroxid sau ca un oxid într-o soluție de la neutru la slab alcalină, dar este solubil ca Fe^{3+} într-o soluție acidă. Se dizolvă într-o soluție alcalină puternică datorită naturii amfoterice a hidroxidului de fier ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) care permite să formeze un oxianion.

Într-un mediu lichid, o mixtură de Fe^{3+} și de Fe^0 este supusă la o reacție de dismutație rezultând formarea Fe^{2+} .



H_2S reduce rapid Fe^{3+} la Fe^{2+} și îl precipită ca o sulfură, sau disulfură (în exces de H_2S).



Ultimele trei reacții sunt importante din punct de vedere microbiologic.

1.3. Importanța biologică a fierului

1.3.1. Funcțiile fierului în celule

Toate organismele, atât procariote cât și eucariote, unicelulare și pluricelulare necesită fier nutritiv, cu excepția unui singur grup mic cunoscut de bacterii fermentative homolactice constând în streptococi lactici. Celelalte organisme au nevoie de fier în unele procese enzimactice care implică transferul de electroni, cum este cazul respirației aere și anaerobe, în care citocromii (fierul lor din gruparea Hem) și alte proteine Fe – S non Hem, joacă un rol important în transferul electronilor la un acceptor final. Fotosintetizantele au de asemenea nevoie de fier pentru *ferredoxină* – o proteină

Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfului.

Fe – S non Hem și pentru unii citocromi care sunt parte din sistemul fotosintetic. Unele microorganisme folosesc fierul în unele dintre *superoxid dismutazele* lor care convertește anionul superoxid la apă oxigenată printr-o reacție de dismutație. Majoritatea organismelor aerobe produc *catalaze și peroxidaze*, enzime Hem, ca un mijloc de descompunere a apei oxigenate toxice la apă și oxigen. Procariotele capabile de fixare de azot molecular, folosesc *ferredoxina* și o altă proteină Fe – S non Hem (componenta II a ferredoxinei), precum și proteine Fe – Fe, Fe – Vn și Fe – Mo a nitrogenazei (Zarnea, 1994).

De asemenea, Fe^{2+} poate servi ca o sursă majoră de energie pentru anumite bacterii. Fe^{3+} poate servi ca un acceptor final de electroni în alte condiții pentru aceeași bacterie, sau pentru bacterii diferite. În timpul apariției evoluționare a fotosintezei oxigenice, Fe^{2+} poate să fi servit ca un important reducător prin eliminarea oxigenului toxic produs în proces până la apariția superoxid dismutazei protectoare împotriva formelor de oxigen toxic (Ehrlich, 1995). Cloud (1973) a evidențiat forme ale fierului legat care au apărut în rapoartele sedimentare de acum 3,3 – 2 miliarde de ani în urmă, ca dovadă pentru această acțiune de eliminare a oxigenului de către Fe^{2+} . Formațiunile de fier legat constau din *magnetită* (Fe_3O_4) și *hematită* (Fe_2O_3).

Din punct de vedere biogeochimic oxidarea microbială a fierului la scară largă e importantă pentru că duce la precipitarea, dar și solubilizarea extinsă a acestuia. În unele medii anaerobe, reducerea microbială a fierului, joacă un rol important în mineralizarea carbonului organic (respirația fierului).

1.3.2. Asimilarea fierului de către microorganisme

De vreme ce în mediile aerobe cu pH neutru, Fe^{3+} precipită ușor din soluție și oxizii de fier și oxihidroxizii de fier nu se dizolvă ușor, și de vreme ce fierul nu poate fi ușor luat în celule în formă insolubilă, un număr de microorganisme și-au dezvoltat capacitatea de a sintetiza *chelatori* care ajută la menținerea Fe^{3+} în soluție sau care pot să-l înapoieze în soluție în cantități suficiente pentru a fi valabil nutritiv. Exemplu de asemenea chelatori, cunoscuți ca *siderofore*, sunt *enterobactin* sau *enterochelin*, un derivat catecol de la *Salmonella typhimurium* (Pollack și Neilands, 1970); *aerobactin*, un derivat hidroxamat produs de *Enterobacter aerogenes* (fost *Aerobacter aerogenes*) (Gibson și Magrath, 1969); un *acid rodo torulic* – un derivat hidroxamat produs de *Rhodotorulla* (Neilands, 1974).

Fierul chelatat este de obicei luat prin prima legare cu receptori ferisiderofori specifici la suprafața celulelor speciilor microbiene care au produs sideroforii. După transportul în celule Fe^{3+} chelatat, este de obicei redus enzimatic la Fe^{2+} și apoi eliberat ușor de către siderofore care au doar o mică afinitate pentru el (Ernst și Winkelmann, 1977).

1.4. Fierul ca sursă de energie pentru bacterii

Acidofilele *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*) și alte bacterii acidofile oxidatoare de fier

Microorganismele pot provoca oxidarea fierului, dar aceasta nu înseamnă că oxidarea este întotdeauna enzimatică. Datorită unei tendințe a Fe^{2+} de a se autooxida într-o soluție oxigenată la $pH > 5$ este dificil de demonstrat oxidarea fierului catalizată prin enzime în soluții aproape neutre. Cea mai bună dovadă pentru oxidarea fierului catalizată de enzime bacteriene este aceea care are loc la valori ale pH – ului sub 5 (Ehrlich, 1995).

Acidithiobacillus ferrooxidans – trăsături generale

Cele mai studiate acidofile sunt bacteriile oxidatoare de fier. *Acidithiobacillus ferrooxidans* a fost pentru prima dată izolată de Colmer *et al.* în 1950 și numită și caracterizată ca o

Capitolul 1. Fiziologia și activitatea biochimică a ferobacteriilor.

chemolitotrofă de Temple și Colmer 1951. În anul 2000 genul *Thiobacillus* a fost redenumit *Acidithiobacillus* (Kelly *et al.*, 2000). Este un bacil mobil, Gram -, care își procură energia și puterea reducătoare din oxidarea substanțelor anorganice reduse. Sursa de carbon pentru aceste bacterii este CO₂, iar azotul provine de obicei din NH₃ – N₂, dar pot folosi și NO₃ – N₂. Unele tipuri pot fixa azotul molecular (Stevens *et al.*, 1986).

Din punct de vedere structural celulele de *A. ferrooxidans* prezintă un perete celular multistratificat tipic pentru Gram -. Ele nu conțin membrane interne speciale ca acelea găsite la nitrificatoare și metilotrofe. Diviziunea celulară este de obicei prin constricție, dar ocazional poate fi prin partiție (partiționare) (Karavaiko și Avakyan, 1970).

A. ferrooxidans este o bacterie acidofilă, majoritatea tipurilor, crescând și oxidând Fe²⁺ la pH între 2 și 2,5. Uneori, creșterea poate fi observată pe un interval de pH de la 1,5 la 6. Fe³⁺ produs de organism precipită la pH peste 1,9 (Buchanan și Gibbons, 1974).

A. ferrooxidans este o bacterie mezofilă; intervalul de temperatură al creșterii pe fier în general între 15 – 42 °C cu un interval optim între 30 – 35 °C. Fierul nu reprezintă singura sursă de energie pentru *A. ferrooxidans*. După cum, de altfel, sugerează și denumirea științifică (*Acidithiobacillus*), poate de asemenea folosi și diferite forme reduse de S cum sunt: H₂S, S⁰, S₂O₃²⁻ și sulfuri metalice ca unice surse de energie. Recent s-a descoperit că *A. ferrooxidans* poate folosi H₂ ca unică sursă de energie cu O₂ ca acceptor final de electroni și formiat, cu O₂ sau Fe³⁺ ca acceptori finali de electroni. *Hidrogenaza*, enzima cheie care face posibilă utilizarea H₂ ca sursă de energie, este determinabilă. Când este utilizat H₂, intervalul de pH optim pentru creștere este între 3 – 5,8 spre deosebire de un optim cu Fe²⁺ de pH 2 (Ehrlich, 1995).

Unele tipuri de *A. ferrooxidans* au fost inițial denumite *Ferrobacillus ferrooxidans* (Leathen 1956) și *F. sulfooxidans* (Kinsel, 1960). Acestea au fost considerate sinonime cu *A. ferrooxidans* (Buchanan și Gibbons, 1974).

Cultivarea în laborator: Studiul în laborator a lui *A. ferrooxidans*, ca și al altor bacterii, depinde de ușurința cultivării. Patru medii lichide sunt mai cunoscute pentru cultivarea lui *A. ferrooxidans*, dintre care mediile 9K și T & K sunt cele mai potrivite. Cultivarea pe medii solide agarizate, larg folosite în laboratoarele de bacteriologie, sau cu silicagel, au avut succes limitat. Tuovinen și Kelly (1963) au sugerat că galactoză din agar poate fi inhibitorie pentru microorganism. Creșterea microorganismului pe medii solide este esențială pentru purificarea culturii și clonare pentru studiile genetice precum și pentru estimarea dimensiunii populației prin calcule variabile. Majoritatea tipurilor formează colonii colorate ruginiu, de morfologie variată, depinzând de tipul bacteriei, în decurs de una sau două săptămâni pe un mediu 9K modificat, solidificat cu agaroză sau agar purificat (vezi capitolul 8; Fig 8.1.1.2.).

O serie de precizări au apărut în literatură, cum că bacteriile de tipul *A. ferrooxidans* pot fi adaptate să crească heterotrof, folosind glucoza în locul fierului, ca unică sursă de carbon și energie. Unele din aceste tipuri pot fi readuse la autotrofie dependentă de fier, în timp ce altele nu. Descoperirea că unele culturi de *A. ferrooxidans* conțineau organisme satelit heterotrofe a suscitât îndoială asupra existenței autotrofiei facultative în oricare din tipurile *A. ferrooxidans* (Zavarzin, 1980).

Consortiu cu *A. ferrooxidans*. Existența organismelor satelit care par să trăiască în asociere cu *A. ferrooxidans* a fost semnalată pentru prima dată de Zavarzin (1972). Astfel organisme diferite din punct de vedere taxonomic au fost izolate din diferite consorții cu *A. ferrooxidans*. Zavarzin în 1972 a izolat un organism pe mediul *Leathen* modificat, distinct morfologic de *A. ferrooxidans* fiind un bacil care nu poate să oxideze fierul chiar dacă necesită prezența acestuia în concentrație mare în mediu și era acidofil (intervalul optim de pH 2 – 3). Necesită extract de drojdie, dar nu crește în exces în prezența lui. Organismul a fost inițial izolat din turbă într-o mlaștină acidă. Semăna cu

Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfului.

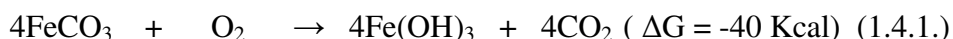
Acetobacter xilinum, dar a crescut la un pH mai mic și avea o abilitate de formare a etanolului și acidului acetic slabă.

Guay și Silver (1975) au derivat un organism satelit din tipul TM al *A. ferrooxidans* prin subcultivarea în mediul 9K cu concentrații crescânde de glucoză de la 0,1 – 1% și descreșteri concomitente în Fe^{2+} . O cultură pură a organismului satelit pe care ei au numit-o *A. acidophilus*, a fost izolată pe agar 9K glucoză - săruri de bază conținând (pH 4,5 și 25 °C). Cultura pură constă din bacili Gram negativi și au fost astfel foarte distincți morfologic de *A. ferrooxidans*.

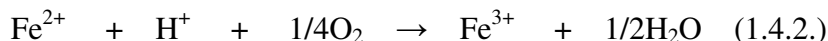
Alte organisme satelit care au fost găsite a fi asociate cu unele culturi de *A. ferrooxidans* include *Acidiphilium cryptum* (Harrison, 1981), *A. organovorum* (Loleos, 1986), *A. angustum*, *A. facilis* și *A. rubrum* (Wichlacz, 1986).

Energetica oxidării Fe^{2+}

Oxidarea Fe^{2+} nu furnizează multă energie pe bază molară, în comparație de exemplu, cu oxidarea glucozei. În trecut, estimarea lui ΔG pentru oxidarea fierului era de aproximativ 10 Kcal mol⁻¹, calculată de Baas Becking și Parks (1927) din ecuația:



Într-o examinare mai recentă a problemei energiei libere create în timpul oxidării Fe, Lees (1969) a propus că reacția decurge astfel:



Luând în considerare efectele pH – ului și solubilității Fe^{3+} asupra reacției, s-a calculat energia molară liberă ΔG [$\Delta G = -1,3 (7,7 - \text{pH} - 0,17)$] care la pH 2,5 este 6,5 Kcal mol⁻¹, abia ajungând pentru sinteza unei molecule de ATP (care necesită aproximativ 7 Kcal mol⁻¹). Dacă presupunem că este nevoie de 120 Kcal de energie pentru a asimila 1 mol de carbon cu eficacitate de 100%, aproximativ 18,5 moli de fier vor trebui să fie oxidați pentru a încorpora atâta carbon. Prin urmare, *A. ferrooxidans* nu este eficient 100% în folosirea energiei disponibile din oxidarea fierului. Din rezultatele experimentale ale lui Beck (1960) aproximativ 100 moli Fe^{2+} trebuie să fie oxidați pentru a fixa un mol de CO_2 de către un tip de *A. ferrooxidans*. Rapoartele molare observate la Fe^{2+} oxidat la CO_2 asimilat ilustrează că mari cantități de fier trebuie oxidate pentru a satisface necesarul de energie pentru creșterea acestor organisme (Ehrlich, 1995).

Sistemul enzimelor oxidatoare de Fe în *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Au fost înregistrate progrese semnificative în elucidarea mecanismului enzimatic al oxidării fierului de către *A. ferrooxidans*.

Fe^{3+} rezultat din Fe^{2+} care se oxidează, cauzează inhibarea enzimelor și limitează creșterea lui *A. ferrooxidans* (Kelly și Jones, 1978, Kovalenko *et al.*, 1982). Efectul inhibitor poate fi modulat prin schimbarea temperaturii. Creșterea temperaturii descrește efectul inhibitor. Și vârsta fiziologică are un efect asupra susceptibilității Fe^{3+} , celulele rămase în urmă fiind mai sensibile decât cele mai avansate în procesele fiziologice (Kovalenko *et al.*, 1982). Fe^{2+} poate cauza inhibarea substratului în creșterea în chemostat (Kelly și Jones, 1983).

Necesitatea ionilor sulfat pentru sistemul oxidator al Fe la *A. ferrooxidans* a fost stabilită de Lazaroff (1963). Schimbările concentrației SO_4^{2-} precum și a pH – ului afectează valorile lui V_{max} , dar nu și ale lui K_m (constantă – Segel, 1975). Chiar și atunci când celulele erau adaptate la prezența Cl^- , Cl^- nu putea înlocui total SO_4^{2-} (Lazaroff, 1963, Vorreiter și Madgwick, 1982). În cel puțin un caz, SO_4^{2-} poate fi înlocuit parțial de HPO_4^{2-} , sau HAsO_4^{2-} dar nu de BO_3^- , MoO_4^{2-} , NO_3^- , sau Cl^- . Ionii de formiat și MoO_4^{2-} au inhibat oxidarea Fe. Selenatul ar fi putut înlocui sulfatul în oxidarea

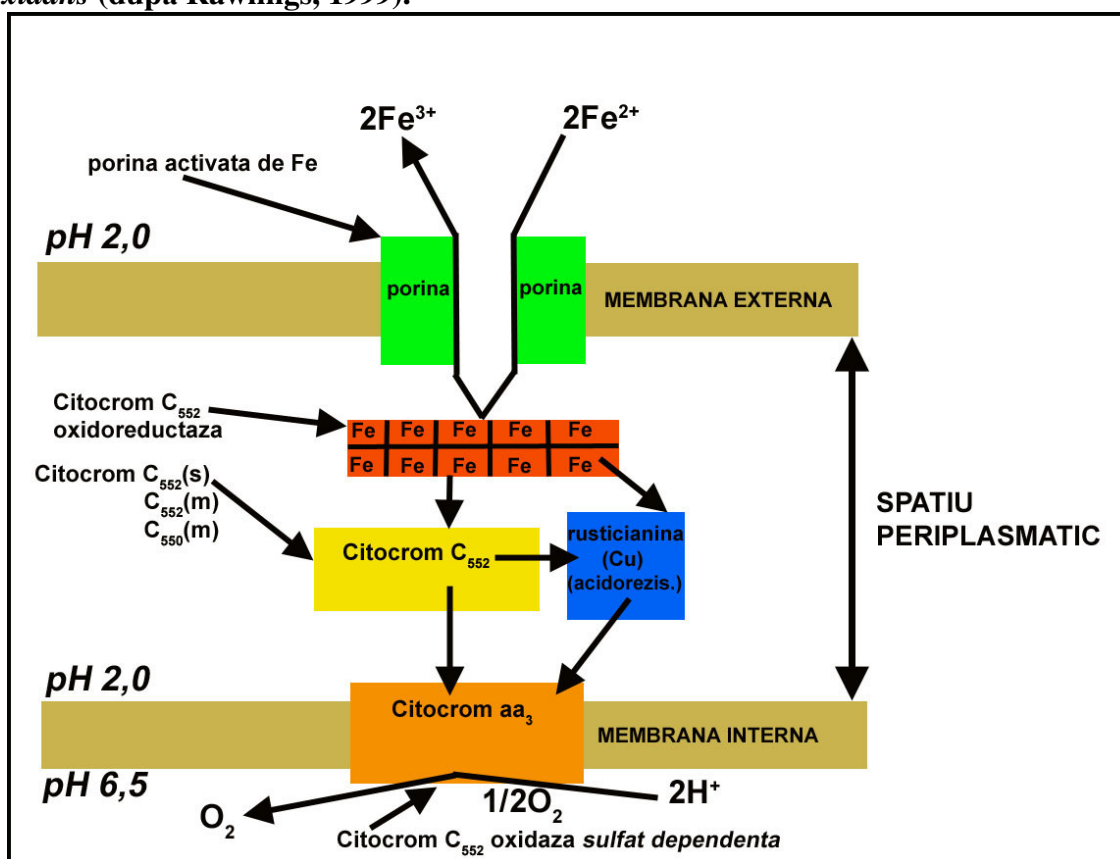
Capitolul 1. Fiziologia și activitatea biochimică a ferobacteriilor.

Fe de către *A. ferrooxidans*, dar nu permite creșterea acestuia. În prezența sulfatului și a selenatului, oxidarea Fe a fost accentuată de telurat, tungstat, arsenat sau fosfat (Lazaroff, 1977). *Un rol al sulfatului în oxidarea Fe de către A. ferrooxidans pare să fie acela al stabilizării complexului hexa – apos al Fe (II) care servește ca substrat pentru sistemul său de enzime oxidatoare de Fe.* Selenatul poate înlocui total sulfatul ca stabilizator anionic și teluratul, tungstatul, arsenatul și fosfatul îl poate înlocui parțial (Lazaroff, 1983). *Formarea extinsă a jarositului, un sulfat de fier bazic cristalin, în prezența, dar nu în absența de A. ferrooxidans sugerează că în oxidarea nonbiologică a Fe (II), H₂O înlocuiește sulfatul în produsul feric* (Lazaroff et al., 1982, 1985).

În ultimele decenii, au fost propuse de diverși autori o serie de modele referitoare la sistemul oxidator de fier la nivelul celulelor de *A. ferrooxidans*. Astfel cele mai cunoscute sunt modelul lui Ingledew 1977 și modelul lui Blake et al. 1993.

Cel mai recent model a fost propus de Rawlings, 1999. Astfel, după acesta, la nivelul celulelor bacteriene sistemul respirator al fierului conține o serie de protein-enzime ce conțin cupru (rusticianina) și două tipuri de citocromi, o porină și un chelat de sulfat de fier (II) (Blake și colab., 1993). La *Acidithiobacillus ferrooxidans*, genele tuturor acestor componente, cu excepția porinei din membrana externă, au fost clonate (Rawlings, 1999) (Fig. 1.4.1.).

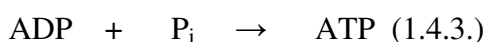
Fig. 1.4.1. Dispunerea componentelor implicate în oxidarea fierului în *Acidithiobacillus ferrooxidans* (după Rawlings, 1999).



Baza pentru modelele curente cele mai plauzibile ale oxidării Fe o reprezintă descoperirea proteinei ce conține cupru - rusticianina în periplasmă.

Cuplarea energiei în oxidarea fierului

Cuplarea energiei în oxidarea fierului la *A. ferrooxidans* este cel mai bine înțelesă printr-un *mecanism chimioosmotic* (Ingledeu, 1982). Un astfel de mecanism presupune instalarea unei *forțe motrice a protonilor* de-a lungul membranei plasmatică datorită separării sarcinilor pe cele două fețe ale membranei. Forța motrice a protonilor rezultă dintr-un gradient de pH generat de concentrația mai mare a protonilor în periplasma acidă față de citoplasma aproape neutră a celulei active de *A. ferrooxidans*, și de un potențial electric transmembranar. Transferul electronilor la O₂ via sistemul transport de electroni rezultă din pomparea protonilor din citoplasmă în periplasmă care împreună cu protonii formați din hidroliza Fe³⁺ generat în oxidare sunt o cauză a gradientului protonului. Cuplarea energiei, sinteza ATP – ului, rezultă din faptul că membrana plasmatică este impermeabilă la protonii din periplasmă cu excepția locurilor în care *adenozin 5' – trifosfataza (ATP aza)* este ancorată în membrană. ATP aza conține un canal de protoni care permite trecerea protonilor în direcția citoplasmei și, ca rezultat al mișcării lor, cauzează sinteza ATP – ului de către ATP aza în reacția:



Stoichiometric, doar un ATP poate fi sintetizat per pereche de electroni trecută la oxigen pentru fiecare doi Fe²⁺ oxidați la 100% eficacitate. De vreme ce, după cum am discutat, eficacitatea cuplării energiei este mult mai mică decât 100%, o cantitate mare de Fe²⁺ trebuie să fie oxidat pentru a realiza energia necesară celulei de *A. ferrooxidans* (Rawlings și Kusano 1994).

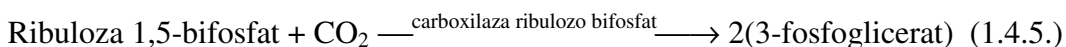
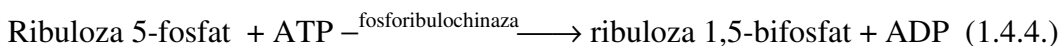
Transportul revers de electroni

Asimilarea de CO₂ de către oricare autotrofă necesită o sursă de putere reducătoare. Când *A. ferrooxidans* crește pe Fe, această sursă este Fe²⁺. Astfel, Fe²⁺ are o funcție dublă în nutriția microorganismului, adică ca și sursă de energie și ca sursă de putere reducătoare.

Pentru a reduce CO₂ fixat, electronii Fe²⁺ sunt transferați la NADP⁺ via sistemului citocromilor împotriva unui gradient electropotențial prin cheltuirea de energie (consum de ATP) într-un proces numit *transport revers de electroni* (Ingledeu, 1982). Cheltuiala de energie se produce deoarece cuplul citocrom c (nivelul la care electronii de la Fe intră în sistemul de transport al electronilor legați de membrană) are un Eh mult mai mare (+245 mV) decât cel al cuplului NAD / NADH (-320 mV), sau cuplul cu NADPH (Eh = -324 mV). Într-un tip de *A. ferrooxidans*, citocromul c, citocromul c₁ și b (complexul bc₁) și o flavină au fost identificați ca participanți în sistemul de transport revers al electronilor (Rawlings și Kusano 1994).

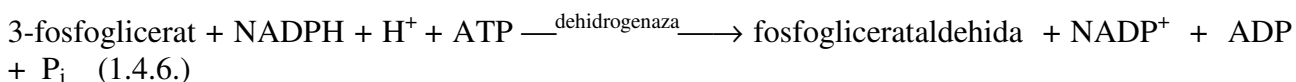
Asimilarea carbonului

Mecanismul major al asimilării de CO₂ în *A. ferrooxidans* include ciclul Calvin – Benson (Gale și Beck, 1967). Un mecanism minor de fixare a CO₂ incluzând fosfoenolpiruvat carboxilaza, există de asemenea în microorganism (Din *et al.*, 1967). Acest din urmă sistem este necesar pentru formarea unor anumiți aminoacizi. În ciclul Calvin – Benson, CO₂ este fixat de ribuloza 1,5 – bifosfat obținută din ribuloza 5 – fosfat, după cum urmează :



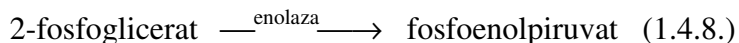
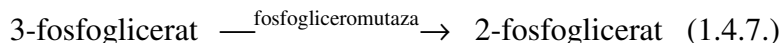
Fiecare 3-fosfoglicerat este apoi redus la 3-fosfoglicerataldehidă:

Capitolul 1. Fiziologia și activitatea biochimică a ferobacteriilor.

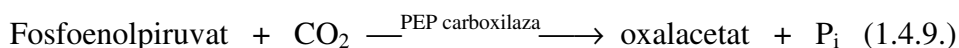


3-fosfogliceraldehida este convertită printr-o serie de pași la diferiți constituenți ai celulei precum și la cantități catalitice de ribuloză 5-fosfat pentru a menține ciclul Calvin-Benson în funcțiune.

Carboxilaza fosfoenolpiruvat catalizează fixarea de CO₂ prin fosfoenolpiruvat, care este format din 3-fosfoglicerat după cum urmează:



Fosfoenolpiruvatul este apoi combinat cu CO₂:



În prezent nu se știe sigur dacă există un ciclu al acizilor tricarboxilici funcțional în *A. ferrooxidans* când acesta crește autotrof pe fier. Anderson și Lundgren (1969) au raportat dovezi experimentale pentru această problemă în celulele care cresc pe fier, dar Tabita și Lundgren (1971) l-au găsit doar în celulele care cresc pe glucoză. Tipul folosit în aceste studii poate să fi fost amestecat cu un microorganism satelit (Ehrlich, 1995).

Alte bacterii oxidatoare de fier acidofile

Mezofile

Alte bacterii acidofile capabile de oxidarea enzimatică a Fe²⁺ au fost descoperite mai recent. Multe din acestea sunt destul de diferite și neînrudite cu *A. ferrooxidans* (Harrison, 1986). Unele dintre ele sunt mezofile, altele sunt termofile și majoritatea sunt chemolitotrofe. Unele pot oxida doar fierul, în timp ce altele pot oxida și sulful redus și sulfurile metalice (Pronk și Johnson, 1992).

Printre mezofilele care pot oxida fierul sunt: *Acidithiobacillus prosperus* (Huber și Stetter, 1989), *Leptospirillum ferrooxidans* și bacterii asemănătoare (Harrison și Norris, 1985, 1990), un tip de *Metallogenium* (Walsh și Mitchell, 1972). *A. prosperus* seamănă cu *A. ferrooxidans*, cu excepția faptului că poate crește în prezența NaCl de până la 6%, în timp ce *A. ferrooxidans* nu poate crește pe medii cu sare, clorura fiind toxică pentru el.

L. ferrooxidans tipic a fost la început izolat dintr-un depozit de cupru din Armenia. Este o celulă vibrioidă cu un flagel polar de aproximativ 25 nm în diametru. Celulele de involuție pot avea formă de spirală "Tori" și se formează la valori ale pH – ului mai mici de 2. În laborator microorganismele au fost crescute pe mediul lui Leathen la pH = 2 – 3 și în mediul 9K la pH = 1,5. Microorganismul oxidează fierul pentru energie, dar nu poate oxida sulful redus și este incapabil de creștere în medii organice (Harrison și Norris, 1985).

Un *Metallogenium* acid – tolerant, a fost semnalat în analize în apele continentale, mezoacide, care conțin fier (Walsh și Mitchell, 1972). Este un microorganism filamentos constând în filamente ramificate (0.1 – 0.4 μm și mai mult de 1 μm lungime), de obicei încrustate cu fier. Microorganismul tolerează un pH cuprins între 3,5 – 6,8, cu un optim 4,1. Nu este clar dacă acest microorganism este autotrof sau heterotrof. Identificarea lui este destul de dificilă deoarece unele precipitate anorganice pot semăna morfologic la microscop cu acest tip de *Metallogenium* (Ivarson, Sojak, 1978).

Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfului.

Termofile

Bacteriile oxidatoare de fier termofile pot fi împărțite în termofile moderate și termofile extreme. Acestui din urmă grup îi aparține un ansamblu incomplet caracterizat de bacterii ca *Acidithiobacillus* (Brierley, 1985, Norris, 1990) și *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (Norris, 1990). Relația lor cu *Acidithiobacillus* este incertă. Cel puțin unele ca *S. thermosulfidooxidans* nu aparține deloc genului *Acidithiobacillus*. În general, ele oxidează fierul la 50 și 55 °C și în unele cazuri la 60 °C. Deși cresc chemolitotrof pe fier, ele necesită frecvent prezența unor cantități mici de extract de drojdie, cisteină și glutation pentru creștere. Unele nu pot folosi compuși ai sulfului anorganici ca sursă de energie.

De asemenea, microorganisme termofile extreme, oxidatoare de fier, bine studiate sunt acidofilele: *Sulfolobus acidocaldarius* (Brock *et al.*, 1972) și *Acidianus* (fost *Sulfolobus*) *brierleyi*. Amândouă genuri aparțin domeniului *Archaea*. Până acum este incert dacă *S. solfataricus* și *S. ambivalens* (Zillig *et al.*, 1985) pot oxida fierul.

Neutrofile

Gallionella

Deși, după cum am arătat, dovezi convingătoare pentru oxidarea enzimatică a fierului de către bacteriile feruginoase la pH acid există, dovezi precise pentru oxidarea enzimatică a fierului de către bacteriile feruginoase la pH neutru lipsesc în majoritate. Cea mai puternică dovadă pentru oxidarea enzimatică a fierului la pH neutru este aceea asociată cu *Gallionella* mai ales *G. ferruginea* (Zarnea, 1994). Acest microorganism a fost descris pentru prima dată de Ehrenberg în 1836. În forma sa cea mai ușor de recunoscut apare ca o celulă sub formă de bob de fasole cu un filament lateral de legături răsucite de fibrili. Celula sub formă de bob de fasole cu filament lateral a fost prima dată recunoscută ca o parte integrală a microorganismului de către Cholodny (1924). Filamentele se pot ramifica dihotomic, fiecare având o celulă ca un bob de fasole la capătul fiecărei ramificații. Filamentul este de obicei ancorat de o suprafață solidă și poate fi bine încrustat cu hidroxid feric. Celulele, care pot forma unul sau doi flageli polari, se pot detașa de filamentul lor. Acestea înoată ca un grup și caută un nou loc de atașare dezvoltând un mod de creștere cu filamente (Giorse, 1984).

În experimentele cu culturi, în laborator, în condiții aerobe în care G. ferruginea crește exponențial, celulele creșteau libere și nu formau filamente, dar erau mobile cu un singur flagel. Filamentele au început să fie formate numai în faza staționară la un pH peste 6. Nici un filament nu s-a format când Fe²⁺ nu s-a autooxidat, condiții care includ microaerobioza. Hallbeck și Pedersen (1990) sugerează că formarea filamentelor protejează împotriva “creșterii capacității reducătoare a Fe²⁺ în timp ce devine instabil într-un mediu care devine oxidator”.

Gallionella a fost general descrisă ca un așa numit *microorganism gradient*; crește cel mai bine la o presiune scăzută a O₂ (0,1 – 1 mg de O₂ / litru) și la un interval al Eh de +200 la +320mV (Hanert, 1981). Este o mezofilă care crește optim la 20 °C, deși creșterea în natură a unor tipuri a fost observată până la 45 °C. Preferă un interval de pH cuprins între 6 – 7,6. Necesitatea scăzută de O₂ explică de ce acest microorganism poate cataliza oxidarea Fe²⁺ la pH neutru. În aceste condiții parțial reduse, fierul se autooxidează doar lent (Wolfe, 1964).

Gallionella poate crește autotrof și mixotrof. Hallbeck și Pedersen (1991) au demonstrat că microorganismul și-a obținut tot carbonul din CO₂ când crește într-un mediu de săruri minerale în condiții aerobe cu FeS ca sursă de energie. Aceeași cercetători au arătat că glucoza, fructoza și sucroza pot îndeplini o parte din necesarul de energie și o parte sau întregul necesar de carbon, depinzând de concentrația respectivelor zaharuri. Microorganismul pare să fixeze CO₂ via carboxilază / ribuloză 1,5 – bifosfat oxidază.

Metodele de izolare și propagare pentru *Gallionella* au fost rezumate de Hanert (1981).

Alte ferobacterii

Alte bacterii care au fost asociate de către unii cercetători cu oxidarea Fe includ bacterii capsulate cum sunt *Sphaerotilus*, *Leptothrix sp.*, *Crenothrix polyspora*, *Clonothrix sp.*, și *Lieskuella bifida* și câteva bacterii capsulate din grupul *Siderocapsaceae*. Multe dintre acestea sunt mai degrabă bacterii care depozitează Fe; ele leagă Fe preoxidat de suprafața celulei lor (Ghiorse și Ehrlich, 1992).

Examinarea ultrastructurală a capsulei la *Leptothrix discophora* SP – 6 a arătat o structură tubulară de fibrili condensați (6,5 nm în diametru) având deasupra un oarecare strat capsular difuz (Emerson și Giorse, 1993). Partea fibriloasă a scutului capsulei a fost ancorată prin poduri de membrana externă a celulelor Gram -. Stratul capsular avea o sarcină negativă netă. Capsulele purificate conțin 34 – 35% polizaharide constând în 1 : 1 amestec de acizi uronici și galactoz – amină, 23 – 25% proteină îmbogățită în cisteină, 8% lipide și 4% substanțe anorganice. Cisteina din proteina capsulei se crede că este importantă în menținerea integrității capsulei (Emerson și Giorse, 1993).

Dubinina (1978) a raportat mai recent că *L. pseudochracea*, *Metallogenium* și *Arthrobacter siderocapsulatus* au oxidat Fe^{2+} cu H_2O_2 produsă metabolic prin activitatea catalazei microorganismelor. Aceasta se poate datora faptului că mecanisme diferite ale oxidării enzimatică ale fierului există.

Pentru toate celelalte bacterii capsulate, oxidarea enzimatică a fierului este doar presupusă, bazată pe asemănări morfologice cu *Leptothrix* și observarea fierului oxidat depus pe capsulele lor. Este foarte probabil ca majoritatea acestor organisme doar să depună fierul preoxidat pe capsulele lor (Emerson și Giorse, 1993).

Deși, până acum, despre oxidarea bacteriană a Fe^{2+} s-a presupus în general că ar necesita oxigen ca acceptor final de electroni, fiind găsită o excepție care apare în jurul pH – ului neutru. Două tipuri fototrofe, anaerobe asemănătoare lui *Rhodospirillum rubrum* și *R. rubrum* și un tip asemănător lui *Thiodictyon sp.* Din punct de vedere metabolic, au fost găsite că oxidează oxizii de Fe (II) la oxizi de Fe (III) la lumină. Aceste bacterii au folosit puterea reductoare generată în oxidarea oxizilor de Fe (II) la oxizi de Fe (III) pentru fixarea de CO_2 . Anaerob, nu a fost observată nici o oxidare a fierului la întuneric sau la lumină în absența bacteriilor. Nici o creștere nu a apărut în mediile experimentale în absență de fier adăugat. Widdel *et al.* (1993) sugerează că această oxidare anaerobă a Fe (II) de către bacterii fototrofe putea să fi contribuit la stadiile incipiente ale formațiunilor înconjurate de structuri ferice care au apărut în timpul Arhaicului. Acest proces bacterian de asemenea permite completarea unui ciclu al fierului în condiții anaerobe (Widdel *et al.*, 1994).

1.5. Fe (III) ca acceptor final de electroni în respirația bacteriană

Fe^{3+} în natură poate fi redus microbial la Fe^{2+} . Fe^{3+} poate fi sub formă dizolvată sau ca un mineral insolubil ca *limonitul*, *ghoetitul*, *hematitul*, etc. Ca și în cazul oxidării fierului, această reducere se poate manifesta ca o formă de respirație, în principal anaerobă, în care Fe^{3+} servește ca acceptor final de electroni exclusiv sau dominant. Amândouă aceste procese reductoare de Fe^{3+} sunt forme ale diferitelor reduceri dezasimilatorii a fierului (Roden și Lovley, 1993).

Când Fe^{3+} este redus în timpul asimilării pentru încorporarea în componente celulare specifice, procesul reprezintă reducerea asimilatorie a fierului. Cantități relativ mari de fier sunt consumate în reducerea dezasimilatorie în timp ce doar cantități foarte mici sunt consumate în reducerea asimilatorie. Fe^{3+} în reducerea asimilatorie la pH aproximativ neutru este de obicei complexat de siderofore și poate fi redus sub această formă complexată sau după eliberarea din ligandul din membrana celulei.

Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfului.

Din punct de vedere geomicrobiologic, cea mai importantă este reducerea dezasimilatorie a fierului (Zarnea, 1994).

1.5.1. Reducerea bacteriană a Fe^{3+} însoțind fermentația

Pentru o anumită perioadă de timp, s-a știut că Fe^{3+} influențează metabolismul fermentativ al bacteriilor ca rezultat al capacității acestuia de a se comporta ca un acceptor final de electroni. Roberts (1947) a arătat o schimbare în balanța fermentației, prin compararea acțiunii lui *Bacillus polymyxa* pe glucoză anaerob în prezența și absența fierului. Fe^{3+} în toate experimentele a fost furnizat ca proaspăt precipitat, suspensie dializată de hidroxid feric obținut într-o reacție de clorură ferică și un exces de hidroxid de potasiu. Suspensia a avut un pH de 7,8. Fe^{3+} părea să acționeze ca un acceptor suplimentar de electroni în fermentație și în acest fel a schimbat cantitățile unor anumiți produși formați din glucoză. Astfel, în prezența fierului, mai puțin H_2 și CO_2 , mai mult etanol și mai puțin 2,3 – butilenglicol au fost formați într-un mediu fie organic fie sintetic, decât în absența fierului. De asemenea, a fost consumată mai multă glucoză în prezența fierului decât în absența lui în oricare dintre medii (Lovley, 1991).

Bromfield (1954) a arătat că pe lângă *B. polymyxa*, culturile de *B. circulans* pot de asemenea reduce Fe^{3+} . Depinzând de mediu, el a găsit că până și *Escherichia freundii*, *Aerobacter* (acum *Enterobacter*) sp. și *Paracolobactrum* (acum probabil *Citrobacter*) pot face acest lucru. El a dedus din aceste rezultate că reducerea fierului nu a fost direct implicată în oxidarea substratului (sursă de energie) care este în contradicție cu rezultatele sale cu celulele inactivate. El a găsit că nu erau necesare condiții anaerobe stricte pentru a obține reducerea Fe^{3+} de către bacterii. Când însă, a fost ridicat nivelul de aerare al culturilor, Fe^{2+} s-a autoreoxidat.

Alte câteva bacterii au fost arătate a fi capabile să reducă Fe^{3+} în asociere cu un proces fermentativ. Ele includ aerobe cum sunt *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp., anaerobe ca *Clostridium* sp., *Bacteroides hypermegas*, *Desulfovibrio desulfuricans* și *Desulfatamaculum nigrificans* (Lovley, 1987). Activitatea de reducere a fierului a fost urmărită în multe din aceste cazuri și considerată ca o “chiuvetă” pentru puterea reductoare care nu furnizează energie celulelor. Această explicație este valabilă numai dacă poate fi demonstrat că reducerea fierului nu este însoțită de conservarea energiei. *Pseudomonas ferrireductans* (acum *Shewanella putrefaciens* tipul 200) pare să conțină reductază constitutivă și determinabilă a Fe^{3+} . Enzima constitutivă este implicată în respirația Fe^{3+} și enzima determinabilă, produsă la o presiune de oxigen mai scăzută, este implicată în eliminarea electronilor fără conservarea energiei (chiuveta electronilor) (Arnold *et al.*, 1987).

Chiar și câțiva fungi au fost implicați în reducerea de Fe (III) (Ottow și von Klopotek, 1969). Abilitatea lor de a reduce Fe^{3+} nu implică respirația anaerobă, dar în schimb implică fie reducerea asimilatorie a fierului, fie producerea de produși de metabolism care se comportă ca și reductori chimici ai fierului.

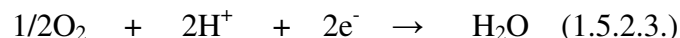
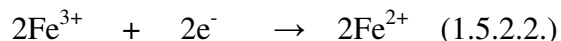
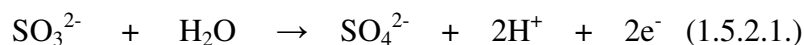
1.5.2. Respirația Fe^{3+}

Respiratorii Fe^{3+} heterotrofi tipici includ atât bacterii strict anaerobe cât și facultative. Exemple de anaerobe stricte includ: *Geobacter metallireducens* (Lovley *et al.*, 1993) (fostul tip GS – 15), *G. sulfurreducens* (Caccavo *et al.*, 1994) și diferiți sulfatoreducători cum sunt *Desulfuromonas acetooxidans* (Roden și Lovley, 1993) și *Desulfovibrio desulfuricans* (Coleman *et al.*, 1993), în absența sulfatului ca acceptor final de electroni. Exemple de bacterii facultativ anaerobe includ diferite tipuri de *Shewanella* (fostă *Pseudomonas*, *Alteromonas*) *putrefaciens* (Obuekwe și Westlake, 1982) și *Pseudomonas* sp. (Balashova și Zavarzin, 1979). Bacteriile facultativ anaerobe reduc fierul numai anaerob.

Unele autotrofe pot de asemenea respira cu fierul ca acceptor final de electroni. *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, și *Sulfolobus* sp. pot reduce Fe^{3+} cu sulf elementar ca donor de electroni (Pronk *et al.*, 1992). *A. thiooxidans* poate realiza această reducere aerob deoarece Fe^{2+} pe

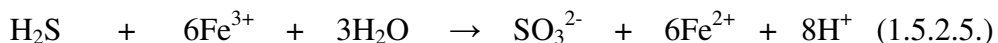
Capitolul 1. Fiziologia și activitatea biochimică a ferobacteriilor.

care îl produce la pH acid (aproximativ 2,5) nu se autooxidează ușor. Pe de altă parte *A. ferrooxidans* formează Fe^{2+} doar anaerob deoarece aceasta reoxidează Fe^{2+} aerob. *S. acidocaldarius* poate forma Fe^{2+} microaerofil la 70 °C deoarece sub această disponibilitate O_2 nu reoxidează Fe^{2+} . Unele culturi de *A. ferrooxidans* care cresc, par să folosească o cale ramificată când oxidează aerob sulful în prezența Fe^{3+} în care electronii din sulfid pot trece la Fe (III) sau O_2 via un complex bc₁ (Pronk et al., 1992). Reacția poate fi rezumată astfel:



Sulfitul este un intermediar metabolic în oxidare sulfului elementar. Formarea sa implică oxigenarea și astfel implică prezența oxigenului.

A. ferrooxidans tipul AP 19 – 3 pare să reducă Fe^{3+} atât aerob cât și anaerob cu sulf printr-un sistem de enzime care include un sulfat Fe (III) – și un sulfid Fe (III) – oxidoreductază. Alte tipuri de *A. ferrooxidans* și *Leptospirillum ferrooxidans* care nu au fost cunoscute anterior că ar oxida sulf elementar, de asemenea par să posede acest sistem de enzime (Sugio et al., 1992). În acest proces, bacteriile transformă sulful elementar la sulfură în prezență de glutatoin redus. Reacțiile implicate în oxidarea sulfului elementar cu Fe (III) de către *A. ferrooxidans* AP 19 – 3 pot fi rezumate astfel:



Creșterea pe sulf în prezența Fe (III) a *A. ferrooxidans* AP 19 – 3 apare numai aerob. *L. ferrooxidans* nu a fost până acum crescut pe sulf. Acesta pare să conserve energie numai din oxidarea fierului și nu din oxidarea sulfului de către Fe^{3+} . Oxidarea chimică a sulfidului intermediar de către Fe^{3+} în periplasma lui *A. ferrooxidans* AP 19 – 3 apare și ea. Oxidarea sulfidului de către Fe^{3+} în *A. ferrooxidans* tipul AP 19 – 3 este văzută ca un mecanism de detoxifiere deoarece sulfidul este toxic dacă i se permite să se acumuleze (Sugio et al., 1992).

Reducerea dezasinilatorie a fierului sub forma respirației anaerobe a fost acum recunoscută ca un mijloc important de mineralizare a materiei organice în medii în care sulfatul sau nitratul apar în cantități insuficiente pentru a susține respirația cu sulfat sau nitrat. Procesul poate opera cu diferiți acizi organici, incluzând acizi grași volatili și cu compuși aromatici ca donatori de electroni. Mai mult, poate înlocui metanogeneza prin competiția pentru H_2 și acetat (Lovley, 1991).

1.5.3. Bioenergetica reducerii dezasinilatorii a Fe

Calculul energiei libere arată că atunci când acetatul este donatorul de electroni (reducătorul), energia liberă standard se schimbă la pH 7 (DG°), când Fe^{3+} este acceptorul de electroni (oxidantul), energia liberă este $-193,4\text{kcal mol}^{-1}$ ($-808,4\text{kJ mol}^{-1}$) care este aproape de valoarea când O_2 este oxidantul ($-201,8\text{kcal mol}^{-1}$ sau $-843,5\text{kJ mol}^{-1}$). Când $\text{Fe}(\text{OH})_3$ este oxidantul acetatului, energia liberă standard se schimbă la pH 7 fiind doar de $-5,5\text{kcal mol}^{-1}$ (-23kJ mol^{-1}) (Ehrlich, 1993). Acest lucru indică faptul că oxizii și hidroxizii de Fe nedizolvați sunt slabi acceptori de electroni la pH neutru sau alcalin și nu permit conservarea biochimică eficientă a energiei la pH 7.

Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfului.

S-a sugerat faptul că nu toate bacteriile reducătoare de Fe(III) au câștigat energie în timpul procesului. De exemplu, Ghiorse(1988) și Lovley(1991) au propus ideea că un număr de bacterii reduc Fe^{3+} doar pentru a scăpa de puterea reducătoare excesivă, via unei căi secundare respiratorii fără a conserva energia, sau că reducerea Fe care a fost observată cu aceste organisme a făcut parte din procesul lor de asimilare a Fe. Absența stimulării creșterii în condiții anaerobe când un organism reduce Fe(III) cu eliberare stoichiometrică de Fe^{2+} extracelular nu este neapărat un indiciu că energia nu este conservată în reducere. Procesul de reducere a Fe(III) poate produce o cantitate insuficientă de energie pentru creștere dacă aceasta este singura sursă de energie, fiind necesar să fie însoțit de un proces adițional respirator sau fermentativ pentru a ajunge la necesarul total de energie (Ehrlich, 1995).

1.5.4. Reducerea Fe^{3+} de către Fungi

Unii fungi par să fie capabili să reducă Fe^{3+} . Lieske a raportat un astfel de fenomen, iar Otto și von Klopotek (1969) au observat reducerea fierului în hematit (Fe_2O_3) de către *Alternaria tenuis*, *Fusarium oxysporium* și *F.solani*, dintre care toate posedau nitrat reductază determinabilă. Fungii din acest studiu, incapabili de reducerea nitrului erau de asemenea incapabili de reducerea Fe^{3+} . De aceea, acești cercetători au concluzionat că nitrat reductaza funcționează la fungi în reducerea Fe^{3+} precum și a nitrului, un mecanism astfel similar cu cel al multor bacterii. Concluzia lor ridică un semn de întrebare și anume unde este localizată nitrat reductaza în fungi pentru a fi capabilă să acționeze pe hematit și dacă aceasta reprezintă o reducere dezasimilatorie sau asimilatorie. Prima pare mai puțin probabilă (Ehrlich, 1995).

1.5.5. Tipuri de compuși ferici atacați via reducerea dezasimilatorie a Fe

Ușurința cu care Fe^{3+} este redus de către bacterii depinde în parte de forma sub care ele îl întâlnesc. În cazul formelor insolubile, ordinea descrescătoarea a solubilității a fost: $FePO_4 \cdot 4HO > Fe(OH)_3 > lepidocrocit$ (γ - $FeOOH$) $>$ *ghoetit* (α - $FeOOH$) $>$ hematit (Fe_2O_3) (Ottow, 1967). Într-un alt studiu de Castro și Ehrlich (1970) folosind glucoza ca donor de electroni, *Bacillus* 29A marin a solubilizat cantități mai mari de Fe din limonit și ghoetit decât din hematit. În stadiile inițiale ale reducerii ordinea descrescătoare a activității a fost: ghoetit $>$ limonit $>$ hematit. Organismul nu a redus Fe^{3+} când a apărut în nodulii de feromangan din zonele marine adânci (Ehrlich, 1973). Datorită naturii insolubile a Fe în noduli, condițiilor aerobe, și în unele cazuri pH – ului circumneutru la care aceste observații au fost făcute, pare puțin probabil că absența reducerii măsurabile a Fe s-a datorat fenomenului de inhibare a Mn descris de Lovley și Philips (1988). Într-un studiu de reducere aeroba a oxizilor fierului pedogen de către *Clostridium butyricum*, Munch și Ottow (1980) au găsit că oxizii amorfi erau mai ușor atacați decât oxizii de Fe cristalini.

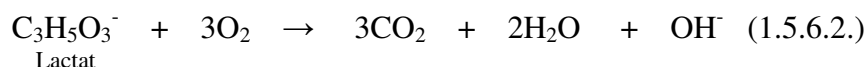
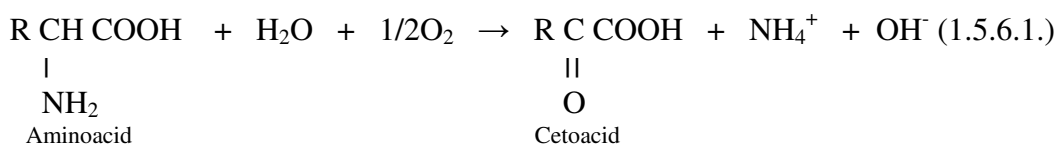
De vreme ce oxizii de Fe^{3+} sunt foarte insolubili la pH aproape neutru, se pune întrebarea cum bacteriile pot ataca acești compuși.

Tendința oxizilor de a disocia în specii solubile la pH aproape neutru este prea mică pentru a explica fenomenul. Contactul fizic dintre celula activă și suprafața particulei de oxid pare esențială. Acest lucru a fost clar demonstrat de Munch și Ottow (1982) în experimente în care au plasat oxidul de Fe înăuntrul unei pungi de dializă ai cărei pori nu au permis trecerea celulelor bacteriene, dar au permis difuzia rapidă a mediului de cultură cu speciile sale chimice dizolvate organice sau anorganice. Nu a apărut reducerea Fe când bacteriile (*Clostridium butyricum* sau *Bacillus polymyxa*) au fost plasate într-un mediu din afara pungii, dar a apărut când bacteriile și oxidul de Fe erau împreună prezente în pungă. Interesant este că metaboliții produși de bacterii, incluzând acizii, au fost capabili să dizolve cantități semnificative de oxid. Mai mult, Eh-ul scăzut (potențialul redox) generat de bacterii, fie în interiorul sau în afara pungii de dializă, a fost de asemenea incapabil să cauzeze reducerea Fe^{3+} în oxizi (Munch și Ottow, 1982).

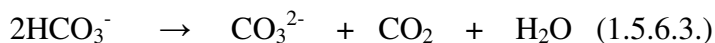
1.5.6. Oxidarea nonenzimatică și reducerea Fe³⁺ de către microorganisme

Oxidarea nonenzimatică

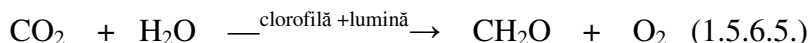
Multe tipuri diferite de microorganisme pot susține indirect (nonenzimatic) oxidarea Fe. Ele pot realiza acest lucru prin influențarea potențialului redox al mediului lor, mai precis, prin generarea de oxidanți care oxidează chimic Fe(II). Ele pot realiza aceasta și prin generarea unui pH>5, la care Fe²⁺ este oxidat de către oxigen în aer (autooxidare). Printre primii care au recunoscut oxidarea indirectă a Fe au fost Harder(1919), Winogradsky(1922) și Cholony(1926). Starky și Halvorson(1927) au demonstrat oxidarea indirectă a Fe în experimentele de laborator cu bacterii și au explicat descoperirile lor în ceea ce privește cinetica reacției implicând oxidarea Fe²⁺ și solubilizarea Fe²⁺ de către acizi. Din rezultatele lor se poate deduce că orice organism care ridică pH-ul unui mediu prin formarea amoniacului din metabolismul proteinelor sau prin consumarea sărurilor din acizii organici poate susține oxidarea Fe²⁺ într-un mediu aerat (Ehrlich, 1995):



Un caz mai specializat de oxidare microbială indirectă a fierului este cel asociat cu fotosinteza algală și cianobacteriană. Procesul fotosintetic poate susține oxidarea Fe²⁺ prin crearea condițiilor care favorizează autooxidarea în doua feluri: (1) prin creșterea pH-ului apelor în care cresc și (2) prin creșterea nivelului de O₂ în apele din jurul lor. Creșterea pH-ului este explicată de ecuațiile:



Prima reacție este susținută de asimilarea CO₂ în fotosinteză, a cărei reacție poate fi rezumată astfel:

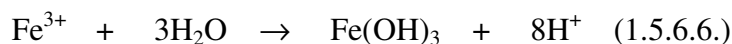


Reacția de asemenea produce mare parte din oxigenul necesar pentru autooxidarea fierului. Geneza sa cauzează o creștere a Eh-ului datorită saturării crescute sau chiar suprasaturării apei.

Fe²⁺ poate fi protejat de oxidarea chimică la pH și Eh ridicat prin chelatarea cu *oxalat*, *citrat*, *acizi humici*. În acest caz, ruptura bacteriană a ligandului va elibera Fe²⁺ care apoi se oxidează la Fe³⁺. Acest lucru a fost demonstrat în laborator cu un tip de *Pseudomonas si Bacillus*. Aceste culturi nu își procură energia din oxidarea Fe, ci mai degrabă din oxidarea ligandului (Ghiorse și Ehrlich,1992).

Producerea de Fe³⁺ din oxidarea Fe²⁺ la valori ale pH-ului peste 5, duce de obicei la precipitarea Fe. Dar prezența agenților de chelație cum sunt substanțele humice și citratul pot împiedica precipitarea. Fe³⁺ nechelatat tinde să hidrolizeze la valori mai mari ale pH-ului și poate forma compuși ca hidroxidul feric:

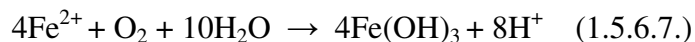
Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfului.



$\text{Fe}(\text{OH})_3$ este relativ insolubil și va ieși din suspensie. Acesta poate cristaliza și deshidrata, formând FeOOH , goetit ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) sau hematit (Fe_2O_3) (Ghiorse și Ehrlich, 1992).

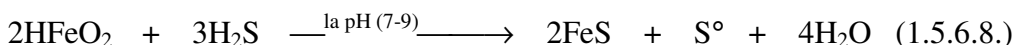
Reducerea nonenzimatică

Starkey și Halvorson (1927) au încercat să explice reducerea Fe^{3+} în natură ca un efect indirect al microorganismelor. Ei au susținut că prin cauzarea unei scăderi a pH-ului și scăderea presiunii de oxigen, Fe^{3+} ar fi schimbat în Fe^{2+} conform relației:



în care Fe^{3+} a fost considerat a fi o fază insolubilă [$\text{Fe}(\text{OH})_3$].

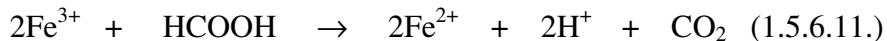
Dar după cum au arătat experimentele lui Munch și Ottow (1982), acest mod de reducere a Fe nu este de obicei semnificativ în natură. Acest fapt a fost de asemenea arătat într-un studiu al lui Lovley *et al.* (1991). Oxidul de fier este relativ stabil în absența oxigenului când este prezent un puternic agent reducător, dar în prezența unor astfel de agenți reducători, reducerea chimică a Fe(III) apare. De exemplu, H_2S produs de bacteriile sulfato-reducătoare poate reduce Fe^{3+} la Fe^{2+} înainte de precipitarea FeS (Berner, 1962)



Bacteriile marine care disproporționează S° în H_2S și sulfat, reduc și ele chimic Fe(III) și Mn(IV) anaerob:



Formiatul produs de un număr de bacterii (ex. *E. coli*) poate reduce Fe(III).



Câțiva alți produși metabolici pot de asemenea acționa ca reducători ai Fe^{3+} . În toate cazurile reducerea este favorizată de pH acid (Lovley, 1991)

1.5.7. Precipitarea microbiană a fierului

Procese enzimatice Cel mai clar exemplu de precipitare enzimatică a Fe(III) este acela de la *Gallionella feruginea*. Fe^{3+} pe care îl produce în oxidarea Fe^{2+} este depozitat în fibriliile filamentelor printr-un mecanism care este complet necunoscut până acum (Ghiorse și Ehrlich, 1992). Reducerea enzimatică a Fe de către alte organisme poate de asemenea rezulta prin precipitarea magnetitului (Fe_2O_3) și în precipitarea Fe(II) ca siderit (FeCO_3) (Lovley *et al.*, 1987).

Procese nonenzimatice. Unele bacterii pot depozita oxizii de Fe pe care i-au format nonenzimatic pe celulele lor. Această oxidare nonenzimatică poate implica distrugerea ligandului chelaților Fe (Aristovskaya și Zavarzin, 1971). Astfel de organisme pot include bacterii încapsulate cum sunt *Leptothrix spp.*, *Siderocapsa*, *Naumanniella*, *Ochrobium*, *Siderococcus*, *Pedomicrobium*, *Seliberia*, *Herpetosiphon*, *Toxothrix* (Krul *et al.*, 1970), *Acinetobacter* și *Archangium*.

Capitolul 1. Fiziologia și activitatea biochimică a ferobacteriilor.

Bioacumularea de Fe. Majoritatea, sau toate bacteriile menționate mai sus, pot de asemenea acumula Fe^{3+} produs de alt organism fie enzimatic sau nonenzimatic. De obicei, fierul este colectat pasiv pe suprafața celulei prin reacția cu un exopolimer acid din glicocalix care expune sarcini negative. Exopolimerul poate fi organizat sub formă de scut, capsulă sau glicocalix (Ghiorse, 1984). De asemenea se știe despre câteva protozoare ca *Anthophysa*, *Euglena* (Mann *et al.*, 1987), *bikosoeca*, și *Siphomona* că depozitează fierul pe celulele lor.

1.6. Conceptul de ferobacterii

O trecere în revistă, din literatură, a bacteriilor care interacționează cu Fe arată că termenul de ferobacterii este definit în mai multe moduri la diferiți autori. Unii au inclus în acest termen orice bacterie care precipită Fe, fie prin oxidarea activă (enzimatică) fie prin acumularea pasivă a oxizilor ferici, indiferent dacă acestea posedă structuri celulare cu afinitate specifică pentru Fe^{3+} sau nu.

După cum a sugerat Starkey (1945) termenul de ferobacterie este rezervat mai ales acelor bacterii care oxidează enzimatic Fe. Bacteriile care acumulează pasiv Fe ar trebui numite acumulatori de Fe, printre care acumulatorii specifici și nespecifici pot fi recunoscuți ca subgrupe.

Bacteriile magnetotactice ocupă o poziție specială printre ferobacterii ele având capacitatea de a lua Fe^{3+} complexat și de a-l transforma în magnetit (Fe_3O_4) printr-un mecanism care poate include reducerea și reoxidarea parțială. Magnetitul este depozitat sub formă de cristale în structuri legate de membrană numite magnetozomi. Cristalele de magnetit sunt magneți cu un singur câmp care ajută bacteriile care l-au format la orientarea acestora în mediu prin alinierea cu câmpul magnetic al Pământului care este înclinat în jos în Emisfera Nordică și în sus în Emisfera Sudică. Acest lucru le ajută în căutarea habitatului preferat, un mediu parțial redus.

După moartea bacteriilor magnetotactice cristalele de magnetit din ele sunt eliberate și în natură pot deveni încorporate în sediment. S-a sugerat că magnetismul detectat în unele roci se poate datora reziduurilor de magnetit din bacteriile magnetotactice, dar magnetitul poate fi format de asemenea de către unele bacterii nemagnetotactice (Ehrlich, 1995).

1.7. Depozite sedimentare de fier de origine biogenă

Depozitele sedimentare de Fe, multe dintre ele reprezentând formațiuni extinse de minereu, pot avea Fe sub formă de oxizi, sulfuri sau carbonați. Multe din aceste tipuri puteau să se fi format ca rezultat al activității microbiene specifice. Participarea microbiană în formarea biogenă a oricărui dintre aceste depozite poate fi dedusă din: prezența microorganismelor fosilizate cu potențial în acumularea sau oxidarea Fe, prezența bacteriilor vii oxidatoare de Fe sau a bacteriilor acumuloare de Fe în depozitele de oxid feric (Fe_2O_3) formate curent; prezența reducătorilor de Fe^{3+} în depozitele de formare curentă a magnetitului (Fe_3O_4); prezența bacteriilor sulfato-reducătoare în cazul depozitelor de formare a sulfurilor sau deducția unor probabile condiții de mediu care au apărut în timpul formării depozitului care ar favoriza depunerea biogenă a fierului. Identificarea microfosilelor într-un depozit de fier poate, de asemenea, să permită deducția unor condiții de mediu din cunoștințele despre necesitățile de mediu ale microorganismelor actuale care seamănă cu microfosilele (K., Konhauser, 2005).

Printre cele mai vechi depozite de Fe, în formarea cărora microorganismele puteau să fi jucat un rol central, sunt formațiunile legate de Fe (BIF) formate mai ales într-o perioadă cuprinsă între 3,3 și 1,8 miliarde ani în urmă. Depozitele majore au fost formate între 2,2 și 1,9 miliarde ani în urmă (Lundgren și Dean, 1979, Neelson și Myers, 1990, Kappler, A., Pasquero, C., K., Konhauser, 2005).

Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfului.

Aceste formațiuni au fost găsite în diferite părți ale lumii și în multe locuri sunt destul de extinse încât să fie exploatare economic ca minereu de Fe. Ele sunt caracterizate prin alternarea straturilor bogate în chert, o formă de silice (SiO_2) și straturilor bogate în minerale de Fe cum sunt hematitul (Fe_2O_3), magnetitul (Fe_3O_4), silicat de Fe chamosit și chiar siderit (FeCO_3). Fe^{3+} predomină față de Fe^{2+} în straturile bogate în Fe. Grosimea medie a straturilor este de 1-2 cm, dar pot fi mai groase sau mai subțiri. Cele mai importante BIF au fost formate în acea perioadă din Precambrian în care atmosfera s-a schimbat de la una reducătoare la una oxidantă datorită apariției fotosintezei oxigenice (Nealson și Myers, 1990).

Cloud (1973) a susținut că straturile alternante reflectă depunerea episodică a oxizilor de Fe, incluzând cicluri sezoniere, anuale și de lungă durată.

În atmosfera reducătoare a Arhaicului, Fe din scoarța Pământului era mai ales în forma feroasă și astfel putea acționa ca un captor de oxigen produs inițial de fotosinteza oxigenică. Reacția de eliminare includea autooxidarea fierului. De vreme ce autooxidarea Fe este o reacție foarte rapidă la pH aproape neutru și mai mare, stocul de Fe^{2+} putea să fi fost periodic terminat și o eliminare ulterioară a oxigenului ar fi trebuit amânată până când s-ar fi refăcut stocul de Fe^{2+} dizolvat prin scurgerea din rocă sau prin emisii hidrotermale (Holm, 1987). Dacă mare parte din Fe^{2+} pentru eliminarea oxigenului a fost format de către bacteriile care respiră Fe^{3+} în timpul consumării carbonului organic produs de către fotosintetizatorii care cresc sezonier, eliminarea periodică a carbonului organic, mai degrabă decât cea a Fe^{2+} , putea să fi fost originea straturilor sărace în Fe. Reducerea bacteriană a Fe oxidat de asemenea putea explica originea magnetitului în straturile bogate în Fe ale BIF de vreme ce Lovley și colaboratorii săi (1987) au observat în experimentele lor de laborator că *Geobacter metallireducens* a precipitat magnetit în reducerea Fe^{3+} .

Anterior s-a presupus că magnetitul din straturile bogate în Fe putea să fi rezultat din reducerea parțială a fierului hematitic de către carbonul organic din activitatea biologică (Perry, 1973).

Dacă Fe a fost într-adevăr cel care primește oxigenul eliminat în cadrul acestei fotosinteze oxigenice timpurii, aceasta ar însemna că sedimentele au devenit tot mai oxidatoare, în comparație cu atmosfera, datorită acumulării de Fe oxidat (Walker, 1987). Doar când oxigenul liber a început să se acumuleze, atmosfera ar fi devenit oxidatoare în comparație cu sedimentele. Chertul a fost depozitat în BIF deoarece nici un microorganism care depozitează silicat (de ex. diatomee, radiolarieni) nu se dezvoltaseră încă. Cu cât fotosintetizatorii generau mai mult oxigen, cu atât au fost mai mult epuizate rezervele de Fe^{2+} , permițând conținutului de oxigen din atmosferă să crească la nivele pe care noi le asociem cu o atmosferă oxidatoare. Aceasta în schimb, ar fi restricționat reducerea Fe(III) în mediile rămase și cu oxigenul epuizat (anaerobe) (Nealson și Myers, 1990).

Deși a fost găsită o gamă largă de microfosile în straturile de chert ale diferitelor BIF, nu toți sedimentologii au considerat că originea BIF a depins de activitatea biologică (Walker *et al.*, 1983).

Descoperirea oxidării Fe(II) de către bacterii fotosintetizatoare anaerobe sugerează că unele BIF puteau să se fi format înainte de apariția fotosintezei oxigenice și/sau fotosintetizatorii anaerobi au inițiat BIF din Fe(II) abundent când atmosfera Pământului era încă reducătoare (Widdel *et al.*, 1993). Anbar și Holland (1992) au sugerat anterior că BIF puteau să fi început să se formeze în oceanele anoxice ale Precambrianului ca rezultat al oxidării fotochimice abiotice a Mn^{2+} la un oxid de Mn(IV) ca *birnesit* care a servit apoi ca oxidant într-o oxidare a complexelor de hidroxid de Fe^{2+} la γ -FeOOH sau hidroxid feric amorf (Kappler *et al.*, 2005).

Printre depozitele moderne de Fe, în a căror formare sunt sau, au fost implicate microorganismele, sunt depozite de ocră, minereuri de Fe din mlaștini, din lacuri și altele.

Formarea depozitelor de ocră constând în oxizi de Fe amorfi (Ivarsov și Sojak, 1978), este observată în mod obișnuit în conducte. *Gallionella*, câteodată în asociere cu *Leptothrix*, este de

Capitolul 1. Fiziologia și activitatea biochimică a ferobacteriilor.

obicei organismul cauzal. Hanert în 1974 a măsurat viteza depunerii ocrului în conducte luând în considerare depunerea Fe^{3+} pe lamele de microscop introduse în pământ. El a găsit 4; 8,8 și 20,2 μg de Fe depozitat per cm^2 în 1,2; respectiv 3 zile. Depozitele biogene de ocru s-au mai format într-un golf (Caldera din Santorini) din insula greacă Palaea Kameni în Marea Egee (Holm, 1987). *Gallionella ferruginea* a fost identificată ca fiind sursa acestui ocru. Sursa de Fe^{2+} care este oxidat de *Gallionella* în acest caz este de origine hidrotermală.

A fost notată de asemenea o depunere de Fe într-o mlaștină în Pine Barrens din New Jersey, U.S.A (Crerar *et al.*, 1979; Madsen *et al.*, 1986). Procesul de depunere pare să depindă de diferite tipuri de bacterii: *A. ferrooxidans*, *Leptothrix ochracea*, *Crenothrix polyspora*, *Siderocapsa geminata* și o *Metallogenium* oxidatoare de Fe. Conform lui Crenar și alții (1979) Fe este oxidat și precipitat de către bacteriile oxidatoare de Fe din apele acide de suprafață care prezintă un pH=4,3-4,5 în timpul verii. Fe se acumulează în nisipuri și mълuri impregnate cu limonit (FeOOH). Sursa de Fe este glauconitul și, într-o măsură mult mai mică, pirita în formațiuni sedimentare de unde este eliberat în apele continentale. Nu se știe încă dacă acest lucru se întâmplă cu ajutor microbial. Fierul este adus la suprafață de apele continentale prin izvoare care aprovizionează pârâurile locale. Biocataliza oxidării fierului pare esențială pentru viteza rapidă de oxidare a fierului în apele acide. *A. ferrooxidans* este probabil cea mai puțin importantă, deoarece nu este întâlnită frecvent, poate pentru că pH-ul mediului este peste optimul său. Fe^{3+} din pârâurile din Pine Barrens poate fi fotoredux (Madsen *et al.*, 1986).

Trafford și alții (1973) au descris un exemplu în care *A. ferrooxidans* pare responsabil de formarea ocrului din conductele de pe câmp din solurile piritice. *Faptul că nu s-a raportat formarea jarositului în aceste condiții nu este surprinzător* (Silver *et al.*, 1986).

1.8. Mobilizarea microbială a fierului din mineralele aflate în minereu, sol și sedimente

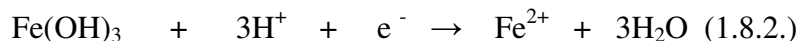
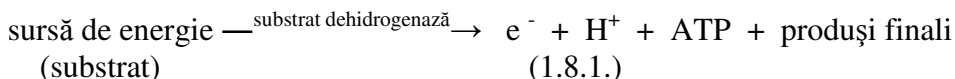
Bacteriile și fungii sunt capabile să mobilizeze cantități majore de fier din mineralele aflate în minereu, sol și sedimente în care Fe este constituentul major. Mineralele includ carbonați, oxizi și sulfuri (Ehrlich, 1994).

După cum am discutat mai sus, reducerea Fe a fost observată cu bacterii din sol și surse acvatice. În ultimii ani a fost realizat un studiu mai sistematic al importanței activității microbiene în sol și sedimente (Burdige, 1993). Reducerea Fe^{3+} poate fi o formă importantă de respirație anaerobă în medii în care nitratul sau sulfatul, sunt prezenți în cantități insuficiente, ca acceptori finali de electroni și în care nu apare metanogeneza (Sorensen și Jorgensen, 1987; Lovley, 1987, 1991). Într-adevăr prezența Fe^{3+} care poate fi bioredux, pare să inhibe reducerea sulfatului și metanogeneza când donorii de electroni, ca acetatul sau hidrogenul, sunt limitați (Lovley și Phillips, 1987). În Great Bay Estuary, New Hampshire, U.S.A a fost găsită o anaerobă facultativă, care a oxidat hidrogenul anaerob, folosind Fe(III) ca acceptor de electroni (Caccavo *et al.*, 1992). Dovezi că unele bacterii oxidatoare de Fe^{3+} pot folosi hidrogenul ca donor de electroni, au fost raportate pentru prima dată de Balashova și Zavazin (1979).

În sol, fenomenul de *gleizare* a devenit asociat cu reducerea bacteriană a oxizilor de fier. Este un proces care apare în condiții anaerobe ca rezultat al inundațiilor. Solul afectat devine lipicios (cleios) și capătă o colorație gri sau verzuie – albastru deschis. Acest proces a fost o dată atribuit reducerii microbiene a sulfatului, dar aceasta nu mai este considerată cauza primară a gleizării. Solul inundat se albește înainte ca reducerea sulfatului să fie detectabilă. Bloomfield (1951) a sugerat că gleizarea era cel puțin în parte datorată produșilor de degradare a plantelor, deși el a demonstrat mai devreme gleizarea în condiții artificiale, într-un mediu ce conține substanțe dulci cărora li s-a permis să fermenteze. O reducere microbială a fierului în care Fe^{3+} este redus

Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfului.

prin respirație bacteriană anaerobă este acum considerată ca o explicație a gleizării (Ehrlich, 1995). Reacția prin care fierul suportă această reducere microbiană poate fi rezumată astfel:



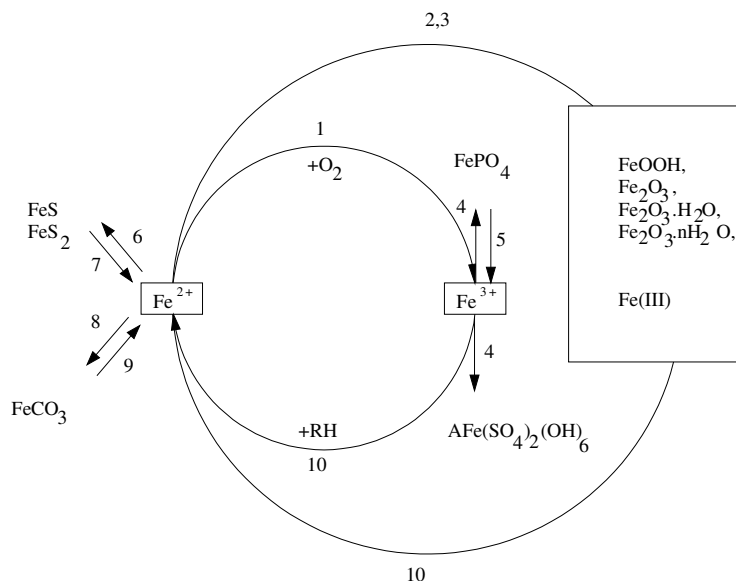
1.9. Microorganismele și ciclul fierul

Transformarea microbiană a fierului joacă un rol important în ciclul fierului în natură (*Fig. 1.9.1.*). Alterarea mineralelor ce conțin fier în roci, soluri, sedimente, introduce fierul în ciclu. Această acțiune de alterare este susținută în parte de activitatea bacteriană și pe de altă parte de procesele chimice (Bloomfield, 1953). Acțiunea bacteriană implică, în multe cazuri, interacțiunea mineralelor cu produșii metabolici finali. Fierul mobilizat, dacă este feros, poate fi oxidat biologic sau nonbiologic la Fe^{3+} la un pH peste 5 în condiții parțial sau total aerobe, independente de lumină, și biologic la lumină în condiții anaerobe. La un pH sub 4 este oxidat mai ales biologic. Oxidarea poate fi urmată de precipitarea imediată a fierului ca un hidroxid, oxid, fosfat sau sulfat (Berthelin *et al.*, 1974).

Dacă agenții de complexare sunt abundenți, cum sunt substanțele humice, Fe^{3+} poate fi convertit la complexe solubile și poate fi dispersat de la locul său de formare. În solurile podzolice (spodosoluri) în climate temperate, de exemplu, acest fier complexat poate fi transportat de la orizonturile superioare A la orizonturile B.

În climatele calde și umede, Fe^{3+} este mai probabil să precipite la locul eliberării lui din mineralele cu conținut de fier din sol, datorită unei acțiuni microbiene intense care mineralizează rapid și aproape complet materia organică disponibilă. Aceste precipitate ale fierului tind să cimenteze particulele de sol între ele printr-un proces numit *laterizare*. Hidroxidul de aluminiu eliberat în procesul de alterare poate fi de asemenea precipitat și contribuie la procesul de laterizare (Merkle, 1955; Brooks și Kaplan, 1972).

Fig. 1.9.1. Ciclul fierului (Ehrlich, 1995).



1. microbial la pH acid;
2. microbial la pH neutru în întuneric când tensiunea O_2 este scăzută sau în lumină când O_2 este absent (în fotosinteza anoxigenică);
3. chimic la pH neutru când tensiunea O_2 este mare;
4. chimic;
5. H^+ , microbial;
6. H_2S , deseori de origine bacteriană;
7. $+O_2$, microbial sau chimic;
8. $+CO_3^{2-}$;
9. H^+ , microbial sau chimic;
10. microbial sau chimic.

În mediile de apă dulce, mobilizarea fierului poate fi accentuată în sedimente, hipolimnionul fiind sărac în oxigen. În sedimentul din Blelhom Tarn în English Lake District, au apărut bacterii care mineralizează materia organică prin respirația fierului (Jones *et al.*, 1984). Hidrogenul putea servi ca reductant (sursă de energie) pentru microorganism. Mineralizarea materiei organice prin respirația fierului poate fi foarte importantă pentru ciclul carbonului în unele medii reducătoare (Lovley și Phillips, 1988). Fe^{2+} mobilizat pare să fie oxidat de *Gallionella* în metalimnionul din Hortlandsstemma, un mic lac eutrof în Norvegia unde concentrația oxigenului dizolvat era doar de $0,005 \text{ mmol l}^{-1}$ la un pH de 6,5 (Heldal și Tumyr, 1983). La concentrații mai mari de oxigen, fierul s-ar fi autooxidat.

Geneza microbială a sulfurilor de fier, incluzând pirita, la un pH aproape neutru și oxidarea biologică a sulfurilor de fier la pH acid aduc contribuții importante la ciclul fierului în medii cum sunt mlaștinile sărate și depozitele de minereu sulfuros (Heldal și Tumyr, 1983).

1.10. Coroziunea bacteriană a metalelor

Coroziunea metalelor este rezultatul unui proces complex, determinat de mecanisme multiple, independente: chimice, mecanice, electrice și biologice. Datorită lor, fierul, oțelul fonta și alte metale menținute într-un mediu umed suferă procese de coroziune, prin care un metal trece de la condiția elementară la o stare de combinație chimică (Iverson, 1968).

Coroziunea bacteriană este frecventă în conductele de apă potabilă și reziduală, de gaze și de petrol, ca și la cele care deservește instalațiile sanitare. Inițial, apar pete de rugină, adânci de 1–6 mm, locuri prin care se produc ulterior pierderi de substanță. În anumite cazuri coroziunea se poate extinde în suprafață și în profunzime mergând până la perforarea conductelor. Conductele de fontă, spre exemplu, suferă un proces de *grafitizare*, în care metalul este corodat cu formare de sulfură feroasă și hidroxid feros. Ele își păstrează aspectul obișnuit, din cauza grafitului prezent în fontă, dar capătă o consistență atât de moale încât pot fi tăiate cu cuțitul (Zarnea, 1994).

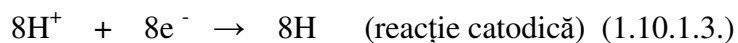
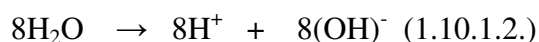
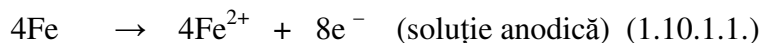
Microorganismele sunt implicate în mai multe tipuri de modificări ale metalelor, incluzând: coroziunea anaerobă, prin depolarizare catodică, producerea de metaboliți corozivi, producerea de fenomene de aerare diferențială și concentrarea de celule pe suprafața acestora, degradarea peliculelor protectoare naturale sau artificiale de pe suprafața acestora etc. (Booth, 1971). Această idee, a participării bacteriilor la coroziune a fost lansată încă din anul 1891 de către Garrett.

1.10.1. Coroziunea bacteriană anaerobă are importanță majoră pentru instalațiile de forare și exploatare a sondelor. Mecanismul coroziunii nu este unanim acceptat, dar a priori s-a acordat atenție deosebită bacteriilor sulfat – reducătoare, izolate frecvent de la adâncimi de peste 1000m, unde se pot dezvolta bine în formațiunile purtătoare de țiței.

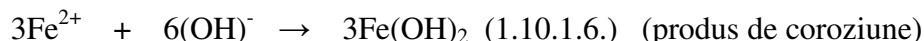
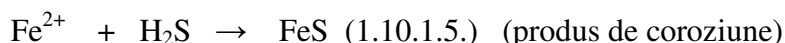
Teoria depolarizării catodice a fost formulată de Kühr și van der Veugt (1934) și explică fenomenele de coroziune a fierului și oțelului menținute în solul umed sau în contact cu ape poluate cu substanțe organice. Coroziunea este asociată cu apariția unui produs de culoare neagră, atașat lax de metal (grafitizare). După îndepărtarea lui, rămâne vizibil metalul lucios.

În mediile umede, suprafața fierului prezintă numeroase sisteme electrochimice, ale căror elemente catodice, în absența oxigenului și în condiții neutre, sunt polarizate de hidrogen. Bacteriile sulfat – reducătoare (*Desulfovibrio vulgaris*, *D. desulfuricans*, *D. aestuarii*, *D. rubentschickii*, *D. salexigenes*, *Desulfatamaculum sp.*), care au în spectrul lor enzimatic hidrogenaze pot folosi hidrogenul molecular catodic. Ele acționează în reacția normală de depolarizare ca un substituent al oxigenului, oxidând hidrogenul catodic și permițând desfășurarea procesului de coroziune (Zarnea, 1994).

Prođuții de coroziune rezultați sunt FeS și Fe(OH)₂, după reacțiile:



$\text{H}_2\text{SO}_4 + 8\text{H} \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 4\text{H}_2\text{O}$ (1.10.1.4.) (depolarizare catodică prin oxidarea H de către bacteriile sulfat – reducătoare).



Capitolul 1. Fiziologia și activitatea biochimică a ferobacteriilor.

Reacția globală:



Etapa critică a teoriei depolarizării catodice este reprezentată de reacția a patra, prin care hidrogenul acumulat pe suprafața metalului este utilizat de bacteriile sulfat reducătoare pentru reducerea sulfatului. Bacteriile sulfat – reducătoare pot produce depolarizare catodică dacă posedă un sistem enzimatic cu activitate hidrogenazică. Reacția cheie a depolarizării catodice este a patra, a reducerii sulfatului cu hidrogenul, reacție de care este capabil *Desulfovibrio vulgaris*, care are hidrogenaze, dar nu și *D. orientis*, care nu posedă acest sistem enzimatic. Prin acest mecanism, bacteriile intră direct într-o serie de reacții la suprafața substratului metalic, fie pentru a iniția, fie pentru a accelera o reacție potențială (Zarnea, 1994).

Pe conductele de apă sau gaze, în canale, modificările apar pe suprafața externă, unde condițiile de dezvoltare a microorganismelor sunt considerate ca optime, iar în bazinele de păstrare a țigeliului corozivitatea este mai amplă pe fața internă și la bază unde se acumulează substanțe organice necesare microorganismelor.

Corozivitatea poate fi produsă și pe alte căi alternative, ca de exemplu: producerea de acizi organici (*Lactobacillus* sp. în fabricile de zahăr); producerea H₂S (foarte coroziv) de către bacteriile care descompun compuși organici ai sulfului; formarea de sulf elementar în sol prin reducerea sulfatului în perioade de anaerobie sau prin oxidarea sulfurilor în cele de aerare intensă; producerea de NH₃ prin degradarea bacteriană a proteinelor (Zarnea, 1994).

1.10.2. Producerea aerării diferențiale sub acțiunea biomasei bacteriene și a precipitatelor de hidroxid feric

Multiplicarea bacteriilor strâns atașate de suprafața metalului are drept consecință distribuția neuniformă a concentrației oxigenului. Aerobe creează anaerobioză, prin consumul de oxigen și apar diferențe de aerare față de zonele în care aprovizionarea cu oxigen rămâne nemodificată. Regiunile anaerobe devin anodice în raport cu cele aerobe și, în consecință, vor deveni centre de pierdere a metalului prin corozivitate (Zarnea, 1994).

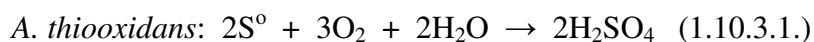
Fenomenul a fost descris ca tipic pentru *Gallionella ferruginea*, care oxidează Fe²⁺ la Fe³⁺, producând precipitarea hidroxizilor ferici. Acțiuni asemănătoare sunt proprii și altor bacterii ca de exemplu *Leptothrix* sp. și *Crenothrix* sp.. Aceștia pot forma pe suprafața internă a conductelor, excrescențe tari numite “tuberculi”, legate ferm de suprafața metalului. Ca urmare, în regiunile situate la marginea depozitului, concentrația oxigenului este mai mare, în timp ce zonele de la bază protejează suprafața conductei de contactul cu oxigenul dizolvat în apă (Booth, 1971).

În consecință, suprafața acoperită de tuberculi devine anodică în raport cu regiunile suprafeței interne a conductei neacoperite de depozitele de bacterii și precipitate de fier, care sunt catodice. Zonele anodice devin sediul unor fenomene de corodare foarte intensă, care perforază conductele. În zona bazală, anaerobă a “tuberculilor”, cresc frecvent bacterii sulfat – reducătoare, care accentuează fenomenul corozivității (Zarnea, 1994).

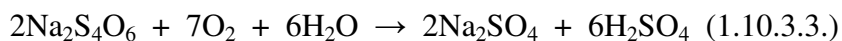
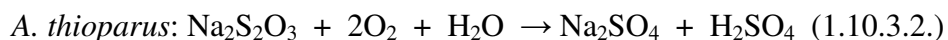
1.10.3. Corozivitatea oxidativă (corozivitatea “acidă”)

Corozivitatea oxidativă are ca substrat producerea de metaboliți corozivi (acizi minerali sau organici), respectiv a unui exces de H⁺ și se realizează în condiții naturale, cel mai adesea prin acțiunea asociată a bacteriilor *Acidithiobacillus* sp. și *Acidithiobacillus (Ferrobacillus) ferrooxidans* (Zarnea, 1994).

Primele obțin energia prin oxidarea S⁰, a tiosulfatilor și a tetracionatului, cu producere de H₂SO₄, după reacțiile:

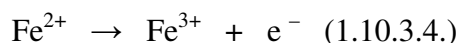


Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfurii.

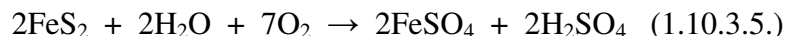


Prin aceste reacții, în culturi pure, in vitro, pH – ul scade la 0,6.

A. ferrooxidans oxidează depozitele de pirită și obține energia din reacția:



Fe^{3+} rezultat oxidează compușii sulfurii la H_2SO_4 după reacția:



Aceste reacții explică acidifierea apelor de drenare din minele de cărbuni și corodarea severă a instalațiilor (Zarnea, 1994).

Unele bacterii filamentoase cum este *Crenothrix polyspora* pot determina blocarea conductelor, blocare produsă atât de biomasa bacteriilor acumulate, cât și de cantitatea mare de hidroxizi de fier ($\text{Fe}_2(\text{OH})_6$) pe care o produc în urma activității lor metabolice. Blocarea este favorizată de prezența unei surse de fier care poate fi din apă, a substanțelor organice și a CO_2 dizolvat. Apa din conducte capătă o turbiditate roșietică și un miros și gust neplăcut (Zarnea, 1994).

Capitolul 2. Bazele teoretice ale acțiunii microorganismelor în circuitul sulfului

2.1. Prezența sulfului în scoarța terestră

Abundența sulfului în scoarța terestră a fost estimată la aproximativ 520 ppm, fiind astfel unul dintre cele mai comune elemente în biosferă (Goldshmidt, 1954).

Concentrația lui în roci, incluzând rocile magmatice și sedimentare, poate varia de la 270 la 2400 ppm (Bowen, 1979). În apele dulci, concentrațiile medii sunt de aproximativ 3,7 ppm, iar în apele sărate 905 ppm (Bowen, 1979). În solurile de câmpie, în regiunile umede, temperate, concentrația totală a sulfului poate varia de la 100 la 1500 ppm, din care 50 – 500 ppm este solubil în acid slab sau apă (Lawton, 1955). Marea parte a sulfului din solurile de pășune din climate umede spre semiaride este organic, în timp ce sulful din solurile mai uscate este conținut în *gips* ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), *epsomit* ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) și în cantități mai mici, în *sfalerit* (ZnS), *calcopirită* (Cu FeS_2) și *pirită sau marcasită* (FeS_2) (Freney, 1977).

2.2. Proprietăți ale sulfului importante geomicrobiologic

Sulful anorganic apare cel mai des în stările de oxidare -2 ; 0 ; $+2$; $+4$ și $+6$ (Roy și Trudinger, 1970). Tabelul 2.2.1. afișează formele importante geomicrobian și stările lor variate de oxidare. În natură, stările de oxidare -2 și $+6$ sunt cele mai întâlnite, reprezentate de sulfură, sulf elementar și respectiv de sulfat. În unele medii (ex. chemoclina în mediile acvatice, în unele soluri și sedimente etc.) pot apărea alte stări de oxidare (ex. tiosulfat, tetrathionat), deși în cantități mai mici (Ehrlich, 1995).

Tab. 2.2.1. Forme ale sulfului importante din punct de vedere geomicrobiologic și stările lor de oxidare (Roy și Trudinger, 1970):

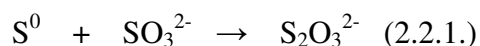
Compus	Formula	Stare de oxidare (pentru S)
Sulfură	S^{2-}	-2
Polisulfură	S_n^{2-}	-2, 0
Sulf ¹	S_8	0
Hiposulfid (ditionit)	$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$	+3
Sulfid	SO_3^{2-}	+4
Thiosulfat ²	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	-1, +5
Dithionat	$\text{S}_2\text{O}_6^{2-}$	+6
Trithionat	$\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$	-2, +6
Tetrathionat	$\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$	-2, +6
Pentathionat	$\text{S}_5\text{O}_6^{2-}$	-2, +6
Sulfat	SO_4^{2-}	+6

¹ apare într-un inel octogonal în formă cristalină.

² sulful din exterior are stare de oxidare -1 și sulful din interior are stare de oxidare $+5$.

Unele reacții chimice care implică sulf elementar pot avea un impact geomicrobiologic. De exemplu, sulful elementar (de obicei scris S^0 dar este de fapt S_8 deoarece constă în 8 atomi de S pe un inel) poate reacționa reversibil cu sulfidul pentru a forma tiosulfatul, care este ușor oxidat sau redus de diferite microorganisme (Roy și Trudinger, 1970).

Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfului.



Reacția care urmează este favorizată de un pH de la neutru la alcalin, în timp ce reacția anterioară este favorizată de pH acid. Tiosulfatul este foarte instabil în soluții apoase sub pH 5.

Sulfurul elementar reacționează de asemenea cu sulfura, formând polisulfuri, o reacție care poate juca un rol important în metabolismul sulfului (Roy și Trudinger, 1970).



Valoarea lui n poate fi 2-3 sau mai mare și este legată de concentrația sulfurii.

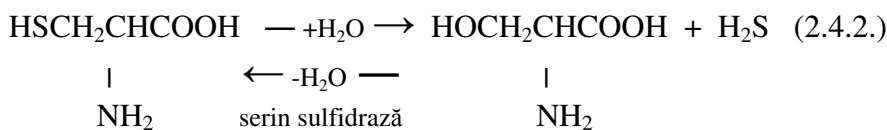
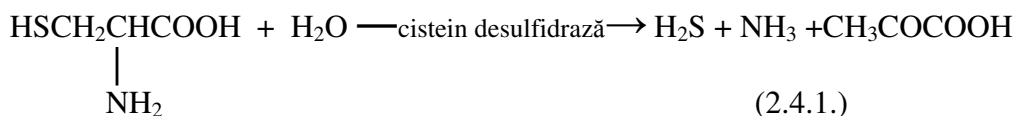
Politionatele, începând cu tritionat ($S_3O_6^{2-}$) pot fi privite ca derivați ai acidului disulfonic. Ei se pot forma ca produși ai oxidării sulfurii și sulfului elementar la sulfat și în reacții de disproporționare. Politionatele pot fi de asemenea metabolizate de unele microorganisme (Roy și Trudinger, 1970).

2.3. Importanța biologică a sulfului

S^0 este un important element din compoziția chimică a materiei vii. În celule, este important mai ales în stabilizarea structurii proteinelor și în transferul protonilor de către enzime în metabolismul redox. Pentru unele procariote, formele reduse ale sulfului pot servi ca surse de energie și / sau surse de putere reducătoare. Formele oxidate, mai ales sulfatul dar și sulfurul elementar, pot servi ca acceptori de electroni ai altor procariote. Reacțiile de oxidare și reducere care implică sulfurul elementar și compușii sulfului sunt deosebit de importante geomicrobiologic (Ehrlich, 1995).

2.4. Mineralizarea compușilor organici ai sulfului

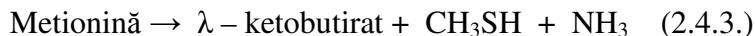
Fiind parte din ciclul carbonului, microorganismele degradează compușii organici ai sulfului cum sunt aminoacizii: cisteină, cistină și metionină și agar-agar (un ester al acidului sulfuric al galactanului liniar) tirozină – *O* – sulfat etc. Desulfizarea este de obicei primul pas în această degradare. Desulfizarea cisteinei de către bacterii poate avea loc anaerob după reacția (Roy și Trudinger, 1970):



Sulfurul din cisteină poate fi eliberat aerob. Reacția din acest caz nu este 100% sigură și poate varia cu diferitele tipuri de microorganisme. Deși alanină –3 acid sulfonic [$\text{HO}_2\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$] a fost presupusă a fi un intermediar cheie de unii cercetători, alții însă s-au îndoit de acest lucru, cel puțin pentru mitocondriile hepatocitelor din ficatul de șobolan (Wainer, 1967).

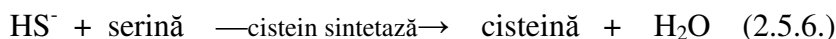
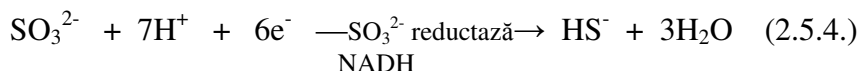
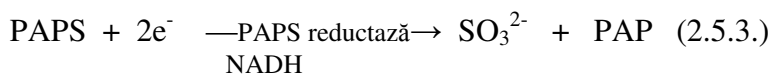
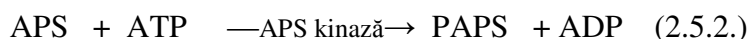
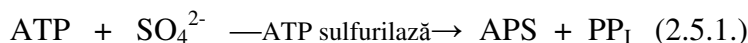
Capitolul 2. Bazele teoretice ale acțiunii microorganismelor în circuitul sulfului.

Metionina este descompusă de extracte de *Clostridium sporogenes* sau *Pseudomonas sp.* după cum urmează (Freney, 1967):



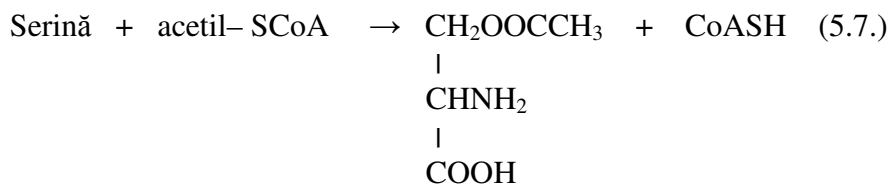
2.5. Asimilarea sulfului

Sulfurul anorganic este de obicei asimilat în compuși organici ca sulfat de către plante și majoritatea microorganismelor. O posibilă cale de asimilare în bacterii poate fi reducerea sulfatului la sulfură și reacția sa ulterioară cu serina pentru a forma cisteina, ca în *Salmonella typhimurium* (Freney, 1967, p.239).



În aceste reacții prescurtările reprezintă: APS – adenzin 5'-sulfatofosfat; PAPS – adenzin 3'-fosfat-5'-sulfatofosfat; PP_i – pirofosfat anorganic; PAP – adenzin 3', 5' difosfat.

Această secvență de reacții a fost găsită și în *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Micrococcus aureus* și *Enterobacter aerogenes*. Ultima reacție poate fi înlocuită de următoarea secvență (Roy și Trudinger, 1970):



Această ultimă parte a fost observată la *Escherichia coli* și *Salmonella typhimurium* (Roy și Trudinger, 1970). Reducerea sulfatului la "tiosulfat activ" și încorporarea sa în serină pentru a forma cisteina este de asemenea posibilă pentru unele microorganisme, cum este *E. coli* (Freney, 1967).

Reducerea sulfatului apare nu numai ca făcând parte dintr-un proces asimilator, ci și dintr-unul dezasimilator sau de respirație (respirator). Acesta din urmă apare în marea majoritate a cazurilor cunoscute doar în anumite bacterii anaerobe în timp ce penultimul apare la bacterii aerobe și anaerobe și la alte organisme. Majoritatea reducătorilor dezasimilatori de sulfat sunt eubacteriile, dar cel puțin două microorganisme din domeniul *Archaea*: *Archaeoglobus fulgidus* (Stetter *et al.*, 1987; Stetter, 1988), și *A. profundus* (Burggraf *et al.*, 1990) sunt cunoscute în acest grup fiziologic.

Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfului.

Aproape fără excepție reducerea asimilatorie de sulfat nu consumă mai mult sulfat decât este necesar pentru asimilare, astfel încât nu se produce sulfură excedentară. Singurele excepții cunoscute sunt un tip de *Bacillus megaterium* (Bromfield, 1953) și *Pseudomonas zelinskii* (Shturm, 1948).

Spre deosebire de reducerea dezasimilatorie a sulfatului, reducerea asimilatorie a sulfatului este astfel o formă de imobilizare scurtă a sulfului, implicând cantități mici de sulf per celulă; sulful fixat este redus în ciclul sulfului după moartea organismului care l-a asimilat (Ehrlich, 1995).

2.6. Tipuri de bacterii importante geomicrobian care reacționează cu sulful și compușii sulfului

Oxidatorii sulfului redus

Majoritatea microorganismelor importante geomicrobian care oxidează forme reduse ale sulfului în cantități relativ mari sunt bacterii. Acestea includ reprezentanți ai eubacteriilor și arheelor. Ele cuprind microorganisme aerobe, facultativ anaerobe și anaerobe și sunt în majoritate autotrofe obligate sau facultative sau mixotrofe (Ehrlich, 1995). Dintre eubacteriile aerobe, unul dintre cele mai importante grupuri este *Acidithiobacillaceae* (Tab.2.6.1.). După cum am văzut și în capitolul 1, în anul 2000 speciile genul *Acidithiobacillus* a fost redenumit *Acidithiobacillus* (Kelly et al., 2000).

Tab. 2.6.1. Câteva bacterii aerobe sulfooxidante (Ehrlich, 1995).

Autotrofe	Mixotrofe	Heterotrofe
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	<i>Acidithiobacillus perometabolis</i>
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	<i>Acidithiobacillus versutus</i> ^d	<i>Beggiatoa sp.</i>
<i>Acidithiobacillus tepidarius</i>	<i>Acidithiobacillus organoparus</i>	
<i>Acidithiobacillus denitrificans</i> ^a	<i>Pseudomonas sp.</i>	
<i>Acidithiobacillus novellus</i> ^b		
<i>Acidithiobacillus thermophilica</i> ^b		
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> ^b		
<i>Acidithiobacillus</i>		
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>		
<i>Acidithiobacillus albertis</i>		
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>		
<i>Beggiatoa alba MS-81-6</i>		
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> ^c		
<i>Acidianus brierlezi</i> ^c		
<i>Thermothrix thiopara</i> ^b		

^a Facultativ anaerobe.

^b Facultativ autotrofe.

^c Archaea.

^d pot de asemenea crește autotrof și heterotrof

Capitolul 2. Bazele teoretice ale acțiunii microorganismelor în circuitul sulfului.

Acest grup include autotrofe obligate și facultative precum și mixotrofe. Printre aerobele arhebacteriene, unul din cele mai studiate grupuri constă din genurile *Sulfolobus* și *Acidianus* (Tab.2.6.1.).

Un alt grup de oxidatori ai hidrogenului sulfurat care are o anumită importanță în mediile de apă dulce și marină este *Beggiatoaceae*. Cei mai cunoscuți membri ai acestui grup folosesc H_2S mixotrof și heterotrof. În acest din urmă caz, ei folosesc oxidarea H_2S ca protecție împotriva H_2O_2 produs metabolic ce apare în absența catalazei (Kuenen și Beudeker, 1982), dar cel puțin un tip marin, *Beggiatoa alba MS-81-6*, poate crește autotrof (Nelson și Jannasch, 1983). Alți oxidatori ai H_2S găsiți în mediile acvatice, includ *Thiovolum* (autotrof) (Wirsen și Jannasch, 1978), *Achromatium*, *Thiothrix*, *Thiobacterium* și *Thiomicrospira*.

Din toate aceste grupuri, doar tiobaciliile produc sulfat direct fără să acumuleze sulf elementar când oxidează H_2S la concentrație normală de oxigen. Celelalte grupuri acumulează sulf elementar pe care îl pot oxida mai departe la sulfat când H_2S disponibil este limitat sau epuizat (Wood și Kelly, 1991).

Dintre eubacterii *Acidithiobacillus thioparus* oxidează S^0 lent la H_2SO_4 . Acest proces este inhibat pe măsură ce pH-ul scade sub 4,5. *Acidithiobacillus halophilus* este o altă neutrofilă, dar halofilă extremă, chemolitotrofă obligată care oxidează S^0 la sulfat (Wood și Kelly, 1991). *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus albertis* și *Acidithiobacillus ferrooxidans* oxidează S^0 la acid sulfuric mai rapid, și fiind acidofile, pot scădea pH-ul sub 1. Toate aceste microorganisme sunt strict autotrofe.

Arheele termofile *Sulfolobus sp.* și *Acidianus sp.* sunt de asemenea capabile să oxideze S^0 la acid sulfuric.

Alte bacterii termofile capabile să oxideze S^0 au fost de asemenea observate, iar multe dintre acestea au fost caracterizate incomplet. Unele au fost izolate din izvoare sulfuroase termale, altele din depozite de minereu. Astfel sunt *Acidithiobacillus thermophilica* (Egorova și Deryugina, 1963) și *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (Ehrlich, 1995).

S-a raportat faptul că un număr de heterotrofe sunt capabile să oxideze S redus în forma S^0 , tiosulfat și tetracionat. Ele includ bacterii și fungi. Multe dintre acestea oxidează S^0 la tiosulfat în timp ce altele oxidează tiosulfatul sau tetracionatul la acid sulfuric (Roy și Trudinger, 1970, p. 248-249). Unele pseudomonade marine și alte organisme pot capta energia folosită din oxidarea tiosulfatului prin folosirea acestuia ca sursă de energie suplimentară (Tuttle și Ehrlich, 1986).

Două exemple de oxidatori de sulf eubacterieni, facultativi anaerobi sunt *Acidithiobacillus denitrificans* și *Thermothrix thiopara*, cea din urmă fiind termofilă, iar prima mezofilă. Ambele organisme folosesc anaerob nitratul ca acceptor final de electroni și îl reduc la oxizi de azot, nitratul fiind un compus intermediar. Ele pot folosi sulful în diferite stări de oxidare ca sursă de energie. *Thermothrix thiopara* este o autotrofă facultativă (Ehrlich, 1995).

Oxidatorii sulfului strict anaerobi sunt reprezentați de bacteriile fotosintetice roșii și verzi și anumite cianobacterii (Pfennig, 1977) (Tab.2.6.2.)

Tab. 2.6.2. Câteva bacterii anaerobe sulf-oxidante (Echrllich, 1995).

Fotolitotrofe	Chemolitotrofe
<i>Chromatium sp.</i>	<i>Thermothrix thiopara</i> ^{a, b}
<i>Chlorobium sp.</i>	<i>Acidithiobacillus denitrificans</i> ^b
<i>Ectothiorhodospira sp.</i>	
<i>Rhodopseudomonas sp.</i> ^a	
<i>Chloroflexus aurantiacus</i> ^a	
<i>Oscillatoria sp.</i> ^b	
<i>Lyngbya sp.</i> ^b	
<i>Aphanothece sp.</i> ^b	
<i>Microcoleus sp.</i> ^b	
<i>Phormidium sp.</i> ^b	

^a Autotrofe facultative.

^b Anaerobe facultative.

Unele dintre aceste bacterii pot crește aerob, dar fără a oxida compușii reduși ai sulfului. Bacteriile sulfuroase roșii (*Chromatiaceae*) sunt anaerobe obligate care oxidează sulful redus, mai ales H₂S prin folosirea acestuia ca sursă de putere reducătoare pentru asimilarea CO₂. În ciuda terminologiei, multe bacterii roșii nesulfuroase (*Rhodospirillaceae*) pot crește și autotrof pe H₂S ca o sursă de putere reducătoare pentru asimilarea CO₂, dar în cea mai mare parte, ele tolerează doar concentrații mici de sulfură în contrast cu bacteriile sulfuroase roșii. În laborator, nesulfuroasele roșii pot de asemenea crește fotoheterotrof, folosind carbonul redus ca sursă majoră de C (Paschinger, 1974).

Majoritatea bacteriilor sulfuroase când cresc pe H₂S îl oxidează la S⁰ pe care îl depozitează intracelular, dar *Ectothiorhodospira sp.* reprezintă o excepție prin depozitarea lui extracelulară. În condiții de limitare a H₂S, aceste tipuri oxidează S⁰ pe care îl acumulează, ca sulfat. Dintre bacteriile roșii nesulfuroase *Rhodopseudomonas palustris* și *R. sulfidophila* nu formează sulf ca un intermediar al H₂S, dar oxidează sulfura direct la sulfat (Hasen și Veldkamp, 1973). În contrast, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas capsulata* și *R. spheroides* formează S⁰ din sulfură, pe care îl depozitează extracelular (Hasen și Gemerden, 1972). *R. sulfidophila* diferă de majoritatea bacteriilor roșii nesulfuroase prin faptul că este mai tolerantă la o concentrație mai mare de sulfură. Bacteriile sulfuroase verzi (*Chlorobiaceae*) sunt fotoautotrofe strict anaerobe care oxidează H₂S prin folosirea acestuia ca sursă de putere reducătoare în fixarea CO₂. Ele depozitează S⁰ pe care îl produc extracelular. În condiții de limitare a H₂S, ele oxidează sulful mai departe la sulfat. Cel puțin câteva tipuri de *Chlorobium limicola* forma *thiosulfatophilum* nu acumulează sulful dar oxidează H₂S direct la sulfat (Paschinger, 1974). Multe bacterii fotosintetizatoare anaerobe pot de asemenea folosi tiosulfatul ca donor de electroni în locul H₂S.

Bacteriile verzi filamentoase (*Chloroflexaceae*) cresc heterotrof în condiții anaerobe, dar cel puțin câteva pot crește fotoautotrof cu H₂S ca donator de electroni în condiții anaerobe (Brock și Madigan, 1988).

Câteva cianobacterii filamentoase, incluzând unii membrii din genurile *Oscillatoria sp.*, *Lyngbya sp.*, *Aphanothece sp.*, *Microcoleus sp.* și *Phormidium sp.*, care sunt în mod obișnuit fotoautotrofe oxigenice, pot realiza fotosinteză în condiții anaerobe cu H₂S ca o sursă de putere reducătoare. Ele oxidează H₂S la S⁰ și îl depozitează extracelular. La întuneric, ele pot reduce sulful pe care îl produc folosind rezervele interne de poliglucoză ca reductant. Până în prezent nu există dovezi care să ateste că aceste microorganisme pot oxida sulful pe care îl produc anaerob, mai departe la sulfat în condiții de limitare a H₂S (Garlick *et al.*, 1977).

Reducători ai sulfului oxidat

Un grup de bacterii foarte important geomicrobian și geochimic sunt bacteriile reducătoare de sulfat. Exemplele cunoscute includ în mare parte eubacteriile, dar au fost descoperite recent două exemple de arhebacterii și anume *Arhaeoglobus fulgidus* (Stetter *et al.*, 1987) și *A. profundus* (Burggraf *et al.*, 1990). În urmă cu câteva decenii, despre reducătorii sulfatului se credea a fi reprezentați de doar trei genuri eubacteriene, *Desulfovibrio*, *Desulfomonas* și *Desulfotomaculum* (clasificat și caracterizat inițial ca și *Clostridium* datorită capacității sale de a forma endospori), care erau foarte specializate nutrițional. Dintre sursele de energie organice, ele puteau folosi doar lactat, piruvat, fumarat, malat și etanol. Mai mult, nici unul dintre micoorganismele cunoscute atunci nu era capabil să degradeze sursele lor de energie organice dincolo de acetat (Postgate, 1984) și astfel că importanța acestui grup în mineralizarea anaerobă în medii bogate în sulfat nu era apreciată.

Punctul de vedere despre reducătorii sulfatului s-a schimbat rapid după 1976 odată cu descoperirea unui reducător de sulfat *Desulfotomaculum acetoxidans* (Widdel și Pfennig, 1981), care este capabil să oxideze acetatul anaerob la CO₂ și H₂O cu sulfat. Ulterior, descoperirea unei largi varietăți de sulfato-reducători a fost raportată. Aceștia sunt diferiți prin natura surselor de energie pe care sunt capabili să le utilizeze. Variați compuși alifatici, aromatici și heterociclici au fost atacați în multe cazuri, complet mineralizați, fiecare de către un grup specific (Tasaki *et al.*, 1991; Kuever *et al.*, 1993, Rueter *et al.*, 1994). Mulți sulfatoreducători sunt de asemenea cunoscuți ca fiind capabili să folosească H₂ ca sursă de energie. Majoritatea necesită o sursă de carbon organic, dar câteva pot crește autotrof pe H₂. În Tab.2.6.3. este prezentată o listă de câteva tipuri de bacterii și intervalele lor nutriționale.

Tab.2.6.3. Câteva bacterii sulfatoreducătoare (eubacterii) (Ehrlich, 1995).

Heterotrofe	Autotrofe ^b
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ^{b,c}	<i>Desulfosarcina variabilis</i>
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	<i>Desulfonema limicola</i>
<i>Desulfovibrio gigas</i>	<i>Desulfovibrio baarsii</i>
<i>Desulfovibrio fructosovorans</i>	<i>Desulfobacter hydrogenophilus</i>
<i>Desulfomonas pigra</i>	
<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	
<i>Desulfotomaculum orientis</i> ^c	
<i>Desulfotomaculum acetoxidans</i>	
<i>Desulfobacter postgatei</i>	
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	
<i>Desulfatobacterium phenolicum</i>	
<i>Desulfatobacterium catecholicum</i>	
<i>Desulfatobacterium indolicum</i>	
<i>Desulfovibrio sulfodismutans</i>	

^a Creștere autotrofă cu H₂ și CO₂

^b Unele tipuri pot crește mixotrof pe H₂ și CO₂ + acetat.

^c Cel puțin un tip poate crește autotrof pe H₂ și CO₂.

În timp ce majoritatea sulfatoreducătorilor descoperiți până acum sunt mezofili, acum sunt cunoscute și tipuri de termofile. Din punct de vedere morfologic, sulfatoreducătorii sunt un grup foarte variat, incluzând coci, sarcine, bacili, vibrioni, spirili și forme filamentoase. Reprezentanții eubacteriilor sunt reprezentați de celule de tip Gram – (Ehrlich, 1995).

Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfului.

Câteva clostridii au fost găsite ca fiind reducători puternici de sulf, ei neputând reduce sulfatul. Un exemplu este *Clostridium pasteurianum*. Semnificația geomicrobiană a acestei trăsături nu este clară deoarece sulfatul nu apare în mod obișnuit liber în mediul înconjurător și în cantități semnificative în absența poluării de către om (Ehrlich, 1995).

O excepție poate apărea în preajma venturilor vulcanice care emit SO₂. Acest gaz, care poate fi de asemenea format când combustibilii fosili conținând sulf sunt arși, formează H₂SO₃ la dizolvarea în apă. *Shewanella putrefaciens* din Marea Neagră este un alt microorganism care nu poate reduce sulfatul, dar poate reduce tiosulfat, sulfat și S⁰ la sulfură (Perry, 1993). Microorganismul formează 20-50% din populația bacteriană în zona anaerobă (azoică) a Mării Negre, unde capacitatea sa de a reduce compușii sulfului parțial oxidați pare să joace un rol important în ciclul sulfului (Perry, 1993).

Un număr de bacterii sunt capabile să folosească S⁰ anaerob ca acceptor final de electroni, reducând S⁰ la H₂S. Unele din aceste bacterii pot crește autotrof pe sulf, folosind hidrogenul sau metanul ca surse de energie. Ele sunt în general arhebacterii termofile. Altele cresc heterotrof pe sulf, folosind ca sursă de carbon substanțe mai complexe ca zaharurile sau mai simple ca acetatul pentru a reduce sulful în procesul lor de generare a energiei. Acest grup include atât eubacterii cât și arhebacterii. Câteva, dar nici într-un caz toate tipurile de bacterii sulfatoreducătoare din genul *Desulfovibrio*, au capacitatea de a folosi sulful în locul sulfatului ca acceptor final de electroni pentru creștere, dar tipuri de *Sulfatamaculum* și *Desulfomonas* sunt incapabile de acest lucru (Biebl și Pfennig, 1977).

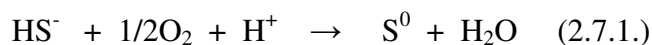
Unii fungi pot de asemenea reduce sulful la sulfură cu un donator de electroni cum este glucoza (Ehrlich și Fox, 1967). După cum era de așteptat, activitatea este mai mult anaerobă decât aerobă.

2.7. Oxidarea microbiană a formelor reduse de sulf. Creșterea autotrofă și mixotrofă pe forme reduse de sulf

A.Sulfurile

Atacul aerob

Multe bacterii aerobe care oxidează sulfura sunt autotrofe chemosintetizante facultative sau chemosintetizant obligate, care cresc într-un mod autotrof, folosind sulfura ca sursă de energie pentru a asimila CO₂. Majoritatea oxidează sulfura la sulfat indiferent de nivelul presiunii oxigenului (de exemplu *Acidithiobacillus thiooxidans*), dar unele ca *Acidithiobacillus thioparus* formează S⁰ dacă pH-ul intern este inițial alcalin și rH₂ este 12, [rH₂ = -ln(H₂) = (Eh/0,029) + 2pH, deoarece Eh = -0,02910g(H₂) + 0,058log(H⁺)], dacă interiorul este parțial redus datorită unei presiuni a oxigenului sub saturație. În cultura de grup în condiții de limitare de oxigen *A. thioparus* a fost observat că produce inițial o ușoară creștere a pH-ului, urmată de o scădere la aproximativ 7,5 în 4 zile și o urcare în rH₂ până la aproximativ 20 (Sokolova și Karavaiko, 1968). Reacția care conduce la formarea S⁰ poate fi rezumată astfel:



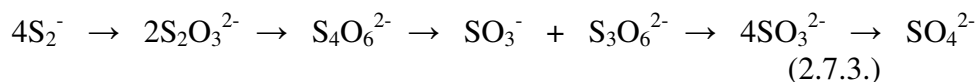
În condiții de presiune mare de oxigen sau aproape de saturație, *A. thioparus* va oxida sulfura solubilă până la sulfat (van den Ende și van Gemerden, 1993):



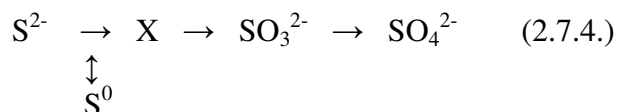
Capitolul 2. Bazele teoretice ale acțiunii microorganismelor în circuitul sulfurii.

Thiovolum sp. este un alt exemplu de bacterie care oxidează sulfura la S^0 la presiune redusă de oxigen.

London și Rittenberg (1964) au sugerat că pașii intermediari în oxidarea sulfurii la sulfat au fost:



Această secvență de reacții, însă, nu explică formarea S^0 la presiune de oxigen redusă. Dacă aceasta nu apare prin intermediul unei căi specializate, ceea ce pare puțin probabil, un model mai alternativ al acestei căi care explică ambele procese, formarea S^0 și a SO_4^{2-} , într-un mod unificat este acela propus de Roy și Trudinger (1970):



În această relație X reprezintă un intermediar obișnuit în oxidarea sulfurii la sulfat și sulf. Roy și Trudinger au vizualizat X ca o derivată a glutatoniului sau un tiol legat de membrană. Poate fi de asemenea reprezentat de un „sulf intermediar” descris de Pronk *et al.* (1990). Schema lui Roy și Trudinger permite integrarea unui mecanism pentru oxidarea S^0 într-o cale unificată pentru formele reduse oxidatoare ale sulfurii.

Sorokin a pus la îndoială capacitatea acidithiobacililor de oxidare a sulfurii convins fiind că ei oxidează doar thiosulfatul rezultat din oxidarea chimică a sulfurii de către O_2 și că orice S^0 format de acidithiobacili din sulfură se datorează interacțiunii chimice a produșilor de oxidare bacteriană cu S^{2-} și $S_2O_3^{2-}$ după cum a propus anterior Nathanson (1902) și Vishniac (1952). Această părere nu este azi acceptată general și întradevăr Vainshtain *et al.* (1977) au prezentat dovezi clare în legătură cu contrariul (Ehrlich, 1995).

Atacul anaerob

Majoritatea bacteriilor care oxidează sulfura anaerob sunt autotrofe fotosintetizante (*Chlorobiaceae*, *Chromatiaceae*, unele *Rhodospirillaceae* și câteva *Cyanobacterii*), dar câteva ca anaerobe facultative *Acidithiobacillus denitrificans* și *Thermatrix thiopara* sunt autotrofe chemosintetizante. În prezența unor cantități nelimitate de sulfură majoritatea autotrofelor fotosintetizante oxidează sulfura la sulf folosind puterea reductoare din această reacție în asimilarea CO_2 . Există și unele excepții și anume cele care nu formează niciodată S^0 , când S^0 este format, el este de obicei acumulat intracelular de către bacteriile sulfuroase roșii și extracelular de *Chlorobium*. Acesta pare să fie ușor accesibil celulelor care l-au format, dar nu și altor indivizi din populația respectivă sau altor bacterii fotosintetizante care aparțin altor specii și care oxidează S^0 . Sulfurii este aparent parțial atașat de suprafața celulei (van Gemerden, 1986). Detaliile biochimiei oxidării sulfurii de către autotrofele fotosintetizante rămân încă de explorat.

Autotrofa chemosintetizantă, *Acidithiobacillus denitrificans*, poate oxida sulfura la sulfat anaerob cu nitratul ca acceptor final de electroni. Pe măsură ce sulfura este oxidată nitratul este redus via nitrit la oxid nitric (NO), oxid nitros (N_2O) și (N_2). S-a observat faptul că acetilena cauzează acumularea sulfurii mai degrabă decât a sulfatului într-un gradient de cultură al unui tip de *A. denitrificans* folosind oxid nitros ca acceptor final de electroni. În absența acetilenei, cultura gradient, spre deosebire de cultura de grup nici măcar nu a acumulat sulf. S-a sugerat faptul că acetilena împiedică transformarea S^0 în SO_3^{2-} în acest sistem de cultură. Polisulfura ($S_{n-1}SH^-$) dar nu sulfurii liber pare să fie un intermediar în oxidarea sulfurii la sulfat de către acest organism.

Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfului.

Polisulfura pare să fie oxidată la sulfit și de aici la sulfat (Nicholas, 1973, 1974). Această secvență de reacții este ca aceea propusă în ecuația (2.7.4.).

Oxidarea sulfurilor de către heterotrofe și mixotrofe

Oxidarea H₂S nu este limitată numai la autotrofe. Majoritatea tipurilor de *Beggiatoa* cresc mixotrof și heterotrof pe sulfură. În primul caz microorganismele obțin energia din oxidarea H₂S. În cel de-al doilea caz ele folosesc aparent oxidarea sulfurii pentru a elimina H₂O₂ ce s-a format metabolic în absența catalazei. Granulele de sulf din depozitele *Beggiatoa* rezultă din oxidare sulfurii în celulele sale, în exteriorul membranei citoplasmice în buzunarele invaginate, dublu stratificate ale membranei (Strohl și Larkin, 1978). Sulful poate fi mai departe oxidat la sulfat în condițiile scăderii cantității de sulfură. Un tip de *Beggiatoa* ce s-a dovedit a fi autotrof și a fost izolat din mediul marin. Heterotrofele *Sphaerotilus natans* (procariotă), *Alternaria* și o serie de drojdii (eucariote, fungi) au fost raportate ca oxidând H₂S la S⁰. Nu s-a stabilit dacă aceste organisme obțin energia din aceste oxidări (Nelson și Jannasch, 1989).

B. Sulful elementar

Atacul aerob

Sulful elementar poate fi oxidat enzimatic la H₂SO₄ de către anumite eubacterii și arhebacterii. Reacția generală poate fi scrisă astfel:



Extractul celular de *Acidithiobacillus thiooxidans* la care au fost adăugate cantități catalitice de glutatation a oxidat sulful la sulfit. În absența formaldehidei ca agent capcană pentru sulfit, tiosulfatul a fost recuperat în amestecul reacției, dar acesta a fost un artefact datorat reacției chimice a sulfitului cu sulful rezidual (ecuația 2.2.1.) (Pronk *et al.*, 1990).

S-a arătat de asemenea că sulfitul se acumulează atunci când sulful a fost oxidat de *Acidithiobacillus thiooxidans* în prezența inhibitorului *N-oxid 2-n-heptil-4-hidroxicinolină* despre care s-a arătat că inhibă oxidarea sulfitului. Stoichiometria, când disponibilitatea de sulf era limitată, a fost 1 mol sulfit acumulat per fiecare mol de sulf și oxigen consumat. O enzimă implicată în oxidarea sulfului în *A. thioparus* a folosit glutatation ca un cofactor la producerea sulfitului. Enzima în ambele organisme a conținut fier non-hem și a fost clasată ca o oxigenază. Mecanismul oxidării sulfului este ca și modelul descris de ecuația (2.7.4.). Glutatationul în acest caz formează o polisulfură (compusul X în ecuația 2.7.4.) cu sulful substratului, care este apoi convertit la sulfit prin introducerea de oxigen molecular. Această reacție pare să nu cedeze energie folositoare celulelor. Oxidarea sulfului la sulfit care nu implică oxigenaza ci o oxidază cu un potențial de conservare a energiei a fost luată de asemenea în considerare. Unele dovezi experimentale susțin un astfel de mecanism (Pronk *et al.*, 1990).

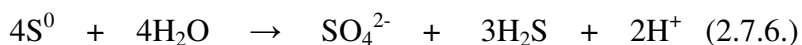
Oxidarea anaerobă a sulfului elementar

Până în prezent sunt cunoscute câteva detalii despre cum S⁰ este oxidat în anaerobe mai ales autotrofe fotosintetizante. *A. denitrificans* pare să urmeze secvența de reacții conform ecuației 2.7.4. cu excepția că formele oxidate ale azotului substituie pentru oxigen ca acceptor final de electroni.

Acidithiobacillus ferrooxidans are capacitatea de a oxida anaerob S⁰ folosind Fe³⁺ ca acceptor final de electroni. Această oxidare anaerobă cedează suficientă energie pentru a susține creșterea la un timp dublat de 24 de ore (Pronk *et al.*, 1991, 1992).

Disproporționarea sulfului

Culturile din probe marine îmbogățite, anaerobe constând predominant din forme bacilare reprezentate de bacili ușor curbați au fost recent descrise ca fiind constituite din bacterii chemolitotrofe care erau capabile să crească pe sulf disproporționându-l în H_2S și SO_4^{2-} , dar numai în prezența compușilor ce preiau sulfurile consumate („gunoierii sulfurilor”) cum sunt: FeOOH , FeCO_3 , MnO_2 (Thamdrup *et al.*, 1993). Reacția de disproporționare poate fi rezumată astfel:

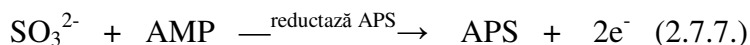


Fe(II) adăugat degradează sulfura prin formarea de FeS , în timp ce MnO_2 degradează sulfura într-o reacție redox în care MnO_2 este redus la Mn^{2+} de către SO_4^{2-} producător de sulfură, având S^0 ca intermediar probabil. Acțiunea de degradare este necesară pentru a împinge reacția în direcția disproporționării S. În această reacție trei perechi de electroni de la un atom de sulf sunt transferați via o cale de transport de electroni, încă nedefinită, la alți trei atomi de sulf generând H_2S în reacția (2.7.6.). Transferul acestor trei perechi de electroni este de asemenea sursa de energie conservată de microorganism pentru creștere și reproducere (Thamdrup *et al.*, 1993).

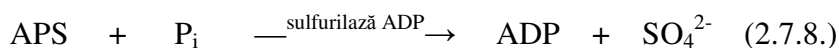
C. Oxidarea sulfitului

Oxidarea de către aerobe

Sulfitul poate fi oxidat de două mecanisme diferite dintre care unul implică fosforilarea la nivelul substratului spre deosebire de celălalt care nu implică acest mecanism deși amândouă pot ceda energie folositoare prin fosforilare oxidativă de către celula intactă (Wood, 1978). În fosforilarea la nivelul substratului sulfitul reacționează oxidativ cu acidul adenilic (AMP) pentru a da adenzin 5-sulfatofosfat (APS).



Sulfatul APS-ului este apoi schimbat pentru fosfat



ADP-ul poate fi apoi convertit la ATP astfel:



Prin urmare oxidarea unui mol de sulfit cedează 0,5 moli de ATP format prin fosforilarea la nivelul substratului. Oricum marea parte a energiei precum ATP-ul este câștigat din transferul electronilor în ecuația (2.7.7.) prin sistemul de transport de electroni legat de membrană la O_2 (Davis și Johnson, 1967).

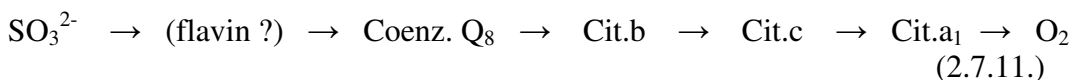
Un număr de tiobacili pot să folosească un sistem AMP independent de sulfit oxidază (Roy și Trudinger, 1970, p. 214). Aceste sisteme nu par să fie toate la fel. AMP-ul independent de sulfit oxidază al lui *A. novelus* crescut autotrof poate folosi următoarea cale de transport de electroni (Charles și Suzuki, 1966):



Sulfit oxidaza lui *A. neapolitanus* poate fi imaginată ca un complex cu o singură enzimă care poate reacționa cu sulfitul, fie cu AMP-ul pentru a da APS urmat de oxidarea la sulfat, fie cu apă urmat de oxidarea la sulfat. Complexul de enzime transferă apoi puterea reducătoare care este

Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfului.

generată la O₂. Enzimele oxidatoare de sulfid care nu necesită prezența de AMP au fost de asemenea detectate în *A.thiooxidans*, *A.denitrificans* și *A.thioparus*, *A.concretivorus* (acum considerat a fi un tip de *A.thiooxidans*) transferă electronii de la oxidarea SO₃²⁻ via următoarea cale la O₂ (Roy și Trudinger, 1970):



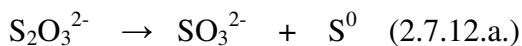
Oxidarea de către anaerobe

A. denitrificans este capabilă să formeze reductază APS nelegată de membrană precum și AMP independent de sulfid oxidază și legat de membrană. Ambele sisteme enzimatică par să fie active în celulele care cresc anaerob. Calea de transport de electroni în condiții de anaerobioză se sfârșește la Cit.d în timp ce în aerobioză se termină în Cit.aa₃ și Cit.d. Nitratul, dar nu nitritul, acționează în anaerobioză ca acceptor final de electroni când sulfidul este donatorul de electroni (Aminuddin și Nicholas, 1974).

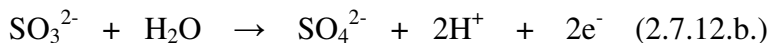
D. Oxidarea tiosulfatului

Majoritatea bacteriilor autotrofe chimiosintetizante care pot oxida sulfurul pot de asemenea oxida tiosulfatul la sulfat. Bacteriile sulfuroase verzi și roșii autotrofe, fotosintetizante și unele bacterii nesulfuroase roșii oxidează tiosulfatul la sulfat ca o sursă de putere reductoare pentru asimilarea CO₂. Mecanismul oxidării tiosulfatului nu este probabil același în toate aceste microorganisme. Autotrofa aerobă chimiosintetică *Acidithiobacillus thioparus* va acumula sulf elementar în afara celulelor sale când crește în exces de tiosulfat în cultură de grup și numai sulfat când crește în cantități limitate de tiosulfat. *A. denitrificans* va face același lucru anaerob cu nitratul ca acceptor final de electroni. Bacteriile roșii fotosintetizante pot acumula trecător sulfurul, dar unele bacterii sulfuroase verzi (*Chlorobiaceae*) nu pot face acest lucru. Multe dintre bacteriile nesulfuroase roșii (*Rhodospirillaceae*) când cresc fotoautotrof cu tiosulfat nu acumulează sulf în celulele lor. Câteva bacterii mixotrofe oxidează tiosulfatul doar la tetratiolat (Schedel și Trueper, 1980).

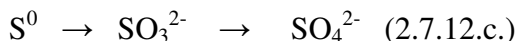
Thiosulfatul este un compus al sulfurului redus cu sulfurul într-o stare de valență mixtă. Dacă sulfurul din exterior sau sulfurul sulfanic din S:SO₃²⁻ are o valență de -2, sulfurul din interior sau sulfurul sulfonic are o valență de +6 (vezi stările de oxidare în Tab. 2.2.1.) și cei doi atomi de sulf sunt legați covalent, oxidarea tiosulfatului poate avea loc după cum au descris Charles și Suzuki (1966), unde tiosulfatul este separat astfel (Ehrlich, 1995):



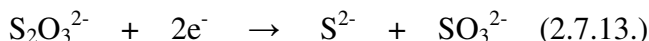
Sulfidul este apoi oxidat la sulfat:



Și sulfurul este oxidat la sulfat via sulfid cum a fost descris anterior:



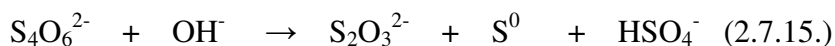
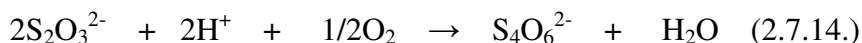
Alternativ, oxidarea tiosulfatului poate fi precedată de o reacție de reducere rezultând în formarea sulfidului din sulfonă și sulfurii din sulfan:



Acești produși sunt apoi oxidați la sulfat (Peck, 1962). În acest din urmă caz, este posibil ca sulfurul să poată fi acumulat trecător prim mecanismul sugerat de ecuația (2.7.4.), dar sulfurul poate de

Capitolul 2. Bazele teoretice ale acțiunii microorganismelor în circuitul sulfului.

asemenea rezulta din hidroliza asimetrică a tetratonatului rezultat din oxidarea directă a tiosulfatului (Roy și Trudinger, 1970):

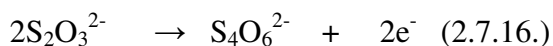


Reacția oxidării directe poate implica enzimele *tiosulfat oxidază* și *tiosulfat-citocrom c reductază*, o enzimă activatoare a tiosulfatului. Tiosulfat oxidaza poate folosi glutationul ca și coenzimă (Roy și Trudinger, 1970, și Wood, 1988).

Tiosulfatul poate fi de asemenea separat de enzima *rodonază* care se găsește în majoritatea bacteriilor oxidatoare de sulf. Poate transfera sulfan sulfură la moleculele acceptoare ca cianura pentru a forma tiocianatul spre exemplu. Enzima poate juca un rol și în oxidarea tiosulfatului (Wood, 1988).

În creșterea anaerobă a lui *A. denitrificans* tipul *RT*, rodonaza inițiază oxidarea tiosulfatului prin cauzarea formării sulfitului din sulfon sulfură care apoi este oxidată la sulfat. Sulfan sulfurile se acumulează trecător ca S^0 în afara celulelor și când sulfon sulfurile sunt epuizate, sulfan sulfurile sunt rapid oxidate la sulfat. La un alt tip de *T. denitrificans*, mai degrabă tiosulfat reductaza decât rodonaza catalizează primul pas al oxidării tiosulfatului, și atât sulfan cât și sulfon sulfurile sunt atacate simultan. *Acidithiobacillus versutus* (fost *Thiobacillus A₂*) pare să oxideze tiosulfatul la sulfat printr-o cale unică care include un sistem multienzimatic oxidator de tiosulfat care are o locație periplasmatică (Lu, 1986). Nu pare să se formeze nici un intermediar liber din sulfan sau din sulfon sulfurile tiosulfatului.

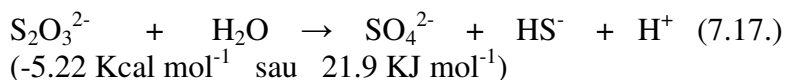
Pronk *et al.* (1990) rezumă dovada care susține un model în care *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* și *A. acidophilus* oxidează tiosulfatul prin formarea tetratonatului într-un pas inițial:



urmat de o serie de pași oxidativi și hidrolitici prin care tetratonatul este transformat în sulfat cu acumulări trecătoare de sulf intermediar din acizii sulfan-monosulfonici (politionați). Tiosulfat dehidrogenaza din *A. acidophilus*, care catalizează oxidarea tiosulfatului la tetratonat a fost purificată și caracterizată parțial (Meulenberg, 1993).

Disproporționarea tiosulfatului

S-a demonstrat experimental că unele bacterii ca *Desulfovibrio sulfodismutans*, pot obține energie anaerob prin disproporționarea tiosulfatului în sulfat și sulfură (Bak și Pfennig, 1987):

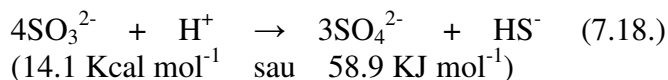


Energia din această reacție le permite să asimileze carbon dintr-o combinație de CO_2 și acetat. Conservarea energiei prin disproporționarea tiosulfatului pare, oricum, paradoxală dacă starea de oxidare a sulfan-sulfurii este -2 și cea a sulfon-sulfurii este +6, deoarece nu ar fi necesară nici o reacție redox pentru a genera un mol de sulfat și sulfură fiecare per mol de tiosulfat. O soluție pentru acest paradox este oferită de raportul lui Vairavamurthy *et al.* (1993) care a demonstrat spectroscopic că densitatea sarcinii sulfan-sulfurii în tiosulfat este de fapt -1 și cea a sulfon-sulfurii este +5. Pe baza acestor descoperiri, formarea sulfurii și sulfatului prin disproporționarea tiosulfatului ar necesita întradevăr o reacție redox (Bak și Pfennig, 1987).

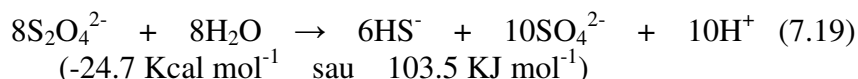
Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfului.

Desulfovibrio sulfodismutans poate de asemenea genera energie folositoare din disproporționarea sulfatului și ditionitului la sulfură și sulfat (Bak și Pfennig, 1987).

-reacția generală pentru disproporționarea sulfatului este:



-reacția pentru disproporționarea ditionatului este:



D. sulfodismutans poate crește și pe lactat, etanol, propanol și butanol ca surse de energie și sulfat ca acceptor final de electroni, ca reducătorii tipici ai sulfatului, dar creșterea este mai lentă decât prin disproporționarea compușilor sulfului parțial reduși. Bak și Pfennig (1987) sugerează că la un anumit punct evoluționar tipurile *D. sulfodismutans* de reducători de sulfat ar putea fi reprezentanți ai progenitorilor reducătorilor de sulfat tipici.

Perry *et al.* (1993) sugerează că *Shewanella putrefaciens* MR-4, pe care ei au izolat-o din Marea Neagră, disproporționează sulfatul la sulfură și sulfat sau S⁰ și sulfat. Ei nu au detectat niciodată vreun sulfat printre produșii acestor reacții. Aceste disproporționări sunt, oricum, endergonice (+7,39 și 3,84 Kcal mol⁻¹ sau +30,98 și 16,10 KJ mol⁻¹ la pH 7,1 și 25°C). Perry și colaboratorii sugerează că la *S. putrefaciens* MR-4, aceste reacții trebuie să fie cuplate cu reacții exergonice cum este oxidarea carbonului.

Disproporționarea tiosulfatului pare să joace un rol semnificativ în ciclul sulfului sedimentelor marine (Jorgensen, 1990). În Kysing Fjord (Danemarca), în sediment, tiosulfatul a fost identificat ca un produs intermediar major al oxidării anaerobe a sulfurii care a fost simultan redus la sulfură, oxidat la sulfat și disproporționat la sulfură și sulfat. Acest lucru s-a întâmplat cu o viteză mare. Soarta metabolică a oxidării tiosulfatului în aceste experimente a fost determinată prin adăugarea de ³⁵S-tiosulfat diferențial etichetat și prin urmărirea consumului de tiosulfat și distribuția izotopilor în sulfat și sulfat format din atomi de S ai sulfan și sulfon-sulfurilor ai tiosulfatului etichetat în timp în experimente separate (Jorgensen, 1990).

Conform lui Jorgensen reacția de disproporționare poate explica marea diferență observată în ³⁴S / ³²S în sediment, în sulfat și sulfură. Aceste descoperiri au fost extinse la transformările sulfului anoxic în experimentele ulterioare cu sedimente din Kysing Fjord și experimente noi cu sedimente din Braband Lake, Arhus Bay, și Aggersund realizate de Elsgard și Jorgensen. Ei au arătat o contribuție semnificativă realizată de către disproporționarea tiosulfatului în producerea anaerobă a sulfatului din sulfură. Adăugarea de nitrat a stimulat oxidarea anoxică a sulfurii la sulfat. Adăugarea de fier ca lepidocrocit (FeOOH) a cauzat oxidarea parțială a sulfurii la pirită și S și precipitarea sulfurilor de fier (Ehrlich, 1995).

E. Oxidarea tetracionatului

Deși oxidarea bacteriană a tetracionatului a fost raportată, mecanismul oxidării este încă neclar (Roy și Trudinger, 1970; Kelly, 1982). El poate include dismutația și reacții de hidroliză. O schemă mai detaliată a fost descrisă de Pronk *et al.* (1990), care au fost menționați mai sus în legătură cu oxidarea tiosulfatului.

2.8. Creșterea autotrofă și mixotrofă pe forme reduse de sulf

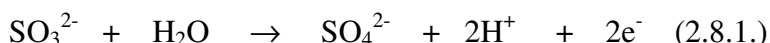
Cuplarea energiei în oxidarea bacteriană a sulfurii

Toate dovezile indică faptul că pentru a conserva biochimic energie folositoare, bacteriile chimiosintetizante autotrofe și mixotrofe care oxidează forme reduse de sulf transferă puterea reductoare (e^-) într-un sistem de transport de electroni legat de membrană, indiferent dacă nitratul sau nitritul sunt acceptorii finali de electroni. Componentii sistemului de transport de electroni, spre exemplu citocromii, chinonele și proteinele cu fier nonheminic, nu sunt identici în toate microorganismele. Indiferent de felul în care se realizează lanțul de transport, starea de oxidare a unui compus anumit cu sulf care este oxidat, sau mai exact potențialul de mijloc al cuplului său redox la pH fiziologic, determină punctul de intrare al electronilor îndepărtați în timpul oxidării în lanțul de transport de electroni (Lu și Kelly, 1983; Kelly, 1993).

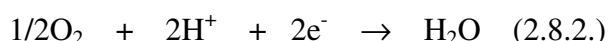
Astfel, despre electronii din S^0 se crede că pătrund în lanțul transportor de electroni la nivelul unui complex de *citocromi bc₁* sau un echivalent. De fapt, primul pas în oxidarea sulfurii la sulfat este formarea sulfitului printr-o oxigenare implicând interacțiunea directă cu oxigenul fără implicarea sistemului de citocromi. Doar în oxidarea ulterioară a sulfitului la sulfat este implicat sistemul de transport de electroni începând de la nivelul unui complex de citocromi *bc₁* sau echivalent cu acesta (Lu și Kelly, 1983; Kelly, 1993).

De asemenea, sulfitul poate fi oxidat printr-o cale independentă sau dependentă de AMP. În oricare dintre cazuri, electronii sunt pasați în sistemul transportor de electroni la nivelul complexului citocromilor *bc₁* sau echivalent. În calea dependentă de AMP, o mare parte din cuplarea energiei poate fi presupusă a fi chimioosmotică; de exemplu în medie unu sau doi moli de ATP pot fi formați per pereche de electroni pasați oxigenului de către sistemul transportor de electroni, dar în plus, alți 0,5 moli de ATP pot fi formați via fosforilării la nivelul substratului (ec.2.7.6-2.7.8). În contrast doar unu sau doi moli de ATP pot fi formați în medie per pereche de electroni pasați la oxigen prin calea independentă de AMP (Kelly, 1993).

Chimioosmoza se explică cel mai bine dacă se presupune că jumătate din reacția oxidării sulfitului apare la exteriorul membranei plasmatică în periplasmă:



Și jumătate de reacție a reducerii oxigenului pe suprafața interioară a membranei – partea citoplasmei:



În *Acidithiobacillus versutus*, un sistem multienzimatic, oxidator de tiosulfat a fost localizat în periplasmă (Lu, 1986).

Gradientul pH rezultat din oxidarea sulfitului și orice pompă de protoni asociată cu transportul de electroni împreună cu orice gradient electrochimic furnizează forța motrice a protonului pentru generarea ATP-ului prin F_0F_1 ATP-ază. Translocarea protonilor în timpul oxidării tiosulfatului a fost observat în *Acidithiobacillus versutus* (Lu și Kelly, 1988). Implicarea cuplării energiei via chimioosmoză este de asemenea indicată pentru *A. neapolitanus* folosind tiosulfatul ca sursă de energie (Holthuijzen *et al.*, 1987)

Forme reduse de sulf ca surse de putere reducătoare pentru fixarea CO₂ de către autotrofe.

Autotrofe chimiosintetizante

Sulful redus nu este doar o sursă de energie, dar și o sursă de putere reducătoare pentru autotrofele chimiosintetizante care îl oxidează. De vreme ce potențialul de mijloc pentru piridin nucleotide este foarte redus în comparație cu potențialul de mijloc pentru cuplurile de sulf redus care ar putea servi ca donori potențiali de electroni, transportul de electroni inversat de la substratul de sulf care donează electroni la piridin nucleotide este necesar. Astfel, electronii călătoresc prin lanțul transportor de electroni, de exemplu împotriva gradientului redox, la NADP cu consumarea ATP-ului, furnizând energia necesară. Acest lucru se aplică atât la aerobe cât și la anaerobe care folosesc nitratul ca acceptor final de electroni (denitrificatori) (Ehrlich, 1995).

Autotrofe fotosintetizante

În bacteriile sulfuroase și nesulfuroase roșii, transportul de electroni inversat, o secvență independentă de lumină, este folosit pentru a genera piridin nucleotide reduse (NADPH) folosind ATP-ul din fosforilare pentru a furniza energia necesară. În bacteriile sulfuroase verzi precum și la cianobacterii, transportul de electroni energizat de lumină este folosit pentru a genera piridin nucleotide reduse (NADPH) (Stanier *et al.*, 1986).

Fixarea CO₂ de către autotrofe

Autotrofele chimiosintetizante

După studiile făcute până acum, tiobacilii (eubacterii) în general fixează CO₂ prin ciclul Calvin-Benson, prin intermediul căii ribuloză 1,5-bifosfat carboxilază. La cel puțin câțiva tiobacili, enzima este detectată în citosol și în corpurile poliedrice citoplasmice numite carboxizomi. Carboxizomii par să nu conțină nici o altă enzimă și pot reprezenta un mijloc de reglare a nivelului de carboxilază în citosol (Holthuijzen *et al.*, 1986). *Sulfolobus* (arhebacterii), asimilează carbonul via un ciclu acid tricarbolic reducător, inversat, ca și bacteriile sulfuroase verzi (Brock și Madigan, 1984).

Autotrofele fotosintetizante

Cianobacteriile și bacteriile sulfuroase roșii care cresc fotoautotrof pe sulf redus fixează CO₂ prin ciclul Calvin-Benson, via calea ribulozo 1,5-bifosfat carboxilază.

Bacteriile sulfuroase verzi, pe de altă parte, folosesc un mecanism al ciclului acizilor tricarbolic, inversat, dar *Chloroflexus aurantiacus* folosește un ciclu 3-hidroxiopropionat (Stanier *et al.*, 1986).

Mixotrofia

Bacteriile care trăiesc liber

Unele bacterii chemosintetizante oxidatoare de sulf pot crește și mixotrof (Smith *et al.*, 1980). Printre oxidatorii sulfului redus, *Acidithiobacillus versutus* este un model bun pentru studiul autotrofiei, mixotrofiei și heterotrofiei. Acesta poate crește chiar și anaerob pe nitrat. Microorganismul poate folosi fiecare din aceste forme de metabolism, depinzând de compoziția mediului. Un alt exemplu studiat mai recent este *A. acidophilus* care crește pe tetrionat (Mason și Kelly, 1988).

Acidithiobacillus intermedius, are o creștere slabă ca autotrof într-un mediu tiosulfat-săruri minerale, crește bine pe acest mediu dacă este suplimentat cu extract de drojdie, glucoză, glutamat sau alți aditivi organici. Materia organică pare să reprime mecanismul de asimilare al CO₂ în acest micoorganism dar nu și cel al generării de energie. *Acidithiobacillus intermedius* crește bine și heterotrof. Are nevoie de tiosulfat sau compuși organici ai sulfului deoarece nu poate asimila sulfat. Un organism asemănător nutrițional este *Acidithiobacillus organoparus*, o bacterie acidofilă,

Capitolul 2. Bazele teoretice ale acțiunii microorganismelor în circuitul sulfului.

facultativ heterotrofă. A fost prima dată izolată din apa acidă de mină în depozitele de cupru în Alaverdi. S-a determinat faptul că ea crește autotrof și mixotrof cu compuși reduși ai sulfului (Markosyan, 1973).

Acidithiobacillus perometabolis nu poate crește deloc autotrof în mediu tiosulfat-săruri minerale, dar necesită adăugare de extract de drojdie, hidrolizat de caseină, sau un singur compus organic potrivit pentru a utiliza tiosulfatul ca sursă de energie (London și Rittenberg, 1977).

Unele *Pseudomonadaceae marine*, care sunt considerate în mod obișnuit că ar crește heterotrof, s-a arătat că ar crește și mixotrof pe compuși reduși ai sulfului (Tuttle *et al.*, 1974).

Un număr de alte bacterii heterotrofe, actinomicete și fungi filamentoși sunt de asemenea capabile să oxideze tiosulfatul la tetracionat, dar nu se cunoaște până acum mecanismul, creșterea oricăreia dintre acestea fiind nuanțată de această oxidare. Aceste microorganisme pot juca un rol important în promovarea ciclului sulfului în sol (Vishniac și Santer, 1957).

Consoțiu neobișnuit

Consoții foarte deosebite sub forma asociațiilor de nevertebrate și bacterii sulfuro-oxidante autotrofe au fost descoperite în comunități submarine hidrotermale din zonele venturilor vulcanice (Jannasch și Taylor, 1984). Viermii vestimentiferi tubulari (*Riftia pachyptila*) care cresc în jurul venturilor submarine, mai ales fumarole, și cărora le lipsește orificiul buco-anal și tubul digestiv, adăpostesc organe speciale în cavitatea corpului numite *trofozomi*. Aceste structuri, văzute în secțiune în microscopie electronică de transmisie, apar ca niște bacterii strâns împachetate (Zarnea, 1994).

Dovada metabolică indică că acestea sunt bacterii chemosintetizante autotrofe. Unele bacterii au fost cultivate din trofozomi, dar rămâne de stabilit dacă vreunele dintre acestea sunt simbioți importanți ai viermilor vestimentiferi. Ele sunt considerate a fi bacterii oxidatoare de sulf, autotrofe, care împart carbonul pe care îl asimilează cu viermii vestimentiferi. Aceștia absorb H_2S și O_2 din apă printr-un organ special și le transmit prin sistemul lor circulator la trofozomi. Sângele lui conține hemoglobină pentru legarea oxigenului și o altă proteină specială care leagă H_2S reversibil pentru a împiedica reacția sulfului cu hemoglobina și în consecință distrugerea acesteia. H_2S și O_2 captați sunt eliberați la nivelul trofozomilor (Zarnea 1994).

Unele consoții mai puțin intime se formează între scoicile uriașe și moluște și bacteriile oxidatoare de sulfură autotrofe din jurul venturilor hidrotermale. În aceste cazuri, bacteriile nu sunt localizate la nivelul organelor interne ale acestor animale, ci în branhiile lor. Aceste consoții mai puțin intime pot apare și în apele de suprafață bogate în H_2S (Ehrlich, 1995).

2.9. Respirația anaerobă folosind forme oxidate ale sulfului ca acceptori finali de electroni

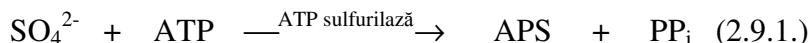
Reducerea sulfatului

Diferite forme de sulf oxidat pot servi ca acceptori finali de electroni în respirația unor bacterii în condiții anaerobe. Acești compuși ai sulfului includ sulfat, tiosulfat și sulf.

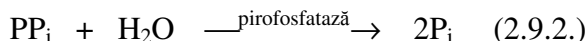
Biochimia reducerii dezsimilatorii a sulfatului

O varietate de bacterii strict anaerobe respiră folosind sulfatul ca acceptor final de electroni. Multe sunt din punct de vedere taxonomic destul de neînrudite și includ atât eubacterii cât și arhebacterii. Până acum, după cum se cunoaște, mecanismul prin care ele reduc sulfatul urmează un model foarte asemănător, dar nu neapărat identic. După cum se înțelege în prezent, reducerea enzimatică a sulfatului necesită o activare inițiată de către ATP pentru a forma adenzin-fosfo-sulfat și pirofosfat (Peck, 1993):

Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfului.

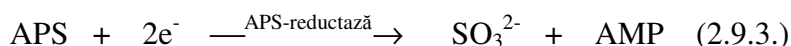


La membrii genului *Desulfovibrio*, pirofosfat este hidrolizat la fosfat anorganic (P_i), care ajută la devierea reacției în direcția APS:



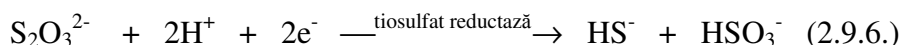
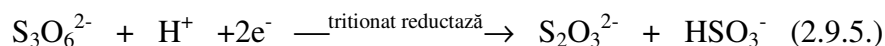
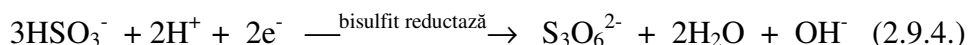
Energia din legătura anhidrid a pirofosfatului este astfel nedisponibilă pentru *Desulfovibrio*. În contrast, această energie este conservată de membrii ai genului *Desulfatomaculum*. Ei nu hidrolizează pirofosfatul, dar îl folosesc ca substituent pentru ATP (Liu *et al.*, 1982). Acest lucru are și el efectul orientării reacției (2.9.1.) în direcția APS.

Spre deosebire de cazul reducerii asimilatorii a sulfatului APS, odată format, este redus direct la sulfit și acid adenilic (AMP):



Reductaza APS, spre deosebire de reductaza PAPS, nu necesită NADP ca și cofactor, dar ca și reductaza PAPS, conține legătura FAD și Fe (Peck, 1993).

Detaliile ulterioare în reducerea sulfitului la sulfură nu sunt acceptate în totalitate. Unele aspecte experimentale sugerează un proces cu mulți pași care implică tritionatul și tiosulfatul ca intermediari (Drake și Akagi, 1978):



LeGall și Fauque au concluzionat în 1988 că o cale directă de la sulfit la sulfat este folosită de *Desulfovibrio* și o cale tritionat de către *Desulfatomaculum*. Detaliile reducerii sulfitului la sulfură de către bacteriile reducătoare de sulfat rămân deocamdată incomplet înțelese (Fauque *et al.*, 1991).

Fracționarea izotopilor sulfului

Bacteriile reducătoare de sulfat pot distinge între izotopii sulfului ^{32}S și ^{34}S ; ele pot realiza fracționarea izotopilor (Jones și Starkey, 1957). Ambii izotopi sunt stabili. Izotopul ^{32}S este cel mai abundent (media 95,1%) iar izotopul ^{34}S în proporție mai mică (4,2%). Raportul $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$ al compușilor naturali ai sulfului se încadrează între 21,3 și 23,2. Sulful meteoritic are un raport $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$ de 22,22. Devreme ce raportul pare să fie relativ constant de la mostră la mostră, el este adesea folosit ca un standard de referință cu care să se compare raporturile izotopilor sulfului din alte materiale, care pot fi ori îmbogățite ori epuizate de ^{34}S . În condiții de creștere lentă, reducătorii sulfatului atacă $^{32}\text{SO}_4^{2-}$ mai rapid decât $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ (Ehrlich, 1995).

Natura donatorului de electroni poate de asemenea afecta gradul de fracționare a izotopilor. Gradul fracționării izotopilor este calculat în valorile $\delta^{34}\text{S}$ ce se exprimă în ‰:

Capitolul 2. Bazele teoretice ale acțiunii microorganismelor în circuitul sulfului.

$$\delta^{34}\text{S} = \frac{{}^{34}\text{S}/{}^{32}\text{S}_{\text{simplu}} - {}^{34}\text{S}/{}^{32}\text{S}_{\text{meteoritic sau standard}}}{{}^{34}\text{S}/{}^{32}\text{S}_{\text{meteoritic sau standard}}} \times 1000 \quad (2.9.7.)$$

Harrison și Thode (1957) au emis părerea că scindarea legăturii S-O care controlează viteza în reducerea bacteriană a sulfatului (reducerea APS la sulfit și AMP) este cea responsabilă pentru fenomenul de fracționare a izotopilor (Ehrlich, 1995).

Reducerea dezasimilatorie a sulfatului nu este singurul proces care poate duce la fracționarea izotopilor sulfului. Reducerea sulfitului de către *Desulfovibrio* și *Saccharomyces cerevisiae* (Kaplan și Rittenberg, 1962, p.81) și de către *Clostridium pasteurianum* (Laishley și Krouse, 1978), eliberarea sulfurii din cisteină de către *Proteus vulgaris*, reducerea asimilatorie a sulfatului de către *Escherichia coli* și *S. cerevisiae* pot conduce la fracționarea izotopilor sulfului (Kaplan și Rittenberg, 1962).

Analiza izotopică pe mineralele sulfului din natură a ajutat la stabilirea faptului că biogeneza este implicată în acumularea lor. Astfel, orice depozit dat trebuie analizat prin luarea de mostre dintr-un număr de locații devreme ce valorile de îmbogățire a izotopilor (δS^{34}) în general se situează într-un interval îngust sau mai extins. Valorile ($\delta^{34}\text{S}$) nonbiogene în general se încadrează într-un interval îngust și au semn pozitiv, în timp ce valorile biogene au semn negativ (Ehrlich, 1995).

Reducerea sulfului elementar

Sulful elementar poate fi folosit ca acceptor final de electroni în condiții anaerobe, în respirația unor bacterii și arhebacterii (Schauder și Kroeger, 1993). Produsul reducerii este sulfura, iar polisulfura poate fi un intermediar în această reducere (Fauque *et al.*, 1991). Eubacteriile includ: *Thermotoga neapolitana* (Jannasch *et al.*, 1988), *Desulfuromonas acetoxidans*, *Desulfovibrio gigas* și alte câteva bacterii sulfatoreducătoare. Arhebacteriile includ: *Desulfurococcus*, *Thermoproteus* și *Thermofilum* (Jannasch *et al.*, 1988).

Deși unele bacterii anaerobe reduc sulful la sulfură ca o parte componentă a metabolismului lor energetic sau pentru a crește optim, reducerea sulfului în aceste cazuri pare a fi un mijloc de a elimina excesul de putere reducătoare care altfel ar deveni un proces de fermentație. Exemple sunt: *Staphylothermus*, *Thermococcus*, și *Pyrococcus* (Schauder și Kroeger, 1993), *Thermotoga sp. FJSS3.B1* (Janssen și Morgan, 1992) și *Thermoproteus uzoniensis* (Bjonch-Osmolovskaya, 1990). Sursa de energie pentru aceste microorganisme este organică precum peptidele mici (cu legături mai scurte), amidon, glucoză etc. Unii fungi ca de exemplu *Rhodotorula* și *Trichosporon*, pot de asemenea reduce sulful la H_2S , cu glucoza ca donator de electroni și aceasta nu este probabil o formă de respirație (Ehrlich și Fox, 1967).

Sursa de energie pentru arhebacteriile care fac respirația sulfului este uneori H_2 și/sau CH_4 , dar mai ales moleculele organice ca și glucoza sau peptidele mici, în timp ce energia pentru eubacterii poate cuprinde compuși organici simpli: etanol, propanol, acetat, sau compuși organici complecși (Ehrlich, 1995).

Reducerea tiosulfatului

Creșterea unor membri ai anaerobelor termofile și ai *Thermotogalelor hipertermofile* s-a arătat a fi stimulată în prezența tiosulfatului (Ravot *et al.*, 1995). Microorganismele testate includ: *Fervidobacterium islandicum*, *Thermosipho africanus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana* și *Thermotoga sp. SEBR 2665*. Ultima menționată a fost izolată dintr-un câmp de petrol. Toate aceste specii au redus tiosulfatul la sulfură. *Thermotogalele*, în acest grup, sunt capabile să fermenteze glucoza printre diferitele substraturi producătoare de energie. Tiosulfatul, ca și sulful, pare să servească drept „chiuvetă” de electroni prin stoparea acumulării de hidrogen în fermentația glucozei. Acumularea de hidrogen are efect inhibitor asupra creșterii acestor

Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfului.

microorganismele. Mecanismul biochimic prin care acestea reduc tiosulfatul rămâne de elucidat (Janssen și Morgan, 1992).

Alți acceptori finali de electroni decât tiosulfat, sulfat, sulfid sau sulf

Puțini reducători de sulfat pot crește cu Fe (III), nitrat, nitrit, fumarat (Lovley *et al.*, 1993), sau în cazul *Desulfomonile tiedjei*, cloroaromați ca acceptori finali de electroni. Câteva tipuri de *Desulfovibrio* pot crește chiar pe piruvat sau fumarat fără un acceptor extern de electroni prin generarea de H₂ ca unul dintre produșii finali metabolici. *Desulfovibrio gigas* și câteva tipuri de *D. desulfuricans* cresc pe fumarat prin disproporționarea acestuia la succinat iar restul este oxidat la malat și succinat (Miller și Wakerley, 1966).

Când Fe(III) servește ca acceptor final de electroni poate fi redus la FeCO₃ (siderit) sau Fe²⁺. Când NO₃⁻ și NO₂⁻ sunt acceptori finali de electroni, ei sunt reduși la amoniac (amonificarea nitrului). Când fumaratul este acceptorul final de electroni el este redus la succinat. Când un cloroaromat ca 3-clorobenzoat este acceptorul final de electroni are loc dehalogenarea reductivă la benzoat și clorură (Ehrlich, 1995).

Rămâne încă de explorat faptul cum multe bacterii sulfatoreducătoare diferite sunt capabile să substituie oricare dintre acești acceptori finali de electroni. Faptul că unii sulfatoreducători se pot folosi, ca acceptori finali de electroni, de substituție poate explica prezența unor astfel de microorganismele în medii ca majoritatea solurilor, în care concentrația de sulfat, sulfid, tiosulfat sau sulf natural este foarte scăzută (Ehrlich, 1995).

Toleranța față de oxigen a sulfatoreducătoarelor

În general, sulfatoreducătoarele sunt anaerobe stricte. Totuși aceste microorganismele au arătat toleranță limitată la oxigen (Marshall *et al.*, 1993). *Desulfovibrio desulfuricans*, *D. vulgaris*, *D. dismutans*, *Desulfobacterium autotrophicum*, *Desulfobulbus propionicus*, și *Desulfococcus multivorans* arată o disponibilitate de a folosi O₂ ca acceptor final de electroni de exemplu pentru a respira microaerofil (sub 10 μM O₂ dizolvat) (Dilling și Cypionka, 1990).

2.10. Autotrofia, mixotrofia, heterotrofia la bacteriile sulfatoreducătoare

Autotrofia

Deși capacitatea lui *Desulfovibrio desulfuricans* de a crește autotrof cu H₂ ca sursă de energie a fost anterior sugerată, experimentele lui Mechals și Rittenberg (1960) au eșuat în demonstrarea acesteia. Seitz și Cypionka (1986) pe de altă parte au obținut creștere autotrofă cu H₂ ca sursă de energie la *Desulfovibrio desulfuricans* tipul *Essex 6*, dar creșterea a fost mică atunci când sulfatul a fost acceptor final de electroni. Creșteri mai bune au fost obținute cu nitrat sau nitrit ca acceptori finali de electroni, probabil deoarece ultimii acceptori nu aveau nevoie să fie activați de ATP care este o necesitate pentru reducerea sulfatului. Nitratul și nitritul sunt reduși la NH₃ de *Desulfovibrio*.

Alți sulfatoreducători care sunt capabili să crească autotrof pe H₂ ca sursă de energie și sulfat ca acceptor final de electroni includ *Desulfonema limicola* și *Desulfosarcina variabilis* (Pfennig *et al.*, 1981) și *Desulfobacterium autotrophicum* (Schauder *et al.*, 1989).

Mixotrofia

Desulfovibrio desulfuricans crește mixotrof cu oricare dintre diferitele substraturi ca unică sursă de energie incluzând H₂, formiat și izobutanol. Carbonul din sursele de energie organice nu a fost asimilat, a fost în schimb derivat din substraturi complexe ca extractul de drojdie, sau simple ca acetatul sau acetat + CO₂. Sulfatul a fost acceptorul final de electroni în toate cazurile (Pfennig *et al.*, 1981).

Capitolul 2. Bazele teoretice ale acțiunii microorganismelor în circuitul sulfului.

Membrii altor genuri de bacterii sulfatoreducătoare pot de asemenea crește mixotrof pe H₂ și pe acetat + CO₂. În toate aceste cazuri ATP-ul este generat chimioosmotic din oxidarea H₂ în periplasmă (Pfennig *et al.*, 1981).

Heterotrofia

Toți sulfatoreducătorii pot crește heterotrof cu sulfat ca acceptor final de electroni. În general sulfatoreducătorii specializați, respectă sursele de carbon energetic pe care le utilizează. Când acetatul servește ca sursă de energie sau este derivat prin degradarea surselor organice complexe de energie prin oxidarea lor completă ca de exemplu cu *Desulfobacter postgatei*, poate fi oxidat anaerob via ciclului acizilor tricarboxilici (Pfennig *et al.*, 1981).

Sinteza ATP-ului în modul heterotrof al reducerii sulfatului este în principal prin fosforilare oxidativă (chimioosmotică) implicând transferul de hidrogen din substraturile organice în periplasmă urmat de oxidarea acesteia. O parte din ATP poate fi format prin fosforilare la nivelul substratului (Ehrlich, 1995).

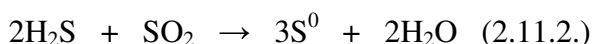
2.11. Biodepozitarea sulfului nativ

Tipuri de depozite

Depozitele de sulf elementar de origine biogenă, și în majoritatea cazurilor de origine abiogenă, au rezultat din oxidarea H₂S:



În unele fumarole sulful se poate de asemenea forma abiogen prin interacțiunea H₂S cu SO₂:



Majoritatea depozitelor de sulf nativ cunoscute nu sunt de origine vulcanică, doar 5% din rezervele cunoscute fiind rezultatul vulcanismului (Ivanov, 1968). Depozitele sedimentare pot avea origine singenetică sau epigenetică. În formarea *singenetică*, depozitarea sulfului se realizează în același timp cu roca gazdă care îl include, sau cu sedimentul în timpul sedimentării sale. În formarea *epigenetică*, sulful este depus în fisurile rocii gazdă preformată. Acest sulf poate avea origine într-un proces diagenetic unde un component sulfat al rocii gazdă este convertit la sulf, sau poate implica o conversie a sulfurii sau a sulfatului dizolvat într-o soluție ce percolează prin fisurile rocii gazdă. Depozitele singenetice de sulf sunt în general formate în mediile limnetice în timp ce depozitele de sulf epigenetic tind să se formeze în medii terestre (Ehrlich, 1995).

Dacă sursa de sulf este SO₄²⁻, transformarea microbiană este un proces în două stadii: - primul stadiu implică reducerea dezasimilatorie a sulfatului la sulfură (S⁰ nu este un intermediar în acest proces), și al - doilea stadiu implică oxidarea sulfurii la S⁰ (Ehrlich, 1995).

Exemple de depunere singenetică a sulfului

Lacul Eyre

Pe lângă alte locații, în acest lac a fost stabilită dovada depunerii de sulf singenetic. În apele de suprafață ale zonei sudice a acestui lac noduli de sulf au fost găsiți de către Bonython. Nodulii au formă ovală sau sferică și sunt acoperiți cu o crustă de gips cristalin în timp ce înăuntru sunt cavernoși. S-au găsit bacterii flagelate, celulozolitice, metanogene etc. Baas Becking și Kaplan (1956) au susținut prima dată că nodulii se formează în prezent cu flagelatele fotosintetizante ce furnizează carbonul organic pe care bacteriile celulozolitice l-au convertit într-o formă utilizabilă de către sulfatoreducători pentru reducerea sulfatului în gips în roca sedimentară înconjurătoare.

Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfului.

S-a crezut atunci că H_2S a fost supus oxidării chimice și biologice (tiobacili) până la sulf nativ. S-a văzut că structura nodulului rezulta din dispersia originală a gipsului în care gipsul este înlocuit cu sulful (Ivanov, 1968).

Radiodatarea unor noduli a arătat că ei sunt vechi de 19 600 ani. Acest fapt sugerează clar că gipsul din crusta nodulului este o formațiune secundară produsă pe cale biogenă dar în Cuaternar, vârsta depozitelor sedimentare înconjurătoare. De aceea este posibil ca sulful din noduli să provină din H_2S generat microbiologic din depozite primare de gips și eliberat în apă și convertit la sulf de către microorganisme cum sunt bacteriile fotosintetizatoare sau *Beggiatoa* ce se găsește pe suprafața unui tip de concrețiuni (Baas Becking și Kaplan, 1956; Ivanov, 1968).

Lacul Solar

Un exemplu de lac în care sulful este produs biogen, dar nu depozitat permanent în sediment este Lacul Solar în Sinai pe țărmul vestic al Golfului Aqaba.

Acesta este un heleșteu hipersalin (7000 m² suprafață, 4-6 m adâncime) în care s-au realizat investigații limnologice foarte extinse. Este un lac tropical și are o chemoclină la interfața O_2 / H_2S și o termoclină, care este inversată iarna (hipolimnionul este mai cald decât epilimnionul). Chemoclina cu o grosime de 0-10 cm și localizată la adâncimi de 2-4 m sub suprafață suferă migrații diurne pe o distanță de 20-30 cm. Cauza principală a acestei migrații este activitatea cianobacteriilor *Oscillatoria limnetica* și *Microcoleus sp.* A căror creștere se extinde din epilimnion la hipolimnion (Ehrlich, 1995).

Bacteriile sulfatoreducătoare incluzând *Desulfatomaaculum acetoxidans* în apropierea fundului în hipolimnionul anoxic generează H_2S din sulfat în apa lacului. O parte din acest H_2S migrează în sus spre chemoclină. În primele ore ale dimineții, H_2S din chemoclină și cel de sub aceasta este oxidat la S^0 prin fotosinteza anaerobă a cianobacteriilor. După ce au epuizat H_2S disponibil lor, cianobacteriile trec la fotosinteza aerobă oxigenică generând oxigen. Astfel în timpul zilei chemoclina scade treptat. După lăsarea întunericului când fotosinteza cianobacteriilor încetează total, H_2S generat de reducătorii de sulfat se formează în chemoclină împreună cu H_2S generat de cianobacterii când acestea reduc S^0 pe care l-au format mai devreme cu poliglucoza pe care au stocat-o din fotosinteza oxigenică. O parte din sulful elementar este de asemenea redus de bacterii ca *Desulfuromonas acetoxidans*. Astfel la întuneric chemoclina crește, iar ciclul este repetat odată cu începutul zilei. O parte din tiosulfat este găsit în chemoclină în timpul zilei în principal ca rezultat al oxidării chimice a sulfurii. Acest tiosulfat este redus noaptea prin mijloace biologice și chimice. Astfel sulful suferă o transformare ciclică în lac astfel încât S^0 nu se acumulează până la o anumită limită. Forța majoră ce conduce acest ciclu al sulfului este lumina solară (Cohen, 1977).

Izvoarele și lacurile termale

Un exemplu de depunere singenetică a sulfului într-un lac termal este **Lacul Ixpaca, Guatemala**. Acest corp de apă este un lac caracteristic care este aprovizionat cu H_2S din *solftoare* (izvoare fierbinți fumarolice care produc ape sulfurate) care descarcă apa la o temperatură de 87-95°C. Apa din lac are o temperatură de 29-32°C. O parte din aceasta este oxidat la sulf nativ provocând apei opalescență. O parte din acest sulf se stabilizează și este acumulat în sediment, iar o altă mică parte din sulf este oxidat la acid sulfuric acidifiind lacul la un pH de 2,27. Acidul sulfuric din apa lacului este foarte coroziv. Acesta atacă și descompune mineralele magmatice ca piroxenii și feldspații în minerale argiloase. Ljunggren (1960) găsit o prezență extensivă a bacteriei *Beggiatoa* în apa asociată cu sedimentul acestui lac. El a implicat acest microorganism în conversia H_2S la sulf nativ, dar nu a determinat dacă acidul sulfuric nu ar putea fi de asemenea format biogen cel puțin în parte așa cum este în unele izvoare fierbinți din Parcul Național Yellowstone din SUA. Studii mai recente ale solfatarelor din alte locuri au condus la descoperirea unui număr de termofile majoritatea arhebacterii cum sunt: *Acidianus*, *Sulfolobus*, *Thermoproteus*, *Thermofilum pendens*,

Capitolul 2. Bazele teoretice ale acțiunii microorganismelor în circuitul sulfului.

Desulfurococcus, dar și ocazional eubacterii cum sunt *Thermothrix thiopara*, care au fie capacitatea de a oxida H_2S , S^0 sau tiosulfat, fie de a reduce S^0 (Mosser *et al.*, 1973).

Un alt exemplu foarte interesant de depozitare singenetică de sulf este cea din **lacul Kara Oban** din Dobrogea (România), care este de asemenea alimentat în zona de fund printr-o serie de izvoare sulfuroase mezotermale, dar metabolismul acestui lac nu este încă bine studiat.

Exemple de depozite epigenetice de sulf

Domuri de sare

Un alt exemplu de sulf nativ biogen de origine epigenetică într-un mediu sedimentar este acela asociat cu domurile de sare după cum s-a găsit în țărmurile de N și V ale Gulf Coast, incluzând cele ale Texasului, Louisiana și Mexico. Astfel de domuri sunt așezate direct peste 90-95% rocă de sare $[NaCl]$, 5-10% anhidride $[CaSO_4]$ și urme de dolomite $[CaMg(CO_3)_2]$, barit $[BaSO_4]$ și celestit $[SrSO_4]$ (Ehrlich, 1995).

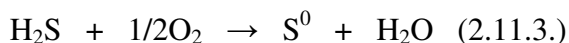
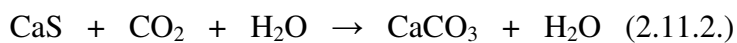
Petrolul poate fi captat în deformații periferice. Domurile constau în principal din anhidridă acoperită de calcit care poate conține petrol exploatabil asociat cu acesta. Între calcit și anhidridă există o zonă ce conține gips $[CaSO_4 \cdot 2H_2O]$ și resturi anhidridice. Sulful este asociat cu calcitul în această zonă intermediară. Domurile de sare își au originea în *evaporite* care s-au format într-o perioadă între Paleozoicul Târziu (acum 230-280 milioane de ani) și Juristic (Mezozoicul Mijlociu, acum 135-181 milioane de ani). O teorie de actualitate (Strahler, 1977) propune că domurile de sare din Gulf Coast au început ca niște evaporite de-a lungul marginilor continentale ale Atlanticului abia apărut, acum 180 milioane de ani.

Evaporitele proveneau din apele hipersaline cu ajutorul căldurii emanate de rezervoarele de magmă aflate sub aceste suprafețe active din punct de vedere tectonic. Pe măsură ce bazinul oceanic se lărgea datorită driftului continental și marginile continentale deveneau mai bine definite, curenții de turbiditate au început să acopere întinderile de sulf tot mai groasele straturi de sediment. În cele din urmă straturile de sediment au devenit atât de grele încât acestea au forțat porțiuni de evaporite care au proprietăți plastice ridicându-se ca niște formațiuni digitiforme de sare prin straturi de sediment din ce în ce mai tinere. Când aceste formațiuni ajung în zona apei subterane, ele își pierd constituenții mai solubili în apă, mai ales roca de sare, lăsând în urmă constituenți relativ insolubili, mai ales anhidrida care a devenit roca principală. În timp, o parte din anhidridă a fost convertită la un gips mai solubil și o parte a fost dizolvată pur și simplu. Se crede, la acel stadiu, că începe sulfatoreducerea bacteriană, având o durată de probabil 1 milion de ani. Bacteriile active au fost cel mai probabil introduse în straturile domului prin microbiota nativă a apelor subterane. Carbonul organic necesar pentru sulfatoreducerea bacteriană se crede a proveni din depozitele adiacente de petrol (Ehrlich, 1995).

Cele mai recente studii au scos la iveală existența sulfatoreducătorilor cu o capacitate de a folosi un lanț scurt, hidrocarburi aromatice, sau saturate alifatică (incluzând lungimi de lanț de C_8 - C_{16}), sau compuși heterociclici, pe care mulți dintre ei îi pot mineraliza (Rueter *et al.*, 1994). Mulți sulfatoreducători au fost capabili să folosească hidrogenul ca sursă de energie. Hidrogenul apare în cantități detectabile în „fântânile” de petrol. Astfel, nu este necesar să presupunem existența trecută a unui ansamblu complex de bacterii fermentative anaerobe care au convertit hidrocarburi de petrol în surse de energie pentru bacteriile sulfatoreducătoare în domurile de sare (Ehrlich, 1995).

Indiferent ce bacterii sulfatoreducătoare erau active în domurile de sare, ele au produs nu doar H_2S ci și CO_2 . CO_2 a apărut din mineralizarea carbonului organic consumat pentru conservarea energiei în sulfatoreducere. Hidrogenul sulfurat a fost ulterior oxidat biologic și / sau chimic la sulf nativ, în timp ce dioxidul de carbon a fost intensiv precipitat ca și carbonat (calcit secundar) calciu provenind din anhidridă sau gips atacat de bacteriile sulfatoreducătoare (Ivanov, 1968).

Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfurului.



2.12. Rolul microorganismelor în ciclul sulfurului

Cercetările realizate pe parcursul timpului au arătat că microorganismele au un rol foarte important în transformările anorganice și organice ale sulfurului. Fig. 2.12.1. arată cum aceste interacțiuni biologice variate se integrează în ciclul sulfurului în sol, sedimente și medii acvatiche. Deși câteva din aceste transformări cum este oxidarea aerobă a H_2S sau S^0 poate acționa parțial pe o cale abiotică deseori semnificativ mai lentă decât calea biotică, cel puțin în cazul altor două transformări, oxidarea anaerobă a H_2S sau S^0 la acid sulfuric și reducerea sulfatului la H_2S nu are loc abiotic ușor la presiunea atmosferică într-un interval de temperatură care predomină la suprafața Pământului.

Sulfatoreducerea este acum recunoscută ca fiind un mecanism important de mineralizare anaerobă a carbonului organic în mediile anoxice estuariene și alte medii de coastă unde sulfatul este disponibil din plin provenind din apele marine. Din punct de vedere geochemic, bacteriile sulfooxidatoare și sulforeducătoare sunt adevărați catalizatori în ciclul sulfurului pe Terra (Ehrlich, 1995).

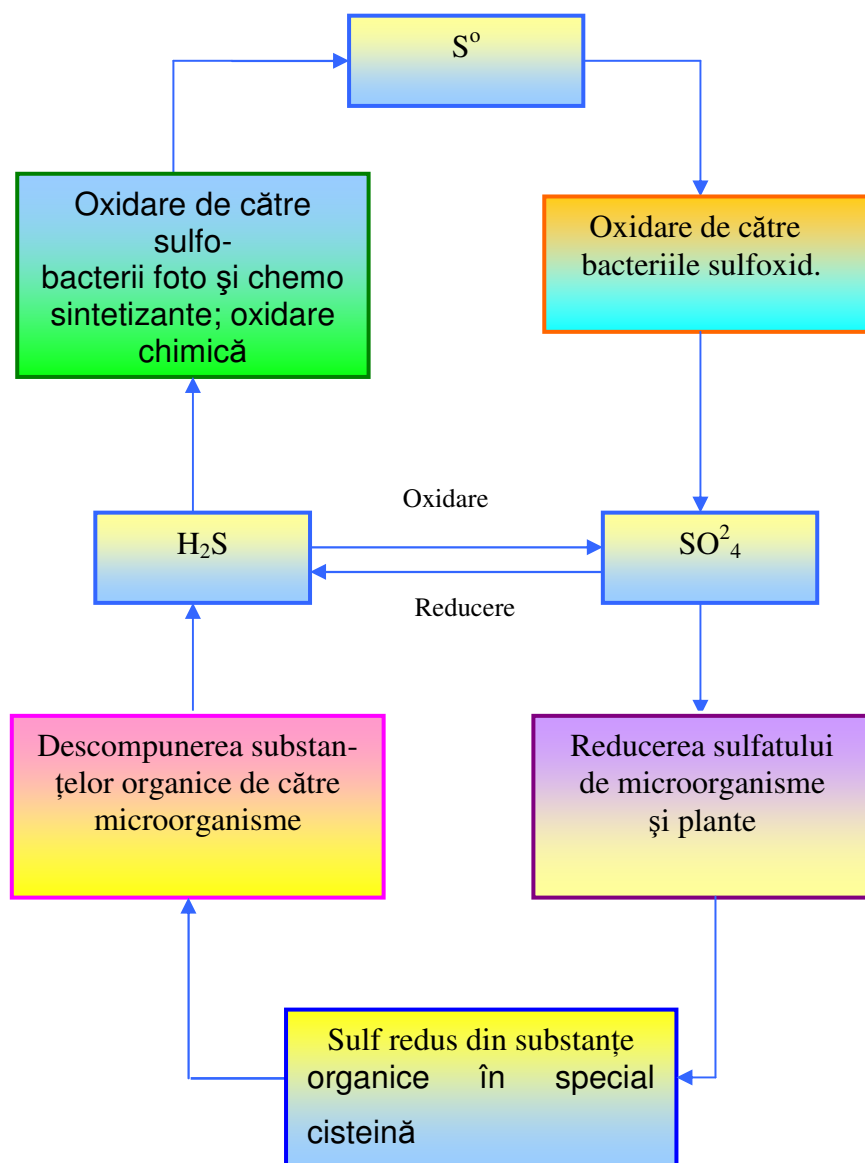


Fig. 2.12.1. Circuitul sulfului în natură (Zarnea 1994).

2.13. Biogeneza și biodegradarea mineralelor sulfuroase de pe suprafața Pământului

O serie de microorganisme au, în natură, un rol important în oxidarea unui număr mare de sulfuri metalice indiferent de originea acestor minerale. Această activitate microbiană oxidativă este exploatată industrial prin extracția de metale din zăcăminte de sulfuri metalice și altele. Există un mare potențial pentru bioextracția unor alte zăcăminte de sulfuri metalice altele decât cele de cupru, metale prețioase, (în special aur) și uraniu. Un termen mai larg și mai des folosit pentru bioextracție este *bioleșierea* (Ehrlich, 1995).

Tab. 2.13.1. Câteva sulfuri minerale importante geomicrobiologic (Ehrlich, 1995).

Compus mineral sau sintetic	Formula
Argentită	Ag ₂ S
Arsenopirită	FeAsS
Bornit	Cu ₅ FeS ₄
Calcocită	Cu ₂ S
Calcopirită	CuFeS ₂
Sulfura de cobalt	CoS
Covelit	CuS
Digenit	Cu ₉ S ₅
Enargit	3Cu ₂ S · As ₂ S ₅
Galenă	PbS
Sulfură de galiu	Ga ₂ S ₃
Marcasită, pirită	FeS ₂
Milerit	NiS
Molibdenit	MoS ₂
Sulfură de nichel	NiS
Pirotit	Fe ₄ S ₅
Sfalerit	ZnS
Tetraedrit	Cu ₈ Sb ₂ S ₇

2.13.1. Originea naturală a sulfurilor metalice

Origine hidrotermală (abiotică). Majoritatea sulfurilor metalice de interes economic sunt de origine magmatică. Teoria actuală care explică formarea lor implică plăcile tectonice care au avut și au în continuare un rol central în formarea acestora. Despre depozitele terestre de *minereuri de cupru porfirice* (cristale mici de sulfuri de cupru dispersate în roca mamă) se crede că au apărut ca rezultat al subducției crustei oceanice care s-a îmbogățit în cupru printr-o activitate hidrotermală în centrele din oceane. Se crede că formarea ulterioară a depozitelor terestre de minereuri de sulfuri porfirice s-a realizat prin intermediul următorilor pași:

- retopirea crustei oceanice subducte;
- ridicarea magmei rezultate;
- eliberarea apei cu fracturarea rocii incipiente și formarea unei soluții hidrotermale conținând H₂S în timpul răcirii progresive a magmei;
- reformarea de cupru și alte sulfuri metalice prin cristalizarea magmei răcite și/sau din reacția H₂S în soluție hidrotermală cu constituenți metalici în magma răcită în roca fracturată (Bonatti, 1978; Tittley, 1981).

Sulfuri metalice sedimentare de origine biogenă Printre sulfurile metalice sedimentare de origine biogenă, sulfurile de fier sunt cele mai comune. Ele sunt de obicei asociate cu zone reducătoare în depozite sedimentare din medii estuariene, care au o rezervă abundentă de sulfat. Prezența sulfatului este importantă deoarece formarea acestor sulfuri metalice este de obicei rezultatul unei interacțiuni a compușilor fierului cu H₂S care a rezultat din reducerea bacteriană a sulfatului în aceste locuri. Interacțiunea H₂S cu compușii fierului duce la formarea piritei (FeS₂) (Marnette *et al.*, 1993).

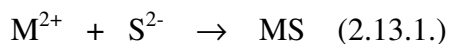
Dacă sulfura amorfă (FeS), pirotină (FeS), și greiggitul (Fe₃S₄) sunt intermediare, în formarea piritei depinde de condițiile de mediu predominante (Luther, 1991). În cel puțin una din

Capitolul 2. Bazele teoretice ale acțiunii microorganismelor în circuitul sulfurii.

mlaștinile sărate unde s-a format pirita apa din pori s-a găsit a fi nesaturată cu acești compuși. Formarea rapidă și extinsă a piritei de origine microbiană a fost observată în mlaștina sărată de la Cape Cod (SUA). Pirita formată din H₂S biogen a fost de asemenea observată în sedimentele bogate în materie organică la Peru Margin din Oceanul Pacific, de-a lungul Coastei Daneze și în două iazuri din Olanda (Marnette *et al.*, 1993).

2.13.2. Principiile formării sulfurilor metalice

Indiferent dacă sunt formate biogen sau abiogen, sulfurile metalice rezultă dintr-o interacțiune între un ion de metal potrivit și un ion de sulfură (Marnette *et al.*, 1993).



Sursa sulfurii în această reacție este cea care determină dacă sulfura metalică este considerată a fi de origine biogenă indiferent dacă sulfura a rezultat din mineralizarea microbiană a compușilor organici sau din reducerea microbiană a sulfatului. Datorită solubilității relative a acestora, sulfurile metalice se formează ușor la temperaturi și presiuni obișnuite (Dévigne, 1968, 1973).

Următoarele calcule vor arăta că relativ scăzutele concentrații ale ionilor metalici sunt necesare pentru a forma sulfurile metalice prin reacția cu H₂S la concentrații specifice în unele lacuri. Să examinăm spre exemplu cazul fierului la formarea sulfurii de fier (Ehrlich, 1995). Constanta de disociere pentru FeS este:

$$[Fe^{2+}][S^{2-}] = 1 \times 10^{-19} \quad (2.13.2.)$$

Constanta de disociere pentru H₂S este:

$$[S^{2-}] = 1,1 \times 10^{-22} \frac{[H_2S]}{[H^+]^2} \quad (2.13.3)$$

de vreme ce

$$\frac{[HS^-][H^+]}{[H_2S]} = 1,1 \times 10^{-7} \quad (2.13.4.)$$

și

$$\frac{[S^{2-}][H^+]}{[HS^-]} = 1 \times 10^{-15} \quad (2.13.5.)$$

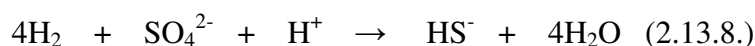
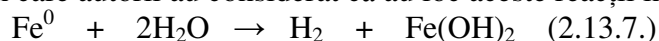
Prin urmare înlocuind Ec. 2.13.3. în Ec. 2.13.2. obținem:

$$[Fe^{2+}] = \frac{[H^+]^2}{[H_2S]} \frac{1 \times 10^{-19}}{1,1 \times 10^{-22}} = \frac{[H^+]^2}{[H_2S]} (9,1 \times 10^2) \quad (2.13.6.)$$

2.13.3. Probe de laborator pentru susținerea biogenezei sulfurilor metalice

Culturile de grup Sulfurile metalice au fost generate în experimentele de laborator utilizând H₂S din reducerea bacteriană a sulfatului. Miller (1950) a afirmat că sulfurile de Sb, Bi, Co, Cd, Fe, Pb, Ni și Zn au fost formate într-o cultură de *Desulfovibrio desulfuricans* în prezență de lactat la care au fost adăugate sărurile insolubile ale metalelor selectate. De exemplu el a găsit că sulfura de bismut este formată ca adiție la (BiO₂)₂CO₃ · H₂O, sulfura de cobalt ca adiție la 2CoCO₃ · 3Co(OH)₂, sulfura lider ca adiție la 2PbCO₃ · Pb(OH)₂ sau PbSO₄, sulfura de nichel ca adiție la NiCO₃ sau Ni(OH)₂ și sulfura de zinc ca adiție la 2ZnCO₃ · 3Zn(OH)₂ ca și componenții de bază.

Baas și Moore (1961) au realizat un studiu de biogeneză pe mineralele sulfuroase. Ca și Miller ei au lucrat cu culturi de grup de bacterii sulfatoreducătoare, folosind *Desulfovibrio desulfuricans* și *Desulfatamaculum*. Mediile erau saline pentru a simula condițiile marine (litorale și estuariene) în care autorii au considerat că au loc aceste reacții în natură.



Cei doi autori au găsit că formarea de covelit și argintit, cupru nativ și argint erau intermediari care au dispărut odată cu producerea bacteriană continuă de H₂S.

Experimentul de coloană un model pentru biogeneza sulfurilor metalice sedimentare

Toxicitatea relativ mare a multor metale grele pentru bacteriile sulfatoreducătoare a fost folosită ca un argument pentru faptul că aceste organisme nu ar putea fi responsabile pentru precipitarea sulfurilor metalice în natură. Într-un mediu sedimentar ionii metalici vor fi în marea majoritate adsorbiți pe particulele de sediment cum ar fi argila sau complexați de materia organică, care le diminuează toxicitatea. Temple și LeRoux (1964) au construit o coloană în care argila sau hidroxidul feric conțineau ioni adsorbiți de Cu²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺. A fost separat de un strat de agar dintr-o cultură lichidă de reducători de sulfat generând activ H₂S în mediul salin. De asemenea ei au testat argila care conținea Fe³⁺. Ei au găsit că în timp s-au format benzi de precipitare în stratul de agar separând stratul purtător de metale de cultura de bacterii sulfatoreducătoare.

Benzile formate ca specii de ioni sulfură care difuzează în sus și speciile de ioni metalici desorbiți care difuzează în jos s-au întâlnit în agar. Desorbția diferențială a ionilor metalici din adsorbant și difuzia lor diferențială în agar au contribuit la formarea benzii discrete de diferite sulfuri. Aceste rezultate demonstrează că biogeneza unor cantități relativ mari de sulfuri într-un mediu sedimentar este posibilă, chiar și în prezența unor cantități relativ mari de ioni metalici, considerând faptul că ionii metalici sunt într-o formă netoxică, adică adsorbiți, complexați, sau sub formă de oxid, carbonat sau sulfat mineral insolubil (Temple și LeRoux, 1964).

2.13.4. Biooxidarea sulfurilor metalice

Indiferent dacă sunt de origine biogenă sau abiogenă, în natură sulfurile metalice pot fi supuse oxidării microbiene. Acest lucru se poate manifesta sub forma unei interacțiuni directe sau indirecte (Zarnea, 1994).

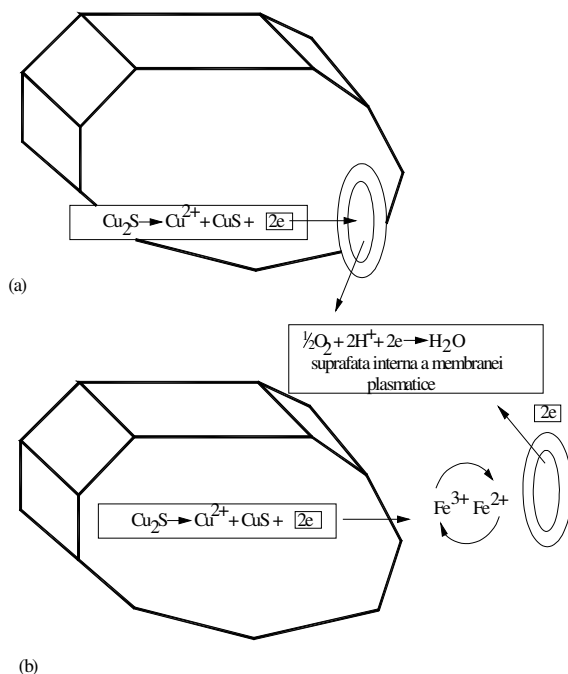
Oxidarea directă În cadrul acțiunii microbiene directe asupra sulfurilor, matricea de cristal a sulfurilor metalice susceptibile este atacată prin oxidare enzimatică. Pentru realizarea acestui lucru microorganismele trebuie să fie într-un contact strâns cu mineralele pe care le atacă.

Atașamentul bacterian pare să nu fie întâmplător ci să apară în anumite locuri și chiar fețe ale cristalelor. Unele probe sugerează că atacul microbial direct este inițiat în locuri cu imperfecțiuni ale cristalului. Atașamentul selectiv al lui *Acidithiobacillus ferrooxidans* sau *Sulfolobus acidocaldarius* la cristale de pirită dispersate în cărbune este foarte activă. Deși detaliile atacului microorganismelor asupra matricelor cristalelor sulfurilor metalice nu sunt încă cunoscute a fost propus un model în care celulele bacteriene acționează ca și conductori catalitici în transferul

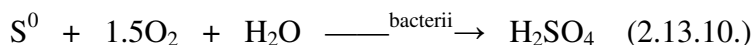
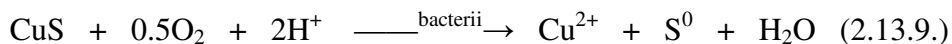
Capitolul 2. Bazele teoretice ale acțiunii microorganismelor în circuitul sulfurii.

electronilor din zonele catodice pe suprafețele de cristal ale sulfurilor metalice la oxigen (Fig 2.13.4.1.) (Ehrlich, 1995).

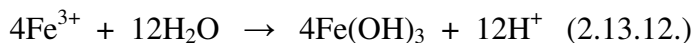
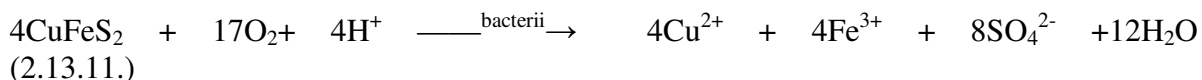
Fig 2.13.4.1. Reprezentarea schematică a oxidării directe și indirecte a unei particule de Cu_2S de către *Acidithiobacillus ferrooxidans*; (a) oxidarea directă: în acest model celula bacteriană acționează ca un conductor de electroni din matricea de cristal a Cu_2S la oxigen în timp ce este atașată de suprafața particulei; (b) oxidarea indirectă: în acest model celulele bacteriene generează și regenerează oxidantul (Fe^{3+}) care acționează ca un mijloc de transport pentru electroni de la matricea cristalului de Cu_2S la bacteria care transferă electronii la oxigen. (Ehrlich, 1995).



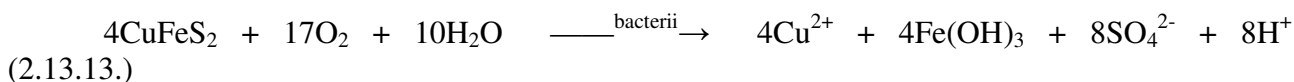
În cazul covelitului (CuS) doar jumătate din sulful mineralului este atacată deoarece jumătate din metal este deja cât se poate de oxidat. Oxidarea mineralului, se realizează probabil în doi pași (Ehrlich, 1995):



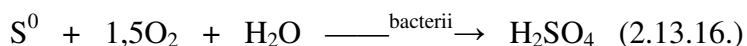
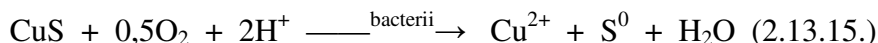
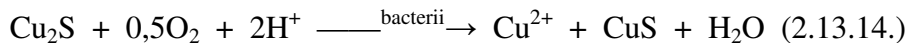
În unele cazuri atât metalul oxidabil cât și jumătatea sulfurii pot fi atacate de către enzime separate cum se întâmplă în cazul calcopiritei (CuFeS_2). Unii cercetători au afirmat că *A. ferrooxidans* a oxidat sulful din calcopirită prin atac direct înainte de a oxida Fe^{2+} în soluție la Fe^{3+} . Odată dizolvat fierul feric a atins o concentrație semnificativă și a promovat oxidarea chimică a calcopiritei reziduale. Reacția generală poate fi scrisă astfel (Ehrlich, 1995):



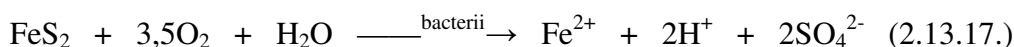
Partea I. Chestiuni generale legate de microbiologia fierului și sulfurului.



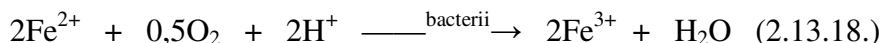
În alte cazuri mijlocul oxidabil al metalului poate fi atacat înaintea sulfurului ca în cazul oxidării calcocitului (Cu_2S) (Nielsen și Beack, 1972).



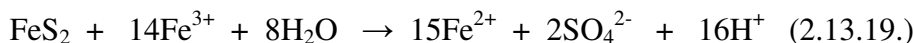
Oxidarea microbiană a piritei este cel mai bine rezumată de reacția:



Fe^{2+} generat în această reacție este mai departe oxidat de către bacterii neatașate la pirită



Fe^{3+} rezultat cauzează apoi oxidarea chimică a piritei reziduale conform reacției:



Un număr de acidofile de alt tip, bacterii oxidatoare de fier, au fost asociate cu oxidarea sulfurii metalice. Cele mai intens studiate sunt clasificate ca fiind *A. ferrooxidans*, *Sulfolobus sp.*, *Acidianus brierleyi*. Toate trei sunt aerobe și puternic acidofile, crescând cel mai bine într-un interval de pH de 1,5-2,5. *A. ferrooxidans* este eubacterie mezofilă, în timp ce *Sulfolobus* și *Acidianus brierleyi* sunt arhebacterii termofile. *A. ferrooxidans* poate folosi NH_4^+ și unii aminoacizi ca surse de azot și este foarte versatil în atacul sulfurilor metalice. S-a constatat că oxidează arsenopirita ($\text{FeS}_2\text{FeAs}_2$), bornit (Cu_5FeS_4), calcocit (Cu_2S), calcopirita (CuFeS_2), covelit (CuS), enargit ($3\text{Cu}_2\text{S} \cdot \text{As}_2\text{S}_5$), galenă (PbS), milerit (NiS), pirită (FeS_2), marcasit (FeS_2), sfalerit (ZnS) și tetraedrit ($\text{Cu}_8\text{Sb}_2\text{S}_7$) (Silverman și Ehrlich, 1964).

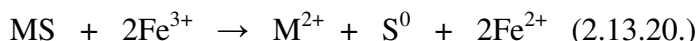
Acidianus brierleyi este probabil la fel de versatil ca și *A. ferrooxidans* în ceea ce privește abilitatea acestuia de a oxida diferite sulfuri metalice. În plus poate oxida MoS_2 , lucru pe care *A. ferrooxidans* nu-l poate realiza datorită faptului că este inhibat de ionul de molibden (Brierley și Murr, 1973).

Oxidarea indirectă

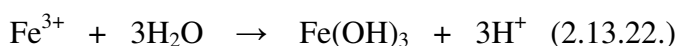
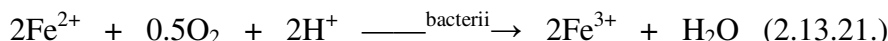
În biooxidarea indirectă a sulfurilor metalice un rol major al bacteriilor îl reprezintă generarea de fier feric care oxidează depozitele de sulfură. Acesta poate fi generat din fierul feros dizolvat la valori ale pH-ului între 3,5 și 5 de către *Metalogenium* într-un interval de temperatură mezofil (Walsh și Mitchell, 1972). La valori ale pH-ului sub 3,5 fierul feric poate fi generat din fierul feros de către *A. thiooxidans* și *Leptospirillum ferrooxidans* într-un interval de temperatură mezofil și de către *Sulfolobus sp.*, *Acidianus brierleyi*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* și alte bacterii neidentificate încă într-un interval de temperatură termofil. Fe^{3+} poate fi de asemenea generat din pirite de către *A. ferrooxidans* și alte acidofile oxidatoare de fier după cum am menționat anterior (Balashova, 1974; Segerer *et al.*, 1988) (vezi capitolul I). Indiferent de modul în

Capitolul 2. Bazele teoretice ale acțiunii microorganismelor în circuitul sulfului.

care este format fierul feric în soluție acidă acționează ca un oxidant pe sulfurile metalice (Ehrlich și Fox, 1967).



unde M poate fi un metal într-o stare de oxidare potrivită care nu trebuie să fie tot timpul bivalentă. Ar trebui menționat faptul că în acest tip de reacție chimică sulfura este doar oxidată la sulf. Oxidarea chimică ulterioară la acid sulfuric de către oxigen este foarte lentă, dar este posibil să fie accelerată de către microorganisme ca *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *Sulfolobus sp.* și *Acidianus brierleyi*. În natură acidul de care este nevoie poate fi format prin autooxidarea sulfului sau cel mai probabil pe cale biologică prin oxidarea bacteriană a sulfului sau fierul fie ca fier feros în soluție sau ca pirită. În oxidarea Fe^{2+} , acidul se formează după cum urmează (Ehrlich, 1995):



Datorită faptului că această reacție are loc în mod normal în prezența sulfatului, hidroxidul feric se poate converti la jarositul mai insolubil, în special în prezența de *A. ferrooxidans* și probabil alți oxidatori de fier acidofili (Carlson *et al.*, 1992).



unde A^+ poate reprezenta Na^+ , K^+ , NH_4^+ , sau H_3O^+ (Duncan și Walden, 1972). Formarea jarositului descrește raportul de protoni produși per fier oxidat de la 2:1 la 1:1. Ca și sulful, jarositul se poate de asemenea forma pe suprafața cristalelor sulfurilor metalice și blocând astfel oxidarea ulterioară (Carlson *et al.*, 1992).

Merită menționat faptul că în cazul oxidării piritei de către fierul feric, sulful este oxidat la sulfat în timp ce fierul rămâne în stare feroasă. Devreme ce piritele însoțesc de obicei alte sulfuri metalice în natură, oxidarea piritei este o sursă importantă de acid pentru reacțiile de oxidare ale sulfurilor metalice neferoase, mai ales acelea care consumă acid. În unele cazuri roca mamă în care sunt conținute sulfurile metalice, inclusiv pirita, poate reacționa ea însăși cu acidul și astfel crește pH-ul mediului suficient de mult încât să cauzeze precipitarea completă a fierului feric și în acest mod să împiedice orice oxidare a sulfurii metalice de către aceasta (Ehrlich, 1995).

Deoarece fierul este prezent permanent în mediile naturale în care au loc procese de leșiere, cele două tipuri de biosolubilizare pot avea loc simultan, probabil mai întâi leșierea directă, care eliberează fierul, după care s-ar declanșa imediat reacțiile leșierii indirecte.

Conversia galvanică este a treia cale de solubilizare a metalelor și se bazează pe principiul general admis după care contactul fizic între două sulfuri metalice diferite, scufundate într-un electrolit, creează o celulă galvanică (Zarnea, 1994).

Fenomenul a fost studiat în cazul cuplului $CuFeS_2 / FeS_2$, având ca electrolit un amestec de acid sulfuric diluat și o soluție de sulfat feric. În acest sistem, calcopirita ($CuFeS_2$) are un potențial electric mai mic și devine anod, în timp ce pirita (FeS_2) se comportă ca un catod. Ca urmare calcopirita este solubilizată rapid, în timp ce pirita rămâne neafectată (Zarnea, 1994).

A. ferrooxidans poate favoriza evoluția acestui proces, prin oxidarea sulfului elementar produs pe această cale, care altfel ar deveni o barieră fizică a sistemului, împiedicând difuzia Cu și Fe din zona de reacție (Zarnea, 1994).

Partea a-II-a. Zona minieră Oravița. Mina Kiesberg

Capitolul 3. Caracteristicile fizico-geografice și climatice ale zonei cercetate

3.1. Caracteristicile fizico-geografice

Zona Oravița este situată în partea de S-V a României, vechea provincie Banat, actualul Județ Caraș-Severin la contactul între Câmpia Carașului și Dealurile Oraviței (*Fig. 3.1.1.*).

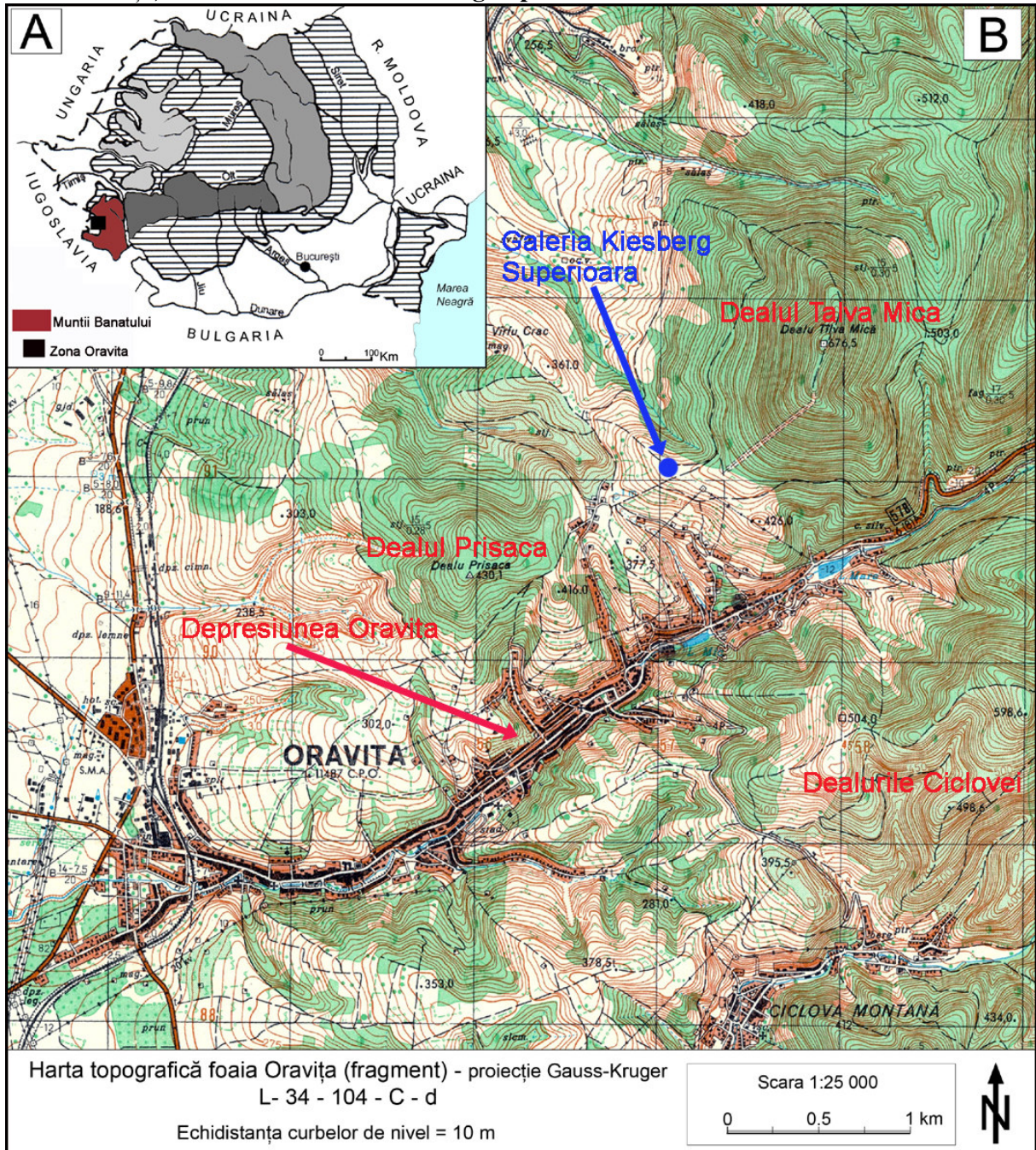
În partea de E, N-E, se învecinează cu Munții Aninei preponderent calcaroși, grupă a Munților Banatului, iar la V Câmpia Carașului ca parte a Sincliniului Reșița-Moldova Nouă.

Orașul Oravița este așezat într-o depresiune formată de-a lungul râului Orăvicioara. Această depresiune se numește Depresiunea Oravița și este încadrată la N de Dealurile Prisaca și Tâlva Mică, iar la S de Dealurile Ciclovei.

Altitudinea medie a Depresiunii Oravița este de 250m, iar dealurile ce o delimitează au altitudini de peste 400m, Dealul Prisaca (420m), Dealul Tâlva Mică (675m) și Dealurile Ciclovei (370-500m). Versanții acestor dealuri, care încadrează depresiunea, sunt brăzdați de mai multe ogașe, unele dintre ele având curgere permanentă (*Fig. 3.1.1.*).

Partea a-II-a. Zona minieră Oravița. Mina Kiesberg.

Fig. 3.1.1. A. Localizarea zonei Oravița pe harta României, B. Harta topografică a zonei Oravița, localizarea Galeriei Kiesberg Superioara.



3.2. Caracteristicile climatice ale zonei Oravița

Datele climatologice, prezentate în acest paragraf au fost preluate de la Stația Meteorologică Oravița.

Depresiunea Oravița are o orientare generală N-E spre S-V cu o largă deschidere spre V, asemenea zone având un regim termic mai ridicat decât cele cu deschidere spre N.

Climatul acestei zone este influențat de regimul activității maselor de aer care vin dinspre Marea Mediterană și Marea Adriatică. Acest fapt se manifestă în ansamblul elementelor climatice prin ierni mai blânde față de alte regiuni ale țării și prin veri călduroase dar nu excesiv de caniculară.

Capitolul 3. Caracteristicile fizico-geografice și climatice ale zonei cercetate.

În acest subcapitol sunt analizați principalii parametri meteorologici (temperatura aerului, precipitații, umezeala aerului, vânt, pe o perioadă de 15 ani respectiv 1990 – 2004).

3.2.1. Temperatura aerului: este mărimea care caracterizează starea de încălzire sau răcire a atmosferei în imediata apropiere a suprafeței terestre. Media multianuală pentru această zonă este de **+ 11,3⁰ C**.

Tot în această zonă se înregistrează și cele mai mici amplitudini din țară. Amplitudinea reprezentând diferența dintre temperatura maximă și cea minimă înregistrată în cursul unei zile. Temperaturile minime sunt doar cu 1-2 grade mai scăzute decât maxima termică din ziua precedentă.

Temperaturile extreme în aer s-au produs în situații sinoptice deosebite. Astfel temperaturile maxime s-au produs în perioade caracteristice când circulația atmosferică a antrenat mase de aer tropical, în condiții anticiclonice de tip stabil și senin.

Maxima absolută în perioada analizată a fost de 39,1 grade în iulie 2000. Tot în anul 2000 în luna august s-a înregistrat la ora 0.1 noaptea o valoare de 30,5 grade, fiind cea mai ridicată valoare nocturnă din țară înregistrată vreodată.

Cea mai scăzută temperatură minimă a fost de -16,6 grade în luna februarie 2004.

Valoarea medie a temperaturilor minime este de 0,3 grade cu o medie mai scăzută cum este și normal în lunile de iarnă de -6,6 grade.

Pe ansamblu temperaturile minime în zonă sunt foarte ridicate, ceea ce face din această regiune să fie una cu temperaturile nocturne cele mai mari din țară.

Numărul mediu al zilelor cu îngheț în zonă este de 93 de zile pe an. Cele mai multe zile cu îngheț s-au înregistrat în anul 1993 cu 124 zile, mai frecvent acestea înregistrându-se în lunile ianuarie și decembrie.

Data medie de producere a primului îngheț este situată între 25 – 30 octombrie, iar cea a ultimului îngheț în 10 aprilie.

3.2.2. Umiditatea. Umezeala relativă în aer este și ea foarte scăzută, diferențele de la o lună la alta fiind foarte mici, aceasta oscilând în jurul valorii de 69 %. Acesta este datorată vântului local Coșava care usucă aerul coborând panta pe versanți. În lunile când acesta înregistrează valori mai mari de 40 m/s respectiv 144 km/ora, valoarea umezelii aerului este cuprinsă între 10-20 %, înregistrându-se o umezeală de 3% în luna martie 1991 și decembrie 1997 când s-au înregistrat intensificări violente ale vântului în zonă.

Precipitațiile atmosferice, în mai mare măsură decât temperatura aerului, prezintă o accentuată instabilitate.

Cantitatea medie multianuală în zona Oravița este de 828,5 L/m⁻², dar în ultimii 15 ani media multianuală a fost de 988,3 L/m⁻² ceea ce demonstrează o creștere accentuată a cantităților de precipitații în ultimii ani.

Analizând variația lunară a precipitațiilor se constată că cele mai mici cantități se înregistrează în luna martie de 38,4 L/m⁻², iar cantitățile cele mai mari s-au înregistrat în timpul verii, respectiv luna iulie cu 109,1 L/m⁻².

Anotimpul de iarnă este cel mai sărac în precipitații datorită scăderii tot mai mult a activității fronturilor și dominarea sistemelor anticiclonice.

Numărul mediu al zilelor cu precipitații este de 140. Dacă diferența de la o lună la alta și chiar de la un an la altul este totuși mică trebuia menționate valorile mari care apar pentru aceeași lună în ani diferiți, ca urmare a manifestărilor fie a perioadelor cu ploi intense, fie a unor perioade de secetă îndelungată.

Astfel, ca exemplu la cele discutate mai sus, prezentăm situația mediilor lunare și anuale a precipitațiilor pe anii 2004 și 2005, în care, în cadrul cercetărilor noastre, au fost realizate analize microbiologice.

Partea a-II-a. Zona minieră Oravița. Mina Kiesberg.

Tabel 3.2.2.1. Mediile lunare și anuale a precipitațiilor pe anii 2004-2005.

luna	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	Medii anuale
2004	100,8	87,3	29,9	68,4	54,6	32,4	141,8	51,0	58,8	62,8	154,4	32,8	875,0
2005	58,4	85,0	49,6	226,4	149,0	84,0	84,0	164,9	104,8	36,0	37,4	122,7	1202,2

3.2.3. Mișcările aerului. În anumite circumstanțe atmosferice când se crează un gradient baric orientat Est-Vest în zona Oravița se declanșează vânturi din sectorul Estic, acest vânt cald și uscat este cunoscut în regiune sub denumirea de Coșava. Acesta este cel mai cunoscut vânt care bate în partea de Sud-Vest a țării și anume în Sudul Banatului. În afară că este un vânt uscat, câte odată atinge și depășește viteze de peste 40 m/s. Nu există o anumită lună în care vântul atinge valori egale sau mai mari de 40 m/s, dar există sezoane, cum ar fi primăvara devreme și pe tot parcursul toamnei începând cu luna septembrie. Direcția predominantă este din sectorul estic.

Caracteristicile climatologice ale zonei Oravița pot fi rezumate astfel (paragraful 4.2.):

- temperatura medie multianuală destul de ridicată de 11,3 grade,
- temperaturile minime foarte ridicate care fac din această regiune una cu cele mai calde nopți din țară,
- înghețurile timpurii și târzii, brume, sunt rare,
- iernile sunt blânde și scurte,
- cețuri rare care apar numai la pătrunderea maselor de aer reci din vest,
- umezeala relativ scăzută, cantitatea medie multianuală în zona Oravița este de 828,5 L/m⁻²,
- în regimuri ciclonice cu vânturi tari, temperatura maximă nu crește mult față de cea minimă,
- inversiunile termice sunt puțin frecvente și numai în cazuri de acalmie s-au de vânt din sector NV-tic,
- stratul de zăpadă durează puțin pe sol (în medie 30 zile) deoarece Coșava în câteva ore evaporă și un strat de jumătate de metru.

Capitolul 4. Istoricul mineritului în zona Oravița

Evoluția unei economii profilate pe minerit și metalurgie în zona Oravița datează din vremea dacilor și romanilor. Un istoric bănățean vorbește, într-o carte apărută în 1904, despre „Oravița romanizată” și despre „ocnele romane”. Un cercetător orăvițean din perioada interbelică menționează minele romane de aur, argint și cupru de la Oravița. Ciclova, Măidan (azi, Brădișorul de Jos), localități din preajma Oraviței, de acelea de la Ocna de Fier, Sasca Montană, Moldova Nouă, Moldova Veche, despre spălatul aurului la Bolvașnița și Borlova, localități arondate, prin tradiția istorică, ținutului cărășean. Demersurile istoriografiei de până acum au confirmat opinia că, în general, romanii exploatau aurul și cuprul în galerii de coastă, *corporațiile de mineri fiind* multe în Dacia Romană.

Pentru epoca medievală, o informație dintr-un document restituit și interpretat de Pesty Frigyes, amintește de *domeniul minier Ciclova*, localitatea din apropierea Oraviței, la 16 decembrie 1437. Încă din 1315, regele Ludovic I transformase într-o *possessio regalis domeniul minier Secăș* (Secășeni, azi), tot în apropierea Oraviței, amintit și în 1358 și 1363, cu două instalații tehnice. În perioada dinaintea penetrării puterii osmane în zonă, continuă la scară mai redusă *exploatarea fierului și cuprului*. În 27 august 1439, trupele sultanului Murad III ocupă *zona minieră Novobrdo* care integra atunci și exploatarea din preajma Oraviței. Această Novobrdo este eliberată ulterior de către Iancu de Hunedoara, în celebra sa campanie din iulie-august 1443, ale cărei desfășurări au atins și aceste zone. La 1494, în studiul său *De Re metalica*, Georg Agricola pomenește de *mina Clementis* în ținutul din apropierea actualei Oravița. În epoca turcească, fier se exploatează în minele de la Carașova iar cupru în zona Vârșeț. Tot atunci, un Rossler, la 1673, vorbește de zăcămintele din fracturi exploatabile, exemplificând cu minele din ținutul nostru.

În arhivele orăvițene s-au păstrat copii după statistici privind exploatarea minelor zonei în vremea turcilor, pentru perioada sfârșitului de secol XVIII. De altfel, în secolul XVIII rezervele bogate de aur, argint, cupru, plumb impun organizări din mers ale mineritului, rezervele fiind semnalate pe o hartă din 1706, imprimată la Amsterdam. În legătură cu exploatarea miniere din zona Oravița, considerată „adevărată zonă industrială”, perimetrul important în resurse minerale care au atras atenția și au trezit de la bun început interesul Casei de Austria pentru expansiunea economică a provinciei bănățene în acest domeniu, bibliografia este destul de bogată pentru un ținut care, după reformarea *Oficiului Superior al Minelor*, are cea mai completă organizare a mineritului, informațiile din documente vorbind de o „viață minieră intensivă” consolidată prin colonizarea cu oameni de specialitate aduși din Austria, Germania, Bohemia, Alsacia, Oltenia, Muntenia.

4.1. Istoricul minelor de aur din zona Oravița

Despre *mineritul aurifer* din zona Oravița s-au păstrat în fondul documentar al Teatrului Vechi din Oravița (cel mai vechi teatru din România – fondat în 1817) foarte multe însemnări, parte editate, parte rămase în manuscris, adunate de-a lungul anilor de celebrul monografist al orașului Oravița, Sim. Sam. Moldovan. El pregătea o lucrare, *Literatură și documente despre aurul din Banat*, pe care n-a mai apucat să o publice.

În cartea dedicată Oraviței și teatrului său, Sim.Sam.Moldovan subliniază „o mentalitate minieră” a colectivităților locale, plecând spre această concluzie tocmai de la considerentul unei economii „care se dezvoltă mai ales în jurul acestui sector”. Tot atunci Oravița oferă modelul unui ținut al solidarităților multietnice în aceste activități economice, la minele orăvițene lucrând 87 mineri germani și 80 mineri români. De altfel, în zona Oravița, înainte de 1770, exploatarea miniere puternice din cadrul galeriilor de la Ciclova, Coșovița și **Tâlva Mică** au determinat ridicarea celei

Partea a-II-a. Zona minieră Oravița. Mina Kiesberg.

mai active topitorii din provincia bănățeană, la 1721, iar de la 1770, minele sunt exploatate de societăți sau grupe de concesionari, în „perimetre miniere” *Grubenfeld*, din 66 galerii, 47 fiind ale societăților. După actul concesionării unor mine la particulari (1733), lista acestor exploatari, studiate de specialiști și ridicate în hărți de Chr. Tr. Delius, I. Mihailowits (pe harta lui semnează un orăvițean, „Procopie chev. Lothka de Zmieslaw”, nimeni altul decât Prokopie Lhotka de Zmislow, activ în vremea fondării Teatrului Vechi). „Planul” lui Carl Dom. Scheels cuprinde numeroase galerii și mine, localizate majoritatea în preajma Oraviței și în Oravița astfel: în Munții Timișeni, *Maria bitt fur uns*; pe Dealurile Ciclovei – *Georg* și *Heilige Dreyfaltigkeit*; pe Vadarna – *Nepomuceni*, puțurile *Thomas* și *Ispas, Antoni, Clementi, Neu Jacobi* (o galerie de prospectare), *Peregrinus*; în zona colinară Mühlberg – *Johann Nepomuce*; pe Dealul Coșovăț (*Gold-Schurf*) – *Maria Theresia, Maria Heimsuchung, Rochus, Floriani, Rochus și Rosalia, Philippi, Petrus, Cei patru Evangheliști, Erasmus, Genoveva* și o galerie de drenaj aparținând erariului; în Munții Tâlva Mică – *Simon et Judas, Vendelini, Servati și Ignaty, Loretha, Sveti-Simeon, Klein.Dilfaer Erbstollen, Caroli*; în Munții Tâlva Cornului – o altă *Heilige Dreyfaltigkeit, Gottes Willen, Neu Elias, Königseger, Samuel et Mercy*.

Un document important, până acum inedit, pe care și-l transcrie în caietul său Sim. Sam. Moldovan, redactat în anul 1888, în legătură cu producția minei de aur „Elisabetha”, atunci în proprietatea lui Simon Horvath. Aflăm că în intervalul 1845-1851, la 5,250 tone minereu prelucrat („zdrobit”) și la o cupă de minereu de 74,420 kg, conținutul în grame aur, numai pe o tonă de minereu, era de 14,175 gr. Iar în perioada 1852-1858, la 24,500 tone și la o cupă de minereu de 35,70 kg, conținutul în grame aur la o tonă minereu este de 14,571 grame.

Între 1860-1870, „mineritul cărbunilor, exploatarea pădurilor și uzinele de fier (Reșița) au devenit în timpul construirii căilor ferate mai rentabile decât exploatarea metalelor și a aurului. Dar „minele vechi erau însă pe atunci așa de ruinate și conținutul lor așa de necunoscut încât s-a arătat nevoia unui nou studiu geologic și metalurgic”.

Imediat după 1900 în zona Oravița, deși se cunoștea din statistici anterioare valoarea superioară a zăcămintului aurifer, în aceeași perioadă exploatarea se află în recul strategic, filoanele fiind fie sigilate, fie sporadic fructificate. O pledoarie pentru disponibilitatea ținutului orăvițean de *relansare a industriei miniere aurifere*, o găsim exprimată într-un *memoriu* adresat, la 1 mai 1939.

Compozițiile la Oravița sunt de 2 și o pătrime pfunzi cupru la 2 și jumătate argint, un raport de 30 procente la 25, cu un procent cuarț, un alt raport 40, 45 % cupru la 8-9 argint iar la Dognecea și Sasca între o jumătate și trei pătrimi pfunzi cupru, cu jumătate pfunzi argint. Între 1799-1801, la Oravița marja face 8,468 „mark”, la Sasca – 815, Dognecea – 1508, Moldova Veche – 250. În aceeași perioadă, producția de argint a Banatului se cifra la 11, 041 „mark” față de 5,700 în Transilvania. La cupru, minele orăvițene dau 2, 157 centenari, cele din Sasca Montană 587, Moldova Nouă și Moldova Veche – 2,383, Ciclova Montană – 1,019, Dognecea – 838 centenari. În Banat, producția anuală de *extracție și prelucrare a plumbului* este de 1,500 centenari. După 1790, *prospecțiunile geologice* intră în competența *Camerei Afacerilor Minerale și a Monetăriei* din Viena.

În 15 august 1903 a fost publicat un *studiu geologic comandat de Politehnica Vienei* în legătură cu geologia Țării Almăjului, perimetrele Oravița, Măidan, Sasca, Steierdorf-Anina, Nera, Bozovici, Șopotul Vechi, Șopotul Nou, Dalboșeț, Mocerîș, studiu incluzând și ținutul orăvițean, pentru care interesul oficial era mai vechi, în zona de preocupări științifice a catedrei de geologie-geodezie de la faimoasa „*K.K.Hochschule für Bodencultur in Wien*”.

În 1914, la începutul războiului, fierul, arama și plumbul se exploatează și se prelucrează din nevoi strategice. Aurul și argintul din zona Oravița, completând producțiile transilvane, iau drumul Vienei și Budapestei prin firmele *Wagner* (Budapesta) și *Roessler* (Viena), dar cea mai mare parte, după ce este evaluată la *Oficiile de Preschimbare* din Abrud și Zlatna, în Munții Apuseni, ia calea *Monetăriei Statului*, în Körmönczbánya.

Capitolul 4. Istoricul mineritului în zona Oravița.

Numai o *relativă relansare a exploatării cuprifere* are loc, după primul război, în Ciclova Montană iar în Sasca Montană, pe baza explorărilor geologice anterioare, se constată un nou reviriment. De altfel, în interbelic, se studia încă magnetismul regiunii Cârnecea-Calina și al zonei orăvițene Prisaca-Ogașul Coșovița.

Refacerea sectorului minier în zona Oravița după primul război mondial a trecut printr-o etapă de confuzii.

Capitolul 5. Caracteristicile geologice ale zonei cercetate

5.1. Contextul geologic general al zonei Oravița

Formațiunile paleozoico-mezozoice ale zonei Reșița-Oravița-Moldova Nouă, sunt dispuse peste fundamentul cristalin al domeniului getic, situat în interiorul Arcului Carpatic.

Formațiunile cristaline sunt reprezentate prin roci cu un grad accentuat de metamorfism regional. Ele sunt constituite în general din micașturi și paragneise care îmbracă faciesul amfibolitelor cu granat și faciesul șisturilor verzi cu clorit și biotit. În șisturile cristaline, în partea de nord a orașului Oravița spre Brădișorul de Jos se întâlnesc intruziuni de granodiorite și granitoide.

Formațiunile sedimentare sunt reprezentate prin depozite detritice grosiere în partea bazală (Paleozoic) carbonatate în partea mediană (Mezozoic) și detritice mai fine la partea superioară (Terțiar). Sedimentarul constituie un sincliniu orientat NNE-SSW, în cadrul căruia se reliefează structura majoră a anticlinalului Anina, flancată de două mari sinclinale cu dezvoltare regională. În partea de vest a sincliniului, contactul dintre sedimentar și cristalin se face în lungul unei importante linii de dislocație cunoscută sub denumirea de *linia Oravița*.

5.1.1. Cristalinul Domeniului Getic

Șisturile cristaline de pe partea vestică și nordică a Munților Semenic, cele din partea vestică a Munților Almăjului și o parte a celor din nord-vestul Oraviței situate între Bocșa Montană și Forotic sunt considerate a fi mai vechi decât Proterozoicul Superior.

În cadrul domeniului getic au fost separate inițial două unități cristalofiliene majore: seria de Sebeș-Lotru și seria de Miniș (Ghica-Budești, 1934; Pavelescu 1959) (*Fig 5.1.1.*).

Seria de Miniș cuprinde formațiunile cristaline din partea de sud a Munților Semenic și din bazinul Văii Minișului, reprezentate prin șisturi amfibolice, amfibolite, șisturi cuarțitice cu biotit și filite cu biotit și clorit.

În cursul anului 1988, Iancu *et al.* separă în acest areal 3 entități lithostratigrafice: grupul de Sebeș-Lotru, formațiunea de Miniș și formațiunea de Buceava. Aceste entități arată dovezi clare ale implicării în pânze de încălecare din timpul orogenezei varisce. Se pot individualiza astfel trei unități structurale suprapuse, care au fost cutate după încălecare și acoperite transgresiv fie de molasa hercinică, fie de formațiunile mezozoice ale zonei Reșița-Oravița-Moldova Nouă și anume Unitatea de Bozovici, Unitatea de Miniș și Unitatea de Nera (*Fig 5.1.1.*).

5.1.2. Cristalinul Domeniului Supragetic

Linia Oravița sau linia vestică (Schreter, 1912) separă în Banatul de Vest, domeniul getic de cel supragetic, acesta din urmă având o poziție internă în raport cu primul.

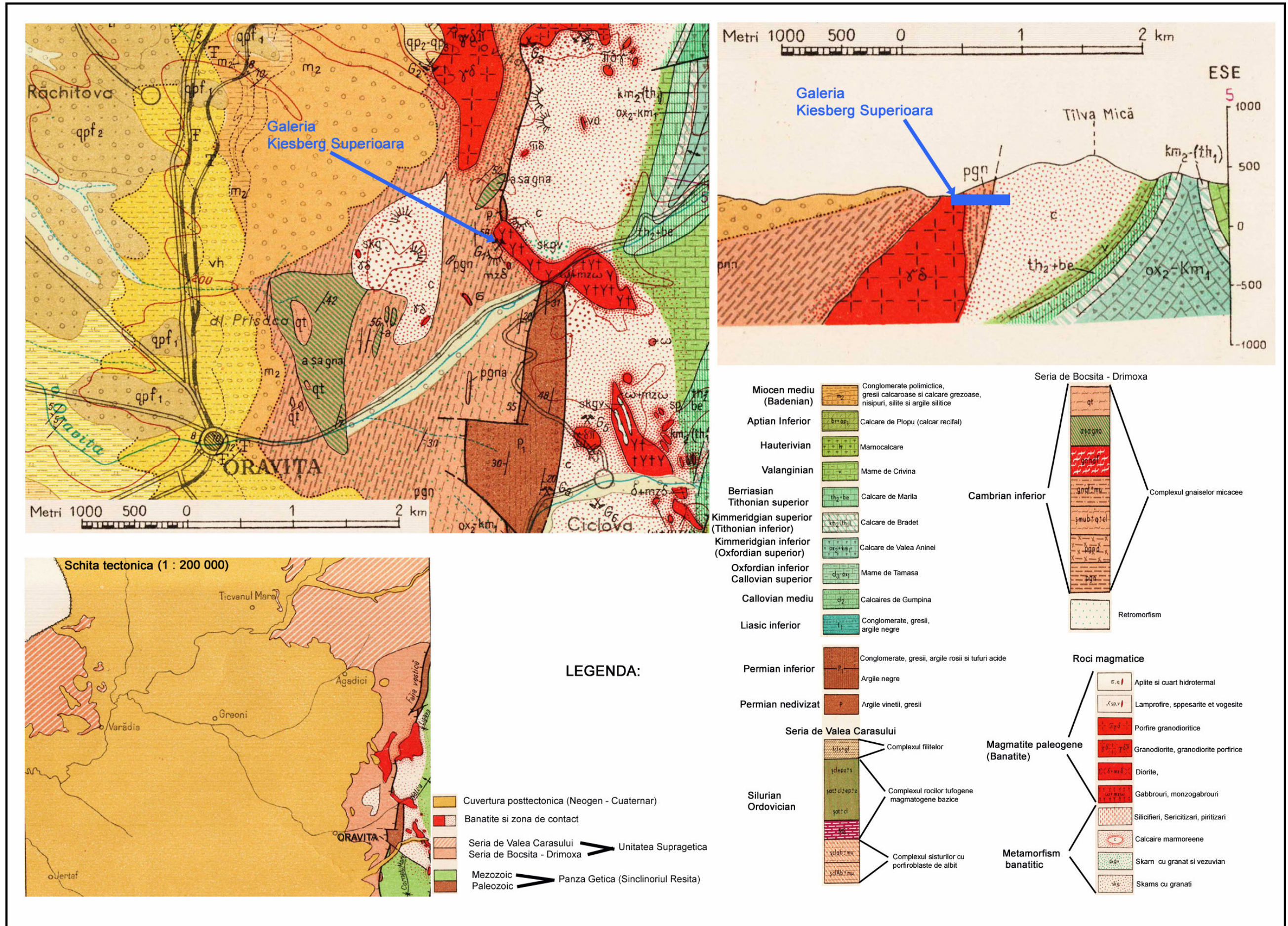
În anul 1931, Al. Codarcea deosebește în cristalinul situat la vest de linia Oravița două zone: una alcătuită din gnaise diaforizate, zona Buchin și o zonă constituită din roci verzi (roci cu biotit și muscovit), zona de Bocșița-Drimoxa, primele încălecând peste cele din urmă care la rândul lor încălecă depozitele Carboniferului superior de la Moniom (*Fig 5.1.1.*).

Streckeisen (1934) consideră întregul cristalin de la vest de falia Oravița ca aparținând unei singure unități tectonice denumită de el "unitatea pânzelor superioare" și corelează șisturile cristaline din Munții Locvei cu rocile verzi separate de Codarcea în 1931.

Mai târziu Al Codarcea *et al.* (1967) reiau această corelare și definesc "unitatea pânzelor superioare" ca Unitate Supragetică.

Partea a-II-a. Zona minieră Oravița. Mina Kiesberg.

Fig. 5.1.1. Harta geologică a zonei Oravița.



Capitolul 5. Caracteristicile geologice ale zonei cercetate.

În zona Dognecea-Oravița, Ana Radu-Mercus (1962) și Constantinof (1972), au separat două serii: 1. seria Bocșița-Drimoxa (complexul gnaiselor micacee) și 2. seria de Valea Carașului cu trei complexe: A. complexul șisturilor cu porfiroblaste de albit; B. complexul șisturilor Vulcanogen-magmatogene bazice și C. complexul filitelor (Constantinof, 1957-1959).

Complexul gnaiselor este alcătuit din paragneise în care se găsesc benzi subțiri de aplitite, pegmatite, migmatite și lentile de amfibolite de origine diorit-gabbroidă.

Gnaisurile alternează cu bancuri de micașisturi cu muscovit și granați, micașisturi cu muscovit, biotit și turmalină, șisturile muscovitice cu cloritoid și porfiroblaste de granați. În aceste roci se intercalează uneori amfibolite.

Rocile din zona retromorfozată de Buchin sunt reprezentate prin paragneise, al căror biotit a fost cloritizat și prin unele varietăți de micașisturi menționate mai sus, ale căror minerale melanocrate, biotit și granat au fost transformate parțial sau total în clorit.

Complexul șisturilor verzi, a fost separat după caracterul rocilor premetamorfice și al celor actuale în trei zone:

A. *Zona epigabbrourilor*, cea mai vestică, constituită din roci care au provenit dintr-un masiv de roci bazice, apar în general ca mase lenticulare.

B. *Zona porfirogen-tufogenă*, este constituită dintr-o alternanță de roci șistoase verzi sau de culoare negricioasă. În ea predomină rocile verzi porfirogene și rocile verzi tufogene cu care se asociază filite sedimentogene și cuarțite.

C. *Zona epigranitelor și epidioritelor*, este alcătuită din roci grăunțoase, dintre care unele sunt gnaise granitice iar altele mai masive, fiind în general dioritice, mai rar gabbroide.

5.1.3. Formațiuni paleozoice

Primele depozite sedimentare care se dispun discordant peste șisturile cristaline aparțin Paleozoicului superior. Acestea ating grosimi ce variază între 1000m și 1500m, constituind un ciclu de sedimentare care începe cu Carboniferul Superior și se încheie cu Permianul Inferior (*Fig 5.1.1.*).

În zona noastră de interes, apar doar depozite care aparțin Permianului Inferior și care sunt reprezentate de gresii arcoziene roșii și verzi cu intercalații de conglomerate, de tufuri tufite și corneene cu pinnit.

Aceste tipuri de roci află de la Ciclova Montană până în nordul comunei Brădișorul de Jos.

După o perioadă de exondare, urmează transgresiv depozite Mezozoice, în cadrul cărora se disting trei cicluri de sedimentare și anume: Ciclul Triasic, Ciclul Jurassic-Eocretacic și ciclul Neocretacic.

În zonă, Triasicul este prezent pe o suprafață relativ restrânsă, află în partea sudică a perimetrului respectiv în teritoriul localității Sasca Montană.

După o altă perioadă de exondare în care cea mai mare parte a depozitelor triasice a fost înlăturată, urmează transgresiunea jurasică, respectiv a Liasicului, când în zonă se instalează un mediu lagunar continental.

Caracterele litologice ale formațiunilor depuse au permis separarea a două orizonturi principale în toată zona Reșița-Moldova Nouă, respectiv Liasicul Inferior, asociat cu cărbuni și argilă refractară și Liasicul Mediu-Superior cu conținut ridicat în bitumen, cunoscut sub denumirea de orizontul șisturilor bituminoase.

Cele două orizonturi au o largă răspândire la nord, nord-est de orașul Oravița în zona Anina, Doman, Secul și la sud de Oravița între Valea Mășcăzeni (Ilidia) și Valea Ghicinului (Ciclova Montană).

Partea a-II-a. Zona minieră Oravița. Mina Kiesberg.

În succesiune stratigrafică se dezvoltă Aalenian-Callovian (aa-cl) alcătuit din marne nisipoase cenușii sau gălbui, depozite grezocalcaroase, marnocalcare și calcare grezoase cu accidente silicioase.

Acestea sunt cunoscute în zonă sub denumirea de calcare de Gumpina.

Oxfordian-Tithonic (ox-th), cuprinde în general depozite predominant calcaroase, cunoscute sub denumirea de calcare de valea Aninei (Oxfordian superior-Kimmeridgian inferior), calcare de Brădet (Kimmeridgian superior-Tithonic inferior) și calcare de Marila (Tithonic superior).

Continuitatea de sedimentare de la calcarele litografice ale Tithonicului Superior la marnocalcarele eocretacice face destul de dificilă trasarea limitei dintre Jurassic și Cretacic.

Berriasianul (be) este reprezentat printr-un orizont marno-calcaros cu bancuri de calcare lithografice.

Valanginianul (v) este cunoscut sub denumirea de marnele de Crivina.

Hauterivianul (h), constituit din marne, marno-calcare și calcare de culoare cenușie, uneori gălbuie, uneori îmbracă un facies calcaros.

Barremian-Apțian inferior (br-ap₁) sunt formațiuni alcătuite din calcare masive sau stratificate, bogate în fosile cunoscute sub denumirea de calcare de Plopa.

Apțian Superior (ap₂), predominant calcaros este cunoscut sub denumirea de calcare de Valea Minișului și este reprezentat prin calcare organogene cenușii-gălbui sau roșcate. Aceste depozite au o mare răspândire în toată zona Reșița-Moldova Nouă, ele formând umplutura sinclinalelor majore.

Albian (al) aceste depozite nu apar în zona Oravița, ci în principal în zona sudică a văii Minișului și se așează discordant peste depozitele Apțianului Superior. Ele sunt formate dintr-un complex detritogen reprezentat prin gresii verzui-gălbui, microconglomerate și conglomerate mai mult sau mai puțin cimentate, sunt cunoscute sub denumirea de straturile de Valea Golumbului.

Formațiunile Cretacicului Superior (K₂) se dispun transgresiv peste depozitele mai vechi și se constată că aria de sedimentare a Cretacicului Superior suferă o deplasare în spațiu de la vest spre est, care se face relativ progresiv astfel încât termenii mai noi se găsesc mai bine dezvoltați spre est.

5.1.4. Formațiuni post-tectonice

Diastrofismul laramic a avut ca efect, printre altele, crearea unui sistem de fracturi profunde sau reactivarea unor fracturi mai vechi, care au folosit drept căi de acces magmatismului subsecvent banatitic, favorizând amplasarea unor corpuri plutonice și subvulcanice, cărora li se asociază numeroase dikeuri, iar pe de altă parte au luat naștere o serie de depresiuni intramontane în care s-au acumulat depozitele terțiare aparținând Neogenului (Fig 5.1.1.).

5.1.4.1. Magmatite paleogene

Magmatismul subsecvent are o mare răspândire și prezintă o mare varietate de tipuri petrografice ceea ce a permis ca în această regiune să se creeze termenul de *banatite* (B von Cotta, 1865) noțiune precizată ulterior de Al. Cadarcea (1931), denumire care se păstrează și astăzi (Fig 5.1.1.).

Rocile eruptive ale provinciei banatitice se dispun de-a lungul a două aliniamente principale după cum urmează:

A. Primul aliniament este situat la vest de zona Reșița-Moldova Nouă, are o direcție aproximativ N-S și este marcat de intruziunile de la Ocna de Fier-Dognecea, Brădișorul de Jos (Măidan)-Oravița-Ciclova, Sasca Montană și Moldova Nouă. Corpurile intrusive străbat șisturile cristaline în partea de vest și nord a zonei, iar spre sud se insinuează pe limita dintre cristalin și

Capitolul 5. Caracteristicile geologice ale zonei cercetate.

depozitele sedimentare, ceea ce arată că acest aliniament corespunde cu importanta linie Tectonică Oravița-Moldova Nouă.

Corpurile banatitice de pe acest aliniament sunt alcătuite din granodiorite în care apar diferite separații granitice sau sienodioritice și o suită largă de filoane de porfire granodioritice, porfire dioritice, microdiorite, microgranodiorite, aplitite, microgabbrouri, keratofire cuarțifere și lamprofire, kersantite, spesartite, minete și odinite.

B. Al-II-lea aliniament de corpuri banatitice se situează la est de zona Reșița-Moldova Nouă și se dezvoltă între Berzasca, Bozovici și Lindenfeld.

Acest corp, corespunde unui sistem de fracturi laramice dispuse paralel cu limita estică a zonei Reșița-Moldova Nouă, fracturi care afectează atât cristalinul getic cât și cel autohton.

5.1.4.2. Rocile de contact

Corpurile banatitice mai sus menționate, metamorfozează la contact șisturile cristaline și depozitele sedimentare terigene sau carbonatice mezozoice, transformându-le în corneene cu biotit și cordierit sau în calcare marmoreene și skarne de care se leagă importante zăcăminte de contact metasomatice, de fier, sulfuri complexe sau de molibdenit (*Fig 5.1.1.*).

Corneenele au cea mai mare răspândire în zonă și sunt marcate de intensitatea metamorfismului, corneenele cu cordierit și andaluzit fiind marcate de metamorfismul cel mai avansat.

Calcarele marmoreene, masive, bine recristalizate cu culori ce variază de la alb, roz până la cenușiu, sunt bine dezvoltate în zona Trei Crai (Ciclova Montană) și în zona **Tâlva Mică (Oravița) – zona Kiesberg**, unde puritatea lor crește odată cu adâncimea.

Astfel sunt cunoscute scarne cu granați, scarne cu epidot-diopsid, scarne cu vezuvian (Og. Crișenilor-Oravița), scarne cu skapolit și granatite.

5.1.5. Substanțele minerale utile

Ca rezultat al activității magmatice banatitice, în zona Ciclova Montană-Oravița-Brădișorul de Jos, s-au format unele dintre cele mai interesante zăcăminte de sulfuri polimetalice și auro-argentifere atât în ceea ce privește varietatea tipurilor genetice a mineralizațiilor, cât și ca importanță economică (*Fig 5.1.1.*).

Intensitatea mineralizației variază direct proporțional cu amploarea și extinderea metamorfismului de contact și al celui hidrotermal, respectiv în funcție de apropierea contactului cu intruziunea, de natura litologică a rocilor, de contactul structural și de alternările hidrotermale cu rol metalogenetic.

Astfel, concentrațiile metalifere le găsim localizate în skarne, în calcare recristalizate, în rocile de contact, în zonele de silicifiere și chiar în magmatitele laramice.

Mineritul foarte extins, practicat în zona Oravița de mai multe secole a dus la epuizarea resurselor minerale cu conținuturi ridicate în util, resurse situate la un nivel superior, care a permis exploatarea prin galerii de coastă până la nivelul văilor existente. Sub nivelul văilor existente în zonă, mineralizațiile au fost cercetate pe adâncimi medii de până la cca. 400m sub nivelul Văii Oravița, cercetare executată cu rețea de foraje geologice, care au confirmat existența mineralizațiilor cu conținuturi ridicate de cupru, aur și argint și la această adâncime, fără a fi încă exploatare.

În zona Ciclova Montană, Oravița, Brădișorul de Jos sunt întâlnite toate tipurile de mineralizații: metasomatică, hidrotermală și de impregnație.

Mineralizația metasomatică este întâlnită în zona Trei Crai (Ciclova Montană), în vestul și nordul Dealului Tâlva Mică (Oravița) și pe Ogașul Cuptoare (Brădișorul de Jos). La contactul

Partea a-II-a. Zona minieră Oravița. Mina Kiesberg.

corpului principal estic de porfire dioritice cuarțifere cu calcarele, s-au format skarne care conțin o mineralizație bogată cupriferă cu conținuturi de peste 5% cupru și auro-argentiferă, mineralizație dispusă sub formă de corpuri neregulate și lentile.

Aceste acumulări au fost exploatate la diferite nivele printr-un mare număr de lucrări miniere cum ar fi: galeria Trei Crai, galeria Labkowitz (Ciclova Montană), Aurelia, Simon Juda, Elias, Prințul Ioan, Prințul Albert, XII Apostoli inferioară, medie și superioară, **Kiesberg superioară și medie**, Loretta, (toate situate în Oravița Dealul Tâlva Mică) precum și printr-o serie de galerii care nu și-au păstrat numele, amplasate pe Ogașul Cuptoare în Zona Brădișorul de Jos.

La limita șisturilor cristaline cu calcarele, s-au întâlnit și au fost exploatate (Gal. XII Apostoli, gal. Elisabeta și Rokus) în zona Oravița, mineralizații de pirită, calcopirită și aur nativ, mineralizații dispuse sub formă de coloane turtite a căror dimensiuni au ajuns de până la 50m lungime.

Paragenezele mineralelor metalice din skarne, prezintă un caracter complex, fiind determinate de asociația oxizilor și a sulfurilor la care se adaugă numeroase minerale de gangă, ceea ce reflectă condițiile fizico-chimice ale proceselor mineralogenetice.

Cele mai întâlnite parageneze în zona Oravița sunt:

- magnetit + aur + pirită ± hematit + calcopirită ± galenă ± blendă;
- pirită + calcopirită ± molibdenit ± pirotină;
- calcopirită + blendă ± molibdenit;
- pirită ± galenă ± blendă + calcopirită.

Mineralele de gangă sunt reprezentate prin: calcit și cuarț, la care se adaugă epidot și granați.

În calcarele cristaline mineralizația are o dezvoltare mai redusă decât aceea din skarne. Ea apare sub formă de impregnații difuze, ca depuneri pe fisuri și în mai mică măsură ca acumulări compacte. Se întâlnesc în proporții variabile: pirită, calcopirită, blenda și galena.

Mineralizația hidrotermală are cea mai mare reprezentare în Dealul Tâlva Mică și a fost exploatată sub denumirea de Zăcământul Sfânta Treime, care era format dintr-un sistem de șase filoane mai importante ca extindere pe direcție de cca. 200-300m, o dezvoltare pe verticală de cca. 100m și grosimi de până la 1m. Cele șase filoane principale erau legate între ele printr-o rețea de filonașe centimetrice și subcentimetrice, formând împreună o volbură de dimensiuni apreciabile.

Zăcământul avea conținuturi de peste 10% cupru și se pare că a fost exploatat în întregime.

Mineralizații hidrotermale au mai fost exploatate și în zona Clementi-Oravița precum și în Brădișorul de Jos, gal. II, gal. IV, gal. V, etc.

Parageneza principală întâlnită la mineralizațiile hidrotermale este: pirită + calcopirită ± molibdenit, iar ca mineral de gangă principal este considerat cuarțul.

Mineralizația de impregnație, cu conținuturi în general mai scăzute este întâlnită în toată zona cuprinsă între Valea Ghicinului (Ciclova Montană), în toată zona Oravița, Dealul Colilii, Tâlva Mică până în nordul localității Brădișorul de Jos.

Mineralizația se prezintă sub forma unor impregnații mai mult sau mai puțin dense și depuneri pe fisuri. Impregnațiile sunt alcătuite din pirită și calcopirită la care se adaugă subordonat molibdenitul asociat cu cuarțul.

Molibdenitul formează concrețiuni intime cu cuarțul în zonele de fisuri, dar mai poate apare și ca impregnații difuze în masa cuarțoasă. Acest tip de mineralizație este răspândit în masa banatitelor.

Capitolul 5. Caracteristicile geologice ale zonei cercetate.

5.1.6. Elemente structurale

Structura geologică complexă a formațiunilor cristaline și sedimentare din zona Oravița, s-a realizat în decursul ciclurilor tectonice, *baicalian*, *hercinic* și *alpin*.

Ciclului tectonic baicalian îi aparțin șisturile cristaline proterozoic superioare, respectiv cele situate la vest de zona de fractură Oravița.

Se remarcă mai multe structuri anticlinale și sinclinale orientate pe direcția N-S. toată stiva de șisturi cristaline din această regiune a fost ridicată în timpul mișcărilor mezocretacice pe linia de fractură care o separă de zona sedimentară Reșița-Moldova Nouă.

Mișcărilor hercinice sunt puse în evidență de transgresiunea Carboniferului și lipsa Permianului Mediu și Superior, care pledează pentru existența unei perioade de exondare ce se înregistrează la sfârșitul acestor mișcări.

Începutul *mișcărilor alpine* este legat de transgresiunea Liasicului iar dovezile despre diversele faze ale acestui ciclu de mișcări le oferă transgresiunile din timpul Jurasicului mediu, Oxfordianului, Barremianului, Albianului etc. Efectul acestor mișcări a imprimat depozitelor sedimentare o structură foarte complicată, exprimată prin linii de încălecare și cute aplecate sau foarte frecvent cu un flanc laminat.

De la vest spre est se întâlnesc numeroase falii și cute orientate NNE-SSW dintre care amintim doar cele prezente în perimetrul Oravița:

-Sinclinalul Clocotici-Lișava, care se dezvoltă între valea Bârzava și localitatea Brădișorul de Jos;

-Anticlinalul Natra, care se dezvoltă între Valea Ciudanovița și Valea Oraviței;

La est de zona Oravița întâlnim: Sinclinalul Valea Doman-Valea Jitin –Ilidia, care este puternic laminat; Anticlinalul Polom; Sinclinalul Brădet-Moldova Nouă, bine conturat în regiunea Brădet, Vârful Rol, Anticlinalul Anina, Sinclinalul Colonovăț-Moldovița, Anticlinalul Beul Sec, etc.

Diastrofismul Laramic a avut ca efect printre altele, crearea unui sistem de fracturi sau reactivarea unor fracturi mai vechi, care au favorizat amplasarea unor corpuri plutonice subvulcanice, cărora li se asociază numeroase dikeuri.

Explicația dată de unii autori amplasării intruziunilor banatitice este legată de existența unor sisteme fosă-arc pe marginea Arcului Carpat. Sub fose se află crusta oceanică. O astfel de fosă separă Carpații de SV de Platforma Moesică (Cioflică *et al.*, 1980). Ea s-a închis în timpul Cretacicului superior, cu subducția înspre vest, ducând la distribuția zonală a produselor magmatismului laramic (banatitic): de la intruziuni mici și puțin adânci de tip monzodiorit-diorit la granodiorit, specifice regiunilor de crustă continentală subțire, spre plutoni granodioritici, specifici unor regiuni de crustă continentală groasă (Vlad, 1997).

5.2. Zăcământul Policarpus. Mina Kiesberg

Zăcământul Policarpus situat în partea de nord a orașului Oravița și în S-W Dealului Tâlva Mică a fost deschis prin galeriile de coastă Kiesberg Superioară, Medie și Inferioară. El se încadrează în zona de tranziție dintre unitatea laramică banatitică mezodioritică-dioritică cu mineralizații de Cu și Mo din partea de S a Banatului și cea granodioritică cu mineralizații de Fe-Pb-Zn din Banatul de Nord (*Fig 5.1.1.*).

Zăcământul Policarpus este cantonat la contactul corpului vestic de banatite Oravița cu depozitele sedimentare calcaroase și șisturile cristaline.

Parageneza mineralelor metalice din skarnele zăcământului Policarpus este:

- pirită + pirotină + calcopirită ± aur ± molibdenit.

Partea a-II-a. Zona minieră Oravița. Mina Kiesberg.

Mineralizația este constituită în principal din pirotină și pirită, subordonat calcopirită, cobaltină și marcasită, și este cantonată în roci cornificate-biotitizate și carbonatate. Această mineralizație se prezintă sub formă de diseminări, uneori cu caracter compact (intrarea în Galeria Kiesberg I).

Cobaltina se întâlnește sub forma unor mici incluziuni în pirotină, iar marcasita are caracter de vinișoare tardive substituind pe alocuri monosulfura de fier.

Datele asupra geologiei zăcământului Policarpus sunt reduse datorită vechimii de exploatare a acestuia, probabil la începutul secolului al-XIX –lea.

Din acea perioadă nu au mai fost păstrate în zonă date privind exploatarea zăcământului, a tipului de minereu exploatat, a cantității extrase, vizibile fiind doar urmele vechilor galerii Kiesberg superioară, medie și inferioară, care reflectă modul de exploatare a zăcămintelor polimetalice existente în zonă și amintite mai sus.

Presupunem că date despre exploatarea Kiesberg ar mai putea exista la Arhivele din Viena.

Capitolul 6. Siturile stabilite pentru analize

6.1. Prezentarea generală a minei Kiesberg

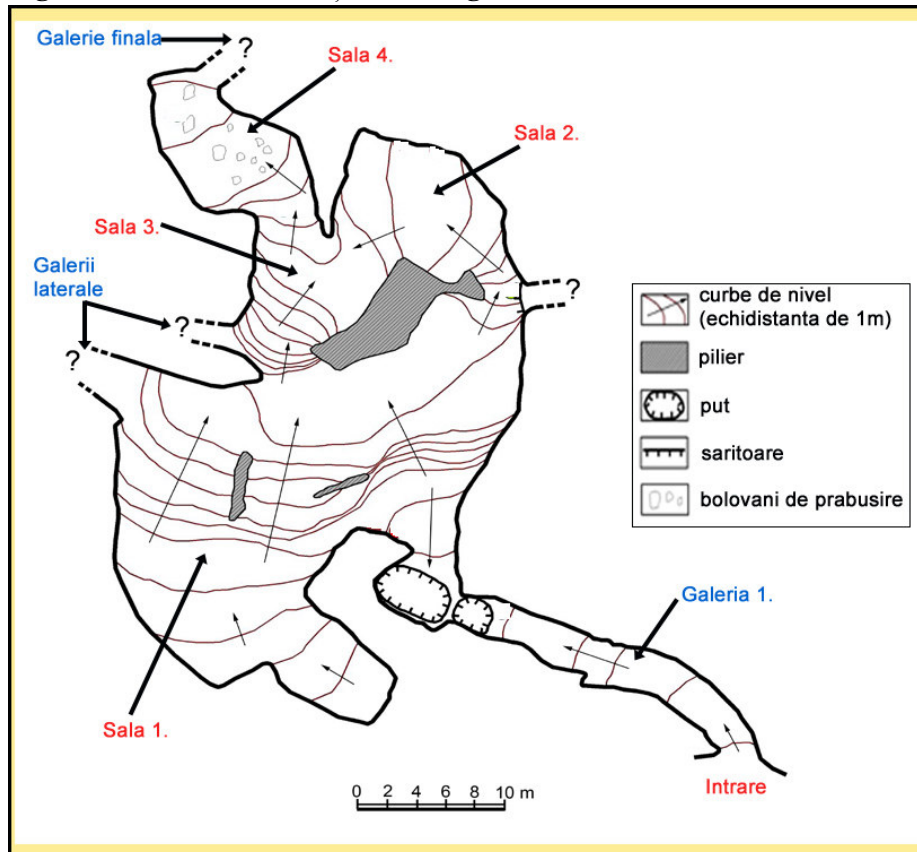
6.1.1. Morfologia cavității Kiesberg

Așa cum spuneam în capitolul 5, Zăcământul Policarpus a fost deschis prin Galeriele Kiesberg Superioară, Medie și Inferioară (Fig. 3.1.1.). Aceste galerii au fost galerii de coastă săpate în Dealul Tâlva Mică la o diferență de nivel de 50 m de alta. Ele au fost dezvoltate dendritic urmărindu-se filoanele lenticulare și „volburele” de sulfuri aurifere ale zăcământului Policarpus, comunicând între ele printr-o serie de puțuri.

În decursul timpului, după abandonarea minei, apele meteorice de percolație care traversau pereții galeriilor fiind foarte acide, la acestea adăugându-se și activitatea intensă a microorganismelor, au făcut ca armăturile de susținere din lemn să fie distruse ducând la prăbușiri majore în cavitate.

În zilele noastre Galeriele Kiesberg Inferioară și Medie sunt inundate și prăbușite fiind total inaccesibile pentru explorare, singura accesibilă fiind Galeria Kiesberg Superioară în care s-au desfășurat cercetările noastre. Această galerie a fost săpată în partea superioară a intruziunii magmatice care are formă convexă. Intruziunea se ridică peste intrarea în galerie cu 8 m. Deasupra intruziunii magmatice în care este săpată galeria se găsește un strat de calcare marmoreene cu o grosime de 5 m, peste care se află un strat subțire de sol, vegetație ierboasă și arbuști.

Fig. 6.1.1.1. Harta cavității Kiesberg.



Galeria Kiesberg Superioară se prezintă ca o cavitate descendentă cu o dezvoltare de 45m și o denivelare de 24m (Fig. 6.1.1.1.). Accesul se face printr-o intrare de aproximativ 1,5 m

Partea a-II-a. Zona minieră Oravița. Mina Kiesberg.

înălțime într-o galerie inițială sau “Galeria 1.”, care începe printr-un pasaj ușor descendent, după care traversăm o prăbușire (scurgere de pământ și argilă). După traversarea acestei prăbușiri coborâm din nou până în marginea unui puț sau săritori de 3m adâncime care are origine probabilă fie într-un vechi puț de acces, fie în prăbușirea tavanului unei galerii de la un nivel inferior. De la baza puțului intrăm printr-o strâmtoare de 45cm înălțime într-o sală mare puternic descendentă, planșeul descendent fiind format din argilă și pământ rezultat din prăbușiri. Această sală pe care noi am numit-o „Sala 1.” a fost formată prin prăbușirea unor galerii de la nivele diferite, urmele acestor galerii fiind vizibile și astăzi la diferite nivele ale acestei săli prin trei mari pilieri ce fac legătura între boltă și planșeu. Unele din aceste galerii sunt încă accesibile, altele fiind total prăbușite. Din această sală coborâm un nivel mai jos, într-o sală mult mai mică, cu boltă relativ înaltă - „Sala 2.”. Din această sală avem acces într-o altă sală a cărui tavan coboară la 1,75m - „Sala 3.”. Din această sală, fie se poate urca la rămășițele unei vechi galerii rămasă suspendată, fie se poate coborî printr-o scurtă galerie de acces descendentă la o altă sală de dimensiuni reduse a cărui planșeu este ocupat de o baltă cu depuneri – „Sala 4”. Din această sală o galerie coboară în continuare aproximativ 15 m în plan înclinat până la rămășițele altei galerii total inundate aici putându-se observa și rămășițele unor vechi puțuri. Acestea făceau probabil legătura cu galeriile cavității Kiesberg Medie.

6.1.2. Caracteristicile speoclimatice ale cavității

După morfologia actuală, Galeria Kiesberg Superioară, este o cavitate descendentă cu dezvoltare dendritică terminată în fund de sac prin galeria inundată care se găsește în punctul cel mai de jos, restul galeriilor laterale fiind de asemenea obturate. O astfel de caracteristică face ca această cavitate să aibă o extrem de slabă circulație a aerului realizând slabe schimburi cu exteriorul doar atunci când temperaturile din interiorul cavității și din exteriorul ei se egalizează. La acesta contribuie și faptul că pe Galeria 1. la 10 m de intrare se află o prăbușire sub forma unei scurgeri de pământ și argilă, care împiedică și mai mult schimburile de gaze. Prin urmare Galeria Kiesberg Superioară reprezintă o adevărată pungă de gaze, cu o atmosferă săracă în O_2 și bogată în CO_2 și alte gaze probabil, rezultate în urma proceselor chimice și biologice intense care se desfășoară în interiorul acestei cavități. La aceste procese se adaugă și cele ce se desfășoară în depozitele de guano, aici în intervalul mai-octombrie găsindu-se una din cele mai mari colonii de lilieci din Munții Aninei. Concentrația acestor gaze atinge un maxim se pare la aproximativ 2 săptămâni de la maximul debitelor apelor care ajung în cavitate, în astfel de perioade accesul în galerie fiind extrem de dificil și periculos fără echipament adecvat (respirație autonomă – mască cu butelie de aer și lumini electrice). Din motive tehnice, din păcate, natura acestor gaze nu a fost încă determinată.

Temperatura medie anuală determinată în cavitate este de $15,5^{\circ}C$, în toate lunile anului temperatura menținându-se în jurul acestei valori. Această temperatură este cu aproximativ $5^{\circ}C$ mai ridicată decât media anuală a temperaturilor din zona Oravița. Termoclina cavității se găsește pe prăbușirea de pe galeria principală (Galeria 1.), la aproximativ 10m de intrare (*Fig. 6.1.1.2., Fig. 6.2.1.*).

Apele care ajung în galeria Kiesberg, sunt ape de origine meteorică, care traversează straturile de calcare marmoreene și rocile eruptive ale intruziunii, altele pătrund aparent în masiv la o altitudine mai mare în Tâlva Mică scurgându-se spre Kiesberg. Pe traseul lor aceste ape dizolvă roca încărcându-se cu diverși ioni și minerale (vezi cap. 7), având un rol ecologic important în interiorul cavității. Cele care traversează prin fisurația fină bolțile galeriilor și sălilor se scurg încet sub formă de picături care au de obicei densități mari, celelalte ajung în galerie pe fisuri mai mari din lateral sub forma unor scurgeri continue. Debitul acestor scurgeri este variabil, atingând un maxim la aproximativ 12-15 zile după precipitații.

6.2. Prezentarea macroscopică a siturilor

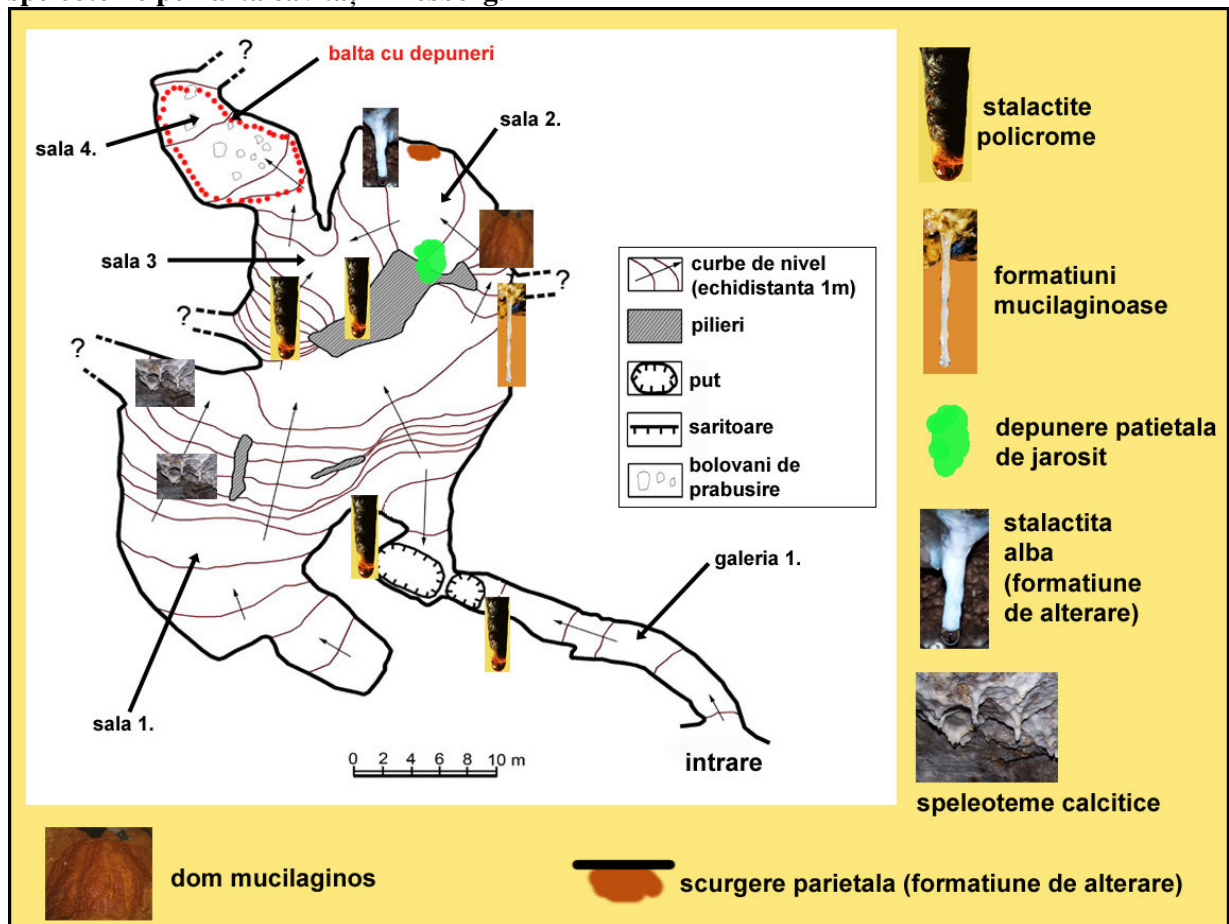
Varietatea mare de procese fizice și chimice care se petrec în cavitatea studiată, cât și microclimatul caracteristic determinat de particularitățile morfologice ale acesteia, a determinat stabilizarea, aici, a unor comunități microbiene extrem de interesante. Aceste comunități cuprind o mare varietate de populații de microorganisme cu o încadrare sistematică variată: *Eubacteria* și *Eucaria*.

Între aceste microorganisme sunt stabilite o serie de relații trofice complexe, existând adevărate rețele trofice, majoritatea având la bază intense procese de *chemosinteză*. Prin urmare unul din cei mai limitativi factori în dezvoltarea acestor comunități este apa (vezi capitolul 8) ce ajunge în cavitate încărcată cu diverși ioni metalici și minerale.

Metabolismul general al acestor conșorii de microorganisme are ca punct final mineralizarea structurilor vii sub forma unor speleoteme ce au făcut obiectul studiului nostru.

Localizarea acestora s-a realizat în Fig. 6.2.1.

Fig. 6.2.1. Localizarea siturilor de recoltare a probelor și a diverselor tipuri de speleoteme pe harta cavității Kiesberg.



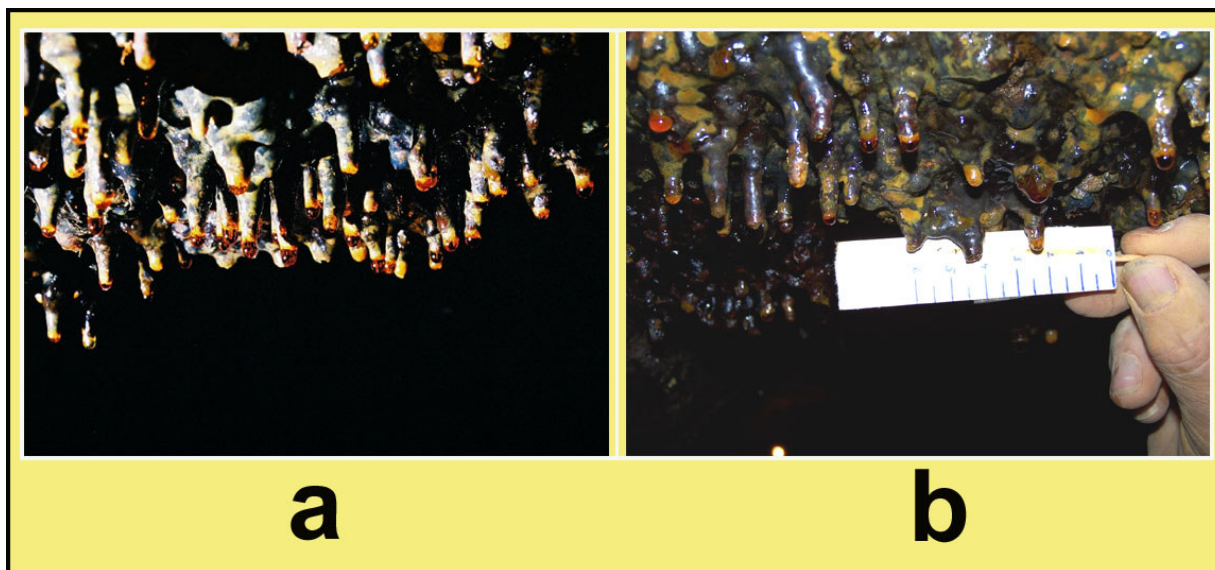
6.2.1. „Stalactitele policrome”

Stalactitele policrome, cum au fost denumite de noi, reprezintă formațiuni stalactitice de formă aproximativ conică (conic-cilindrică), cu dimensiuni cuprinse între 0,5 – 5 cm lungime și grosimi între 0,3 – 0,8 cm. Ele au o bază comună care se prezintă sub forma unei cruste continue pe bolta cavității.

Partea a-II-a. Zona minieră Oravița. Mina Kiesberg.

Culorile lor variază destul de mult, având predominant culori închise: negru, maro, combinate cu diverse culori cum ar fi: galbenul cu diferite nuanțe, roșu și portocaliu (Fig. 6.2.1.1. a., b.).

Fig. 6.2.1.1. a., b. Vedere de ansamblu cu grupuri de stalactitele policrome.



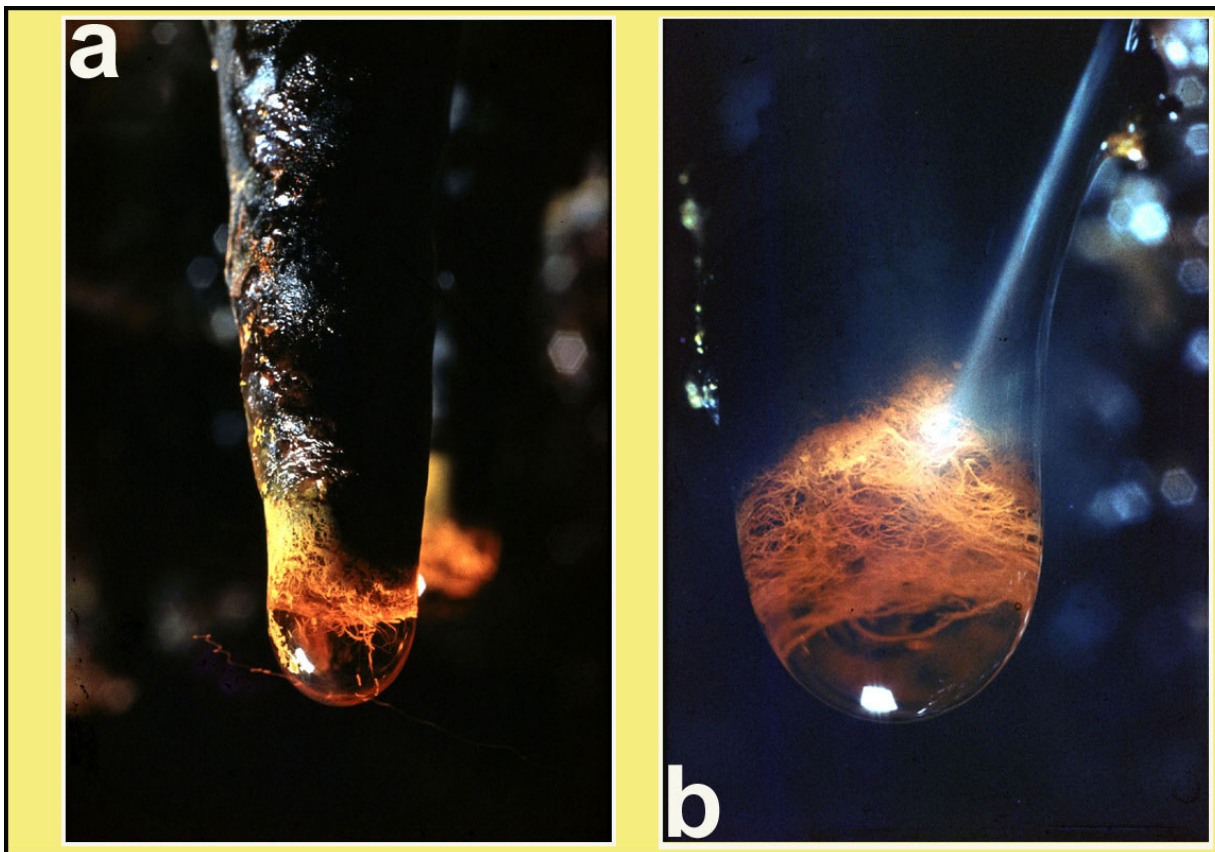
Din punct de vedere al consistenței, stalactitele policrome sunt formațiuni friabile cu pereți subțiri sub forma unei cruste continue, iar la interior au o consistență extrem de laxă prin care circulă soluția de percolație care le alimentează.

Stalactitele policrome sunt localizate pe bolții, în anumite sectoare ale cavității cu un debit constant al apei de percolație care traversează prin fisurație fină, foarte încet, straturile de deasupra cavității. În aceste sectoare, ele s-au format de obicei în grupuri sau câmpuri de stalactite cu baze unite, comune, mai rar fiind izolate. Aceste grupuri sau câmpuri pot uni între 10 până la 200 de stalactite sau chiar mai multe. Ca localizare în cavitate, observăm stalactite policrome relativ izolate lângă săritoare, pe Galeria 1. și câteva câmpuri sau grupuri la nivelul sălii mai profunde notată de noi -Sala 3 (Fig. 6.2.1.).

Încă de la prima explorare a cavității, exploratorului îi este atrasă atenția de picăturile de culoare portocalie până la roșu rubiniu (Fig. 6.2.1.2. a., b.). Culoarea lor variază în funcție de cantitatea de apă ce traversează bolta. Cu cât aportul de apă este mai mare cu atât culoarea este mai deschisă și cu cât cantitatea de apă este mai mică, culoarea este mai închisă. Picăturile roșu-rubinii din perioadele secetoase se mențin o perioadă îndelungată în vârful speleotemelor, aceasta datorându-se densității mari a soluției. În verificările pe care le-am efectuat cu fâșii de hârtie plasate sub stalactite s-a observat faptul că astfel de picături se mențin în vârful stalactitelor uneori 25-30 zile, iar în perioadele foarte secetoase, s-a observat chiar exicarea lor.

Capitolul 6. Siturile stabilite pentru analize.

Fig. 6.2.1.2. a. Stalactită policromă – detaliu; b. Picătură din vârful stalactitei cu hife de fungi – detaliu (foto Mihai Ciuprina).



Dacă privim aceste picături cu o lupă, observăm cu ușurință existența în interiorul picăturii a unui ghem de filamente albe ce coboară în picătură din interiorul stalactitei (Fig. 6.2.1.2. b.). Aceste filamente au fost surprinse de fiecare dată în macrofotografiile realizate, iar după realizarea cercetărilor noastre am observat că sunt hife de ciuperci microscopice (vezi capitolele 8 și 10).

6.2.2. Stalactitele mucilaginoase. Scurgeri parietale mucilaginoase. Scurgeri de planșeu mucilaginoase

Un alt subiect care de asemenea ne-a atras atenția este cel legat de stalactitele și scurgerile mucilaginoase.

Stalactitele mucilaginoase sau snotitele au formă alungită, de baghetă, cu dimensiuni foarte variabile având lungimi cuprinse între 1 și 10 cm și grosimi de 0,5-1cm la bază și 0,2-0,3cm la vârf (Fig. 6.2.2.1. a.).

Fig. 6.2.2.1. a. Stalactite mucilaginose; Scurgeri mucilaginose.



Culoarea snotitelor este albă, modificându-se în timp spre galben ruginiu. Această modificare a culorii are loc de la bază spre vârf și din centrul spre marginea snotitelor și se datorează depunerilor masive, în timp, de hidroxizi ferici în aceste structuri vii. După o perioadă de timp, care variază în funcție de cantitatea și debitul apei de alimentare, ele se mineralizează în totalitate, acestea având culori ce variază de la galben-ruginiu, la brun –negru-roșcat (Fig. 6.2.2.1. a.).

Consistența lor este, așa cum le spune și numele, – mucilaginoasă – în stare vie, atunci când trăiesc într-un flux continuu de apă, ele reprezentând un consorțiu de microorganisme (vezi capitolele 8-10). După ce se mineralizează, ele devin dure, dar relativ casante.

Capitolul 6. Siturile stabilite pentru analize.

Fig. 6.2.2.2. a. Nișa în care se găsesc formațiunile mucilaginoase; b. Scurgeri de planșeu mucilaginoase.



Stalactitele mucilaginoase se găsesc pe bolta unei „nișe” (Fig. 6.2.2.2. a.), care se află în peretele Sălii 1., în partea inferioară a acesteia, lângă coborârea spre Sala 2. (Fig. 6.2.1.). Nișa are o înălțime cuprinsă între 50-100 cm și o profunzime de 1,5–2m. Ea are originea probabilă într-o veche galerie parțial prăbușită, care este alimentată cu apă de sus prin boltă, dar și din lateral. În perioadele de regim hidric maxim debitul apei în nișă este de 1-2 L/s, iar în perioadele de secetă, debitul scade la 0,2–0,4 L/s.

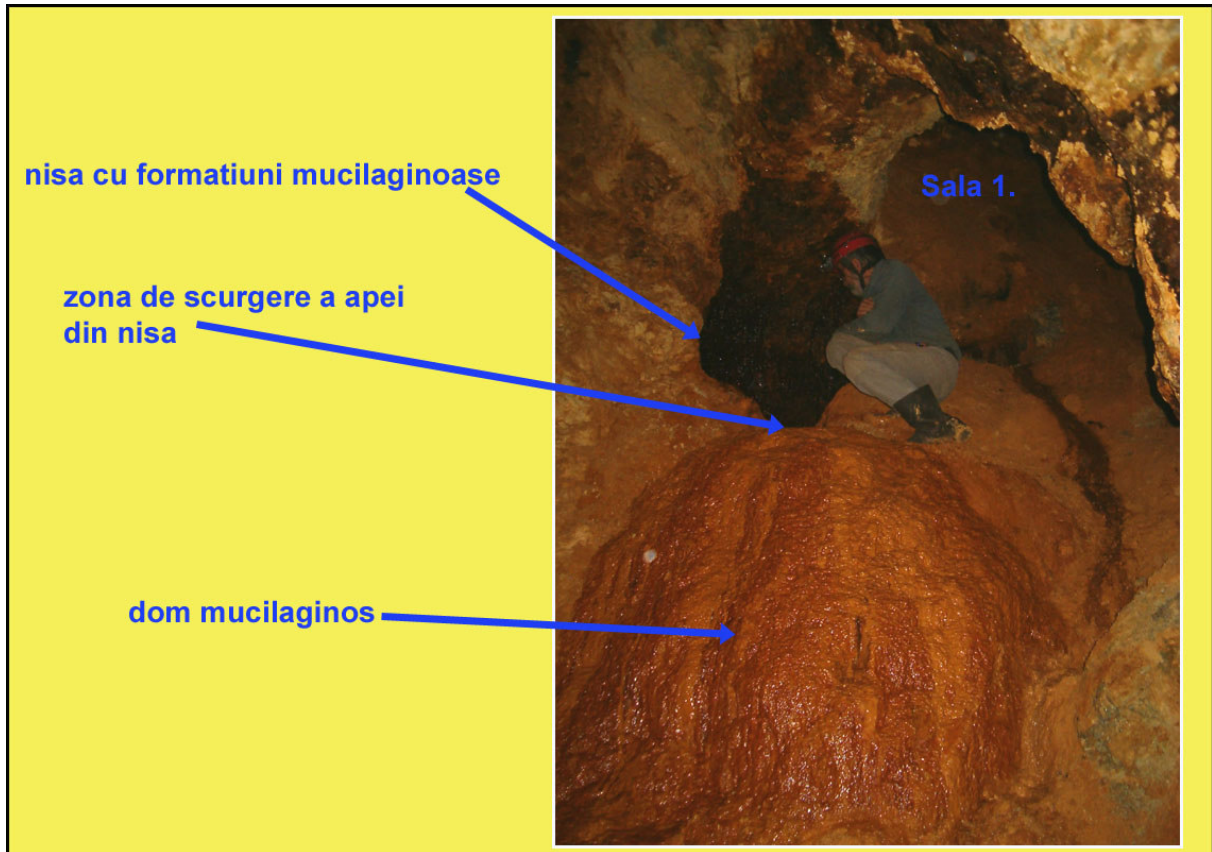
Scurgerile parietale (Fig. 6.2.2.1. b.) și cele de planșeu (Fig. 6.2.2.2. b.), reprezintă același consorțiu de microorganisme ca și snotitele. Ele au forma unor voaluri dispuse în masa apei, pe toată grosimea stratului de apă. Acestea tapetează de fapt atât pereții cât și planșeu nișei, grosimea stratului putând fi de câțiva centimetri.

Scurgerile de planșeu mucilaginoase se continuă în fluxul de apă care iese din nișă, se mineralizează treptat, și formează un dom mucilaginos peste o veche prăbușire, la coborârea din Sala 1. în sala 2 (Fig.6.2.1.).

Culoarea, la fel ca la snotite, este albă, transformându-se în galben ruginie (Fig. 6.2.2.3.). Mineralizațiile în cazul acestor voaluri încep de la margine spre interior.

Partea a-II-a. Zona minieră Oravița. Mina Kiesberg.

Fig. 6.2.2.3. Dom mucilaginos în zona de evacuare a apei din nișa cu formațiuni mucilaginose.



6.2.3. Balta cu depuneri

Apele care se drenează din sălile și galeriile cavității se scurg spre zonele cele mai joase ale acesteia, acumulându-se într-o baltă care are aproximativ formă dreptunghiulară, cu o lungime de 4m și o lățime de 2m. Adâncimea ei variază între 10 și 45 cm și este localizată în Sala 4 (Fig. 6.2.1.).

De la prima vedere se observă faptul că balta prezintă două tipuri de depuneri: depuneri roșii și depuneri albe (Fig. 6.2.3.1. a., b.).

Fig. 6.2.3.1. a. Balta cu depuneri, vedere generală; b. Depunere albă.



Capitolul 6. Siturile stabilite pentru analize.

Depunerea roșie ocupă 90-95% din suprafața bălții și se prezintă sub forma unor nori dispuși în toată masa apei, având aspect și consistență flocular-mucilaginosă. Culoarea acestei depuneri este roșie ruginie.

Depunerea albă, ocupă doar 5-10% din suprafața bălții, are aspectul unor pete cu diametrul cuprins între 20-45 cm. Culoarea este albă, alb roșcat, iar consistența este floculară, fiind mai compactă în masa apei ca cea de la depunerile roșii.

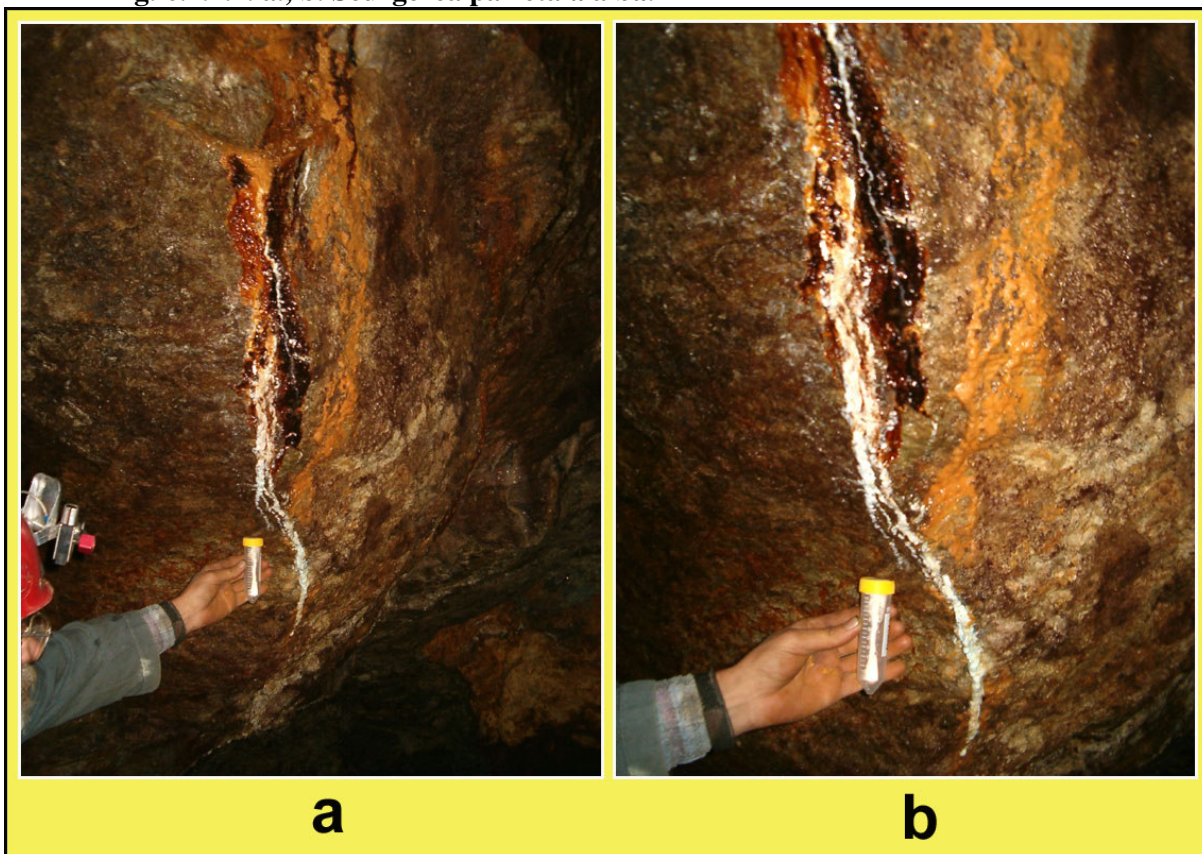
În perioadele maximelor hidrologice, are un debit de 2,5-4 L/s, iar în perioadele secetoase de 0,5-0,8 L/s. Din această baltă, apa se scurge direct în galeria descendentă finală până la galeriile cele mai inferioare total inundate.

6.2.4. Formațiuni constituite din materiale de alterare

Aceste formațiuni sunt reprezentate de o scurgere parietală și o stalactită cu depunere stalagmitică. La baza formării lor stau procesele de alterare chimice și biologice ale aluminosilicaților din roca pereților cavității Kiesberg (capitolul 11.).

Scurgerea parietală, are o lungime de aproximativ 80-100cm și o lățime de 2-15cm fiind localizată pe unul din pereții Sălii 2 (Fig. 6.2.1.). Culoarea este alb-albăstruiie, iar consistența este moale ușor granulară putând fi asemănată cu pasta de dinți (Fig. 6.2.4.1.).

Fig. 6.2.4.1. a., b. Scurgerea parietală albă.



Partea a-II-a. Zona minieră Oravița. Mina Kiesberg.

Stalactita cu depunere stalagmitică au dimensiuni mici de câțiva centimetri și se găsesc de asemenea pe unul din pereții Sălii 2., aproape de scurgerea parietală albă (Fig. 6.2.1.). Culoarea și consistența acestei formațiuni este la fel ca cea a scurgerii parietale albe (Fig. 6.2.4.2.).

Fig. 6.2.4.2. a. Stalactită albă; b. Depunere stalagmitică albă.



Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite

Capitolul 7. Analize chimice efectuate

Pentru a înțelege mecanismele biologice și ecologice care stau la baza formării diverselor tipuri de formațiuni analizate în cavitatea Kiesberg, primele analize care au trebuit efectuate au fost analizele chimice ale apei.

Probele pentru analize au fost recoltate din primele trei situri luate în studiu plus lacul care s-a format prin inundarea celor mai profunde galerii ale cavității Kiesberg. Analizele au fost efectuate în Laboratorul de Chimie a Apei de la Regionala Apele Române Timișoara.

Eșantioanele au fost recoltate în flacoane speciale și au fost aduse în laborator fiind supuse analizelor în maximum 24h de la recoltate. În analizele noastre au fost urmăriți următorii parametri: *pH, O₂ dizolvat, fosfați, azotați, sulfați, Fe total, Na, K, Cr, Cd, Ni, Pb, Zn, Mn, Cu, Ca, Mg.*

7.1. Tehnici folosite pentru analizele cantitative

Pentru determinarea acestor parametri a fost utilizată aparatură de laborator și o serie de tehnici prevăzute de staturile în vigoare din România și Uniunea Europeană. Acestea sunt: - pentru pH – *stas SR ISO 10523*, - O₂ dizolvat – *stas SREN ISO 25813*, - fosfați – *stas SREN 1189*, - azotați – *stas SR ISO 7890-1*, - Mn – *stas 8622 / 2 / 1997*, - Cr – *stas SR 9174 / 1997* și cel pentru alte metale – *stas SR ISO 8288*.

Pentru măsurarea pH-ului s-a utilizat metoda electrochimică, folosind un pH-metru cu impedanță de intrare superioară valorii de 10¹² Ω, cu dispozitiv de compensare a temperaturii și de corelație a curbei în milivolți la unitatea de pH și cu o exactitate superioară de 0,01 unități.

În cazul O₂ dizolvat a fost utilizată metoda iodochimică, metodă care este aplicabilă în toate tipurile de ape ce au o concentrație de oxigen dizolvat mai mare de 0,2mg/l până la dublul saturației de oxigen (în jur de 20 mg/L⁻¹). Principiul metodei constă în reacția oxigenului dizolvat din probă asupra hidroxidului de mangan proaspăt precipitat (format prin adăugarea hidroxidului de sodiu sau potasiu cu sulfat de mangan). Acidifierea și oxidarea iodurii de către compusul de mangan la valență superioară format cu eliberarea unei cantități echivalente de iod. Se dozează apoi cantitatea de iod eliberat prin titrare cu tiosulfat de sodiu.

Pentru fosfați s-a utilizat metoda de extracție cu solvenți și dozarea prin spectrofotometrie. Principiul metodei constă în reacția ionilor de ortofosfați cu o soluție acidă care conține ioni de molibdat și de stibiu pentru formarea unui complex fosfomolibdenic de stibiu. Complexul este redus cu acid ascorbic pentru formarea unui complex de molibden puternic colorat albastru. Ortofosfații prezenți sunt dozați prin măsurarea absorbției acestui complex. Polifosfații și compușii organofosforici trebuie transformați în ortofosfați prin hidroliză cu molibdatul. În analize a fost utilizat un spectrofotometru cu prismă cu drumul optic al cuvelor între 10 mm și 50 mm ce permite măsurarea absorbției în domeniul vizibil și infraroșu apropiat cu lungimea de undă cea mai sensibilă de 880nm.

Azotații au fost analizați tot printr-o metodă spectrometrică, care constă în reacția azotaților cu 2,6-dimetilfenol în prezența acidului sulfuric și acidului fosforic, rezultă 4-nitro-2,6-dimetilfenol. Durata reacției este de aproximativ 5 min. Se măsoară spectrometric absorbția produsului de reacție la lungimea de undă de 324nm urmată de citirea pe curba de etalonare a concentrației de azotați a probei de încercare.

Capitolul 7. Analize chimice efectuate.

Sulfatii au fost analizați prin metoda precipitării-turbidizării cu BaCl₂. Prin metoda spectrometrică, se măsoară turbiditatea la extincția 420nm, iar apoi calculele s-au făcut după metoda prevăzută în stas.

Metalele au fost analizate folosind un *spectrometru de absorbție atomică GBC 932 plus*. În analiza metalelor proba se fixează imediat după prelevare cu acid azotic (d=1.4) până la obținerea unui pH între 1 și 2. Este important să se noteze cantitatea de acid azotic adăugată pentru a se utiliza aceeași cantitate pentru prepararea probei martor. Proba martor se prepară folosind aceeași reactivi ca la proba test, dar în locul apei de analizat se folosește apa distilată. Conținutul de metal din test și martor se citește pe afișajul aparatului și se exprimă în mg/L⁻¹.

7.2. Rezultatele analizelor chimice

Rezultatele analizelor chimice cantitative realizate după metodele și stasurile expuse mai sus sunt prezentate în Tabelul 7.2.1.:

Tab. 7.2.1. Rezultatele analizelor chimice a probelor recoltate din Galeria Kiesberg Superioară.

<i>mg/L⁻¹</i>	balta	stalactite mucilaginoase	stalactite policrome	galeria inferioară
<i>pH</i>	6,09	2,81	1,21	3,01
<i>O₂ dizolvat</i>	1,20	1,61		0,20
<i>Fosfați</i>	0,0183	0,0404		0,0498
<i>Azotați</i>	0,6434	3,2673		1,4073
<i>Sulfati</i>	1273	2810,5		2066
<i>Fe total</i>	1120	80,2	>15	>12
<i>Na</i>	15	5	30	12
<i>K</i>	12	3	22	6
<i>Cr</i>	0	0	0,227	0
<i>Cd</i>	0,001	0,004	0,08	0,003
<i>Ni</i>	0,052	0,082	1,18	0,10
<i>Pb</i>	0,05	0,04	0,04	0
<i>Zn</i>	0	0,37	2,9	0,38
<i>Mn</i>	0,1	1,04	>7,2	1,3
<i>Cu</i>	0	2,5	>10	1,4
<i>Ca</i>	10,52	376,4		394,6
<i>Mg</i>	15,18	97,2		91,1

În cazul stalactitelor policrome, cantitatea de soluție de percolație care poate fi recoltată este foarte mică, prin urmare nu a fost posibilă analiza tuturor parametrilor ca în cazul celorlalte eșantioane. Din analizele chimice ale soluției de percolație din apexul stalactitelor policrome, observăm faptul că aceasta are cel mai scăzut pH (1,21) din toate eșantioanele analizate și reprezintă o soluție puternic concentrată. Această valoare a pH-ului este rezultatul oxidării sulfului elementar de către bacteriile chemolitotrofe din picătură, oxidare din care rezultă acid sulfuric (vezi

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

capitolul 11). Elementele chimice analizate se găsesc în concentrații de câteva ori mai mari decât în celelalte eșantioane. Viscositatea acestei soluții, este de asemenea de câteva ori mai mare față de celelalte eșantioane.

În analizele chimice ale apei în care se găsesc formațiunile mucilaginoase, observăm, de asemenea, un pH acid (2,81), parțial întreținut la această valoare prin formarea de acid sulfuric, ca și în cazul stalactitelor policrome, prin oxidarea sulfurului. În comparație cu celelalte eșantioane, mai observăm, în cazul stalactitelor mucilaginoase, mari cantități de sulfat ($2810,5 \text{ mg/L}^{-1}$) ceea ce arată existența unei oxidări intense a tuturor formelor de sulf redus de către bacteriile chemosintetizante ale consorțiului mucilaginos. De asemenea observăm cantități destul de mari de calciu ($376,4 \text{ mg/L}^{-1}$) și cantități de câteva ori mai mici de sodiu și potasiu față de celelalte eșantioane. Având în vedere faptul că, în preparatele de microscopie electronică, am observat existența unor mari cantități de jarosit cu potasiu și a unui carbonat de fier cu sodiu (vezi capitolele 10 și 11), putem deduce cauza acestei diferențe de concentrație a celor două elemente față de celelalte eșantioane.

În balta cu depuneri, observăm o concentrație de sulfați relativ ridicată, dar la jumătate față de celelalte eșantioane. Fierul total determinat este în concentrație de zece ori mai mare ca în celelalte eșantioane, fiind sub formă de hidroxid feric depus pe filamente spiralate de mucopolizaharide bacteriene (vezi capitolul 10).

Capitolul 8. Determinări microbiologice

8.1. Metode folosite

După stabilirea siturilor, sau stațiilor de recoltare a probelor și după efectuarea unor analize chimice cantitative și calitative, au fost recoltate probe în flacoane sterile pentru analize microbiologice. Flacoanele sterile au fost păstrate în lada frigorifică și au fost transportate în laborator în maxim 24 de ore, fiind supuse analizelor. În aceste analize microbiologice s-a urmărit izolarea pe medii de cultură specifice a diverselor grupe de microorganisme și aprecierea lor numerică, pentru a putea înțelege apoi mecanismele metabolice care stau la baza formării structurilor luate în studiu în cadrul acestei teze.

Analizele microbiologice au fost efectuate pe parcursul anilor 2004 și 2005 în două perioade distincte din punct de vedere al cantității de precipitații și deci a cantității de apă cu care a fost alimentată cavitatea: -un sezon uscat și -un sezon ploios. Astfel, în 2004 măsurătorile s-au realizat în luna martie, cu o valoare a sumei precipitațiilor de 29,9 mm (sezonul uscat) și în luna iulie, cu o valoare a sumei precipitațiilor de 141,8 mm (sezonul ploios), iar în 2005 măsurătorile s-au realizat în luna noiembrie, având o valoare a sumei precipitațiilor de 37,4 mm (sezonul uscat) și în luna aprilie având o valoare a sumei precipitațiilor de 226,4 mm (sezonul ploios).

Până în momentul de față s-a reușit analiza microbiologică a stalactitelor policrome, formațiunilor mucilaginoase și a bălții cu depuneri.

În toate siturile analizate există comunități de microorganisme, așa cum am mai precizat, care cuprind organisme din două domenii sistematice: *Eubacteria* și *Eucaria*. În cadrul acestor comunități, sunt stabilite o serie de relații ecologice importante între diversele tipuri de microorganisme, imprimând comunității anumite caracteristici. Cu excepția bălții cu depuneri unde pH-ul apei este în jurul valorii de 6, în stalactitele policrome și formațiunile mucilaginoase, microorganismele formează comunități acidofile.

În general, în cadrul populațiilor mixte de microorganisme acidofile, acestea interacționează complex între ele, interacțiunile fiind pozitive și negative. Prezența lor în mediile respective este evidențiată mai mult prin producții de metabolism -cele mai evidente fiind depunerile roșiatice bogate în Fe^{3+} . Mult mai rar, prezența microorganismelor este evidențiată prin acumularea de biomasă. În acest caz se observă formarea de macrostructuri gelatinoase -„*filamente acide*”- destul de răspândite în siturile acide (în special în cele subterane) (Johnson, 1999).

În cazul nostru, al Minei Kiesberg, prezența microorganismelor este evidențiată atât de acumulările destul de mari de biomasă (stalactitele și depunerile mucilaginoase) cât și de speleotemele cu structuri și morfologii particulare.

În Țara Galilor există o mină de pirită închisă de peste 70 de ani -*mina „Cae Coch” care este foarte asemănătoare cazului nostru*, unde biovolumul acestor filamente mucilaginoase este mult mai mare depășind $100m^3$. Acestea se prezintă sub forma unor depuneri gelatinoase mari și filamentoase situate în izvorul feruginos acid (pH 2,3) și sub formă de depuneri lungi (până la 1m) asemănătoare cu stalactitele. Comunitatea bacteriană din filamentele din Cae Coch include o varietate de bacterii fier-oxidante chemolitotrofe (*Acidithiobacillus ferrooxidans* și *Leptospirillum ferrooxidans*) și heterotrofe (*Acidiphilium sp.*). Protozoarele și rotiferele se hrănesc cu bacteriile care formează filamentele (Johnson, 1999).

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

8.1.1. Metode de izolare a microorganismelor

8.1.1.1. Metode de izolare a bacteriilor chemolitotrofe acidofile

Izolarea bacteriilor chemolitotrofe se efectuează prin inocularea mediilor nutritive cu probele corespunzătoare de minereu sau soluții (apă de mină), astfel fiind obținute *culturile îmbogățite* (Johnson, 1999).

În cazul nostru, pentru toate cele trei situri, au fost utilizate soluții pentru inoculare: picăturile rubinii din vârful stalactitelor policrome, apa cu stalactitele mucilaginoase și apa cu flocoane roșii și albe în cazul bălții cu depuneri.

Chiar dacă sunt folosite medii selective, se apelează la culturi îmbogățite ale bacteriilor izolate. Obținerea de culturi pure în cazul chemolitotrofelor prezintă cel mai adesea dificultăți (Karavaiko *et al.*, 1988).

Bacteriile chemolitotrofe acidofile prezente în eșantioanele noastre sunt reprezentate de specii ale genului *Acidithiobacillus* implicate în metabolismul sulfului și fierului.

Culturile îmbogățite s-au realizat în vase Erlenmeyer sau tuburi de sticlă, folosindu-se următoarele medii:

-mediul nutritiv steril 9K –pH 2,5 recomandat de Silverman și Lundgren (1959) **pentru izolarea lui *Acidithiobacillus ferrooxidans***. Mediul a fost folosit pentru izolarea acestuia din soluțiile rubinii din vârful stalactitelor policrome. Culturile îmbogățite pe mediul 9K au fost apoi utilizate pentru obținerea de culturi pure;

-mediul Winogradski (W_6) pentru alte ferobacterii (Winogradski, 1952) –pH 6 care se prepară astfel: $\text{-NH}_4\text{NO}_3$0,5g; NaNO_30,5g; K_2HPO_40,5g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,5g; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$0,2g; citrat feroamoniacal....10g; apă distilată....1000ml;

-mediul Starkey (S_6) pentru *Acidithiobacillus thiooxidans* (Starkey *et al.*, 1934) –pH 6 care se prepară astfel: -se dizolvă în 1000ml apă distilată următoarele ingrediente: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$0,2-0,4g; KH_2PO_43-4g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,5g; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$0,25g; $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$0,01g. Se adaugă sulf pulbere....5g sau $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$10g.

Sterilizarea ultimelor două medii se realizează la vapori deschiși timp de o oră, trei zile succesiv (sau timp de 1,5 h, 2 zile succesiv). Aceste medii au fost utilizate pentru estimările numerice și determinările de specii în funcție de pH, culturile fiind incubate la 28-30°C timp de 28 de zile (*paragraful 8.1.2.1. și 8.1.3.1.*).

Mediul 9K, (Silverman, Lundgren, 1959), folosit în special **pentru izolarea lui *Acidithiobacillus ferrooxidans*** din soluțiile rubinii din vârful stalactitelor policrome, se prepară astfel:

Soluția I: -se dizolvă în 700 ml de apă distilată următoarele ingrediente:

$\text{-(NH}_4)_2\text{SO}_4 - 3\text{g; KCl} - 0,1\text{g; K}_2\text{HPO}_4 - 0,5\text{g; MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,5\text{g; Ca(NO}_3)_2 - 0,01\text{g.}$

Soluția 2: -se dizolvă în 300 ml apă distilată următoarele ingrediente:

$\text{-FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 44,2\text{g}$ la care se adaugă 1ml din soluție 10N de acid sulfuric. În locul sulfatului feros se poate folosi de asemenea și sarea Mohr ($\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). În acest caz nu este adăugat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ci soluția este preparată astfel: - 63g sare mohr este dizolvată în 300 ml de apă distilată și se adaugă 1 ml de 10N H_2SO_4 . Această cantitate de sare Mohr corespunde la 9g/l Fe și 21,4 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Soluțiile se sterilizează separat: soluția I la 1 atm, iar soluția II la 0,5 atm. Înainte de folosire, cele două soluții se amestecă.

Vasele au fost apoi incubate la o temperatură de 30 °C până s-a observat o creștere clară. Creșterea bacteriană este stabilită prin apariția culorii brune în mediu datorită formării de săruri ferice și s-a realizat după aproximativ 28 de zile de incubare (*ANEXA I: Fig. 8.1.1.1.1.*).

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

În scopul izolării de tulpini bacteriene active în oxidarea mineralelor sulfurice, și rezistente la ioni metalici, este recomandat să se folosească drept sursă de energie minerale sulfurice în loc de sulfat feros și să se adauge ioni de metale grele mediului respectiv (Johnson, *et al.*, 1983).

Izolarea culturilor pure s-a realizat prin utilizarea mediului **9K solid** (agarizat), recomandat de Bown și Lester, 1980. Mediul 9K solid este realizat după aceeași rețetă ca și cel lichid, doar că se adaugă agar sau agaroză în concentrații scăzute (0,7%), acidithiobacilii fiind inhibați de concentrații crescute de agar. Prin urmare plăcile Petri se incubează la 28-30°C timp de 28 zile, dar cu capacul în sus, mediul fiind semisolid.

Pentru obținerea culturilor pure de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, a fost folosită metoda diluțiilor zecimale sau seriale. Din culturile îmbogățite, care după datele analitice conțin aproximativ $10^7 - 10^8$ celule/ml, 1ml se diluează de 10, 100,1 milion și 10 milioane de ori. În consecință diluțiile terminale vor conține celule izolate de chemolitotrofi. Din aceste diluții se fac practic însămânțări pe mediul solid.

Coloniile crescute pe mediul solid au culoare maron-ruginie și apar după aproximativ 28 de zile de incubare (*ANEXA I: Fig. 8.1.1.1.2.*).

Coloniile obținute au fost apoi repicate în baloane pe mediu 9K lichid, steril, pentru a obține o biomasă cât mai mare, fiind utilizate pentru determinările genetice (vezi paragraful 8.3.2.). Pentru a inhiba sau îndepărta diversele tipuri de heterotrofi care însoțesc de obicei acidithiobacilii, Johnson și Kelso (1983), recomandă adăugarea a 1-5g/l Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) la mediul 9K, ionii de cupru fiind toxici pentru aceste microorganisme.

8.1.1.2. Bacterii heterotrofe acidofile și neutrofile aere și facultativ anaerobe

Așa cum spuneam la începutul acestui capitol, în mediile acide naturale sau artificiale trăiesc Consorții de microorganisme variate din punct de vedere taxonomic și metabolic. La baza acestor Consorții stau bacteriile chemolitotrofe, pe seama lor dezvoltându-se bacterii heterotrofe acidofile și alte câteva grupe de microorganisme eucariote (protiste, ciuperci).

Pentru izolarea culturilor pure de bacterii heterotrofe acidofile și neutrofile aere și facultativ anaerobe s-au realizat la început culturi îmbogățite din cele trei eșantioane pe medii lichide. Mediile lichide utilizate au fost:

-mediul March (Wood, Kelly, 1983), pH- 2,5, **pentru microorganismele heterotrofe acidofile** diluat 1/10 și 1/100 cu următoarea compoziție: -se dizolvă în 1000ml apă distilată următoarele ingrediente: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,4g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$0,2g; KCl....0,1g; KH_2PO_40,1g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$13,9g; extract de drojdie....0,2g; FeS_22g sau sulf pulbere 5g. pH- 2,5.

-mediul G.Y.E. recomandat de Johnson (1983) la pH 3, **pentru microorganismele heterotrofe acidofile** cu următoarea compoziție: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$2g; KCl....0,1g; K_2HPO_40,1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,5g; glucoză....1g; extract de drojdie....0,1g; apă distilată....1000ml. Sterilizarea se face prin autoclavare la 121°C timp de 15 min.

-bulionul simplu la pH 6,5 **pentru bacteriile heterotrofe neutrofile aere din balta cu depuneri.**

Culturile îmbogățite de pe mediul March și G.Y.E. au fost utilizate pentru izolarea de actinomicete și fungi (paragrafele 8.1.1.3 și 8.1.1.4.).

Izolarea culturilor pure de bacterii heterotrofe neutrofile din balta cu depuneri s-a realizat prin utilizarea mediului solid **geloză simplă** folosindu-se metoda „serial and-point dilution”. Astfel au fost realizate diluții zecimale până la 10^{-8} , iar pentru fiecare diluție au fost utilizate trei repetiții (3 plăci Petri cu mediu solid geloză simplă, sterilă/fiecare diluție). Pe plăcile însămânțate cu aceste diluții, după 48-72 de ore de incubare la 28-30°C au apărut patru tipuri morfologice diferite de tulpini.

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

După morfologia externă coloniile se prezintă astfel (vezi paragraful 8.1.3.2.) (ANEXA II: Fig. 8.1.1.2.1.):

T1: -colonie crem-portocalie, netedă, mucilaginoasă-lucioasă, bombată, cu margini întregi regulate, prezentă în depunerea roșie diluția D2. (În microscopie optică – cocobacili Gram -).

T2: -colonie alb-crem-maronie, netedă, mucilaginoasă, umbonată, cu creștere concentrică, cu margini lobate, prezentă în depunerea roșie diluția D2 și depunerea albă diluțiile D2 și D4. (În microscopie optică – bacili Gram -).

T3: -colonie galben portocalie, netedă, mucilaginoasă-lucioasă, plată, cu creștere ușor invazivă pe mediu, cu margini întregi regulate, prezentă în depunerea albă diluția D2. (În microscopie optică – bacili Gram -).

T4: -colonie albă, netedă, cremoasă-mată, plată, cu margini neregulate, prezentă în depunerea albă diluția D8. (În microscopie optică – coci Gram +).

8.1.1.3. Actinomicete

Izolarea actinomicetelor s-a realizat pe mediul lichid G.Y.E. pH 3 (paragraful 8.1.1.2.) și pe mediul solid Manning pH 3.

Mediul Manning (Manning, 1975).

Soluția A: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$33,4g/l; apă distilată 300ml. pH-ul se ajustează la 2,5 cu 6M H_2SO_4 , iar sterilizarea se face prin filtrare la 0,3 atm, 30min.

Soluția B: în 550ml apă distilată se dizolvă următoarele ingrediente: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$6g; KCl....0,2g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$1g; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$0,02g. pH-ul se ajustează la 3, iar sterilizarea se face prin autoclavare la 121⁰C, 15min.

Soluția C : 70g de agar purificat L₂₈ este adăugat la 150ml apă distilată și este lăsat 15min, după care se autoclavează la 121⁰C timp de 15min.

Se combină soluțiile B și C după care se adaugă soluția A prin agitare, apoi mediul este repartizat în plăci Petri.

Inocularea mediilor s-a realizat din diluții seriale ale probelor, iar incubarea culturilor s-a făcut la 30⁰C timp de 15-20 de zile. Au fost apoi realizate aprecieri numerice prin metoda „serial and-point dilution” (calculul numărului probabil (MPN) de microorganisme), iar în cazul mediului solid metoda numărării coloniilor (paragraful 8.1.2.2.).

După incubare s-a observat creșterea actinomicetelor doar în culturile corespunzătoare formațiunilor mucilaginoase (ANEXA III: Fig. 8.1.1.3.1.).

Până la ora actuală nu am reușit să realizăm determinări de specii, realizând în cazul actinomicetelor doar determinări și aprecieri numerice pe culturi.

8.1.1.4. Fungi

Identificarea ciupercilor microscopice s-a realizat prin izolarea lor pe mediul solid Czapeck (ANEXA III: Fig.8.1.1.4.1.) pornind de la diluțiile seriale ale culturilor îmbogățite realizate din probe pe mediul lichid March (Joly, 1964; Ramirez., 1982; Raper *et al.*, 1965; Baltimore *et al.*, 1969).

Mediul Czapeck se prepară astfel: -se amestecă următoarele cantități de substanțe: - NaNO_32g; KH_2PO_41g; MgSO_40,5g; KCl....0,5g; FeSO_40,01g; glucoză....30 g; apă distilată....1000 ml; 2% agar sau cu 10% gelatină. Se sterilizează prin autoclavare la 121⁰C timp de 20 minute.

Majoritatea speciilor determinate în siturile luate de noi în studiu sunt specii relative comune în sol sau în ape cu substanțe organice în descompunere.

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

8.1.2. Metode de evaluare cantitativă

8.1.2.1. Metoda „serial and-point dilution”

Metoda „serial and-point dilution” este cea mai veche și cel mai mult folosită în laboratoare, fiind larg folosită pentru numărarea celulelor vii, atât în cazul microorganismelor autotrofe, cât și heterotrofe (Koh *et al.* 1983; Meinel, 1967).

În scopul obținerii „and point tenfold dilutions” pe parcursul înregistrării bacteriilor chemolitotrofe se impune folosirea mediului nutritiv în locul apei. Pentru numărarea bacteriilor dintr-un mililitru de soluție sau 1g de minereu, se folosesc tabele bazate pe variația metodelor statistice (Koh *et al.* 1983).

Acuratețea de calculare a numărului probabil (MPN) de celule este mai ridicată cu numărul mai mare de tuburi test inoculate (ex. de la 5 la 10) pentru fiecare diluție. În condiții de teren, mai ales, dar și în analiza curentă, nu sunt incubate mai mult de două tuburi test din fiecare diluție. Aceasta dă posibilitatea numărării celulelor bacteriene până la o anumită acuratețe a unui factor, de exemplu 10^5 , 10^6 etc. Incubarea se efectuează la temperatură optimă, iar timpul optim de incubare este stabilit experimental.

În unele cazuri, cum ar fi două specii cu proprietăți fiziologice apropiate, numărarea lor poate întâmpina dificultăți. De exemplu aceleași medii sunt folosite pentru cultivarea lui *Acidithiobacillus ferrooxidans* și *Leptospirillum ferrooxidans* sau *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* și *A. acidophilus*, etc. Prin urmare, când se numără celulele bacteriene, este necesar ca ele să fie identificate. Din această cauză probele trebuie supuse analizelor de microscopie și inoculate pe medii nutritive selective. Numărarea bacteriilor sulfat-reducătoare prin inocularea mediilor selective conduce la subestimare, una din cauze fiind capacitatea unor bacterii sulfat-reducătoare de a forma agregate care nu se disociază în celule izolate (diverse specii care formează structuri filamentoase, pachete, etc). O metodă mult mai eficientă pentru evidențierea în sursele naturale a bacteriilor sulfat-reducătoare este estimarea intensității procesului de sulfat reducere folosind $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ marcat (Romanenko, Kuznetsov, 1990).

În cazul studiului nostru, această metodă a fost utilizată pentru determinările cantitative în cazul chemolitotrofilor. Prin urmare, probele au fost inoculate pe mediile **9K**, **S₅** și **S₆** cât și pe mediul **W₆** (paragraful 8.1.1.1.), iar pe culturile obținute s-au făcut atât determinări de pH cât și analize și determinări numerice.

Din probele luate în studiu se realizează diluții seriale, sau zecimale, care se inoculează în tuburi ce conțin cele două medii sterile. Tuburile sunt de 50 ml iar mediu se pune 10ml. Pentru o cât mai corectă interpretare statistică pentru fiecare diluție se utilizează trei tuburi (trei repetiții). În cazul cercetărilor noastre, au fost realizate diluții până la 10^7 pentru fiecare diluție fiind utilizate trei repetiții.

Tuburile sunt incubate la 28-30°C timp de 28 de zile, după care se observă tuburile pozitive, adică acele tuburi în care au crescut tiobacili după culoarea roșie rubinie a culturii. Aceste date sunt utilizate pentru determinările numerice folosind Tabelul 8.1.2.1.1. din ANEXA IV (Rodina, 1972).

Din tuburile pozitive s-au realizat măsurători de pH pentru determinarea speciilor de tiobacili. Măsurătorile de pH s-au realizat cu un pH-metru de laborator (capitolul 7).

8.1.2.2. Metoda numărării coloniilor bacteriene. Metoda plăcilor turnate (bacteriile heterotrofe care se dezvoltă la 37°C) (Cușa, 1996, STAS 3001/91)

Coloniile bacteriene sunt obținute prin inocularea mediului solid. În consecință principiul utilizat în această metodă este că numărul optim de colonii estimate pe placă este între 30-100. Limita minimă este fixată pentru acuratețea statistică, iar cea maximă pentru a evita suprapunerea coloniilor.

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

Numărul bacteriilor din eșantioane (apă, probe de minereu) este de obicei necunoscut, prin urmare sunt preparate diluții seriale înaintea inoculărilor pe mediul solid. Din diluții se iau 0,1ml care se transferă pe suprafața mediului solid în plăci Petri. Astfel pe suprafața mediului solid (geloză simplă) vor fi practic două-trei picături de inocul, care vor fi răspândite pe suprafața mediului cu ajutorul unei spatule sterile. Plăcile vor fi incubate la termostat la temperatura optimă (la 37°C timp de 48 ore). După perioada de incubare și apariția coloniilor acestea sunt numărate, iar acest număr este înmulțit cu numărul diluției.

$$\text{Numărul total de bacterii mezofile(UFC/ml)} = \Sigma (n \times d) / N \times V$$

unde : n – numărul de colonii ce s-au dezvoltat într-o cutie Petri ;

d – inversul diluției probei însămânțate ;

N – numărul de cutii Petri luate în calcul ;

V – volumul probei luate în lucru, în ml (Drăgan-Bularda, 2000, STAS 3001/91).

Pentru numărarea celulelor de *A. ferrooxidans* (O., H., Touvinen, D., P., Kelly, 1972) mediul solid este preparat prin amestecul de 0,06 N H₂SO₄ care conține (g/l): - K₂HPO₄ – 0,8g; MgSO₄ · 7H₂O – 0,8g; (NH₄)₂SO₄ – 0,8g; FeSO₄ · 7H₂O – 66,6g cu un volum egal de apă care conține agar sau agaroză în concentrație de 0,2-0,3%. Două părți din mediu sunt autoclavate separat la 5psi timp de 10min. Volumul este turnat în plăci Petri sterile, pH-ul inițial al mediului solid fiind 1,5. Diluțiile zecimale din cultura lichidă de *A. ferrooxidans* se fac în 0,01N H₂SO₄.

8.1.3. Metode de evaluare calitativă

8.1.3.1. Determinarea indirectă a speciilor de *Acidithiobacillus* prin măsurarea pH-ului culturilor

Diversele specii de *Acidithiobacillus* au fost supuse unor serii îndelungate de teste între 1966-1969, în urma cărora a fost posibilă stabilirea unei metode de determinare a speciilor în funcție de pH-ul culturilor (Hutchinson *et al.*, 1969). În urma acestor teste a fost posibilă și stabilirea numărului probabil de microorganisme după frecvența tuburilor pozitive (cu plaja de pH caracteristică unei anumite specii) pentru fiecare diluție în parte. În funcție de caracteristicile metabolice, tulpinile luate în acest studiu au fost clasificate pe grupe. Pentru stabilirea acestor grupe testele realizate pe tulpini au fost multiple: creșterea pe diverse concentrații de sulf, Fe²⁺, tioacetamidă, hidrogen sulfurat, diverse concentrații de agar, utilizarea citratului, depuneri de sulf pe marginile coloniilor, comportarea față de unii inhibitori, etc.

Identificarea unei tulpini necunoscute de *Acidithiobacillus* (Phylum: *Proteobacteria*; Clasa: *Gamoproteobacteria*; Ordinul: *Acidithiobacillales*; Familia: *Acidithiobacillaceae*) (Garrity, *et al.*, 2004)

Așa cum am precizat mai sus, eșantioanele noastre au fost însămânțate pe mediile **9K**, **S₅** și **S₆** cât și pe mediul **W₆** pentru a se determina valoarea pH-ului pentru teste. Experiența a arătat că este necesar să se treacă tulpinile ferooxidante, suspecte de a fi acidithiobacili, printr-un mediu cu sulf, înainte de a le testa în tiosulfat.

Creșterea este determinată prin cantitatea de tiosulfat oxidat și de valoarea pH-ului după 28 de zile (ANEXA V: Tabelul 8.1.3.1.1.).

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

8.1.3.2. Determinări genetice

Determinări genetice au fost realizate la Laboratorul de Bacteriologie de la Facultatea de Medicină a Universității François Rabelais din Tours, pe trei tulpini de *Acidithiobacillus* izolate din picăturile stalactitelor policrome și respectiv pe cele patru tulpini de bacterii heterotrofe neutrofile izolate din balta cu depuneri.

Izolarea tulpinilor de *Acidithiobacillus* s-a realizat pe mediul solid 9K pe care s-au obținut colonii caracteristice după 28 de zile, care apoi au fost din nou transferate pe mediul 9K lichid pentru o sporire de biomasă. Pentru determinările genetice au fost deci folosite cele trei tulpini izolate pe mediul 9K lichid după o incubare la 30°C timp de 28 de zile.

Tulpinile de bacterii heterotrofe neutrofile au fost izolate în culturi pure pe mediul geloză simplă pornind de la culturi pe bulion lichid. În determinările genetice au fost utilizate coloniile caracteristice fiecărei tulpini.

Metoda de lucru utilizată de noi în determinările genetice a fost cea clasică, des utilizată astăzi în laboratoarele de genetică bacteriană (Rådström *et al.*, 1994).

A. Principiul metodei

În această metodă descriem modalitățile de extracție a ADN-ului pornind de la culturi bacteriene, seruri sau lichide biologice (lichid cefalo-rahidian, articulare) cu kitul Invisorb Spin Cell Mini.

Metoda de extracție se bazează pe captarea ADN-ului pe nanoparticule minerale optimizate.

B. Materiale necesare

Kit Invisorb Spin Cell Mini, reactivi ca: Lysis Buffer D (LBD), Carrier Suspension B (CSB), Binding Buffer HL (BBHL), Wash Buffer (WB), Elution Buffer D (EBD), centrifugă pentru microtuburi, bloc încălzire tuburi, microtuburi, micropipete.

C. Extracția ADN-ului

În cadrul cercetărilor noastre, așa cum am precizat mai sus, s-a pornit de la coloniile bacteriene (heterotrofii neutrofilii) și de la culturi pure pe mediul lichid 9K (chemolitotrofi acidofili).

a. Pregătirea eșantioanelor și extracția

Tamponul de eluție se incubează la 70°C (în blocul de încălzire pentru tuburi).

Operațiunile viitoare se realizează în condiții sterile într-o nișă de însămânțare, astfel se lucrează cu mănuși sterile și se sterilizează bine cu alcool masa de lucru și pipetele.

Liza bacteriană se efectuează cu Lysis Buffer D. În cazul în care sunt observate precipitate în Lysis Buffer D, se incubează într-o baie de apă la 50°C. Astfel, în microtuburi de 1,5ml, care se notează, se pune în suspensie 1μl de colonie bacteriană (neapărat cultură pură) în 500μl apă sterilă până la obținerea unei suspensii dense. Într-un alt microtub de 1,5ml, notat în prealabil se pun 100μl din suspensia realizată la care se adaugă 500μl de Lysis Buffer D bine omogenizat în prealabil. Amestecul este incubat timp de 10 min la temperatura camerei, agitându-se din când în când pentru o mai bună eficiență a lizei peretelui bacterian. După acest interval se adaugă 10μl de Carrier Suspension B care în prealabil a fost bine agitat într-un agitator tip „vortex”. Se mai adaugă de asemenea și 200μl de Binding Buffer HL după care se agită bine în același agitator pentru tuburi. Incubarea EBD-ului se face la 70°C.

b. Captarea ADN-ului și purificarea

Suspensia se transferă într-o coloană filtrantă introdusă într-un microtub de 2ml, după care tubul se acoperă cu capacul. Tubul acoperit se incubează 2 minute la temperatura camerei, după care se centrifughează 3 minute la 12 000 rpm. Se elimină apoi filtratul, păstrându-se tubul rezervor care va servi pentru spălările viitoare).

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

În continuare, se adaugă 550µl de Wash Buffer în coloana filtrantă și se centrifughează 1 minut la 12 000rpm. Se îndepărtează filtratul (păstrându-se tubul rezervor), după care se centrifughează timp de 3 minute la 12 000rpm pentru eliminarea etanolului rezidual.

c. Eluția

Eluția reprezintă repunerea în suspensie a ADN-ului în vederea izolării. Coloana filtrantă se transferă într-un nou microtub de 1,5ml care a fost notat în prealabil. Se adaugă 100 µl de Elution Buffer D (EBD) care în prealabil a fost încălzit la 70°C și se incubează 2 minute la temperatura camerei.

După incubare se centrifughează 2 minute la 9000rpm pentru eluarea ADN-ului (50-100 µl de ADN sunt recuperați).

D. Conservarea ADN-ului extras

În cazul în care ADN-ul extras nu va fi utilizat imediat, va trebui conservat la congelator la -20°C. Pentru a se evita orice confuzie tubul trebuie în prealabil foarte bine notat și identificat. În unele cazuri pentru siguranță și în vederea unei utilizări ulterioare, împreună cu tubul cu ADN se păstrează și suspensia bacteriană în aceleași condiții.

E. PCR

PCR-ul a fost realizat folosind amorsa EUB 1492R, iar talia fragmentelor de restricție a fost 1057 pb.

Tab. 8.1.3.2.1. Parametrii PCR-ului.

Mix	Conc. finală	Volume per tub în µl	volume pentru eşant. ...
Apă		7.55	
dNTP 1mM	0,2mM	5	
tampon MgCl ₂ 10X	1X	2.5	
MgCl ₂ 25mM	1,5mM	1.5	
amorsă sens (10µM)	0,5 µM	1.25	
amorsă anti-sens (10 µM)	0,5 µM	1.25	
ampliTaq polym 5U/µl	2.5 U	0.2	
DMSO		0.75	
ADN extras		5	
Volum total		20	

Migrarea s-a realizat pe gel de agaroză la 1%, durată de 1 h la 110 V.

Ciclurile au fost: 94°C.....5'

30 cicluri 94°C.....30''

gradient de 48°C la 60°C.....30''

72°C.....1'

Rezultatele obținute:

-toate variantele de amorse, încercate de noi în cazul tulpinilor de acidithiobacili izolați din stalactitele policrome nu au dat rezultate satisfăcătoare, deci încercările vor trebui reluate cu alte amorse.

- **T₁** este reprezentat de *Flexibacter sancti* (Phylum: Firmicutes; Clasa: Sphingobacteria; Ordinul: Sphingobacteriales; Familia: Flexibacteraceae) (Garrity, et al., 2004) tulpina: IFO 16033.

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

- T_2 este reprezentat de *Acidovorax delafieldii* (Phylum: *Proteobacteria*; Clasa: *Betaproteobacteria*; Ordinul: *Burkholderiales*; Familia: *Comamonadaceae*) (Garrity, et al., 2004) tulpina: DSM 50263.

- T_3 *Chryseobacterium gleum* (Phylum: *Bacteroidetes*; Clasa: *Flavobacteria*; Ordinul: *Flavobacteriales*; Familia: *Flavobacteriaceae*) (Garrity, et al., 2004) tulpina: CCUG 14555.

- T_4 *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (Phylum: *Firmicutes*; Clasa: *Bacilli*; Ordinul: *Bacillales*; Familia: *Staphylococaceae*) (Garrity, et al., 2004), tulpina NCTC 8325.

8.1.4. Metode pentru analize statistice

Datorită faptului că datele obținute în urma analizelor microbiologice sunt relativ disparate și au un anumit grad de heterogenitate, se impune folosirea unor programe pentru analizele statistice, putându-se apoi trage o serie de concluzii. Astfel atunci când obținem șiruri de date, se pot evidenția: valorile extreme (minime și maxime), media aritmetică, deviația standard, eroarea standard de la medie, diverse corelații între șiruri diferite de date. Acestea, asociate cu grafice arată dominanța unor grupe, sau specii de microorganisme față de altele, gradul de sensibilitate a speciilor față de anumiți factori de mediu etc.

Valorile extreme (maximă și minimă) reprezintă limitele în care se încadrează rezultatele obținute în urma analizelor microbiologice. Distanța între valoarea cea mai mică și cea mai mare se numește *amplitudinea variației*. Acest indice însă, prezintă o serie de dezavantaje. Astfel, fiind calculat din cele două valori extreme depinde mult de întâmplare și nu reflectă împrăștierea celorlalte valori ale șirului. În afară de aceasta, valoarea sa crește sensibil în raport cu sporirea numărului de observații. Din aceste motive utilizarea lui este redusă (Ceapoiu, 1968).

Media aritmetică, este cea mai des utilizată și reprezintă valoarea medie a măsurătorilor efectuate, fiind exprimată de poziția centrului distribuției, care pe un grafic este localizată în vârful curbei de distribuție. Formula după care poate fi calculată media aritmetică este (Ceapoiu, 1968):

$$\bar{X} = \sum X_i / N$$

unde: X_i = valorile măsurătorilor individuale,

N = numărul valorilor individuale.

Întinderea distribuției este descrisă de **derivația standard (S sau σ) sau abaterea standard**, care pe un grafic ar corespunde distanței de la vârful curbei de distribuție la punctul de inflexiune al curbei. Această derivație standard este o măsură a cât de mult diferă punctele de medie. În prima etapă se calculează varianța populației (V) care este valoarea medie a pătratului distanței fiecărui punct față de medie. Varianța este deci egală cu suma pătratelor raportată la numărul de determinări (Mărușteri, 2006; Ciulca, 2006):

$$V = \frac{\sum (X_i - y)^2}{N}$$

y = media aritmetică.

Pentru a calcula derivația standard se scoate rădăcina pătrată a acestei valori, exprimată în aceleași unități ca și media. Matematic derivația standard σ este:

$$S \text{ sau } \sigma = \sqrt{\frac{\sum (X_i - y)^2}{N}}$$

Pentru a exprima derivația standard se împarte la $N-1$ și atunci formula devine:

$$S \text{ sau } \sigma = \sqrt{\frac{\sum (X_i - y)^2}{N - 1}}$$

Abaterea pătratică este un indicator care arată dispersia valorilor unui parametru, fiind de fapt rădăcina pătrată a unei variații unui șir de date. O abatere mică dovedește o dispersie strânsă

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

în jurul mediei, în timp ce o abatere standard mare este rezultatul unei împrăștieri mari (Ceapoiu, 1968; Ciulca, 2006).

Abaterea standard fiind o măsură absolută a dispersiei nu permite compararea a două sau mai multe distribuții de frecvențe în ceea ce privește variația lor. Astfel, distribuțiile alcătuite din valori mari au abaterea standard mare, iar distribuțiile formate din valori mici au abaterea standard mică. Este greșit însă să tragem concluzia că primele au o dispersie mai mare decât ultimele. Comparația este însă perfect posibilă dacă recurgem la *coeficientul de variație s%* (sau *v* sau *C.V.*) propus de Pearson, care nu este altceva decât raportul dintre abaterea standard și media aritmetică (N. Ceapoiu, 1968).

$$s\% = S/y$$

sau abaterea standard exprimată în procente din media aritmetică (abaterea standard relativă).

$$s\% = S \cdot 100/y$$

Eroarea standard a mediei (ES) este o măsură a cât de mult mediile eșantioanelor ar diferi în medie față de media determinărilor. La fel ca și derivația standard, eroarea standard este distanța față de centrul curbei de distribuție a punctului de inflexiune al curbei. Formula după care poate fi determinată eroarea standard a mediei este:

$$ES = \sigma / \sqrt{N}$$

unde σ este derivația standard, iar N numărul de determinări din eșantion. De remarcat că odată cu creșterea mărimii eșantionului, scade eroarea standard (Ennos, 2000).

Calcululele statistice se aplică în cazul determinărilor de date deoarece pot interveni erori de determinare. Aceste calculule sunt complexe, dar astăzi ele pot fi realizate cu ajutorul unor pachete de programe statistice disponibile pe calculator, precum MINITAB, SPSS și EXCEL. Rezultatele obținute în urma determinărilor se introduc în program și calculatorul va calcula totul. Utilizarea unui astfel de program prezintă 2 avantaje: calculatorul execută calcululele mult mai rapid și rezultatele pot fi salvate pentru alte analize (Gopal, 1993).

Pentru a aprecia relațiile care apar între parametrii microbiologici și fizico-chimici au fost efectuate teste de semnificație între factorii abiotici (cantitatea de precipitații, respectiv cantitatea de apă) și densitățile bacteriene obținute. În acest sens, s-a folosit testul coeficientului de corelație.

Analizele statistice au fost determinate pentru fiecare eșantion, pe cele două sezoane analizate: uscat și ploios.

Pentru a stabili magnitudinea corelațiilor dintre aceste date și pentru a vedea dacă acestea sunt pozitive sau negative, se calculează coeficientul de corelație (r). Statistica matematică descrie un test cu ajutorul căruia se poate verifica dacă există o legătură funcțională între două caractere cantitative. În cazul existenței unei corelații între două caractere (legătură funcțională), rezultatele se așează în graficul cartezian de-a lungul unei drepte. Pentru fiecare valoare a lui x există o valoare a lui y , iar în final, se obține dreapta de regresie care exprimă legătura dintre cele două caractere (Mărușteri, 2006).

Bravais și Pearson au propus un coeficient de corelație liniară bazat pe variabilitățile lui x și y și pe principiul celor mai mici pătrate; acest coeficient poate indica existența (ipoteza nulă) unei corelații între două variabile x și y . Formulele de calcul ale coeficientului de corelație „ r ” diferă, după notațiile diferiților autori. În practică, se folosește formula de mai jos, care se poate aplica la eșantioane reduse ($n < 50$) (Ciulca, 2006):

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \times \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

Valoarea lui "r" este întotdeauna cuprinsă între -1 și +1. Dacă proprietățile x și y nu sunt corelate, $r = 0$. Dacă $r > 0$, înseamnă că există o legătură funcțională directă între cele două variabile. Cu cât r este mai aproape de 1, cu atât corelația este mai bună. Când $r = 1$, apare o singură dreaptă de regresie teoretică. Când $r < 0$, există o legătură funcțională de sens invers, cu alte cuvinte, când valorile unei variabile cresc, valorile celeilalte scad. Acest test este folositor pentru stabilirea unor legături funcționale între două variabile, a stării de dependență sau de independență între cele două variabile x și y.

După calcularea coeficienților de corelație, aprecierea confidenței se face în funcție de numărul de parametri corelați (*Anexa VI: Tabelul 8.1.4.1.; 8.1.4.2.*). La început se calculează gradele de libertate $GL = n - 2$ (unde n este numărul de parametri corelați). Pragul de eroare care, în general, poate fi asumat având diferență semnificativă este p sau $\alpha = 5\%$.

Limitele de eroare reprezintă intervalul în care se poate prevedea că se găsește valoarea unei medii; intervalul respectiv se numește *interval de încredere*. Limitele de eroare sunt, în general, proporționale cu valoarea mediei și pot fi exprimate ca procente ale acestei medii. De regulă, în determinări biologice, limitele de eroare se calculează la o probabilitate $p = 5\%$. *Gradele de libertate* reprezintă, în cazul determinărilor biologice, numărul mărimilor independente (determinări, observații) folosite pentru experimentarea respectivă, din care se scade două unități (Ciulca, 2006).

8.2. Datele obținute. Interpretarea rezultatelor

După cum am precizat deja, analize microbiologice au fost realizate în anii 2004 și 2005 în două perioade diferite din punct de vedere hidrologic, adică într-o perioadă cu precipitații crescute (2004 luna iulie – 141,8 mm iar în 2005 luna aprilie – 226,4 mm) și deci cu o cantitate mare de apă în cavitate –sezon ploios- și alta cu precipitații scăzute (2004 luna martie – 29,9 mm iar în 2005 luna noiembrie – 37,4 mm), deci cantități mici de apă în cavitate –sezon uscat. Din punct de vedere hidric, cei doi ani, 2004 și 2005, prezintă unele diferențe, astfel suma precipitațiilor pe tot anul 2004 a fost de 875 mm în timp ce suma precipitațiilor pe 2005 a fost de 1202,2 mm. Astfel, observăm faptul că anul 2005 a fost semnificativ mai bogat în precipitații decât 2004.

8.2.1. Stalactitele policrome

În cazul stalactitelor policrome, în flacoane sterile, ca eșantioane de analiză, s-au izolat picături din vârful formațiunilor.

În anul 2004: -speciile determinate și numărul cel mai probabil al acestora (nr. de celule/ml de apă) sunt prezentate în *Tabelul 8.2.1.1.*

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

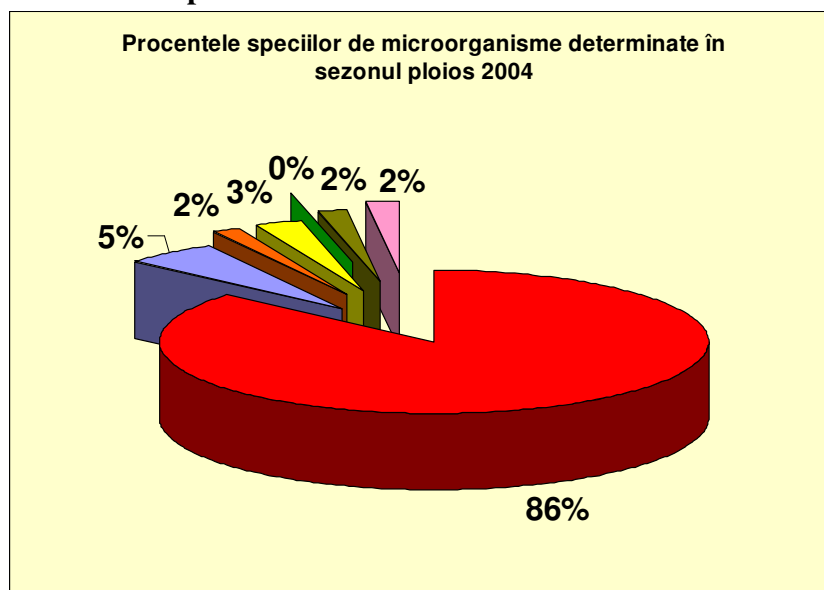
Tabelul 8.2.1.1. Numărul cel mai probabil de microorganisme, în anul 2004, în stalactitele policrome.

Specia	2004		amplitudinea variației (nr.celule/ml)
	Ploios (nr.celule/ml)	Uscat (nr.celule/ml)	
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	9500	4500	5000
<i>Penicillium expansum</i>	600	500	100
<i>Penicillium cyclopium</i>	200	150	50
<i>Penicillium frequentans</i>	300	200	100
<i>Penicillium griseo-azureum</i>	0	200	200
<i>Penicillium citreo-viride</i>	200	0	200
<i>Penicillium lividum</i>	200	200	0

În Tabelul 8.2.1.1. observăm faptul că, în picăturile din vârful stalactitelor policrome, au fost determinate șapte specii de microorganisme. Din acestea, *Acidithiobacillus ferrooxidans* este singura specie bacteriană, fiind o bacterie chemolitotrofă (capitolul 1.) ce realizează oxidarea piritei, a Fe^{2+} și a compușilor cu sulf (rezultați din oxidarea piritei), asigurând producția primară de substanță organică în cadrul consorțiului stalactitelor policrome (vezi capitolul 11.). Restul speciilor determinate sunt reprezentate de șase specii de fungi din genul *Penicillium*, care sunt microorganisme heterotrofe acidofile toate făcând parte din Familia *Moniliaceae*.

Procentele speciilor determinate în cele două sezoane, ploios și uscat, pe anul 2004, sunt prezentate în Figurile 8.2.1.1.; 8.2.1.2.

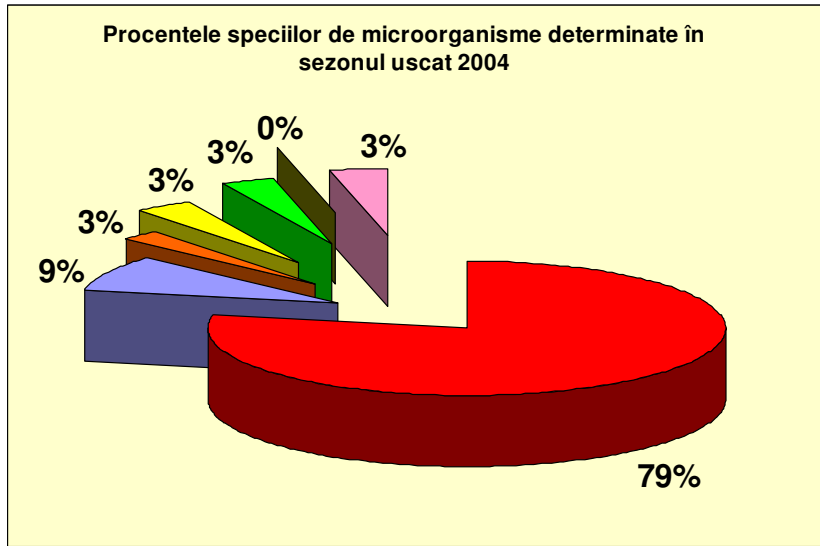
Fig. 8.2.1.1. Procentele speciilor de microorganisme determinate în sezonul ploios 2004, în stalactitele policrome.



1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*; 2. *Penicillium expansum*; 3. *P. cyclopium*; 4. *P. frequentans*; 5. *P. griseo-azureum*; 6. *P. citreo-viride*; 7. *P. lividum*.

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

Fig. 8.2.1.2. Procentele speciilor de microorganisme determinate în sezonul uscat 2004 în stalactitele policrome.

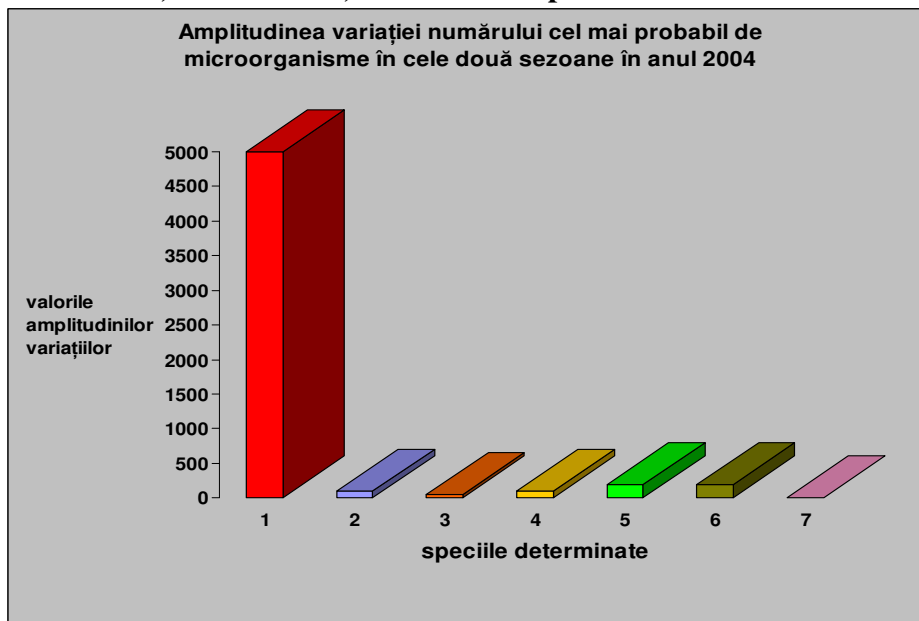


1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*; 2. *Penicillium expansum*; 3. *P. cyclopium*; 4. *P. frequentans*; 5. *P. griseo-azureum*; 6. *P. citreo-viride*; 7. *P. lividum*.

În figurile 8.2.1.1.; 8.2.1.2. se observă o dominație netă, în ambele sezoane, a speciei *Acidithiobacillus ferrooxidans*, ce se găsește în proporție de aproximativ 80%, restul de aproximativ 20% fiind reprezentat de microorganismele heterotrofe reprezentate prin cele șase specii de *Penicillium*.

Amplitudinea variației numărului de microorganisme, de la un sezon la altul, în 2004 (Tabelul 8.2.1.1.) este prezentată în Figura 8.2.1.3.

Fig. 8.2.1.3. Amplitudinea variației numărului cel mai probabil de microorganisme, de la un sezon la altul, în anul 2004, în stalactitele policrome.



1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*; 2. *Penicillium expansum*; 3. *P. cyclopium*; 4. *P. frequentans*; 5. *P. griseo-azureum*; 6. *P. citreo-viride*; 7. *P. lividum*.

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

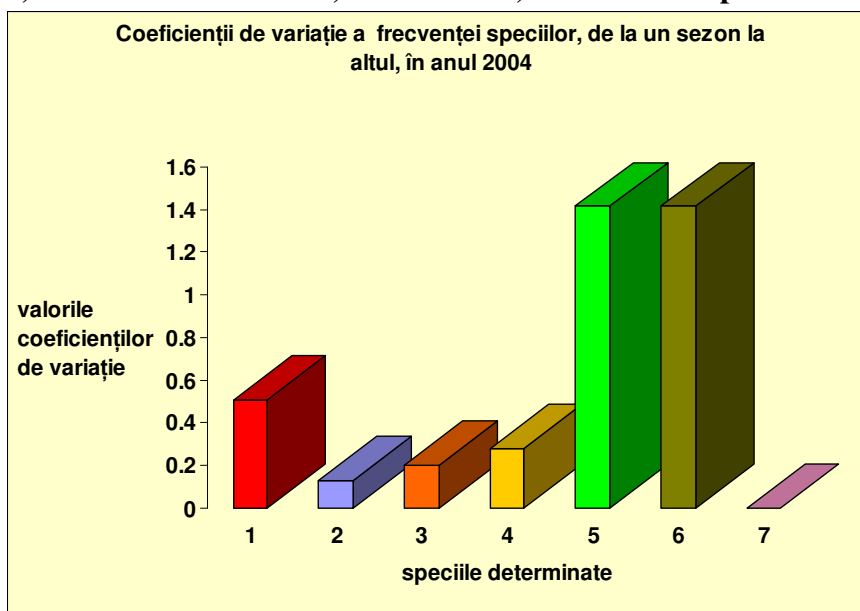
În figura 8.2.1.3. observăm, că de la sezonul ploios la cel secetos, cea mai mare variație a numărului de celule/ml de apă o prezintă *A. ferrooxidans*. Alte specii ce prezintă variații sunt *Penicillium griseo-azureum* și *Penicillium citreo-viride*, restul speciilor înregistrând variații destul de mici. *P. lividum* nu prezintă nici o variație.

Pentru a observa, care dintre speciile determinate suferă variații mai drastice de frecvență de la un sezon la altul, au fost calculați o serie de parametri ca: media aritmetică, derivația standard (DS), eroarea standard (ES), iar pe seama acestora s-au calculat coeficienții de variație (vezi paragraful 8.1.4.) (Tabelul 8.2.1.2., Fig. 8.2.1.4.).

Tabelul 8.2.1.2. Media aritmetică, eroarea standard a mediei (ES), derivația standard (DS) și coeficienții de variație a speciilor pe anul 2004, în stalactitele policrome.

Specia	2004				coeficienții de variație
	Ploios (nr.celule/ml)	Uscat (nr.celule/ml)	media ± ES	DS	
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	9500	4500	7000±2500	3535,53	0,50
<i>Penicillium expansum</i>	600	500	550±50	70,71	0,12
<i>Penicillium cyclopium</i>	200	150	175±25	35,35	0,20
<i>Penicillium frequentans</i>	300	200	250±50	70,71	0,28
<i>Penicillium griseo-azureum</i>	0	200	100±100	141,42	1,41
<i>Penicillium citreo-viride</i>	200	0	100±100	141,42	1,41
<i>Penicillium lividum</i>	200	200	200±0	0	0

Fig. 8.2.1.4. Reprezentarea grafică a coeficienților de variație a speciilor de microorganismе, de la un sezon la altul, în anul 2004, în stalactitele policrome.



1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*; 2. *Penicillium expansum*; 3. *P. cyclopium*; 4. *P. frequentans*; 5. *P. griseo-azureum*; 6. *P. citreo-viride*; 7. *P. lividum*.

În figura 8.2.1.4. observăm, că de la sezonul ploios la cel secetos, cele mai drastice variații ale distribuțiilor frecvențelor le înregistrează *Penicillium griseo-azureum* și *Penicillium citreo-viride*. Prima, din aceste două specii, în sezonul ploios practic nu a fost identificată, iar a doua în

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

sezonul secetos nu a fost identificată (Tabelul 8.2.1.2.). *Penicillium lividum* este singura specie care nu prezintă variații de frecvență în cele două sezoane.

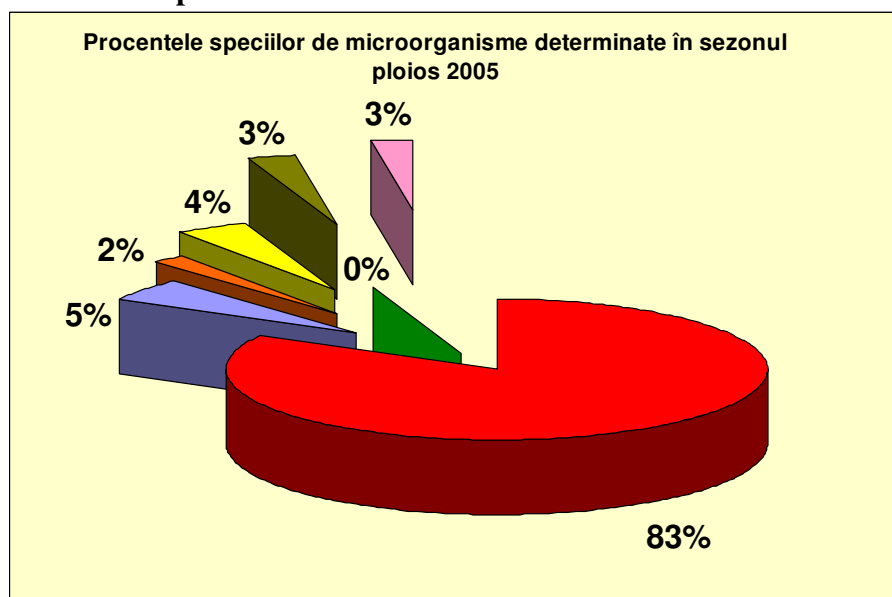
În anul 2005: -speciile determinate și numărul cel mai probabil al acestora sunt prezentate în Tabelul 8.2.1.3.

Tabelul 8.2.1.3. Numărul cel mai probabil de microorganisme, în anul 2005, în stalactitele policrome.

Specia	2005		amplitudinea variației (nr.cel./ml)
	Ploios (nr.cel./ml)	Uscat (nr.cel./ml)	
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	9500	8000	1500
<i>Penicillium expansum</i>	600	600	0
<i>Penicillium cyclopium</i>	250	150	100
<i>Penicillium frequentans</i>	500	300	200
<i>Penicillium griseo-azureum</i>	0	200	200
<i>Penicillium citreo-viride</i>	300	200	100
<i>Penicillium lividum</i>	300	300	0

În anul 2005 au fost determinate aceleași specii de microorganisme ca și în 2004, iar procentele acestora în cele două sezoane, ploios și uscat, sunt prezentate în Figurile 8.2.1.5.; 8.2.1.6.

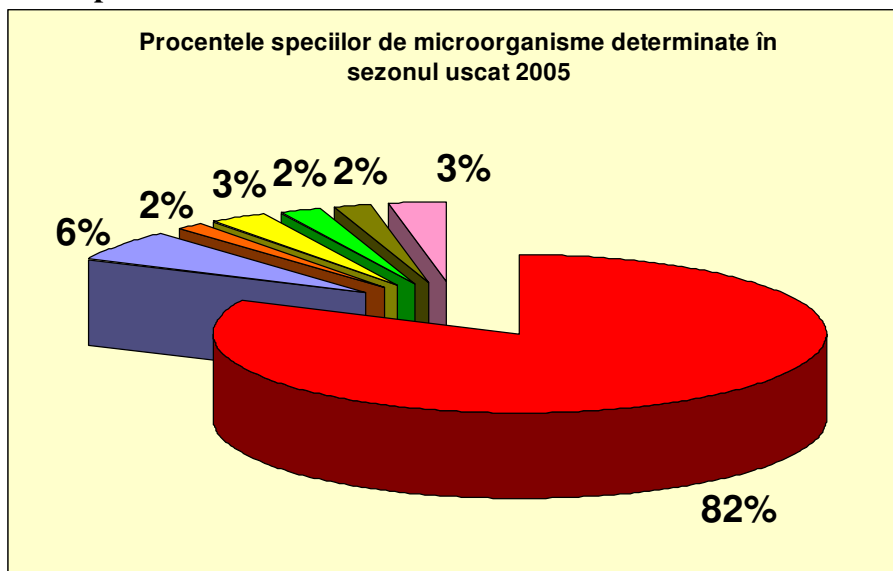
Fig. 8.2.1.5. Procentele speciilor de microorganisme determinate în sezonul ploios 2005, în stalactitele policrome.



1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*; 2. *Penicillium expansum*; 3. *P. cyclopium*; 4. *P. frequentans*; 5. *P. griseo-azureum*; 6. *P. citreo-viride*; 7. *P. lividum*.

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

Fig. 8.2.1.6. Procentele speciilor de microorganisme determinate în sezonul uscat 2005, în stalactitele policrome.

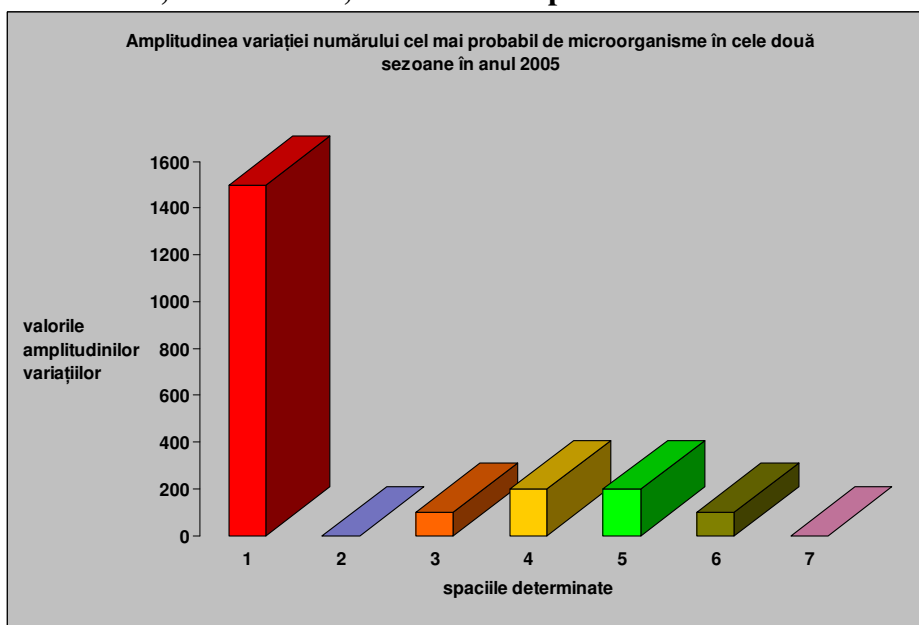


1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*; 2. *Penicillium expansum*; 3. *P. cyclopium*; 4. *P. frequentans*; 5. *P. griseo-azureum*; 6. *P. citreo-viride*; 7. *P. lividum*.

La fel ca în 2004, și în anul 2005, în figurile 8.2.1.5.; 8.2.1.6., se observă o dominație netă, în ambele sezoane, a speciei *Acidithiobacillus ferrooxidans*, ce se găsește în proporție de peste 80%, restul fiind reprezentat de cele șase specii de *Penicillium*, ca microorganisme heterotrofe.

Amplitudinea variației numărului de microorganisme de la un sezon la altul, în anul 2005 (Tabelul 8.2.1.3.) este prezentată în Figura 8.2.1.7.

Fig. 8.2.1.7. Amplitudinea variației numărului cel mai probabil de microorganisme, de la un sezon la altul, în anul 2005, în stalactitele policrome.



1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*; 2. *Penicillium expansum*; 3. *P. cyclopium*; 4. *P. frequentans*; 5. *P. griseo-azureum*; 6. *P. citreo-viride*; 7. *P. lividum*.

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

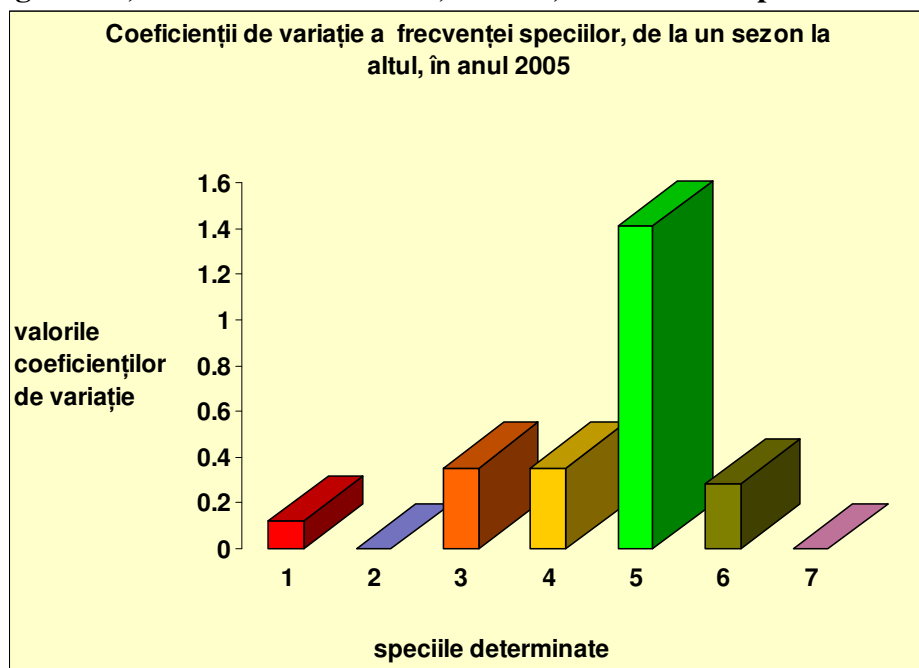
În figura 8.2.1.7. observăm, că de la sezonul ploios la cel secetos, cea mai mare variație a numărului de celule/ml de apă o prezintă *A. ferrooxidans*, la fel ca și în anul 2004. Alte specii ce prezintă variații mai semnificative sunt *P. frequentans* și *P. griseo-azureum*, iar într-o măsură mai mică *P. cyclopium* și *P. citreo-viride*. De la un sezon la altul, în 2005, *P. expansum* și *P. lividum* nu au înregistrat variații numerice.

Pentru variațiile de frecvență, de la un sezon la altul, s-au calculat coeficienții de variație (Tabelul 8.2.1.5., Fig. 8.2.1.8.), pe seama mediei aritmetice și derivația standard (DS).

Tabelul 8.2.1.4. Media aritmetică, eroarea standard a mediei (ES), derivația standard (DS) și coeficienții de variație a speciilor pe anul 2005, în stalactitele policrome.

Specia	2005				coeficientul de variație
	Ploios (nr.celule/ml)	Uscat (nr.celule/ml)	media ± ES	DS	
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	9500	8000	8750±750	1060,66	0,12
<i>Penicillium expansum</i>	600	600	600±0	0	0
<i>Penicillium cyclopium</i>	250	150	200±50	70,71	0,35
<i>Penicillium frequentans</i>	500	300	400±100	141,42	0,35
<i>Penicillium griseo-azureum</i>	0	200	100±100	141,42	1,41
<i>Penicillium citreo-viride</i>	300	200	250±50	70,71	0,28
<i>Penicillium lividum</i>	300	300	300±0	0	0

Fig. 8.2.1.8. Reprezentarea grafică a coeficienților de variație a speciilor de microorganisme, de la un sezon la altul, în 2005, în stalactitele policrome.



1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*; 2. *Penicillium expansum*; 3. *P. cyclopium*; 4. *P. frequentans*; 5. *P. griseo-azureum*; 6. *P. citreo-viride*; 7. *P. lividum*.

În figura 8.2.1.8. observăm, că de la sezonul ploios la cel secetos, cele mai mari variații ale distribuțiilor frecvențelor le înregistrează *Penicillium griseo-azureum*. Variații mai semnificative ale frecvenței le înregistrează și *P. cyclopium*, *P. frequentans* și *P. citreo-viride*, iar într-o mai mică

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

măsură *A. ferrooxidans*, *P. expansum* și *P. lividum* nu au înregistrat variații ale frecvenței, de la un sezon la altul, în anul 2005.

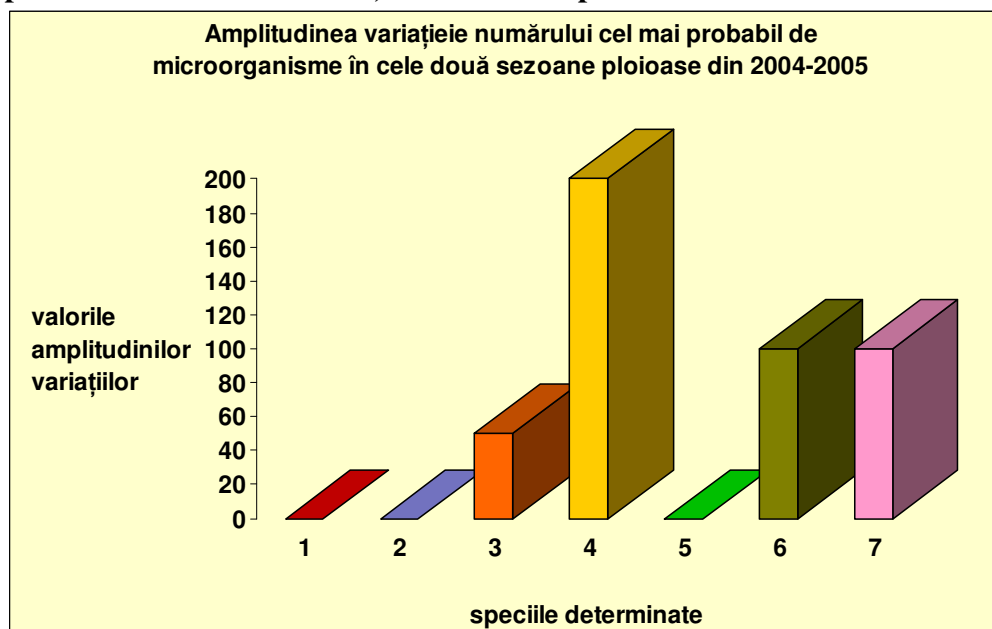
Limitele minime și maxime ale numărului cel mai probabil de microorganisme determinate în sezoanele ploioase și în cele secetoase din cei doi ani, 2004-2005, în care s-au desfășurat determinările microbiologice, cât și amplitudinea variațiilor acestora sunt prezentate în tabelul 8.2.1.5.

Tabelul 8.2.1.5. Limitele minime și maxime ale numărului cel mai probabil de microorganisme în sezoanele ploioase și secetoase din anii 2004-2005, în stalactitele policrome.

Specia	2004-2005		Amplitudinea variației în 2004-2005 (nr.cel./ml)	
	Ploios (nr.celule/ml)	Uscat (nr.celule/ml)	ploios	uscat
	minim-maxim	minim-maxim		
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	9500-9500	4500-8000	0	3500
<i>Penicillium expansum</i>	600-600	500-600	0	100
<i>Penicillium cyclopium</i>	200-250	150-150	50	0
<i>Penicillium frequentans</i>	300-500	200-300	200	100
<i>Penicillium griseo-azureum</i>	0-0	200-200	0	0
<i>Penicillium citreo-viride</i>	200-300	0-200	100	200
<i>Penicillium lividum</i>	200-300	200-300	100	100

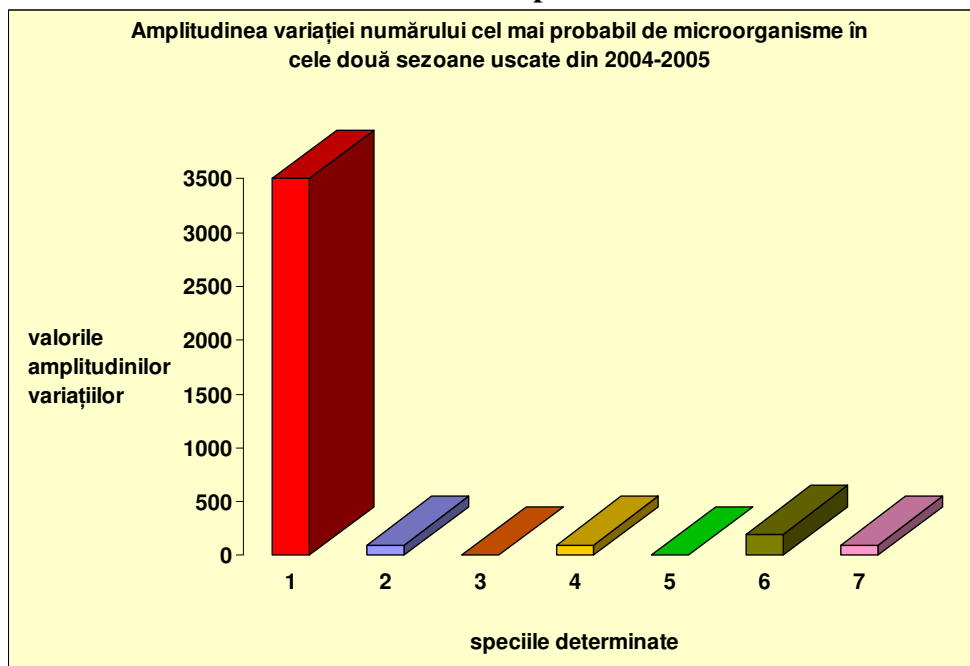
Amplitudinea variației numărului de microorganisme, de la un an la altul, în cele două sezoane, sunt prezentate în *Figurile 8.2.1.9., 8.2.1.10.*

Fig. 8.2.1.9. Amplitudinea variației numărului cel mai probabil de microorganisme în sezoanele ploioase din anii 2004-2005, în stalactitele policrome.



1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*; 2. *Penicillium expansum*; 3. *P. cyclopium*; 4. *P. frequentans*; 5. *P. griseo-azureum*; 6. *P. citreo-viride*; 7. *P. lividum*.

Fig. 8.2.1.10. Amplitudinea variației numărului cel mai probabil de microorganisme în sezoanele uscate din anii 2004-2005 în stalactitele policrome.



1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*; 2. *Penicillium expansum*; 3. *P. cyclopium*; 4. *P. frequentans*; 5. *P. griseo-azureum*; 6. *P. citreo-viride*; 7. *P. lividum*.

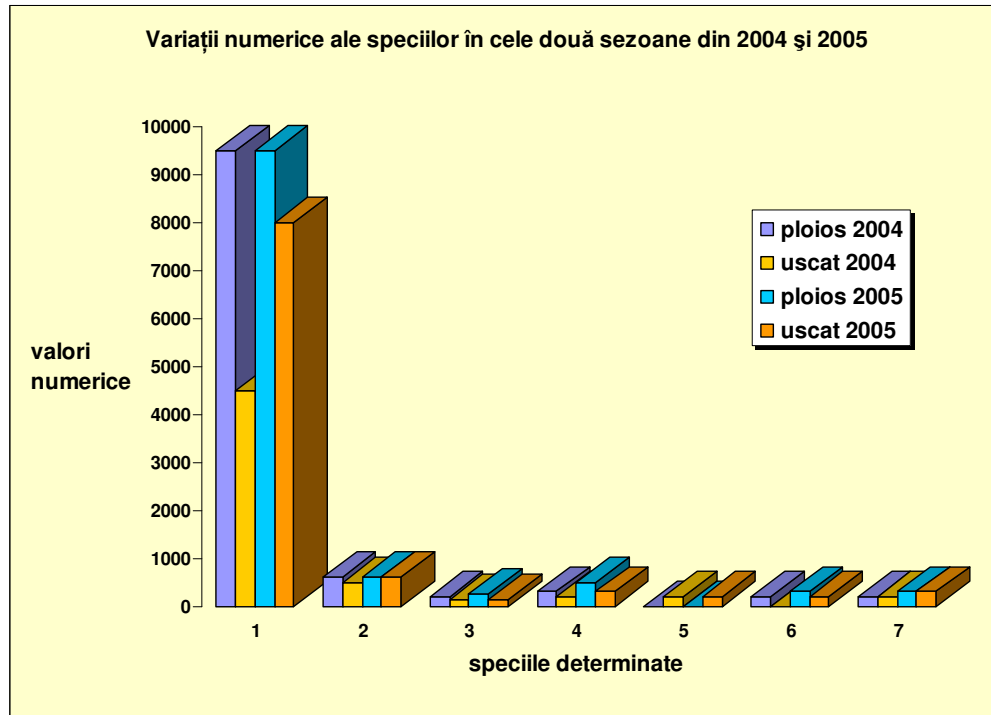
În figura 8.2.1.9. observăm, pentru cele două sezoane bogate în precipitații, o variație numerică mare, între cei doi ani în cazul speciei *P. frequentans*. O variație mai semnificativă se observă și în cazul speciilor *P. citreo-viride* și *P. lividum* și într-o mai mică măsură în cazul lui *P. cyclopium*. *A. ferrooxidans*, *P. expansum* și *P. griseo-azureum* nu înregistrează nici o variație în sezoanele bogate în precipitații din cei doi ani.

În figura 8.2.1.10. observăm, pentru cele două sezoane sărace în precipitații, o variație numerică mare, de la un an la altul, în cazul lui *A. ferrooxidans*. *P. citreo-viride* prezintă, de asemenea, o variație mai semnificativă, iar *P. expansum*, *P. frequentans* și *P. lividum* într-o mai mică măsură. *P. cyclopium* și *P. griseo-azureum* nu înregistrează nici o variație în sezoanele uscate din cei doi ani.

Pentru a avea o imagine generală asupra modului în care fiecare specie înregistrează variații numerice de la sezonul ploios la cel uscat în cei doi ani, am realizat o prezentare grafică de ansamblu (Fig. 8.2.1.11.).

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

Fig. 8.2.1.11. Reprezentarea grafică în ansamblu a variațiilor numerice ale speciilor, în cele două sezoane din anii 2004-2005, în stalactitele policrome.



1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*; 2. *Penicillium expansum*; 3. *P. cyclopium*; 4. *P. frequentans*; 5. *P. griseo-azureum*; 6. *P. citreo-viride*; 7. *P. lividum*.

Din Fig. 8.2.1.11. se observă, în general, o abundență mai mare a microorganismelor, atât în sezonul ploios cât și cel uscat, în 2005 față de 2004, dar și o variație numerică mai mică de la sezonul ploios la cel uscat în 2005 față de 2004.

Corelațiile dintre numărul cel mai probabil de microorganisme determinat în lunile, martie și iulie ale anului 2004, și respectiv aprilie și noiembrie din 2005 și sumele precipitațiilor acestora (martie 29,9 mm și iulie 141,8 mm, noiembrie 37,4 mm și aprilie 226,4 mm) sunt afișate în Tabelul 8.2.1.6. Reprezentarea grafică a coeficienților de corelație este redată în figura 8.2.1.12.

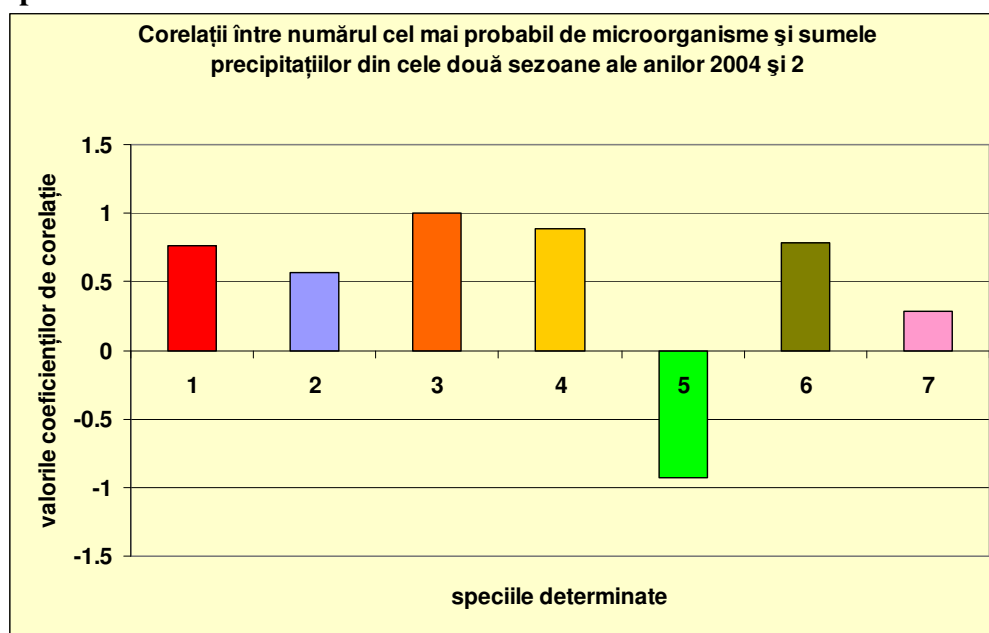
Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

Tabelul 8.2.1.6. Corelații între numărul microorganismelor și sumele precipitațiilor în 2004 și 2005, în stalactitele policrome.

Specia		Uscat (nr.celule/ml)	Ploios (nr.celule/ml)	Uscat (sum.precip. în mm)	Ploios (sum.precip. în mm)	Coefficienți de corelație
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	2004	4500	9500	29,9	141,8	0,758
	2005	8000	9500	37,4	226,4	
<i>Penicillium expansum</i>	2004	500	600	29,9	141,8	0,562
	2005	600	600	37,4	226,4	
<i>Penicillium cyclopium</i>	2004	150	200	29,9	141,8	0,997**
	2005	150	250	37,4	226,4	
<i>Penicillium frequentans</i>	2004	200	300	29,9	141,8	0,889
	2005	300	500	37,4	226,4	
<i>Penicillium griseo-azureum</i>	2004	200	0	29,9	141,8	-0,928
	2005	200	0	37,4	226,4	
<i>Penicillium citreo-viride</i>	2004	0	200	29,9	141,8	0,780
	2005	200	300	37,4	226,4	
<i>Penicillium lividum</i>	2004	200	200	29,9	141,8	0,284
	2005	300	300	37,4	226,4	

$p \leq 5\%$

Fig. 8.2.1.12. Reprezentarea grafică a coeficienților de corelație între numărul microorganismelor și sumele precipitațiilor din cele două sezoane din 2004 și 2005, în stalactitele policrome.



1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*; 2. *Penicillium expansum*; 3. *P. cyclopium*; 4. *P. frequentans*; 5. *P. griseo-azureum*; 6. *P. citreo-viride*; 7. *P. lividum*.

În figura 8.2.1.12. observăm o tendință de corelații pozitive, între numărul de microorganisme și precipitațiile din cele două sezoane ale anilor 2004 și 2005, în cazul următoarelor specii: *A. ferrooxidans*, *P. expansum*, *P. cyclopium*, *P. frequentans*, *P. citreo-viride* și *P. lividum*. Tendință de a se corela negativ se observă în cazul lui *P. griseo-azureum*. Cu alte cuvinte deci, cu cât crește cantitatea de precipitații cu atât crește și numărul de microorganisme din

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

speciile ce au prezentat corelații pozitive, iar în cazul lui *P. griseo-azureum*, cu cât crește cantitatea de precipitații cu atât scade numărul acesteia.

Pentru o valoare a lui $p \leq 5\%$ (vezi paragraful 8.1.4. și Anexa VI: Tabelul 8.1.4.1.) din Tabelul 8.2.1.6. observăm că singura specie care prezintă corelații semnificative cu precipitațiile este *P. cyclopium*, restul speciilor fiind corelate nesemnificativ.

Pe seama datelor obținute în urma analizelor microbiologice efectuate pe stalactitelor policrome și prezentate mai sus putem rezuma și concluziona următoarele:

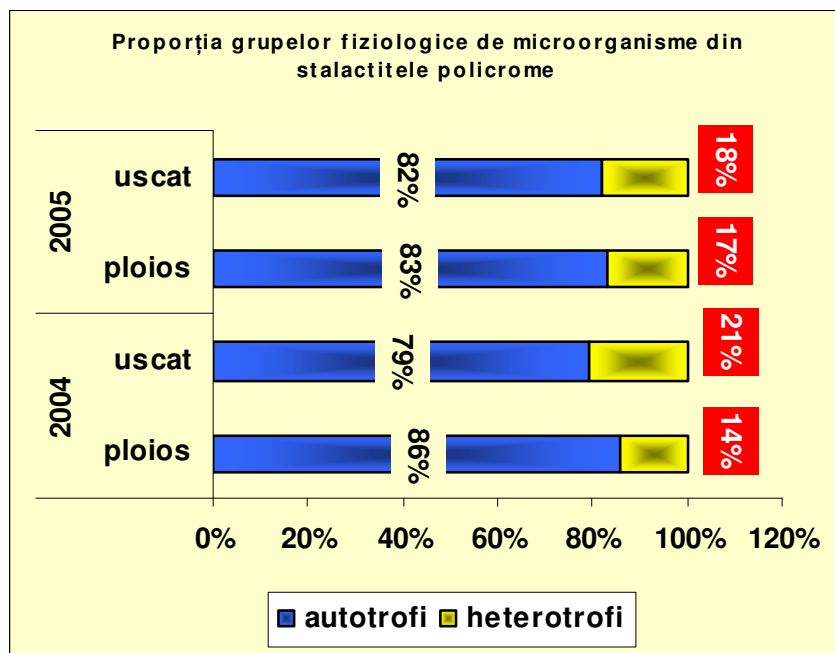
- atât în anul 2004 cât și în 2005, în stalactitele policrome au fost determinate șapte specii de microorganisme care formează o asociație sau un consorțiu fiind interconectate funcțional. Din acestea, *A. ferrooxidans* este singura specie bacteriană chemolitotrofă, reprezentând producția primară de substanță organică în cadrul acestei asociații. Restul, sunt reprezentate de șase specii de fungi din genul *Penicillium*, acestea fiind organisme heterotrofe care folosesc substanța organică provenită de la producătorul primar reprezentat de *A. ferrooxidans*.

- în cadrul consorțiului, populația lui *A. ferrooxidans*, ca producător primar, este dominantă, reprezentând aproximativ 80% din populația totală. Heterotrofii, reprezentați prin cele șase specii de *Penicillium*, reprezintă aproximativ 20% din populația totală (Tabelul 8.2.1.7., Fig. 8.2.1.13.).

Tabelul 8.2.1.7. Proporția grupelor fiziologice de microorganisme din stalactitele policrome, în sezoanele ploioase și uscate ale anilor 2004 și 2005, în stalactitele policrome.

anul	sezonul	autotrofi	heterotrofi
2004	plouos	86%	14%
	uscăt	79%	21%
2005	plouos	83%	17%
	uscăt	82%	18%

Fig. 8.2.1.13. Reprezentare grafică cu proporția grupelor fiziologice de microorganisme din stalactitele policrome, în sezoanele ploioase și uscate ale anilor 2004 și 2005.



Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

- cea mai mare variație a numărului de celule/ml de apă, de la sezonul ploios la cel secetos, atât în 2004 cât și în 2005, o prezintă *A. ferrooxidans*. Alte specii ce prezintă variații sunt *Penicillium griseo-azureum* și *Penicillium citreo-viride*, restul speciilor înregistrând variații destul de mici. *P. lividum*, atât în 2004 cât și în 2005 nu înregistrează deloc variații numerice de la sezonul ploios la cel secetos.

- variațiile de frecvență cele mai mari, de la sezonul ploios la cel secetos, în cei doi ani, le înregistrează, *P. griseo-azureum*, iar în 2004 *P. citreo-viride*. Prima, din aceste două specii, în sezonul ploios practic nu a fost identificată, iar a doua în sezonul secetos din 2004 nu a fost identificată. *Penicillium lividum* este singura specie care nu prezintă variații de frecvență în cele două sezoane din cei doi ani.

- din realizarea corelațiilor am observat că, în cele două sezoane din 2004 și 2005, pentru o valoare a lui $p \leq 5\%$ (vezi paragraful 8.1.4. și *Anexa VI: Tabelul 8.1.4.1.*), în *Tabelul 8.2.1.6.*, singura specie care prezintă corelații semnificative cu precipitațiile este *P. cyclopium*, restul speciilor fiind corelate ne semnificativ.

- din analiza generală a variațiilor numerice ale speciilor, în 2004 și 2005, am observat o abundență mai mare a microorganismelor în 2005 față de 2004, cât și o variație numerică mai mică de la sezonul ploios la cel uscat în 2005 față de 2004.

Dacă luăm în considerare faptul că suma precipitațiilor pe anul 2004 (875 mm) a fost semnificativ mai mică decât cea a anului 2005 (1202,2 mm), putem spune că în anul 2005 cantitatea de apă fiind mai mare pe toate lunile, față de 2004, numărul microorganismelor nu apucă să scadă foarte mult de la un sezon la altul.

Pe de altă parte, stalactitele policrome sunt alimentate prin bolta cavității cu soluție de percolație printr-un sistem de fisuri fine, astfel că, de la un sezon la altul, soluția de percolație nu dispare niciodată din stalactite ci curge mai lent (fapt demonstrat cu rondele de hârtie puse sub stalactite – vezi capitolul 6.) mărindu-și concentrația în diverși ioni. Astfel, presupunem că, în cazul stalactitelor policrome, variațiile numerice ale microorganismelor determinate, de la sezonul bogat în precipitații la cel uscat, se datorează mai mult unui efect inhibitor pe care îl au diverși ioni din soluția hiperconcentrată din perioadele uscate.

În concluzie, în soluția acidă (pH 1,21) din stalactitele policrome există o comunitate de microorganisme acidofile formată dintr-o populație numeroasă de *A. ferrooxidans* (80%), care reprezintă producătorul primar de substanță organică al comunității, și populațiile a șase specii de *Penicillium* (20%), acestea reprezentând organismele heterotrofe, care folosesc substanța organică de la producătorul primar.

8.2.2. Formațiunile mucilaginoase

În cazul formațiunilor mucilaginoase, eșantioanele de analiză, au fost reprezentate de stalactite mucilaginoase, scurgeri parietale mucilaginoase și scurgeri de planșeu mucilaginoase (capitolul 6.).

În anul 2004: -speciile determinate și numărul cel mai probabil al acestora sunt prezentate în *Tabelul 8.2.2.1.*

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

Tabelul 8.2.2.1. Numărul cel mai probabil de microorganisme în anul 2004, în formațiunile mucilaginoase.

Specia	2004		amplitudinea variației (nr.celule/ml)
	Ploios (nr.celule/ml)	Uscat (nr.celule/ml)	
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	9500	0	9500
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	9500	3000	6500
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	4500	0	4500
<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	4500	3000	1500
<i>Actinomicete</i>	45000	4500	40500
<i>Penicillium citreo-viride</i>	200	0	200
<i>Penicillium implicatum</i>	600	300	300
<i>Penicillium expansum</i>	400	200	200
<i>Penicillium verucosum</i>	300	0	300
<i>Penicillium verucosum var. corimbiferum</i>	2000	200	1800
<i>Penicillium griseo-fulvus</i>	400	0	400
<i>Penicillium steckii</i>	200	0	200
<i>Aspergillus nidulans</i>	400	0	400
<i>Aspergillus thomii</i>	600	300	300
<i>Rhodotorula sp.</i>	400	300	100
<i>Cladosporium herbarum</i>	0	300	300
<i>(Scytilidium sp.)</i>	0	0	0

În Tabelul 8.2.2.1. observăm faptul că au fost determinate șaisprezece specii de microorganisme, care sunt intim asociate între ele prin intermediul mucopolizaharidelor extracelulare (capitolul 10.) formând o asociație sau un ”consorțiu mucilaginos”. Din cele șaisprezece specii identificate, cele patru specii de acidithiobacili împreună cu actinomicetele, sunt reprezentanți ai bacteriilor, restul speciilor determinate fiind reprezentanți ai fungilor. Trei din speciile de acidithiobacili și anume: *A. neapolitanus*, *A. thiooxidans* și *A. thioparus* reprezintă bacterii chemolitotrofe acidofile care realizează oxidarea compușilor cu sulf reduși, rezultați din oxidarea biologică și chimică a piritei din pereții Galeriei Kiesberg (vezi capitolul 11.), reprezentând, în cadrul consorțiului, producătorii primari de substanță organică. A patra specie de acidithiobacili identificată și anume *A. intermedius* este o specie cu un metabolism mixotrof, fiind heterotrof facultativă.

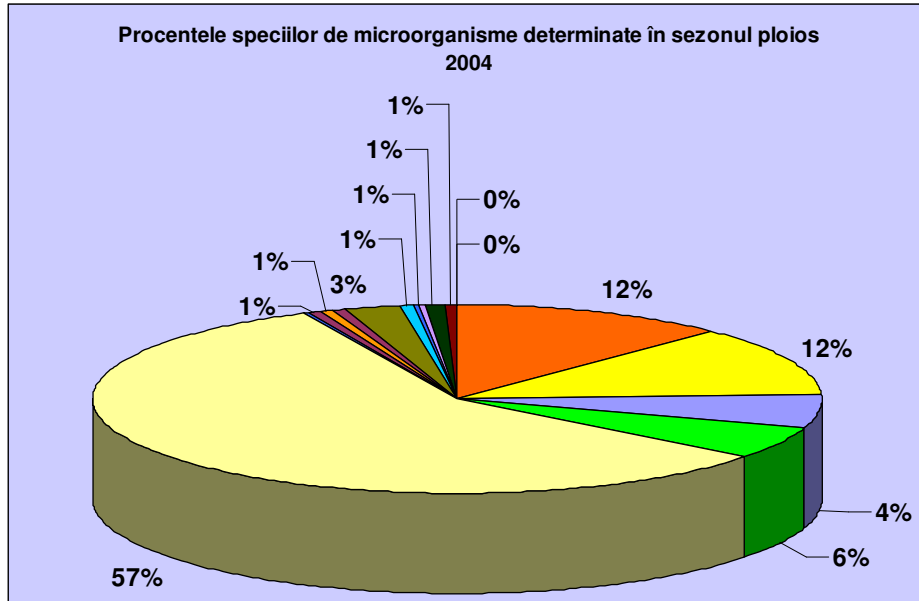
Substanța organică rezultată din activitatea producătorilor primari (a acidithiobacililor), împreună cu substanța organică alohtonă, venită cu apa din alte sectoare ale cavității (capitolul 11.) este descompusă de microorganismele heterotrofe din acest consorțiu. Aceste microorganisme heterotrofe sunt reprezentate de actinomicete, la care din păcate până în acest moment nu s-a reușit identificarea speciilor, cât și de următoarele specii de fungi: Fam. Moniliaeae: *Aspergillus nidulans*; *Aspergillus thomii*; *Penicillium steckii*; *P. expansum*; *P. verucosum*; *P. griseo-fulvus*; *P. implicatum*; *P. verucosum var. corybiferum* Fam. Cryptococaceae: *Rhodotorula sp.*; Fam. Dematiaceae: *Cladosporium herbarum*.

Pentru a ușura apoi comparațiile între rezultatele determinărilor din cele două sezoane din anii 2004 și 2005, am preferat specificarea în tabelele și graficele referitoare la anul 2004 a genului *Scytilidium* (Fam. Dematiaceae), care a fost identificat de fapt doar în eşantioanele anului 2005.

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

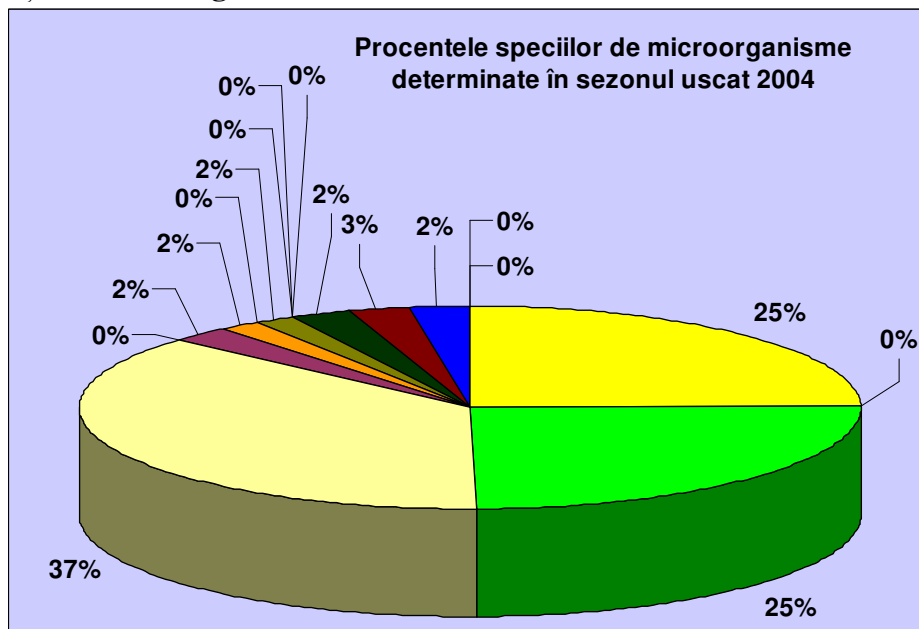
Procentele speciilor determinate în cele două sezoane, ploios și uscat, pe anul 2004, sunt prezentate în *Figurile 8.2.2.1.; 8.2.2.2.*

Fig. 8.2.2.1. Procentele speciilor de microorganisme determinate în sezonul ploios 2004, în formațiunile mucilaginose.



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. Actinomicete; 6. *Penicillium citreo-viride*; 7. *P. implicatum*; 8. *P. expansum*; 9. *P. veruncosum*; 10. *P. veruncosum var. corimbiferum*; 11. *P. griseo-fulvus*; 12. *P. steckii*; 13. *Aspergillus nidulans*; 14. *A. thomii*; 15. *Rhodotorula sp.*; 16. *Cladosporium herbarum*; 17. *Scytalidium sp.*

Fig. 8.2.2.2. Procentele speciilor de microorganisme determinate în sezonul uscat 2004, în formațiunile mucilaginose.



În figura 8.2.2.1., care reprezintă sezonul ploios, se observă o dominație netă a speciilor bacteriene, în special a actinomicetelor, care reprezintă peste 50%, dar și a speciilor de

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

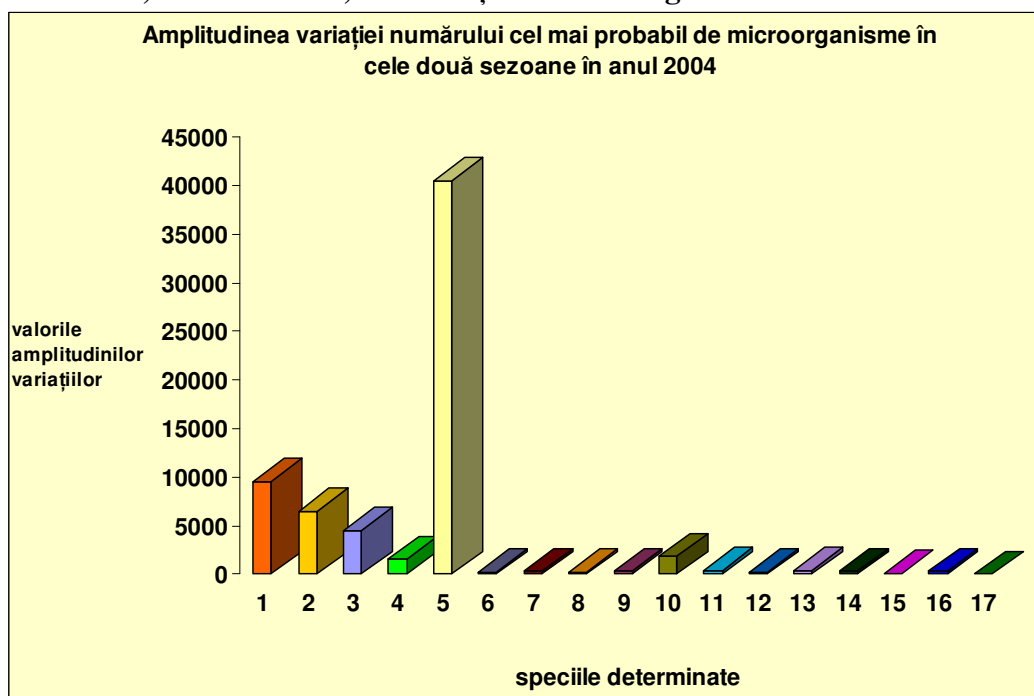
acidithiobacili, care reprezintă peste 30% din populația totală. Speciile de fungi reprezintă până în 10% din populația totală.

În figura 8.2.2.2., care reprezintă sezonul uscat, se observă o dominație clară a speciilor de acidithiobacili: *A. thiooxidans* și *A. intermedius* cu câte 25%, dar și a actinomicetelor cu 37%. Speciile de fungi reprezintă, în sezonul uscat, puțin peste 10 procente din populația totală.

Astfel, în sezonul ploios 2004, în cadrul „consorțiului mucilaginos”, heterotrofii sunt dominanți, actinomicetele și fungii, reprezentând 66%, față de chemolitotrofi care reprezintă 34%. În sezonul uscat populația chemolitotrofilor (50%) este egală cu cea a heterotrofilor (50%), cu specificarea că *A. intermedius*, care reprezintă jumătate din proporția chemolitotrofilor (25%) este heterotrof facultativ.

Amplitudinea variației numărului de microorganisme, de la sezonul ploios la cel secetos, din anul 2004 (Tabelul 8.2.2.1.) este prezentată în Figura 8.2.2.3.

Fig. 8.2.2.3. Amplitudinea variației numărului cel mai probabil de microorganisme de la un sezon la altul, din anul 2004, în formațiunile mucilaginoase.



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Actinomicete*; 6. *Penicillium citreo-viride*; 7. *P. implicatum*; 8. *P. expansum*; 9. *P. verucosum*; 10. *P. verucosum var. corimbiferum*; 11. *P. griseo-fulvus*; 12. *P. steckii*; 13. *Aspergillus nidulans*; 14. *A. thomii*; 15. *Rhodotorula sp.*; 16. *Cladosporium herbarum*; 17. *Scytalidium sp.*

În figura 8.2.2.3. observăm, că de la sezonul ploios la cel secetos, cea mai mare variație a numărului de celule/ml de apă o prezintă *Actinomicetele*. Alte specii ce prezintă variații numerice semnificative sunt *Acidithiobacillus neapolitanus*; *A. thiooxidans*; *A. thioparus*; *A. intermedius* și *P. verucosum var. corimbiferum*, restul speciilor înregistrând variații numerice mai mici.

Variațiile de frecvență, pentru speciile determinate, de la un sezon la altul, în anul 2004, au putut fi observate prin calculul coeficienților de variație (Tabelul 8.2.2.2., Fig. 8.2.2.4.).

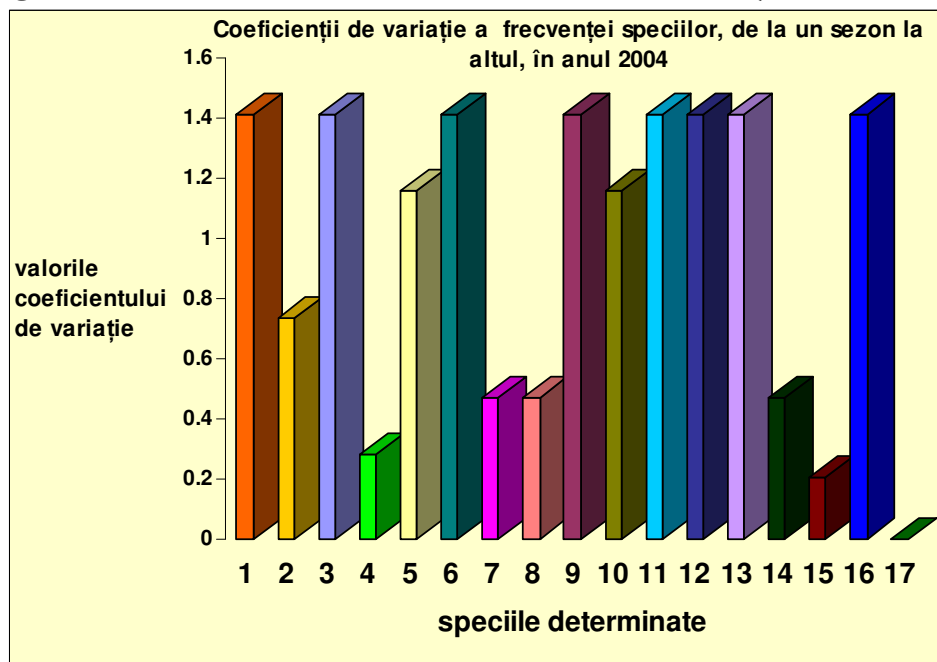
Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

Tabelul 8.2.2.2. Media aritmetică, eroarea standard a mediei (ES), derivația standard (DS) și coeficienții de variație a speciilor pe anul 2004, în formațiunile mucilaginoase.

Specia	2004				
	Ploios (nr.celule/ml)	Uscat (nr.celule/ml)	media ± ES	DS	coeficientul de variație
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	9500	0	4750±4750	6717,5	1,41
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	9500	3000	6250±3250	4596,2	0,73
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	4500	0	2250±2250	3182	1,41
<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	4500	3000	3750±750	1060,7	0,28
<i>Actinomicete</i>	45000	4500	24750±20250	28638	1,15
<i>Penicillium citreo-viride</i>	200	0	100±100	141,42	1,41
<i>Penicillium implicatum</i>	600	300	450±150	212,13	0,47
<i>Penicillium expansum</i>	400	200	300±100	141,42	0,47
<i>Penicillium veruncosum</i>	300	0	150±150	212,13	1,41
<i>Penicillium veruncosum var. corimbiferum</i>	2000	200	1100±900	1272,8	1,15
<i>Penicillium griseo-fulvus</i>	400	0	200±200	282,84	1,41
<i>Penicillium steckii</i>	200	0	100±100	141,42	1,41
<i>Aspergillus nidulans</i>	400	0	200±200	282,84	1,41
<i>Aspergillus thomii</i>	600	300	450±150	212,13	0,47
<i>Rhodotorula</i>	400	300	350±50	70,711	0,20
<i>Cladosporium herbarum</i>	0	300	150±150	212,13	1,41
<i>(Scytalidium sp.)</i>	0	0	0	0	0

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

Fig. 8.2.2.4. Reprezentarea grafică a coeficienților de variație a speciilor de microorganisme, de la un sezon la altul, în anul 2004, în formațiunile mucilaginose.



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Actinomicete*; 6. *Penicillium citreo-viride*; 7. *P. implicatum*; 8. *P. expansum*; 9. *P. veruncosum*; 10. *P. veruncosum var. corimbiferum*; 11. *P. griseo-fulvus*; 12. *P. steckii*; 13. *Aspergillus nidulans*; 14. *A. thomii*; 15. *Rhodotorula sp.*; 16. *Cladosporium herbarum*; 17. *Scytalidium sp.*

De la sezonul ploios la cel uscat (Fig. 8.2.2.4.), cele mai mari variații ale distribuțiilor frecvențelor le înregistrează *Acidithiobacillus neapolitanus*; *A. thioparus*; *Penicillium citreo-viride*; *P. veruncosum var. corimbiferum*; *P. griseo-fulvus*; *P. steckii*, care practic, în sezonul uscat, nu au fost deloc identificate. *Cladosporium herbarum*, nu a fost identificată în sezonul ploios.

În anul 2005: -speciile determinate și numărul cel mai probabil al acestora sunt prezentate în Tabelul 8.2.2.3.

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

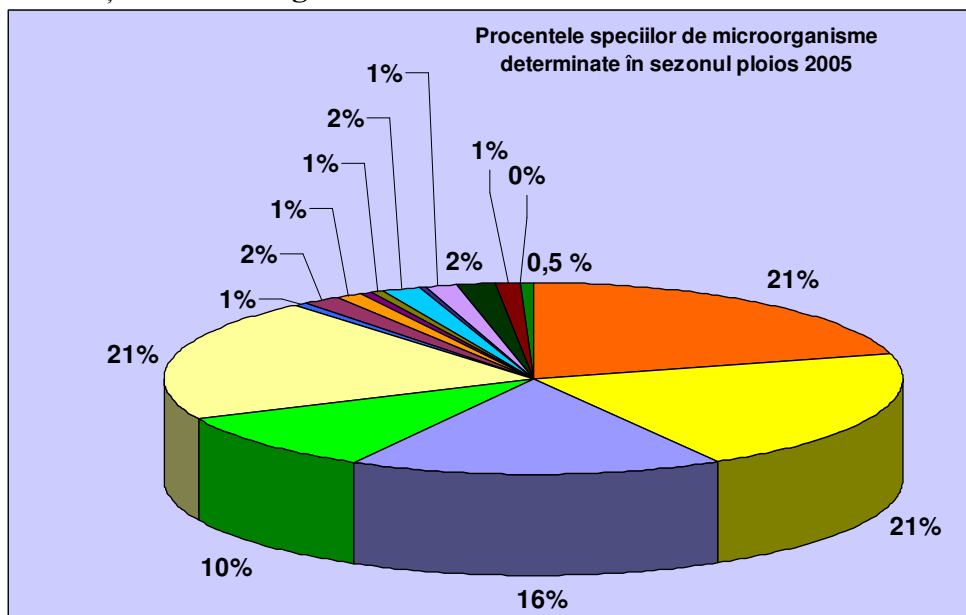
Tabelul 8.2.2.3. Numărul cel mai probabil de microorganisme în anul 2005, în formațiunile mucilaginoase.

Specia	2005		
	Ploios (nr.celule/ml)	Uscat (nr.celule/ml)	amplitudinea variației (nr.celule/ml)
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	9500	1400	8100
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	9500	4500	5000
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	7500	2000	5500
<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	4500	4500	0
<i>Actinomicete</i>	9500	4500	5000
<i>Penicillium citreo-viride</i>	300	200	100
<i>Penicillium implicatum</i>	700	0	700
<i>Penicillium expansum</i>	600	200	400
<i>Penicillium veruncosum</i>	200	0	200
<i>Penicillium veruncosum var. corimbiferum</i>	300	0	300
<i>Penicillium griseo-fulvus</i>	700	300	400
<i>Penicillium steckii</i>	200	0	200
<i>Aspergillus nidulans</i>	600	200	400
<i>Aspergillus thomii</i>	700	300	400
<i>Rhodotorula sp.</i>	600	400	200
<i>Cladosporium herbarum</i>	0	200	200
<i>Scytalidium sp.</i>	200	0	200

Din tabelul 8.2.2.3., observăm că în anul 2005 au fost determinate șaptesprezece specii de microorganisme, dintre care șaisprezece au fost identificate și în 2004. Genul *Scytalidium sp.*, un reprezentant al fungilor din *Familia Dematiaceae*, este singurul identificat în plus în 2005 față de 2004. Procentele acestor specii, în cele două sezoane, ploios și uscat din anul 2005, sunt prezentate în *Figurile 8.2.2.5.; 8.2.2.6.*

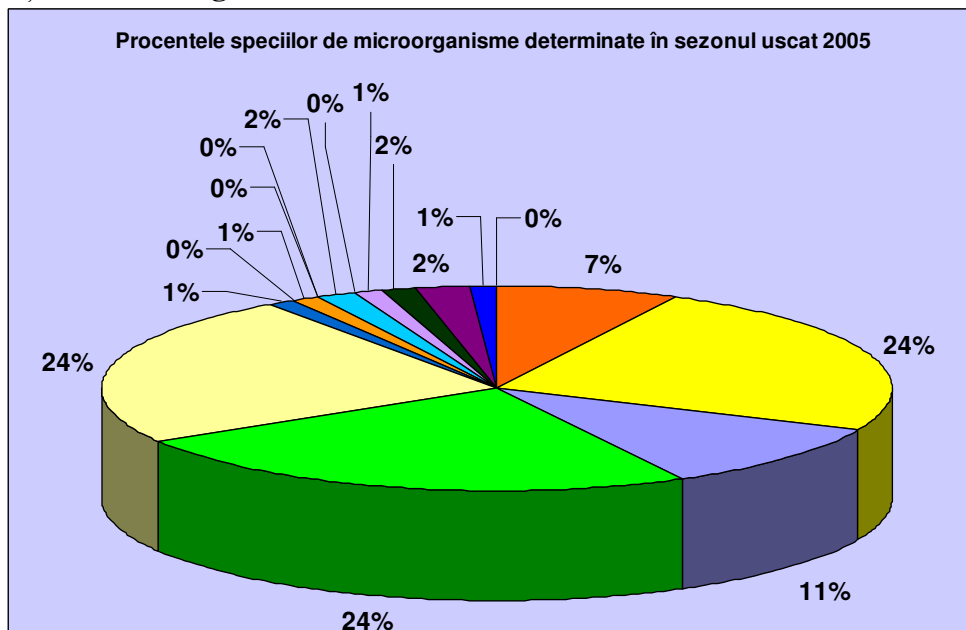
Capitolul 8. Determinări microbiologice.

Fig. 8.2.2.5. Procentele speciilor de microorganisme determinate în sezonul ploios 2005, în formațiunile mucilaginose.



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Actinomicete*; 6. *Penicillium citreo-viride*; 7. *P. implicatum*; 8. *P. expansum*; 9. *P. verucosum*; 10. *P. verucosum var. corimbiferum*; 11. *P. griseo-fulvus*; 12. *P. steckii*; 13. *Aspergillus nidulans*; 14. *A. thomii*; 15. *Rhodotorula sp.*; 16. *Cladosporium herbarum*; 17. *Scytalidium sp.*

Fig. 8.2.2.6. Procentele speciilor de microorganisme determinate în sezonul uscat 2005, în formațiunile mucilaginose.



În 2005, la fel ca în 2004, în ambele sezoane, speciile bacteriene sunt dominante cu aproximativ 90% din populația totală, față de speciile de fungi care sunt în proporție de aproximativ 10%.

În figura 8.2.2.5., care reprezintă sezonul ploios, acidithiobacilii chemolitotrofi sunt dominanți, cu 68% din care 10% este reprezentat de *A. intermedius* care este heterotrof facultativ.

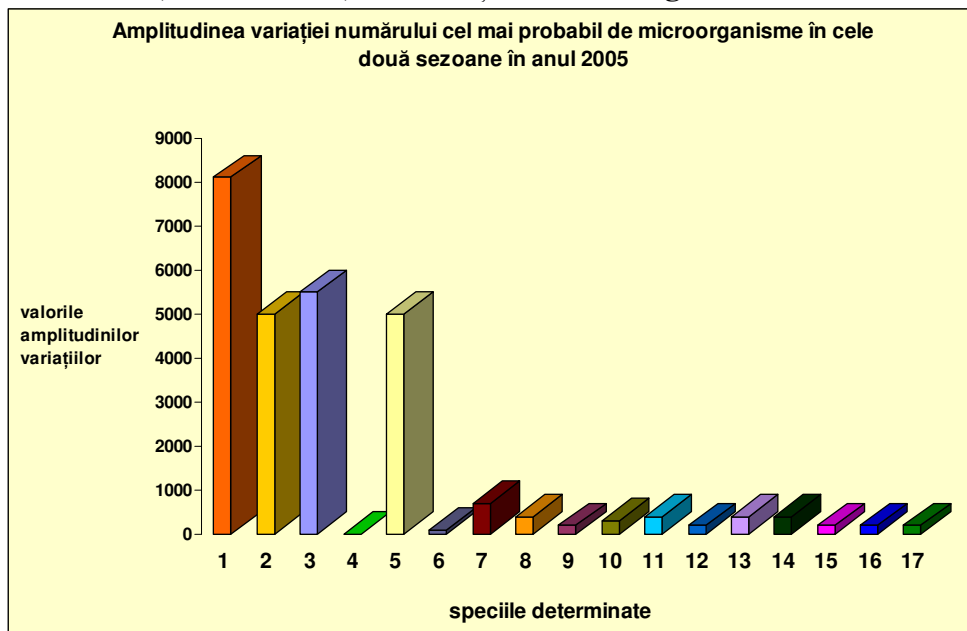
Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

Heterotrofii reprezintă 32% din care actinomicetele 21%, iar speciile de fungi reprezintă 11% din populația totală.

În sezonul uscat (Fig. 8.2.2.6.), de asemenea, speciile de acidithiobacili chemolitotrofi sunt dominante, cu 66%, din care 24% este reprezentat de *A. intermedius* care este heterotrof facultativ. Heterotrofii reprezintă 34% din care actinomicetele 24%, iar speciile de fungi reprezintă 10% din populația totală.

Amplitudinea variației numărului de microorganisme de la sezonul ploios la cel uscat, în anul 2005 (Tabelul 8.2.2.3.) este prezentată în Figura 8.2.2.7.

Fig. 8.2.2.7. Amplitudinea variației numărului cel mai probabil de microorganisme, de la un sezon la altul, în anul 2005, în formațiunile mucilaginoase.



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Actinomicete*; 6. *Penicillium citreo-viride*; 7. *P. implicatum*; 8. *P. expansum*; 9. *P. verucosum*; 10. *P. verucosum var. corimbiferum*; 11. *P. griseo-fulvus*; 12. *P. steckii*; 13. *Aspergillus nidulans*; 14. *A. thomii*; 15. *Rhodotorula sp.*; 16. *Cladosporium herbarum*; 17. *Scytalidium sp.*

În figura 8.2.2.7. observăm, că de la sezonul ploios la cel secetos, în anul 2005, cea mai mare variație a numărului de celule/ml de apă o prezintă *Acidithiobacillus neapolitanus*. Alte specii ce prezintă variații numerice semnificative sunt *A. thiooxidans*; *A. thioparus*; *Actinomicetele*, dar și *P. expansum*; *P. griseo-fulvus*; *Aspergillus nidulans*; *A. thomii*. *A. intermedius* nu a înregistrat variații numerice, de la un sezon la altul, în 2005.

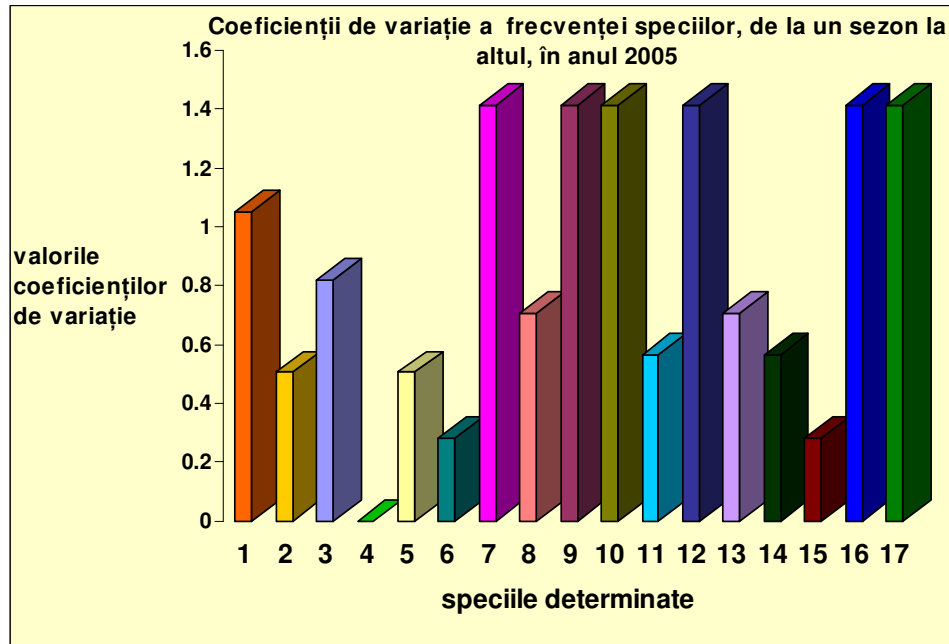
Pentru observarea variațiilor de frecvență, pentru speciile determinate, de la un sezon la altul, în anul 2005, au fost calculați coeficienții de variație (Tabelul 8.2.2.4., Fig. 8.2.2.8.)

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

Tabelul 8.2.2.4. Media aritmetică, eroarea standard a mediei (ES), derivația standard (DS) și coeficienții de variație a speciilor pe anul 2005, în formațiunile mucilaginoase.

Specia	2005				
	Ploios (nr.celule/ml)	Uscat (nr.celule/ml)	media ± ES	DS	coeficientul de variație
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	9500	1400	5450±4050	5727,56	1,05
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	9500	4500	7000±2500	3535,53	0,50
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	7500	2000	4750±2750	3889,09	0,81
<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	4500	4500	4500±0	0	0
<i>Actinomicete</i>	9500	4500	7000±2500	3535,53	0,50
<i>Penicillium citreo-viride</i>	300	200	250±50	70,71	0,28
<i>Penicillium implicatum</i>	700	0	350±350	494,97	1,41
<i>Penicillium expansum</i>	600	200	400±200	282,84	0,70
<i>Penicillium verucosum</i>	200	0	100±100	141,42	1,41
<i>Penicillium verucosum var. corimbiferum</i>	300	0	150±150	212,13	1,41
<i>Penicillium griseo-fulvus</i>	700	300	500±200	282,84	0,56
<i>Penicillium steckii</i>	200	0	100±100	141,42	1,41
<i>Aspergillus nidulans</i>	600	200	400±200	282,84	0,70
<i>Aspergillus thomii</i>	700	300	500±200	282,84	0,56
<i>Rhodotorula sp.</i>	600	400	500±100	141,42	0,28
<i>Cladosporium herbarum</i>	0	200	100±100	141,42	1,41
<i>Scytalidium sp.</i>	200	0	100±100	141,42	1,41

Fig. 8.2.2.8. Reprezentarea grafică a coeficienților de variație a speciilor de microorganisme, de la un sezon la altul, în anul 2005, în formațiunile mucilaginoase.



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Actinomicete*; 6. *Penicillium citreo-viride*; 7. *P. implicatum*; 8. *P. expansum*; 9. *P. veruncosum*; 10. *P. veruncosum var. corimbiferum*; 11. *P. griseo-fulvus*; 12. *P. steckii*; 13. *Aspergillus nidulans*; 14. *A. thomii*; 15. *Rhodotorula sp.*; 16. *Cladosporium herbarum*; 17. *Scytalidium sp.*

De la sezonul ploios la cel secetos (Fig. 8.2.2.8.), cele mai mari variații ale distribuțiilor frecvențelor le înregistrează *P. implicatum*; *P. veruncosum*; *P. veruncosum var. corimbiferum*; *P. steckii*; *Scytalidium sp.*, care în sezonul uscat nu au fost identificate și *Cladosporium herbarum*, care nu a fost identificat în sezonul ploios. Variații destul de mari de frecvență, de la un sezon la altul, se înregistrează și în cazul celorlalte specii, cu excepția lui *A. intermedius* care nu înregistrează nici o variație.

Limitele minime și maxime ale numărului cel mai probabil de microorganisme determinate în sezoanele ploioase și în cele secetoase din anii 2004-2005, cât și amplitudinea variațiilor acestora sunt prezentate în Tabelul 8.2.2.5.

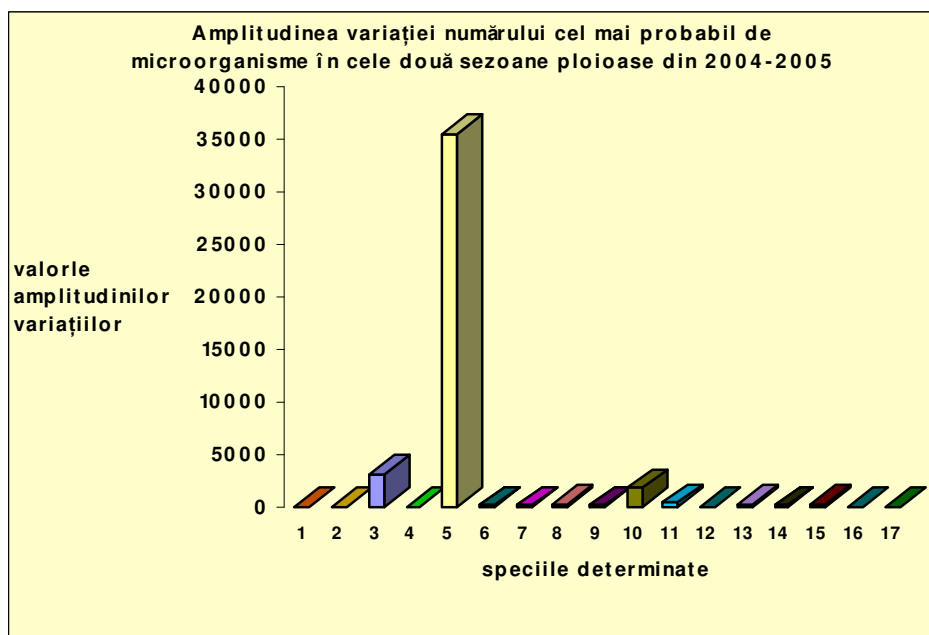
Capitolul 8. Determinări microbiologice.

Tabelul 8.2.2.5. Limitele minime și maxime ale numărului cel mai probabil de microorganisme în sezoanele ploioase și uscate din anii 2004-2005, în formațiunile mucilaginoase.

Specia	2004-2005		amplitudinea variației pe 2004-2005 (nr.celule/ml)	
	Ploios (nr.celule/ml)	Uscat (nr.celule/ml)	ploios	uscat
	minim-maxim	minim-maxim		
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	9500-9500	1400-1400	0	0
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	9500-9500	3000-4500	0	1500
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	4500-7500	2000-2000	3000	0
<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	4500-4500	3000-4500	0	1500
<i>Actinomicete</i>	9500-45000	4500-4500	35500	0
<i>Penicillium citreo-viride</i>	300-200	200-0	100	200
<i>Penicillium implicatum</i>	600-700	300-300	100	0
<i>Penicillium expansum</i>	400-600	200-200	200	0
<i>Penicillium veruncosum</i>	200-300	0-0	100	0
<i>Penicillium veruncosum var. corymbiferum</i>	300-2000	200-200	1700	0
<i>Penicillium griseo-fulvus</i>	400-700	300-300	300	0
<i>Penicillium steckii</i>	200-200	0-0	0	0
<i>Aspergillus nidulans</i>	400-600	200-200	200	0
<i>Aspergillus thomii</i>	600-700	300-300	100	0
<i>Rhodotorula sp.</i>	400-600	300-400	200	100
<i>Cladosporium herbarum</i>	0-0	300-300	0	0
<i>Scytalidium sp.</i>	0-0	200-200	0	0

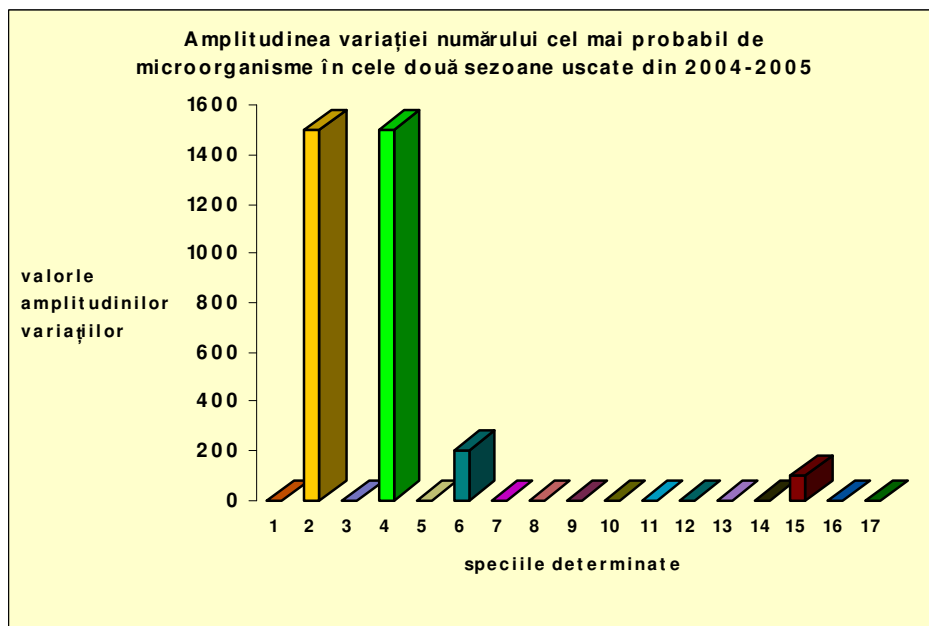
Amplitudinea variației numărului de microorganisme în cele două sezoane ale anilor 2004-2005 sunt prezentate în *Figurile 8.2.2.9., 8.2.2.10.*

Fig. 8.2.2.9. Amplitudinea variației numărului cel mai probabil de microorganisme în sezoanele ploioase din anii 2004-2005, în formațiunile mucilaginoase.



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Actinomicete*; 6. *Penicillium citreo-viride*; 7. *P. implicatum*; 8. *P. expansum*; 9. *P. veruncosum*; 10. *P. veruncosum var. corimbiferum*; 11. *P. griseo-fulvum*; 12. *P. steckii*; 13. *Aspergillus nidulans*; 14. *A. thomii*; 15. *Rhodotorula sp.*; 16. *Cladosporium herbarum*; 17. *Scytalidium sp.*

Fig. 8.2.2.10. Amplitudinea variației numărului cel mai probabil de microorganisme în sezoanele uscate din anii 2004-2005, în formațiunile mucilaginoase.



În figura 8.2.2.9. observăm, pentru cele două sezoane bogate în precipitații, din anii 2004-2005, o variație mare a numărului *Actinomicetelor*. Alte specii ce prezintă variații numerice mai semnificative sunt: *A. thioparus* și *P. veruncosum var. corimbiferum*, restul prezentând variații

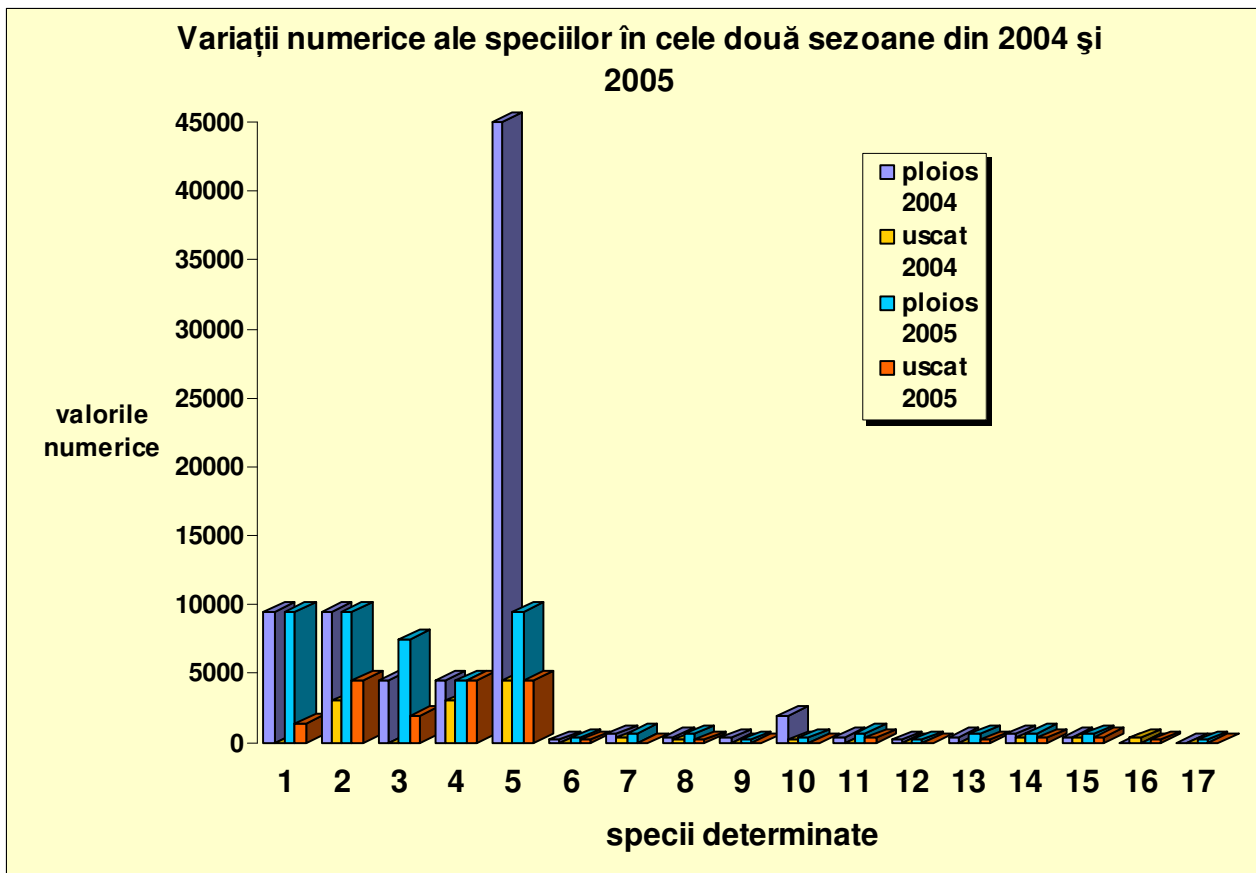
Capitolul 8. Determinări microbiologice.

mici. *Acidithiobacillus neapolitanus*; *A. thiooxidans*; *A. intermedius*; *P. steckii* și *Cladosporium herbarum*, nu prezintă variații numerice, din 2004 în 2005, în sezoanele bogate în precipitații.

În figura 8.2.2.10. observăm, pentru cele două sezoane sărace în precipitații, o variație mare a numărului în cazul lui *A. thiooxidans* și *A. intermedius* și în mai mică măsură în cazul lui *Penicillium citreo-viride* și *Rhodotorula sp.* Restul speciilor nu înregistrează nici o variație în sezoanele uscate din cei doi ani.

Fig. 8.2.2.11. reprezintă o imagine generală a modului în care fiecare specie înregistrează variații numerice de la sezonul ploios la cel uscat în cei doi ani.

Fig. 8.2.2.11. Reprezentarea grafică în ansamblu a variațiilor numerice ale speciilor în cele două sezoane din anii 2004-2005, în formațiunile mucilaginose.



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Actinomicete*; 6. *Penicillium citreo-viride*; 7. *P. implicatum*; 8. *P. expansum*; 9. *P. verucosum*; 10. *P. verucosum var. corimbiferum*; 11. *P. griseo-fulvus*; 12. *P. steckii*; 13. *Aspergillus nidulans*; 14. *A. thomii*; 15. *Rhodotorula sp.*; 16. *Cladosporium herbarum*; 17. *Scytalidium sp.*

Din Fig. 8.2.2.11. se observă, în general, o variație numerică mai mică a microorganismelor, de la sezonul ploios la cel secetos, în 2005 față de 2004. În 2004 se observă, de asemenea, în cazul *Actinomicetelor*, o variație numerică foarte mare, de la sezonul ploios la cel secetos, acest fapt fiind probabil o situație întâmplătoare și de scurtă durată.

La fel ca în cazul stalactitelor policrome, și pentru formațiunile mucilaginose au fost realizate corelații între numărul cel mai probabil al microorganismelor, determinat în lunile, martie și iulie ale lui 2004 și aprilie și noiembrie, din 2005 și sumele precipitațiilor acestora (Tabelul 8.2.2.6., Fig. 8.2.2.12.).

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

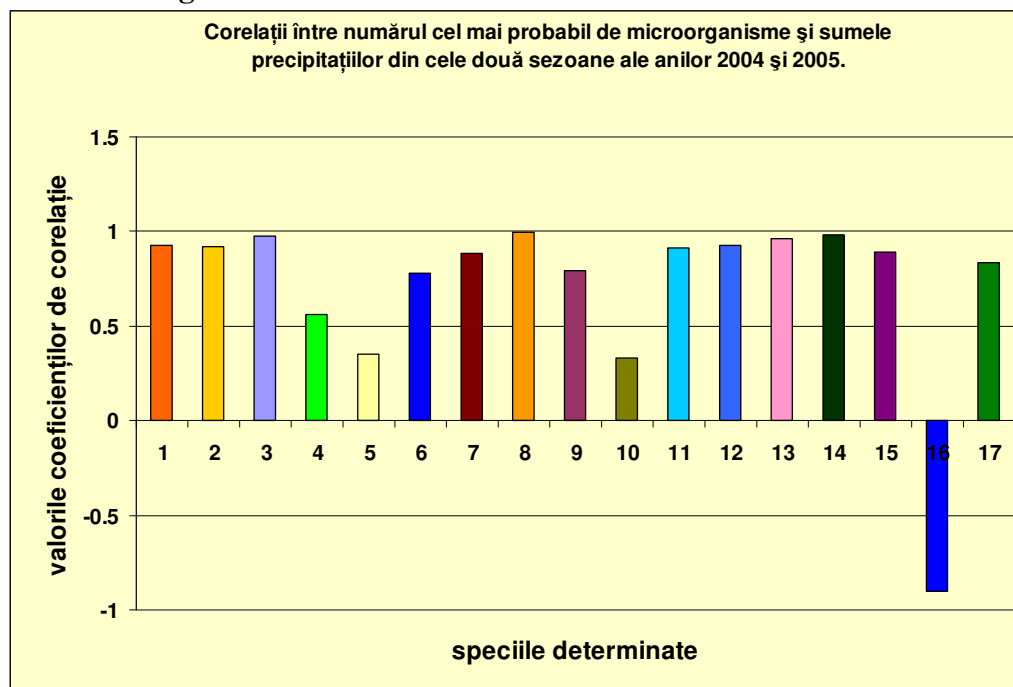
Tabelul 8.2.2.6. Corelații între numărul microorganismelor și sumele precipitațiilor în cele două sezoane ale lui 2004 și 2005, în formațiunile mucilaginoase.

Specia		Uscat (nr.celule/ml)	Ploios (nr.celule/ml)	Uscat (sum.precip. în mm)	Ploios (sum.precip. în mm)	corelație
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	2004	0	9500	29,9	141,8	0,926
	2005	1400	9500	37,4	226,4	
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	2004	3000	9500	29,9	141,8	0,919
	2005	4500	9500	37,4	226,4	
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	2004	0	4500	29,9	141,8	0,975*
	2005	2000	7500	37,4	226,4	
<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	2004	3000	4500	29,9	141,8	0,562
	2005	4500	4500	37,4	226,4	
<i>Actinomicete</i>	2004	4500	45000	29,9	141,8	0,35
	2005	4500	9500	37,4	226,4	
<i>Penicillium citreo-viride</i>	2004	0	200	29,9	141,8	0,780
	2005	200	300	37,4	226,4	
<i>Penicillium implicatum</i>	2004	300	600	29,9	141,8	0,882
	2005	0	700	37,4	226,4	
<i>Penicillium expansum</i>	2004	200	400	29,9	141,8	0,997**
	2005	200	600	37,4	226,4	
<i>Penicillium verucosum</i>	2004	0	300	29,9	141,8	0,793
	2005	0	200	37,4	226,4	
<i>Penicillium verucosum var. corimbiferum</i>	2004	200	2000	29,9	141,8	0,328
	2005	0	300	37,4	226,4	
<i>Penicillium griseo-fulvus</i>	2004	0	400	29,9	141,8	0,913
	2005	300	700	37,4	226,4	
<i>Penicillium steckii</i>	2004	0	200	29,9	141,8	0,928
	2005	0	200	37,4	226,4	
<i>Aspergillus nidulans</i>	2004	0	400	29,9	141,8	0,957*
	2005	200	600	37,4	226,4	
<i>Aspergillus thomii</i>	2004	300	600	29,9	141,8	0,983*
	2005	300	700	37,4	226,4	
<i>Rhodotorula sp.</i>	2004	300	400	29,9	141,8	0,889
	2005	400	600	37,4	226,4	
<i>Cladosporium herbarum</i>	2004	300	0	29,9	141,8	-0,902
	2005	200	0	37,4	226,4	
<i>Scytalidium sp.</i>	2004	0	0	29,9	141,8	0,837
	2005	0	200	37,4	226,4	

$p \leq 5\%$

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

Fig. 8.2.2.12. Reprezentarea grafică a coeficienților de corelație între numărul microorganismelor și sumele precipitațiilor din cele două sezoane din 2004 și 2005, în formațiunile mucilaginoase.



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Actinomicete*; 6. *Penicillium citreo-viride*; 7. *P. implicatum*; 8. *P. expansum*; 9. *P. veruncosum*; 10. *P. veruncosum var. corimbiferum*; 11. *P. griseo-fulvus*; 12. *P. steckii*; 13. *Aspergillus nidulans*; 14. *A. thomii*; 15. *Rhodotorula sp.*; 16. *Cladosporium herbarum*; 17. *Scytalidium sp.*

În figura 8.2.2.12. observăm tendința de corelații pozitive cu precipitațiile la șaisprezece din cele șaptesprezece specii determinate în formațiunile mucilaginoase. *Cladosporium herbarum* este singura specie, din cadrul consorțiului, la care se observă o tendință de corelații negative, deci numărul acesteia variază invers proporțional cu cantitatea de apă care alimentează cavitatea.

Pentru o valoare a lui $p \leq 5\%$ (vezi paragraful 8.1.4. și Anexa VI: Tabelul 8.1.4.1.), din tabelul 8.2.2.6. observăm că cea mai semnificativă corelație cu precipitațiile o prezintă *P. expansum*. Alte specii ce prezintă corelații semnificative sunt *A. thioparus*, *A. thomii* și *Aspergillus nidulans*, toate aceste specii prezentând corelații pozitive. Corelațiile în cazul restului speciilor sunt nesemnificative..

Luând în considerare cele discutate mai sus, în legătură cu formațiunile mucilaginoase, putem rezuma și concluziona următoarele:

- în anul 2004 au fost determinate șaisprezece specii de microorganisme, iar în anul 2005, pe lângă cele șaisprezece specii, identificate în 2004 a mai fost identificat și genul *Scytalidium* (Fam. *Dematiaceae*). Patru specii de acidithiobacili împreună cu actinomicetele, sunt reprezentanți ai bacteriilor, restul fiind reprezentanți ai fungilor. *A. neapolitanus*, *A. thiooxidans* și *A. thioparus* reprezintă bacterii chemolitotrofe acidofile care oxidează compușii cu sulf reduși, rezultați din oxidarea biologică și chimică a piritei din pereții cavității și sunt producătorii primari. *A. intermedius* este o specie cu un metabolism mixotrof, fiind heterotrof facultativă.

Substanța organică autohtonă, de la producătorii primari (acidithiobacilii), împreună cu substanța organică alohtonă, venită cu apa din alte sectoare ale cavității este descompusă de microorganismele heterotrofe. Heterotrofele sunt reprezentate de actinomicete, cât și de doisprezece specii de fungi

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

- din punct de vedere procentual, speciile bacteriene sunt dominante, cu aproximativ 90% din populația totală, față de fungi cu 10%.

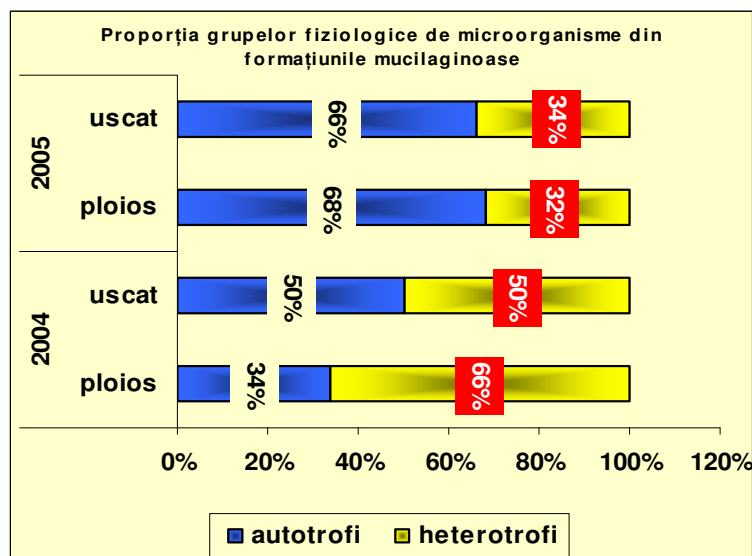
În sezonul ploios 2004, populațiile de heterotrofi sunt dominante, actinomicetele și fungii, reprezentând 66%, față de chemolitotrofi care reprezintă 34%. În sezonul uscat 2004, populația chemolitotrofilor (50%) este egală cu cea a heterotrofilor (50%), cu specificarea că *A. intermedius*, care reprezintă jumătate din proporția chemolitotrofilor (25%), este heterotrof facultativ.

În sezonul ploios 2005, speciile dominante sunt acidithiobaciliile chemolitotrofi 68% din care 10% este reprezentat de *A. intermedius* (heterotrof facultativ). Heterotrofii reprezintă 32% din care actinomicetele 21%, iar speciile de fungi reprezintă 11% din populația totală. În sezonul uscat 2005, ca și în cel ploios, speciile dominante sunt cele de acidithiobacili chemolitotrofi cu 66%, din care 24% este reprezentat de *A. intermedius*. Heterotrofii reprezintă 34% din care actinomicetele 24%, iar speciile de fungi reprezintă 10% din populația totală (Tabelul 8.2.2.7., Fig. 8.2.2.13.).

Tabelul 8.2.2.7. Proporția grupelor fiziologice de microorganisme din formațiunile mucilaginoase, în sezoanele ploioase și uscate ale anilor 2004 și 2005.

anul	sezonul	autotrofi	heterotrofi
2004	ploios	34%	66%
	uscat	50%	50%
2005	ploios	68%	32%
	uscat	66%	34%

Fig. 8.2.2.13. Reprezentare grafică cu proporția grupelor fiziologice de microorganisme din formațiunile mucilaginoase, în sezoanele ploioase și uscate ale anilor 2004 și 2005.



- cea mai mare variație a numărului de celule/ml de apă, de la sezonul ploios la cel secetos, în 2004 o prezintă *Actinomicetele*. Variații numerice semnificative înregistrează și speciile de acidithiobacili, dar și *P. veruncosum* var. *corimbiferum*, restul speciilor înregistrând variații numerice mai mici. În anul 2005, cea mai mare variație numerică o prezintă *Acidithiobacillus neapolitanus*. Alte specii ce prezintă variații numerice semnificative sunt *A. thiooxidans*; *A. thioparus*; *Actinomicetele*, dar și *P. expansum*; *P. griseo-fulvus*; *Aspergillus nidulans*; *A. thomii*.

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

- în cele două sezoane ale lui 2004 și 2005 s-a observat o variație mult mai mare a populațiilor de microorganisme, în formațiunile mucilaginoase față de stalactitele policrome.

- corelațiile realizate între numărul cel mai probabil de microorganisme și sumele precipitațiilor lunilor în care s-au făcut măsurătorile, în anii 2004 și 2005, pentru o valoare a lui $p = 0,05$ (vezi paragraful 8.1.4. și *Anexa VI: Tabelul 8.1.4.1.*), în tabelul 8.2.2.6., atată că cea mai semnificativă corelație cu precipitațiile o prezintă *P. expansum*. Alte specii ce prezintă corelații semnificative sunt *A. thioparus*, *Aspergillus nidulans* și *A. thomii*, toate aceste specii prezentând corelații pozitive. Corelațiile în cazul restului speciilor sunt ne semnificative.

- în cele două sezoane bogate în precipitații, din 2004 în 2005, s-a înregistrat o variație mare a numărului *Actinomicetelor*, ceea ce demonstrează că numărul foarte mare al acestora în 2004 este o situație întâmplătoare și de scurtă durată.

- a fost observată, de asemenea, o variație numerică mai mică a microorganismelor, de la sezonul ploios la cel secetos, în 2005 față de 2004.

După cum spuneam în capitolul 6, debitul apei din nișa în care se găsesc formațiunile mucilaginoase variază mult de la perioadele bogate în precipitații la cele sărace în precipitații. Astfel, spre deosebire de stalactitele policrome, în formațiunile mucilaginoase am observat o variație mai mare a populațiilor de microorganisme, în cei doi ani, de la sezonul ploios la cel secetos.

Producătorii primari, reprezentați de speciile de acidithiobacili, realizează oxidarea piritei și a altor sulfuri metalice (vezi capitolul 11) din pereții Galeriei Kiesberg, dar și a Fe^{2+} și a compușilor cu sulf reduși, rezultați din oxidarea biologică și chimică a piritei. Oxidarea biologică a piritei spre exemplu, care se realizează la locul de contact al formațiunilor mucilaginoase cu peretele galeriei, este foarte intensă în perioadele în care există cantități mari de apă, care preiau producția de oxidare, deoarece acumulările locale ale acestora sunt inhibitoare asupra acidithiobacililor activi în oxidare (capitolul 1 și 2). Producția rezultați din oxidarea piritei sunt oxidați rapid de chemolitotrofele consorțiului mucilaginos aflați la o oarecare distanță de rocă. Astfel, a fost observat faptul că în anul 2005, în care cantitatea de apă a fost semnificativ mai mare pe toate lunile (1202,2 mm), față de 2004 (875 mm), au predominat, în cadrul formațiunilor mucilaginoase, populațiile de microorganisme autotrofe (chemolitotrofe), în anul 2004 predominând, în general, populațiile de heterotrofi.

În concluzie, formațiunile mucilaginoase reprezintă o asociație formată din populații de microorganisme acidofile (pH-ul apei este de 2,81), autotrofe (chemolitotrofe) și heterotrofe între care există relații strânse, iar raportul dintre acestea variază în funcție de aportul de apă și de alți factori de mediu.

8.2.3. Balta cu depuneri

„Balta cu depuneri” a fost eșantionată în flacoane sterile, iar eșantioanele au fost reprezentate de depunerile roșii și albe (vezi capitolul 6.).

În anul 2004: -speciile determinate și numărul cel mai probabil al acestora (nr. de celule/ml de apă) sunt prezentate în *Tabelul 8.2.3.1.*

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

Tabelul 8.2.3.1. Numărul cel mai probabil de microorganisme în anul 2004, în balta cu depuneri.

Specia	2004		
	Ploios (nr.celule/ml)	Uscat (nr.celule/ml)	amplitudinea variației (nr.celule/ml)
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	9500	4500	5000
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	7500	3000	4500
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	4500	2000	2500
<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	9500	7500	2000
<i>Flexibacter sancti</i>	12000	10000	2000
<i>Acidovorax delafieldii</i>	500	1500	1000
<i>Chryseobacterium gleum</i>	10500	7500	3000
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	11000	7500	3500
<i>Penicillium notatum (dep. Roșie)</i>	600	200	400
<i>Aspergillus thomii (dep. Roșie)</i>	700	0	700
<i>Penicillium notatum (dep. Albă)</i>	700	400	300
<i>Aspergillus niger (dep. Albă)</i>	300	200	100
<i>(Aspergillus thomii) (dep. Albă)</i>	0	0	0

În Tabelul 8.2.3.1. observăm faptul că, în balta cu depuneri, au fost determinate doisprezece specii de microorganisme, din care zece specii în depunerea roșie și trei în depunerea albă. Pe lângă aceste specii, presupunem prezența masivă, în acest bazin și a bacteriei *Gallionella ferruginea*, care oxidează enzimatic Fe^{2+} la pH-ul aproape neutru al apei din balta cu depuneri (pH între 6 și 7).

Din imaginile de microscopie electronică de baleiaj (M.E.B.) (vezi capitolul 11), am observat că depunerea roșie este formată în totalitate din filamente organice spiralate pe care se depune hidroxidul feric, aceste filamente semănând foarte mult cu filamentele de *G. ferruginea*. Prezența acestui microorganism, o presupunem și datorită caracteristicilor fiziologice ale bacteriei *G. ferruginea*, demonstrate de-a lungul timpului de diverși autori (vezi capitolul 1) și anume:

- oxidează enzimatic Fe^{2+} la pH neutru (Zarnea, 1994), balta cu depuneri fiind un bazin cu un pH de peste 6.

- în culturi, în laborator, în condiții aerobe, crește exponențial, celulele crescând libere, mobile cu un singur flagel și fără formare de filamente. Filamentele au început să fie formate numai în faza staționară la un pH peste 6. Nici un filament nu s-a format când Fe^{2+} nu s-a autooxidat, condiții care includ microaerobioza. Hallbeck și Pedersen (1990) sugerează că formarea filamentelor protejează împotriva “creșterii capacității reducătoare a Fe^{2+} în timp ce devine instabil într-un mediu care devine oxidator”.

- preferă un interval de pH cuprins între 6 – 7,6, iar necesitatea scăzută de O_2 explică de ce acest microorganism poate cataliza oxidarea Fe^{2+} la pH neutru. În aceste condiții parțial reduse, fierul se autooxidează doar lent (Wolfe, 1964).

- poate crește autotrof și mixotrof (Hallbeck și Pedersen, 1991).

Până în momentul de față, din cauza unor probleme tehnice, nu s-a reușit identificarea acesteia, dar pe viitor vom încerca demonstrarea acestei presupuneri.

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

Din cele doisprezece specii identificate, cele patru specii de acidithiobacili împreună cu *Flexibacter sancti*; *Acidovorax delafieldii*; *Chryseobacterium gleum*; *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, sunt reprezentanți ai bacteriilor, restul speciilor determinate fiind reprezentanți ai fungilor.

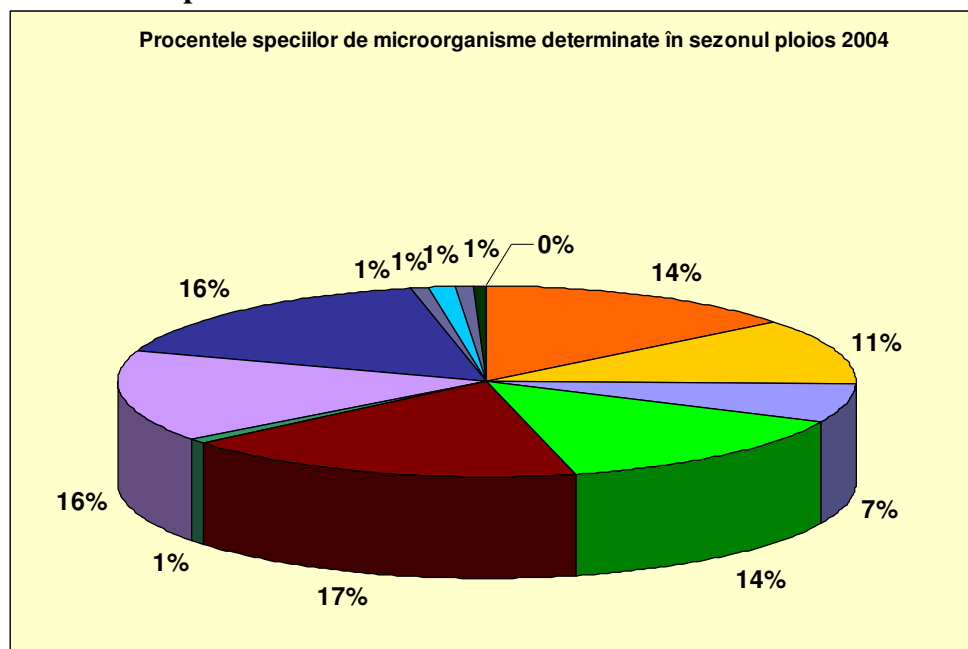
A. neapolitanus, *A. thiooxidans* și *A. thioparus* reprezintă bacterii chemolitotrofe, care realizează oxidarea compușilor cu sulf reduși, rezultați din oxidarea biologică și chimică a piritei din pereții Galeriei Kiesberg (vezi capitolul 11.), reprezentând, în cadrul acestei comunități de microorganisme, producătorii primari de substanță organică. A patra specie de acidithiobacili identificată și anume *A. intermedius* este o specie cu un metabolism mixotrof fiind heterotrof facultativă.

Balta cu depuneri, fiind un bazin cu apă ce se găsește în unul din cele mai profunde sectoare ale Galeriei Kiesberg (vezi capitolul 6), drenează o bună parte din apele cavității, acestea aducând cantități mari de substanță organică, pe de o parte de la alte comunități de microorganisme, pe de altă parte de la coloniile de lilieci (guano și cadavre) aflate în diverse sectoare ale cavității. Substanța organică alohtonă deci, împreună cu cea rezultată din activitatea producătorilor primari (a acidithiobacililor) (capitolul 11.), este descompusă de microorganismele heterotrofe din acest microecosistem. Aceste microorganisme heterotrofe sunt reprezentate de celelalte specii bacteriene identificate, cât și de următoarele specii de fungi: 1. *depunere roșie*: Fam. Moniliaceae: *Penicillium notatum*; *Aspergillus thomii*; 2. *depunerea albă*: Fam. Moniliaceae: *P. notatum*, *A. niger*.

La fel ca în cazul formațiunilor mucilaginoase și în cazul bălții cu depuneri, pentru a ușura apoi comparațiile între rezultatele determinărilor din cele două sezoane din anii 2004 și 2005, am preferat specificarea în tabelele și graficele referitoare la anul 2004 a genului *A. thomii* (Fam. Moniliaceae), care a fost identificat de fapt doar în eșantioanele anului 2005.

Procentele speciilor determinate în cele două sezoane, ploios și uscat, pe anul 2004, sunt prezentate în Figurile 8.2.3.1.; 8.2.3.2.

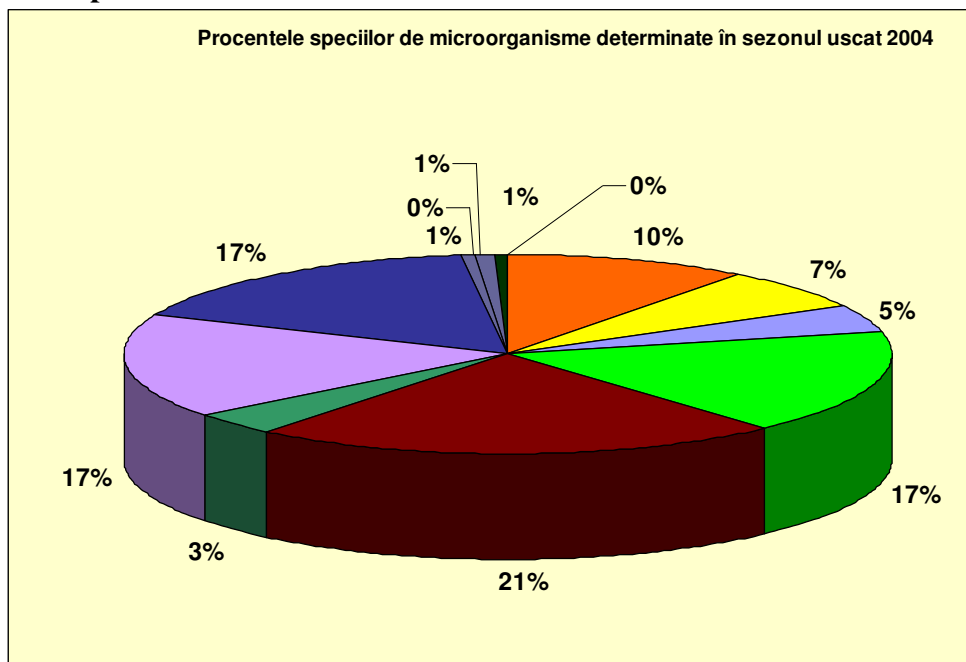
Fig. 8.2.3.1. Procentele speciilor de microorganisme determinate în sezonul ploios 2004, în balta cu depuneri.



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Flexibacter sancti*; 6. *Acidovorax delafieldii*; 7. *Chryseobacterium gleum*; 8. *Staphylococcus aureus subsp. aureus*; 9. *Penicillium notatum* (dep. Roșie); 10. *Aspergillus thomii* (dep. Roșie); 11. *Penicillium notatum* (dep. Albă); 12. *Aspergillus niger* (dep. Albă); 13. *Aspergillus thomii* (dep. Albă).

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

Fig. 8.2.3.2. Procentele speciilor de microorganisme determinate în sezonul uscat 2004, în balta cu depuneri.



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Flexibacter sancti*; 6. *Acidovorax delafieldii*; 7. *Chryseobacterium gleum*; 8. *Staphylococcus aureus subsp. aureus*; 9. *Penicillium notatum (dep. Roșie)*; 10. *Aspergillus thomii (dep. Roșie)*; 11. *Penicillium notatum (dep. Albă)*; 12. *Aspergillus niger (dep. Albă)*; 13. *Aspergillus thomii (dep. Albă)*.

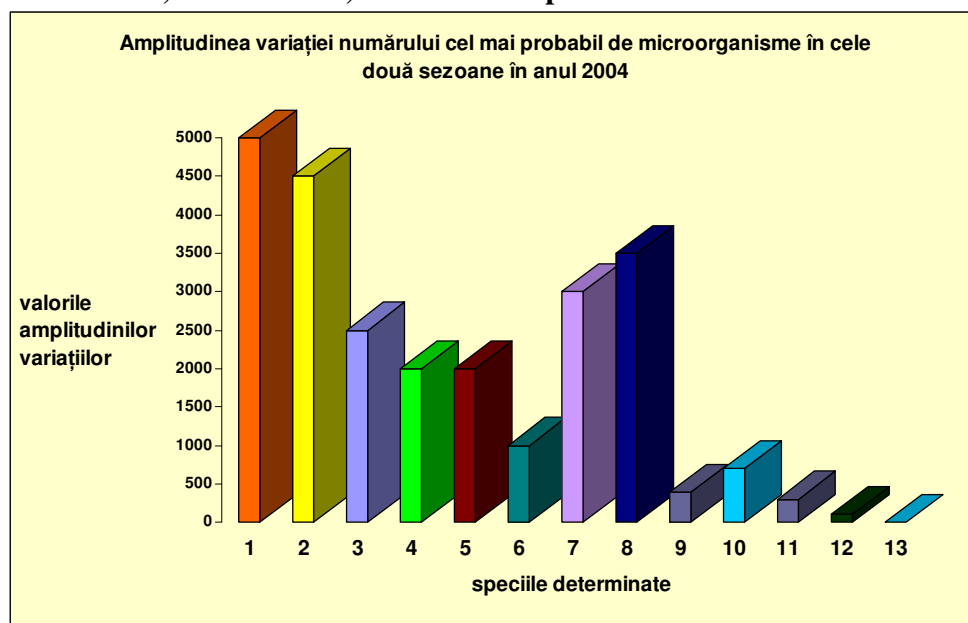
În figurile 8.2.3.1. și 8.2.3.2., atât în sezonul ploios cât și în cel uscat, se observă o dominație clară a speciilor bacteriene, care reprezintă peste 90%, față de speciile de fungi cu doar câteva procente din populația totală.

În ambele sezoane ale anului 2004 populațiile heterotrofelor sunt dominante, în sezonul ploios reprezentând 54%, iar în cel uscat 61%. Populațiile chemolitotrofe (autotrofe) de acidithiobacili reprezintă 46% din populația totală în sezonul ploios și 39% în cel uscat, cu precizarea că din aceste procente 14-17% reprezintă *A. intermedius* care este un microorganism mixotrof, heterotrof facultativ.

Amplitudinea variației numărului de microorganisme, de la un sezon la altul, în anul 2004 (Tabelul 8.2.3.1.) este prezentată în Figura 8.2.3.3.

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

Fig. 8.2.3.3. Amplitudinea variației numărului cel mai probabil de microorganisme, de la un sezon la altul, în anul 2004, în balta cu depuneri.



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Flexibacter sancti*; 6. *Acidovorax delafieldii*; 7. *Chryseobacterium gleum*; 8. *Staphylococcus aureus subsp. aureus*; 9. *Penicillium notatum* (dep. Roșie); 10. *Aspergillus thomii* (dep. Roșie); 11. *Penicillium notatum* (dep. Albă); 12. *Aspergillus niger* (dep. Albă); 13. *Aspergillus thomii* (dep. Albă).

În figura 8.2.3.3. observăm, că de la sezonul ploios la cel secetos, majoritatea speciilor identificate suferă variații numerice, cea mai mare diferență numerică prezentând-o cele patru specii de thiocacili, dar și celelalte specii bacteriene.

Prin calculul coeficienților de variație (Tabelul 8.2.3.2., Fig. 8.2.3.4.), am observat variațiile de frecvență ale speciilor determinate, de la un sezon la altul, în anul 2004.

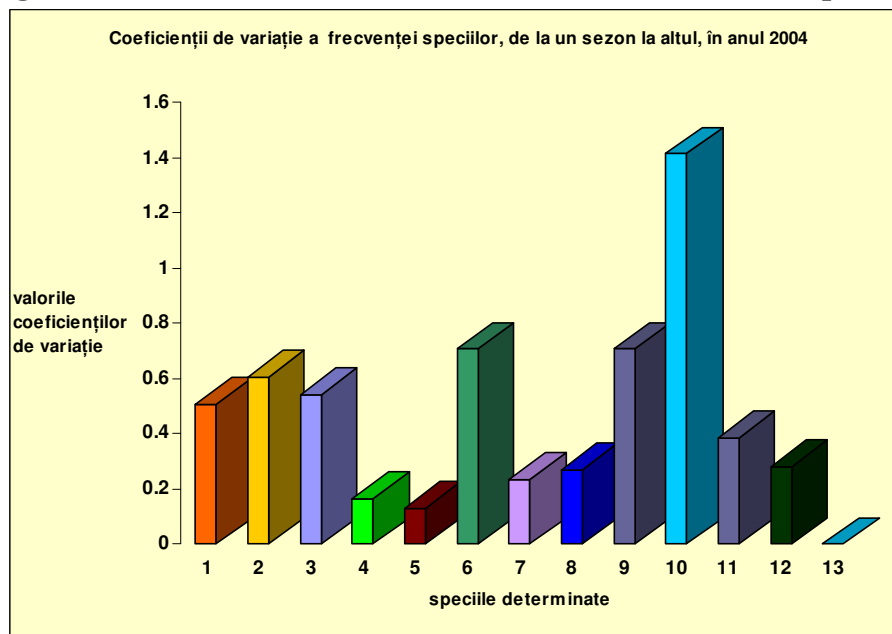
Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

Tabelul 8.2.3.2. Media aritmetică, eroarea standard a mediei (ES), derivația standard (DS) și coeficienții de variație a speciilor pe anul 2004, în balta cu depuneri.

Specia	2004				
	Ploios (nr.celule/ml)	Uscat (nr.celule/ml)	media ± ES	DS	coeficientul de variație
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	9500	4500	7000±2500	3535,53	0,50
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	7500	3000	5250±2250	3181,98	0,60
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	4500	2000	3250±1250	1767,76	0,54
<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	9500	7500	8500±1000	1414,21	0,16
<i>Flexibacter sancti</i>	12000	10000	11000±1000	1414,21	0,12
<i>Acidovorax delafieldii</i>	500	1500	1000±500	707,10	0,70
<i>Chryseobacterium gleum</i>	10500	7500	9000±1500	2121,32	0,23
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	11000	7500	9250±1750	2474,87	0,26
<i>Penicillium notatum</i> (dep. Roșie)	600	200	400±200	282,84	0,70
<i>Aspergillus thomii</i> (dep. Roșie)	700	0	350±350	494,97	1,41
<i>Penicillium notatum</i> (dep. Albă)	700	400	550±150	212,13	0,38
<i>Aspergillus niger</i> (dep. Albă)	300	200	250±50	70,71	0,28
(<i>Aspergillus thomii</i>) (dep. Albă)	0	0	0	0	0

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

Fig. 8.2.3.4. Reprezentarea grafică a coeficienților de variație a speciilor de microorganisme, de la un sezon la altul, în anul 2004, în balta cu depuneri.



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Flexibacter sancti*; 6. *Acidovorax delafieldii*; 7. *Chryseobacterium gleum*; 8. *Staphylococcus aureus subsp. aureus*; 9. *Penicillium notatum* (dep. Roșie); 10. *Aspergillus thomii* (dep. Roșie); 11. *Penicillium notatum* (dep. Albă); 12. *Aspergillus niger* (dep. Albă); 13. *Aspergillus thomii* (dep. Albă).

De la sezonul ploios la cel secetos (Fig. 8.2.3.4.), observăm că cele mai mari variații ale distribuțiilor frecvențelor le înregistrează *Aspergillus thomii* (dep. Roșie), care în sezonul uscat, nu a fost identificată. Alte specii care prezintă variații mari de frecvență sunt: *Acidithiobacillus neapolitanus*; *A. thiooxidans*; *A. thioparus*; *Acidovorax delafieldii* și *Penicillium notatum* (dep. Roșie), restul prezentând variații mai mici.

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

În anul 2005: -speciile determinate și numărul cel mai probabil al acestora sunt prezentate în Tabelul 8.2.3.3.

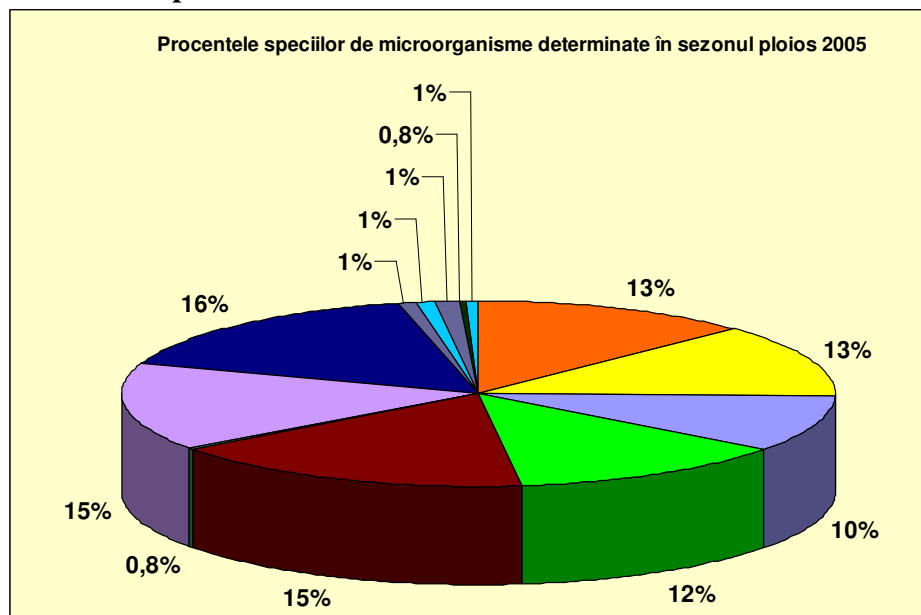
Tabelul 8.2.3.3. Numărul cel mai probabil de microorganisme în anul 2005, în balta cu depuneri.

Specia	2005		
	Ploios (nr.celule/ml)	Uscat (nr.celule/ml)	amplitudinea variației (nr.celule/ml)
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	9500	7500	2000
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	9500	4500	5000
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	7500	4500	3000
<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	9500	7500	2000
<i>Flexibacter sancti</i>	12500	9500	3000
<i>Acidovorax delafieldii</i>	300	1500	1200
<i>Chryseobacterium gleum</i>	11500	7500	4000
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	12000	9500	2500
<i>Penicillium notatum (dep. Roșie)</i>	700	200	500
<i>Aspergillus thomii (dep. Roșie)</i>	600	200	400
<i>Penicillium notatum (dep. Albă)</i>	700	600	100
<i>Aspergillus niger (dep. Albă)</i>	300	0	300
<i>Aspergillus thomii (dep. Albă)</i>	400	200	200

Din tabelul 8.2.3.3., observăm că în anul 2005 au fost determinate treisprezece specii de microorganisme, dintre care doisprezece au fost identificate și în 2004. *Aspergillus thomii (dep. Albă)* din *Fam. Moniliaceae* este singurul identificat în plus în 2005 față de 2004. Procentele speciilor identificate în anul 2005, în cele două sezoane, sunt prezentate în *Figurile 8.2.3.5.; 8.2.3.6.*

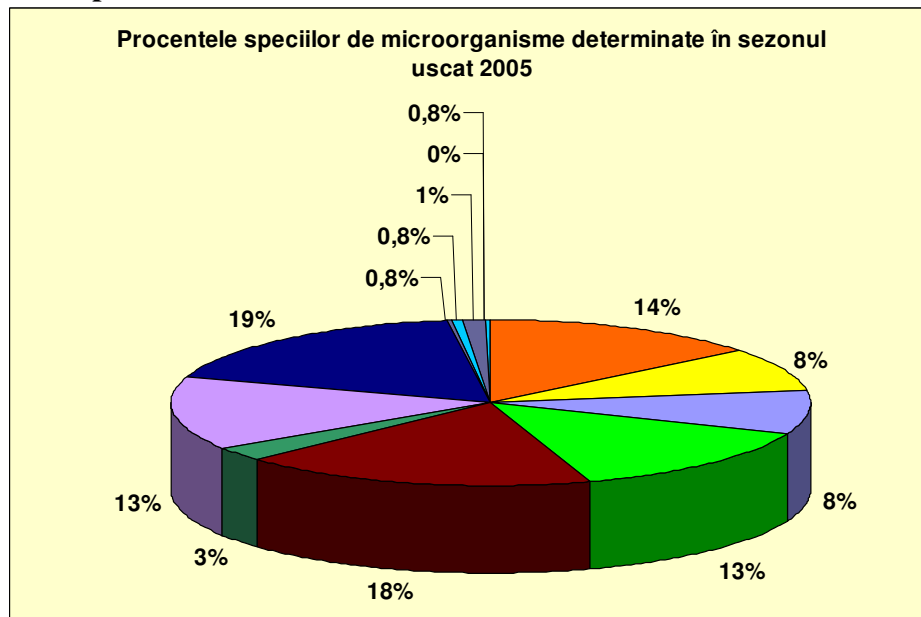
Capitolul 8. Determinări microbiologice.

Fig. 8.2.3.5. Procentele speciilor de microorganisme determinate în sezonul ploios 2005, în balta cu depuneri.



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Flexibacter sancti*; 6. *Acidovorax delafieldii*; 7. *Chryseobacterium gleum*; 8. *Staphylococcus aureus subsp. aureus*; 9. *Penicillium notatum (dep. Roșie)*; 10. *Aspergillus thomii (dep. Roșie)*; 11. *Penicillium notatum (dep. Albă)*; 12. *Aspergillus niger (dep. Albă)*; 13. *Aspergillus thomii (dep. Albă)*.

Fig. 8.2.3.6. Procentele speciilor de microorganisme determinate în sezonul uscat 2005, în balta cu depuneri.



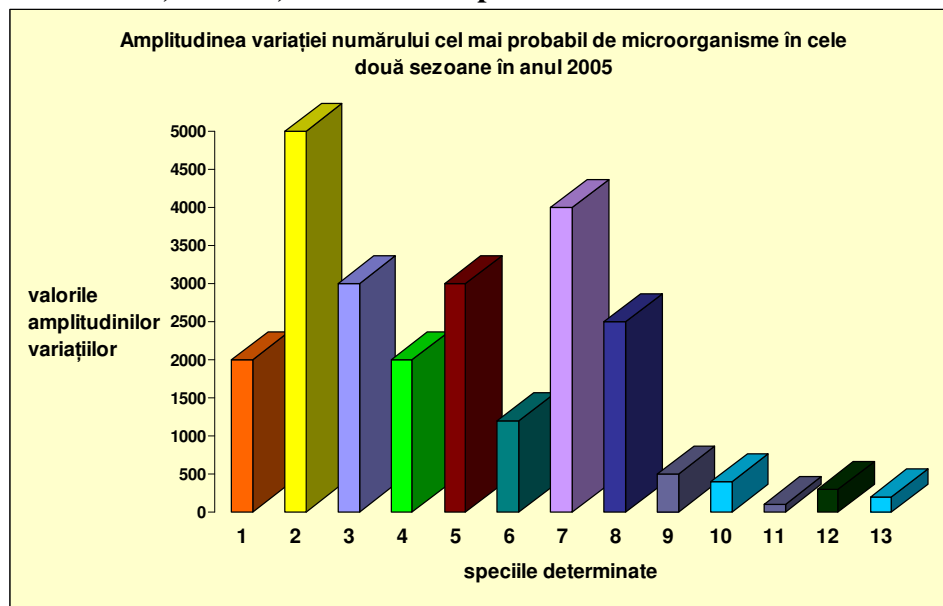
La fel ca în 2004, în ambele sezoane ale lui 2005 observăm dominația speciilor bacteriene, care reprezintă peste 90%, față de speciile de fungi cu doar câteva procente din populația totală. Populațiile microorganismelor heterotrofe sunt dominante în ambele sezoane, astfel, în sezonul ploios reprezintă 52%, iar în cel uscat 67%. Populațiile de acidithiobacili chemolitotrofi (autotrofe)

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

reprezintă 48% din populația totală în sezonul ploios și 43% în cel uscat, cu precizarea că din aceste procente 12-13% reprezintă *A. intermedius* care este heterotrof facultativ.

Amplitudinea variației numărului de microorganisme, de la un sezon la altul, în 2005 este prezentată în *Figura 8.2.3.7*.

Fig. 8.2.3.7. Amplitudinea variației numărului cel mai probabil de microorganisme, de la un sezon la altul, în 2005, în balta cu depuneri.



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Flexibacter sancti*; 6. *Acidovorax delafieldii*; 7. *Chryseobacterium gleum*; 8. *Staphylococcus aureus subsp. aureus*; 9. *Penicillium notatum* (dep. Roșie); 10. *Aspergillus thomii* (dep. Roșie); 11. *Penicillium notatum* (dep. Albă); 12. *Aspergillus niger* (dep. Albă); 13. *Aspergillus thomii* (dep. Albă).

Cele mai mari diferențe numerice (*Fig. 8.2.3.7.*), de la un sezon la altul, le prezintă populațiile de *A. thiooxidans*; *A. thioparus*; *Flexibacter sancti*; *Chryseobacterium gleum* și *Staphylococcus aureus subsp. aureus*. Și populațiile celorlalte specii prezintă diferențe numerice destul de mari. De la un sezon la altul.

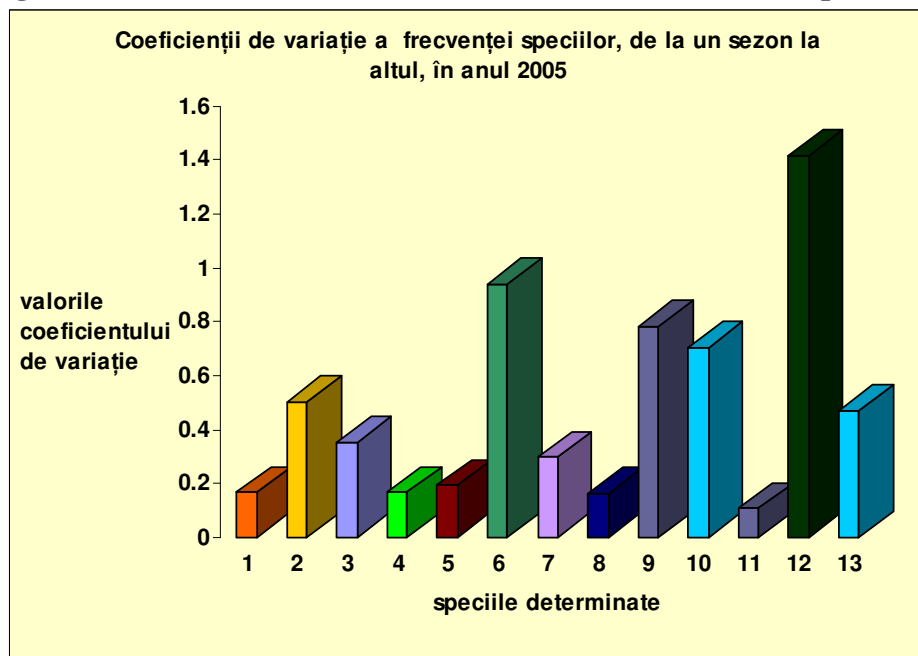
Variațiile de frecvență ale speciilor determinate, de la un sezon la altul, în anul 2005, au fost observate prin calculul coeficienților de variație (*Tabelul 8.2.3.4., Fig. 8.2.3.8.*),.

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

Tabelul 8.2.3.4. Media aritmetică, derivația standard (DS), eroarea standard (ES), și coeficienții de variație a speciilor pe anul 2005, în balta cu depuneri.

Specia	2005				
	Ploios (nr.celule/ml)	Uscat (nr.celule/ml)	media ± ES	DS	coeficientul de variație
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	9500	7500	8500±1000	1414,21	0,16
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	9500	4500	7000±2500	3535,53	0,50
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	7500	4500	6000±1500	2121,32	0,35
<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	9500	7500	8500±1000	1414,21	0,16
<i>Flexibacter sancti</i>	12500	9500	11000±1500	2121,32	0,19
<i>Acidovorax delafieldii</i>	300	1500	900±600	848,52	0,94
<i>Chryseobacterium gleum</i>	11500	7500	9500±2000	2828,42	0,29
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	12000	9500	10750±1250	1767,76	0,16
<i>Penicillium notatum (dep. Roșie)</i>	700	200	450±250	353,55	0,78
<i>Aspergillus thomii (dep. Roșie)</i>	600	200	400±200	282,84	0,70
<i>Penicillium notatum (dep. Albă)</i>	700	600	650±50	70,71	0,10
<i>Aspergillus niger (dep. Albă)</i>	300	0	150±150	212,13	1,41
<i>Aspergillus thomii (dep. Albă)</i>	400	200	300±100	141,42	0,47

Fig. 8.2.3.8. Reprezentarea grafică a coeficienților de variație a speciilor de microorganisme, de la un sezon la altul, în anul 2005, în balta cu depuneri.



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Flexibacter sancti*; 6. *Acidovorax delafieldii*; 7. *Chryseobacterium gleum*; 8. *Staphylococcus aureus subsp. aureus*; 9. *Penicillium notatum (dep. Roșie)*; 10. *Aspergillus thomii (dep. Roșie)*; 11. *Penicillium notatum (dep. Albă)*; 12. *Aspergillus niger (dep. Albă)*; 13. *Aspergillus thomii (dep. Albă)*.

În Fig. 8.2.3.8., observăm că cele mai mari variații ale distribuțiilor frecvențelor le înregistrează *Aspergillus niger (dep. Albă)*, care în sezonul uscat, nu a fost identificată. Alte specii care prezintă variații destul de mari de frecvență sunt: *A. thiooxidans*; *A. thioparus*; *Acidovorax delafieldii*; *Penicillium notatum (dep. Roșie)*; *Aspergillus thomii (dep. Roșie)*; *Aspergillus niger (dep. Albă)* și *Aspergillus thomii (dep. Albă)*, restul prezentând variații destul de mici.

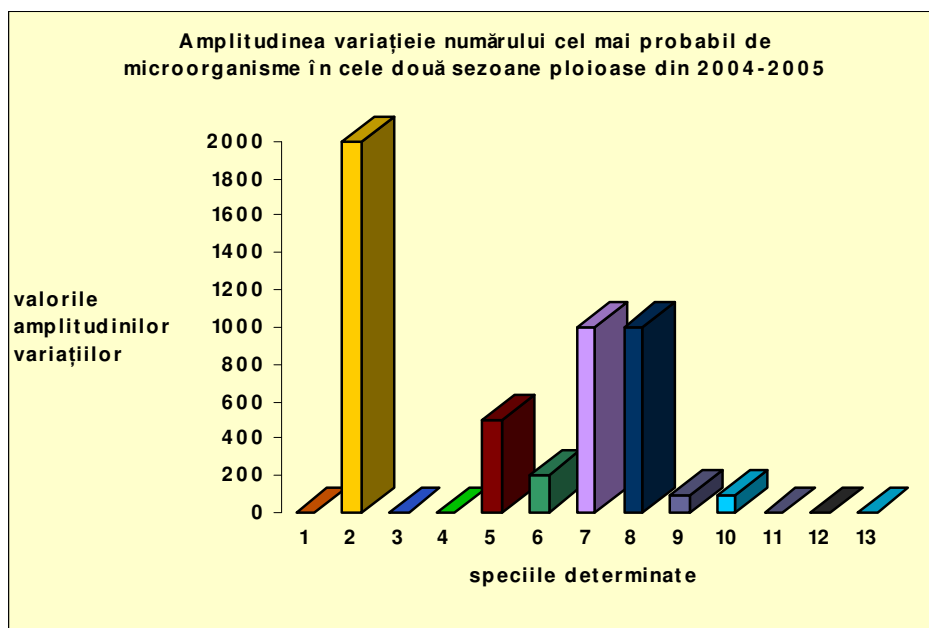
Limitele minime și maxime ale numărului cel mai probabil de microorganisme determinate în cele două sezoane, din cei doi ani, 2004-2005, cât și amplitudinea variațiilor acestora sunt prezentate în tabelul 8.2.3.5. și în Figurile 8.2.3.9., 8.2.3.10.

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

Tabelul 8.2.3.5. Limitele minime și maxime ale numărului cel mai probabil de microorganisme în sezoanele ploioase și secetoase din anii 2004-2005, în balta cu depuneri.

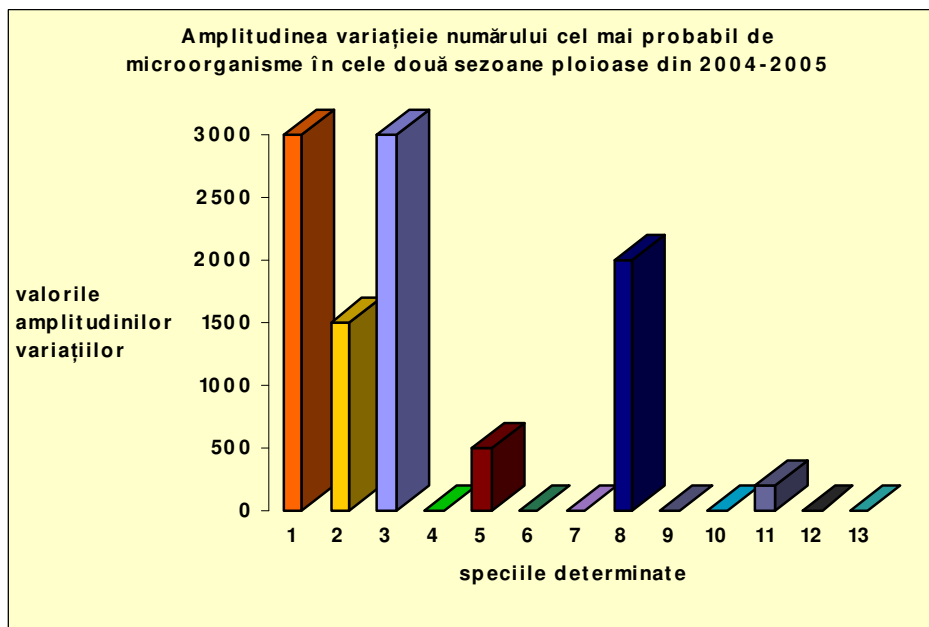
Specia	2004-2005			
	Ploios (nr.celule/ml)	Uscat (nr.celule/ml)	Amplitudinea variației (nr.celule/ml)	
	minim-maxim	minim-maxim	ploios	uscat
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	9500-9500	4500-7500	0	3000
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	7500-9500	3000-4500	2000	1500
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	9500-9500	4500-7500	0	3000
<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	9500-9500	7500-7500	0	0
<i>Flexibacter sancti</i>	12000-12500	9500-10000	500	500
<i>Acidovorax delafieldii</i>	300-500	1500-1500	200	0
<i>Chryseobacterium gleum</i>	10500-11500	7500-7500	1000	0
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	11000-12000	7500-9500	1000	2000
<i>Penicillium notatum (dep. Roșie)</i>	600-700	200-200	100	0
<i>Aspergillus thomii (dep. Roșie)</i>	600-700	200-200	100	0
<i>Penicillium notatum (dep. Albă)</i>	700-700	400-600	0	200
<i>Aspergillus niger (dep. Albă)</i>	300-300	200-200	0	0
<i>Aspergillus thomii (dep. Albă)</i>	400-400	200-200	0	0

Fig. 8.2.3.9. Amplitudinea variației numărului cel mai probabil de microorganisme în sezoanele ploioase din anii 2004-2005, în balta cu depuneri.



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Flexibacter sancti*; 6. *Acidovorax delafieldii*; 7. *Chryseobacterium gleum*; 8. *Staphylococcus aureus subsp. aureus*; 9. *Penicillium notatum (dep. Roșie)*; 10. *Aspergillus thomii (dep. Roșie)*; 11. *Penicillium notatum (dep. Albă)*; 12. *Aspergillus niger (dep. Albă)*; 13. *Aspergillus thomii (dep. Albă)*.

Fig. 8.2.3.10. Amplitudinea variației numărului cel mai probabil de microorganisme în sezoanele uscate din anii 2004-2005, în balta cu depuneri.



Variațiile numerice cele mai mari (Fig. 8.2.3.9.), pentru cele două sezoane bogate în precipitații, din anii 2004-2005, le observăm în cazul lui *A. thiooxidans*. Alte specii ce prezintă variații numerice mai semnificative sunt: *Flexibacter sancti*; *Chryseobacterium gleum* și

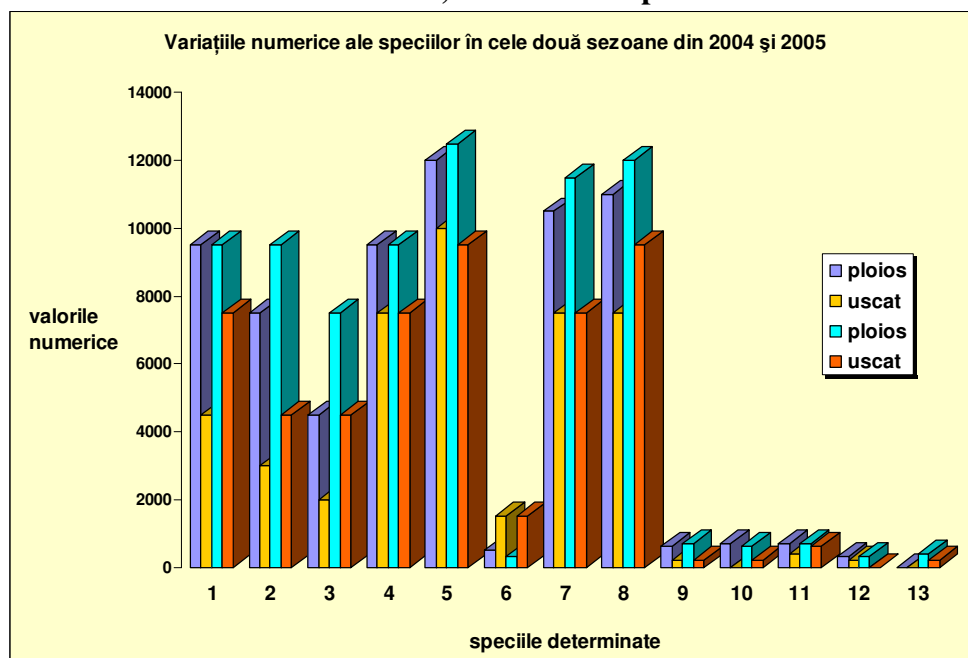
Capitolul 8. Determinări microbiologice.

Staphylococcus aureus subsp. aureus, restul prezentând variații mici. *Acidithiobacillus neapolitanus*; *A. thioparus*; *A. intermedius*; *Penicillium notatum* (dep. Albă); *Aspergillus niger* (dep. Albă); *Aspergillus thomii* (dep. Albă) nu prezintă variații numerice, din 2004 în 2005, în sezoanele bogate în precipitații.

În sezoanele sărace în precipitații (Fig. 8.2.3.10.) observăm o variație numerică mare în cazul lui *Acidithiobacillus neapolitanus*; *A. thiooxidans*; *A. thioparus* și *P. expansum*. În mai mică măsură, variații numerice, din 2004 în 2005, mai prezintă *Flexibacter sancti* și *Penicillium notatum* (dep. Albă), iar restul speciilor nu înregistrează nici o variație în sezoanele uscate, din cei doi ani.

Fig. 8.2.3.11. reprezintă o imagine generală a modului în care fiecare specie înregistrează variații numerice de la sezonul ploios la cel uscat în cei doi ani.

Fig. 8.2.3.11. Reprezentarea grafică, în ansamblu, a variațiilor numerice ale speciilor în cele două sezoane din anii 2004-2005, în balta cu depuneri.



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Flexibacter sancti*; 6. *Acidovorax delafieldii*; 7. *Chryseobacterium gleum*; 8. *Staphylococcus aureus subsp. aureus*; 9. *Penicillium notatum* (dep. Roșie); 10. *Aspergillus thomii* (dep. Roșie); 11. *Penicillium notatum* (dep. Albă); 12. *Aspergillus niger* (dep. Albă); 13. *Aspergillus thomii* (dep. Albă).

Din Fig. 8.2.3.11. se observă, ca și în cazul celorlalte eșantioane, o variație numerică mai mică a microorganismelor, de la sezonul ploios la cel secetos, în 2005 față de 2004. Variații numerice mari se observă în cazul *Acidithiobacillus neapolitanus*; *A. thiooxidans*; *A. thioparus*; *A. intermedius*; *Flexibacter sancti*; *Chryseobacterium gleum* și *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, restul speciilor înregistrând variații mai mici.

Ca și la celelalte eșantioane și în cazul bălții cu depuneri au fost realizate corelații între numărul cel mai probabil de microorganisme, determinat în lunile, martie și iulie ale lui 2004 și aprilie și noiembrie, din 2005 și sumele precipitațiilor acestora (Tabelul 8.2.3.6., Fig. 8.2.3.12.).

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

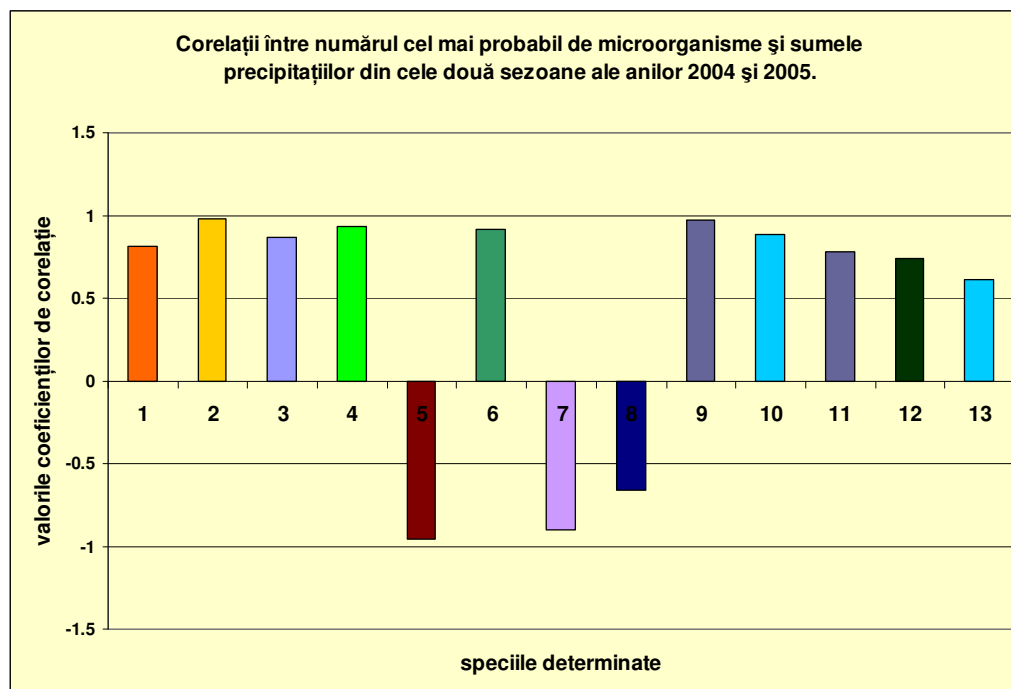
Tabelul 8.2.3.6. Corelații între numărul microorganismelor și sumele precipitațiilor din cele două sezoane ale lui 2004 și 2005, în balta cu depuneri.

Specia		Uscat (nr.celule/ml)	Ploios (nr.celule/ml)	Uscat (sum.precip. în mm)	Ploios (sum.precip. în mm)	Corelație
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	2004	4500	9500	29,9	141,8	0,811
	2005	7500	9500	37,4	226,4	
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	2004	3000	7500	29,9	141,8	0,980*
	2005	4500	9500	37,4	226,4	
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	2004	2000	4500	29,9	141,8	0,871
	2005	4500	7500	37,4	226,4	
<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	2004	7500	9500	29,9	141,8	0,928
	2005	7500	9500	37,4	226,4	
<i>Flexibacter sancti</i>	2004	12000	10000	29,9	141,8	-0,957*
	2005	12500	9500	37,4	226,4	
<i>Acidovorax delafieldii</i>	2004	500	1500	29,9	141,8	0,916
	2005	300	1500	37,4	226,4	
<i>Chryseobacterium gleum</i>	2004	10500	7500	29,9	141,8	-0,903
	2005	11500	7500	37,4	226,4	
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	2004	11000	7500	29,9	141,8	-0,660
	2005	12000	9500	37,4	226,4	
<i>Penicillium notatum (dep. Roșie)</i>	2004	200	600	29,9	141,8	0,974*
	2005	200	700	37,4	226,4	
<i>Aspergillus thomii (dep. Roșie)</i>	2004	0	700	29,9	141,8	0,855
	2005	200	600	37,4	226,4	
<i>Penicillium notatum (dep. Albă)</i>	2004	400	700	29,9	141,8	0,777
	2005	600	700	37,4	226,4	
<i>Aspergillus niger (dep. Albă)</i>	2004	200	300	29,9	141,8	0,739
	2005	0	300	37,4	226,4	
<i>Aspergillus thomii (dep. Albă)</i>	2004	0	0	29,9	141,8	0,608
	2005	200	400	37,4	226,4	

$p \leq 5\%$

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

Fig. 8.2.3.12. Reprezentarea grafică a coeficienților de corelație între numărul microorganismelor și sumele precipitațiilor din cele două sezoane din 2004 și 2005, în balta cu depuneri.



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Flexibacter sancti*; 6. *Acidovorax delafieldii*; 7. *Chryseobacterium gleum*; 8. *Staphylococcus aureus subsp. aureus*; 9. *Penicillium notatum (dep. Roșie)*; 10. *Aspergillus thomii (dep. Roșie)*; 11. *Penicillium notatum (dep. Albă)*; 12. *Aspergillus niger (dep. Albă)*; 13. *Aspergillus thomii (dep. Albă)*.

Din reprezentarea grafică a coeficienților de corelație (Fig. 8.2.3.12.) observăm faptul că *Flexibacter sancti*; *Chryseobacterium gleum*; *Staphylococcus aureus subsp. aureus* prezintă o tendință de variații numerice invers proporțional cu precipitațiile (corelații negative). Restul speciilor determinate prezintă o tendință de corelații pozitive cu precipitațiile, deci numărul lor crește proporțional cu debitul apei care intră în balta cu depuneri (influentul).

Pentru o valoare a lui $p \leq 5\%$ (vezi paragraful 8.1.4. și Anexa VI: Tabelul 8.1.4.1.), din tabelul 8.2.3.6. observăm că cele mai semnificative corelații cu precipitațiile le prezintă *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Flexibacter sancti* și *Penicillium notatum (dep. Roșie)*. Dintre acestea *Acidithiobacillus thiooxidans* și *Penicillium notatum (dep. Roșie)* prezintă corelații pozitive, iar *Flexibacter sancti* este corelată negativ. Corelațiile în cazul restului speciilor sunt nesemnificative.

Rezumând și concluzionând, cele discutate mai sus referitor la balta cu depuneri, putem considera următoarele:

- în anul 2004 au fost determinate doisprezece specii de microorganisme, iar în anul 2005, pe lângă cele doisprezece specii, identificate în 2004 a mai fost identificat și *Aspergillus thomii (dep. Albă)* (Fam. Moniliaceae).

- cele patru specii de acidithiobacili împreună cu *Flexibacter sancti*; *Acidovorax delafieldii*; *Chryseobacterium gleum*; *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, sunt reprezentanți ai bacteriilor, restul speciilor determinate fiind reprezentanți ai fungilor.

A. neapolitanus, *A. thiooxidans* și *A. thioparus* sunt bacterii chemolitotrofe și reprezintă producătorii primari de substanță organică. *A. intermedius* este o specie cu un metabolism mixotrof fiind heterotrof facultativă.

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

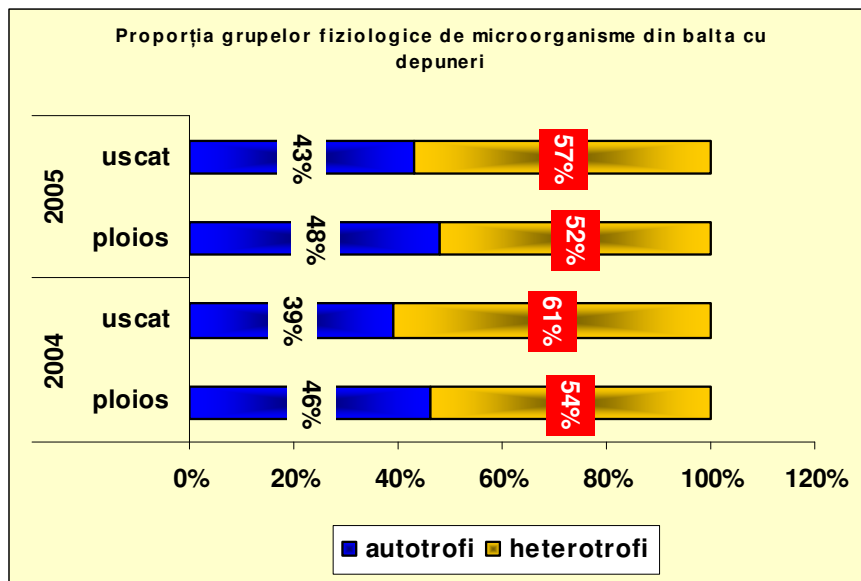
- substanța organică alohtonă ajunsă în balta cu depuneri odată cu apa drenată din alte sectoare ale cavității, împreună cu cea rezultată din activitatea producătorilor primari (acidithiobacililor) (capitolul 11.), este descompusă de microorganismele heterotrofe care sunt reprezentate de celelalte specii bacteriene identificate, cât și de speciile de fungi.

- procentual, speciile bacteriene domină cu peste 90% din populația totală, față de fungi cu doar câteva procente. Heterotrofele sunt dominante în ambele sezoane, ale lui 2004 și 2005 astfel, observându-se o creștere a acestora în sezoanele uscate (peste 50% în sezoanele ploioase și peste 60% în sezoanele uscate din populația totală). Populațiile de acidithiobacili chemolitotrofi (autotrofe) reprezintă aproximativ 40% din populația totală, observându-se o ușoară scădere de câteva procente de la sezonul bogat în precipitații la cel uscat. *A. intermedius* care este heterotrof facultativ a reprezentat aproximativ 15% din populația totală de acidithiobacili (Tabelul 8.2.3.7., Fig. 8.2.3.13.).

Tabelul 8.2.3.7. Proporția grupelor fiziologice de microorganisme din balta cu depuneri, în sezoanele ploioase și uscate ale anilor 2004 și 2005, în balta cu depuneri.

anul	sezonul	autotrofi	heterotrofi
2004	plouos	46%	54%
	uscat	39%	61%
2005	plouos	48%	52%
	uscat	43%	57%

Fig. 8.2.3.13. Reprezentare grafică cu proporția grupelor fiziologice de microorganisme din balta cu depuneri, în sezoanele ploioase și uscate ale anilor 2004 și 2005, în balta cu depuneri.



- cea mai mare variație a numărului de celule/ml de apă, de la sezonul ploios la cel secetos, în 2004 și 2005 o prezintă cele patru specii de acidithiobacili, dar și celelalte specii bacteriene.

- prin calculul coeficienților de corelație între numărul cel mai probabil de microorganisme și sumele precipitațiilor lunilor în care s-au făcut măsurătorile, în anii 2004 și 2005, pentru o valoare a lui $p = 0,05$ (vezi paragraful 8.1.4. și Anexa VI: Tabelul 8.1.4.1.), din tabelul 8.2.3.6. observăm că cele mai semnificative corelații cu precipitațiile le prezintă *Acidithiobacillus*

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

thiooxidans, *Flexibacter sancti* și *Penicillium notatum* (dep. Roșie). Dintre acestea *Acidithiobacillus thiooxidans* și *Penicillium notatum* (dep. Roșie) prezintă corelații pozitive, iar *Flexibacter sancti* este corelată negativ. Corelațiile în cazul restului speciilor sunt ne semnificative.

- dintr-o privire generală asupra variațiilor numerice ale speciilor, în cele două sezoane ploioase și uscate din 2004 și 2005, am observat, în general, ca și în cazul celorlalte eșantioane, o variație numerică mai mică a microorganismelor, de la sezonul ploios la cel secetos, în 2005 față de 2004. Variații numerice mari se observă în cazul *Acidithiobacillus neapolitanus*; *A. thiooxidans*; *A. thioparus*; *A. intermedius*; *Flexibacter sancti*; *Chryseobacterium gleum* și *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, restul speciilor înregistrând variații mai mici.

Balta cu depuneri, este un bazin cu apă ce se găsește în unul din cele mai joase sectoare ale cavității Kiesberg (vezi capitolul 6), are un pH între 6 și 7 și drenează o mare parte din apele din celelalte galerii ale cavității.

În zona cu depuneri roșii, care ocupă 90% din suprafața ei, există o comunitate mixtă, formată din populații de microorganisme chemolitotrofe (autotrofe) (aproximativ 40% din totalul populațiilor) și populații de microorganisme heterotrofe (aproximativ 60%).

În cadrul comunităților chemolitotrofe, oxidarea Fe^{2+} din apa din baltă este realizat, presupunem de către *Gallionella ferruginea*, care formează o cantitate foarte mare de filamente spiralate (vezi capitolul 10), de fapt toată depunerea roșie din baltă fiind constituită din aceste filamente. Populațiile speciilor de acidithiobacili identificați aici, realizează oxidarea compușilor cu sulf reduși rezultați din oxidarea piritei din pereții cavității.

În urma activității populațiilor chemosintetizante rezultă substanță organică, care împreună cu substanța organică alohtonă este descompusă de către populațiile de microorganisme heterotrofe. În perioadele mai uscate în care aporturile de apă din exterior sunt mai slabe, activitatea microorganismelor heterotrofe se intensifică.

Astfel, în balta cu depuneri, în depunerea roșie, are loc o intensă activitate chemolitotrofă, dar o și mai intensă activitate heterotrofă, aici realizându-se descompunerea substanțelor organice din cavitate, ca într-un bazin de epurare biologică, la un pH aproape neutru.

Depunerea albă, în care se găsesc doar trei specii de ciuperci, reprezintă o zonă de alterare secundară a feldspațiilor (vezi capitolul 11).

Pentru a avea o imagine generală asupra activităților metabolice care se desfășoară în cele trei situri analizate: stalactite policrome, formațiuni mucilaginoase și balta cu depuneri, prezentăm distribuția speciilor bacteriene și a speciilor fungice (Tabelul 8.a., Tabelul 8.b.), cât și proporția grupelor fiziologice de microorganisme din aceste trei situri pe perioada în care s-au făcut analizele (Fig. 8.a.).

Partea a-III-a. Cercetări efectuate în siturile din mina Kiesberg. Tehnici folosite.

Tabelul 8.a. Distribuția speciilor bacteriene în cele trei situri analizate.

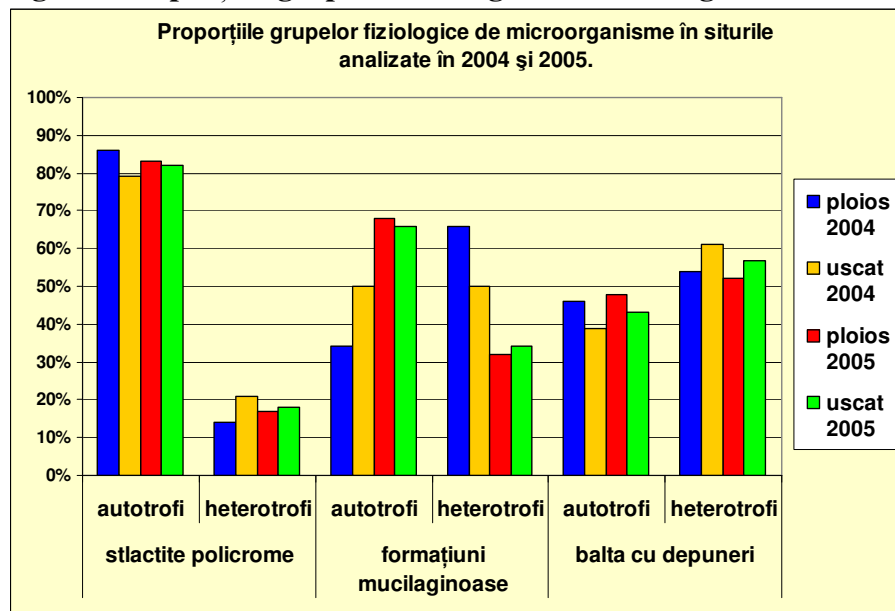
Specia	Stalactite policrome				Formațiuni mucilaginoase				Balta cu depuneri			
	2004		2005		2004		2005		2004		2005	
	ploios	uscat	ploios	uscat	ploios	uscat	ploios	uscat	ploios	uscat	ploios	uscat
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Actinomicete</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Flexibacter sancti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Acidovorax delafieldii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Chryseobacterium gleum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Capitolul 8. Determinări microbiologice.

Tabelul 8.b. Distribuția speciilor de fungi în cele trei situri analizate.

Specia	Stalactite plicrome				Formațiuni mucilaginoase				Balta cu depuneri			
	2004		2005		2004		2005		2004		2005	
	ploios	uscat	ploios	uscat	ploios	uscat	ploios	uscat	ploios	uscat	ploios	uscat
<i>Penicillium cyclopium</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium frequentans</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium griseo-azureum</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium citreo-viride</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium lividum</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium expansum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Penicillium implicatum</i>	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Penicillium verucosum</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Penicillium verucosum var. corzmbiferum</i>	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Penicillium griseo-fulvum</i>	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Penicillium steckii</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Penicillium notatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Aspergillus nidulans</i>	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Aspergillus thomii</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Rhodotorula</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Cladosporium herbarum</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Scytalidium</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Fig. 8.a. Proporțiile grupelor fiziologice de microorganisme în cele trei situri analizate.



Analizând tabelele 8.a., 8b. și Fig 8.a., putem spune următoarele:

- *Acidithiobacillus ferrooxidans*, care poate folosi Fe^{2+} ca singură sursă de energie, dar și sulf sau tiosulfat (Hutchinson, *et al.*, 1969), se găsește doar în stalactitele policrome unde formează o populație chemolitotrofă destul de mare și probabil în formațiunile mucilaginoase unde poate fi confundat cu *A. thiooxidans* (vezi capitolul 11).

- *Acidithiobacillus neapolitanus*, care realizează oxidarea S^0 , $S_2O_3^{2-}$; *A. thiooxidans* ce oxidează: S^0 , SO_3^{2-} , $S_2O_3^{2-}$, $S_4O_6^{2-}$; *A. thioparus* (S^0 , SO_3^{2-} , $S_2O_3^{2-}$) și *A. intermedius* (S^0 , SO_3^{2-}) (Hutchinson, *et al.*, 1969) formează comunități puternice în formațiunile mucilaginoase, unde sunt dominante, dar și în balta cu depuneri.

- *Actinomicetele* se găsesc doar în formațiunile mucilaginoase, unde reprezintă principalul grup de microorganisme heterotrofe.

- *Flexibacter sancti*; *Acidovorax delafieldii*; *Chryseobacterium gleum* și *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, comune în soluri și ape cu un conținut ridicat de substanță organică, au fost identificate doar în balta cu depuneri, unde reprezintă principalele microorganisme heterotrofe.

- speciile de fungi identificate, sunt specii comune în soluri și ape bogate în substanțe organice și reprezintă prezențe constante în rândurile heterotrofilor din cele trei situri analizate. În stalactitele policrome, speciile de *Penicillium* (20% din populația totală), depun pasiv la exteriorul hifelor hidroxidul feric, rezultat din activitatea lui *A. ferrooxidans*, formând structura internă a stalactitei (vezi capitolele 10., 11.).

- populațiile de microorganisme autotrofe (Fig. 8.a.) predomină în stalactitele policrome și formațiunile mucilaginoase, în timp ce în balta cu depuneri predomină populațiile microorganismelor heterotrofe.

Ca o concluzie generală asupra rezultatelor analizelor microbiologice realizate pe cele trei situri, putem spune că acestea reprezintă comunități de microorganisme, constituite din populații bacteriene și fungice între care există o serie de relații strânse, de natură trofică (vezi capitolul 11). Raportul între diferite populații de microorganisme, se schimbă în funcție de factorii de mediu, cel puțin în funcție de cantitatea de apă (ilustrată de noi până în prezent), apa fiind esențială în activitatea oxidativă a chemolitotrofelor, dar și ca transportator al diversilor compuși anorganici și organici.

Partea a-IV-a. Cercetarea electronomicroscopică a eșantioanelor

Capitolul 9. Metodele de lucru folosite pentru prepararea eșantioanelor

Una dintre cercetările de bază în cadrul acestei teze de doctorat, pentru a înțelege structura diverselor tipuri de formațiuni recoltate din mina Kiesberg, cât și metabolismele care au condus la formarea acestora, o reprezintă cercetarea lor electronomicroscopică. Astfel, au fost realizate multe observații în microscopia electronică de transmisie (M.E.T.), microscopia electronică de baleiaj (M.E.B.) și în crio- M.E.B.

În cercetările de microscopie electronică o bună reușită constă în prepararea eșantioanelor. Aceasta poate fi diferită în funcție de natura fiecăruia.

9.1. Prepararea eșantioanelor pentru microscopia electronică de transmisie (M.E.T.)

În **M.E.T.** se lucrează cu preparate secționare ultrafin, deci aceasta permite observarea structurii interne a unor țesuturi, a raportului dintre diverse structuri, a ultrastructurii celulelor, etc (Mc. Dowell, Trump, 1976).

În cazul nostru am folosit această tehnică de observație în cazul consoțiilor de microorganisme din formațiunile mucilaginoase, a consoțiilor din picăturile stalactitelor policrome și în cazul flocoanelor din balta cu depuneri.

A. Materiale necesare

a. Echipamente: balanță; centrifugă; agitator magnetic cu încălzire; etuvă; hotă aspirantă; microscop optic; pH metru; piramitom (aparatură de modelare a blocurilor de rășină); ultramicrotom, microscop electronic de transmisie.

b. Reactivi: amestec fixator după Mc Dowell și Trump; tampon fosfat după Sorensen; tetraoxid de osmiu; etanol (50⁰, 70⁰, 90⁰, 100⁰); mediul de incluziune; albastru de toluidină, contrastant acetat de uraniu și citrat de plumb.

B. Mod de lucru

Înainte de prepararea propriu zisă, toate eșantioanele trebuie cu atenție marcate și notate.

a. Fixarea prin imersie

În general eșantioanele sunt fixate în fixator Trump, prin imersie, încă de la recoltare și sunt păstrate la rece în frigider sau lăzi frigorifice la 4⁰C. În cazul în care ele nu au fost fixate în prealabil, în laborator, se pun în tuburi de sticlă cu fixator Trump.

Eșantioanele sunt scoase în fixator într-o cutie Petri cu fundul acoperit cu ceară dentară și se secționează fragmentele de interes în blocuri mici (aproximativ 1mm³). Aceste blocuri sunt imersate în fixator Trump în tuburi de sticlă de 5ml, care se notează și se lasă minimum 2 ore la 4⁰C înainte de a se trece la următoarea operațiune.

b. Spălarea

Eșantioanele sunt scoase din fixator și sunt spălate de aproximativ zece ori în lichidul de spălare. Astfel, tuburile se golesc înclinându-le progresiv și având grijă ca eșantioanele să rămână la fundul vasului. Lichidul de spălare se schimbă tot la 15 min. După ultima spălare, tuburile sunt stocate la 4⁰C.

Capitolul 9. Metode de lucru folosite pentru prepararea eșantioanelor.

c. Post-fixarea

Post-fixarea în *tetraoxid de osmium* trebuie făcută sub o hotă aspirantă. Deoarece tetraoxidul de osmium este extrem de toxic.

Lichidul de spălare este înlocuit cu soluția de tetraoxid de osmium. Peste tuburile cu eșantioanele în tetraoxid de osmium se pune o folie de aluminiu pentru a crea obscuritate și se lasă sub hotă la temperatura camerei o oră. După o oră, se elimină soluția post-fixatoare, iar eșantioanele sunt spălate de trei ori cu apă ppi.

d. Deshidratarea

Eșantioanele sunt deshidratate în băi de etanol cu grade crescânde, apoi în două băi de oxid de propilenă. Deshidratarea se face la temperatura camerei (*Tab. 9.1.1.*).

Tab. 9.1.1. Protocolul deshidratării preparatelor pentru M.E.T.

Substanțe	Număr de băi	Timp (minute)
Etanol 50°	2	5
Etanol 70°	2	10
Etanol 90°	2	15
Etanol 100°	3	20
Oxid de propilenă	2	30

e. Pre-impregnarea

După deshidratare, eșantioanele sunt trecute minimum 2 ore, la temperatura camerei, într-un amestec de oxid de propilenă-eponă.

f. Impregnarea

Eșantioanele sunt lăsate o noapte la 4°C în mediul de incluziune cu eponă pentru a completa impregnarea. Pentru aceasta, amestecul de pre-impregnare este înlocuit cu mediul de incluziune cu eponă.

g. Includerea

Includerea se face de obicei în microcelule transparente de gelatină. În funcție de orientarea preparatului în timpul secționării pot fi folosite pentru includere și microcelule plate de silicon.

Înainte de includere se prepară mici etichete de hârtie (0,3 x 1,5 cm) pe care se scrie cu creionul numărul corespondent din caiet al eșantionului și data la care acesta a fost fixat.

Microcelulele se așează în suportul corespunzător, se pune câte o picătură de rășină eponă după care se așează eșantionul în poziția dorită. Se umple microcelula cu rășină eponă după care se așează eticheta astfel încât să se poată citi informațiile.

Microcelulele se pun în etuvă pentru polimerizare la 68°C timp de 48 de ore. După 48 de ore blocurile de rășină cu preparatele în interior se păstrează în cutii etichetate.

h. Secționarea

Secționarea blocurilor de rășină are loc în trei etape:

1. *Utilizarea aparatului de modelare a blocurilor (piramitomul)*. Blocurile polimerizate sunt modelate sub forma unei piramide prin secționare trapezoidală cu ajutorul piramitomului EM TRIM. Această operațiune are rolul de a elimina surplusul de rășină din jurul preparatului și de a facilita realizarea secțiunilor propriuzise.

2. *Secțiunile semifine (0,5-1μm)*. Observarea acestor secțiuni semifine în microscopie optică, permite eventuala selecționare a zonelor de preparat care vor fi observate în M.E.T.

Secțiunile se realizează cu un histodiamant (Diatome). Secțiunile realizate sunt apoi depuse pe o lamă de sticlă tratată cu AES (aminopropiltriethoxisilan diluat la 3% în acetonă) pentru a fi observate în microscopie optică. Secțiunile sunt recuperate pe suprafața unei picături de apă din

Partea a-IV-a. Cercetarea electronmicroscopică a eșantioanelor.

spatele histodiamantului și sunt preluate cu ajutorul unor inele decupate de pe marginea unui film fotografic și depuse pe lama de sticlă.

Pentru izolare se mai utilizează și o scobitoare de vârful căreia este lipit un fir de păr din barbă sau sprânceană.

Lama cu secțiunile se pune pe o placă cu încălzire la 60°C pentru uscare și se îndepărtează inelul de film (secțiunea rămâne lipită de lama). Secțiunile se acoperă cu albastru de toluidină filtrată și se lasă 15 secunde evitându-se uscarea.

După colorare se spală colorantul cu apă, iar dacă se observă o colorare prea puternică se pune prima dată pe lamă o picătură de etanol, după care se spală cu apă. Se lasă al uscat pe placa cu încălzire, după care secțiunile se acoperă cu ulei de imersie peste care se așează o lamelă. Marginea lamelei se izolează cu ceară dentară și se observă la microscopul optic. Se alege zona de interes și eventual se remodelează blocul de rășină cu preparatul.

3. *Secțiunile ultrafine.* Acestea se realizează cu ajutorul unui cuțit diamant care în spate are un rezervor de apă pentru recuperarea secțiunilor ultra-fine montat pe un ultramicrotom Ultracut E Reichert.

Există câțiva factori de care trebuie ținut cont pentru a avea o bună calitate a secțiunilor ultrafine:

- înclinarea cuțitului față de bloc trebuie să fie de 5-8°,
- viteza de secționare 1mm/s,
- nivelul apei din rezervorul din spatele cuțitului trebuie să fie perfect ajustat, astfel trebuie să vedem reflexele gri strălucitoare ale cuțitului,
- baza mare a secțiunii trebuie să fie paralelă cu tăișul cuțitului,
- grosimea secțiunilor trebuie să fie cuprinse între 70-90 nm,
- grosimea secțiunilor este apreciată în funcție de culoarea secțiunilor (interferența luminii pe suprafața secțiunilor) care trebuie să fie galben-pal sau albe (cele gri sunt prea fine, iar cele roz prea groase).

Secțiunile realizate sunt depuse pe grile de cupru sau aur de 3mm diametru. Manipularea secțiunilor pe suprafața picăturii de apă se realizează cu ajutorul scobitorii cu fir de păr în vârf. Secțiunile se recuperează cu ajutorul grilei ținută cu o pensă fină. Grilele se pun pe o hârtie de filtru sub o cutie Petri la uscat, la temperatura camerei timp de 2 ore, după care se pot aranja în cutii speciale pentru grile.

i. Contrastarea

Secțiunile ultrafine, pentru a putea fi văzute în M.E.T., trebuie mai întâi contrastate.

1. *Contrastarea cu acetat de uranil.* Trebuie în primul rând avut în vedere faptul că acetatul de uranil ((CH₃COO)₂UO₂ · 2H₂O, PM = 424,15 g/mol) este radioactiv.

Citratul de uranil se filtrează și se pune într-un vas de sticlă care se acoperă. Se așează grilele cu secțiunile în jos citratul de plumb. Se acoperă vasul și se pune în obscuritate 10-20 min. Se clătesc apoi grilele în două băi fie de alcool, fie de apă, intrând și ieșind din lichid de aproximativ 10 ori. Se usucă apoi cu fața strălucitoare pe o hârtie de filtru.

2. *Contrastare cu citrat de plumb* (după Reynolds). Această contrastare se face în incintă de NaOH. Astfel, se curăță o sticlă de ceas ce conține ceară dentară cu NaOH 1N. Pe ceară (în incintă de NaOH) se depun picături de citrat de plumb (5 maximum). Se pun grilele să plutească în picăturile de citrat de plumb cu fața mată (adică cu cea cu secțiunile) în jos spre picătură. Se clătesc apoi într-o soluție diluată de NaOH: 1ml NaOH 1N în 50ml apă ppi și se usucă apoi ușor pe o hârtie de filtru. După aceasta, se mai clătesc în două băi de apă ppi, apoi se usucă pe un filtru cu fața strălucitoare spre acesta. După uscare, ele pot fi observate la microscopul electronic de transmisie. Observațiile au fost realizate la aparate JEOL 1010 și JEOL 1230 la o tensiune de accelerare de 80 kV.

Capitolul 9. Metode de lucru folosite pentru prepararea eșantioanelor.

În cercetările noastre, probleme deosebite au pus consorțiile mucilaginoase, în special la secționare din cauza faptului că, fie existau părți din mucopolizaharidele extracelulare mineralizate, fie existau cristale printre celule în interiorul consorțiului (capitolul 10.).

9.2. Prepararea eșantioanelor pentru microscopia electronică de baleiaj (M.E.B.)

În M.E.B., există unele etape în prepararea eșantioanelor comune cu microscopia electronică de transmisie, iar altele specifice pentru aceasta.

A. Materiale necesare

Din punct de vedere a materialelor necesare, unele sunt comune cu microscopia electronică de transmisie, altele sunt specifice.

a. Echipamente: balanță; centrifugă; agitator magnetic cu încălzire; etuvă; hotă aspirantă; lupă binoculară; pH metru; aparat de punct critic cu CO₂; aparat de pulverizare catodică (Magnetron Sputtering Device); microscop electronic de baleiaj.

b. Reactivi: amestec fixator după Mc Dowell și Trump; tampon fosfat după Sorensen; tetraoxid de osmiu; acetonă (50⁰, 70⁰, 90⁰, 100⁰); butelie de CO₂ cu tub plonjor sau etanol (50⁰, 70⁰, 90⁰, 100⁰); HMDS (hexametildisilazan); coș pentru aparatul de punct critic; lipici conductor carbon; diluant pentru lipici carbon; portuare aluminiu.

Tehnicile de **fixare, spălare, post-fixare** sunt aceleași ca și în cazul microscopiei electronice de transmisie.

d. Deshidratarea

Eșantioanele sunt deshidratate în băi succesive de acetonă de grade crescânde la temperatura camerei (Tab. 9.2.1.).

Tab. 9.2.1. Protocolul deshidratării în preparatele M.E.B.

Substanțe	Număr de băi	Timp (minute)
Acetonă 50 ⁰	2	5
Acetonă 70 ⁰	2	10
Acetonă 90 ⁰	2	15
Acetonă 100 ⁰	3	20

La final deshidratarea se face *prin metoda punctului critic*.

În cazul nostru, această metodă am folosit-o doar în cazul eșantioanelor solide, dure ca de exemplu stalactite, cruste etc. Fiind o metodă care funcționează la presiune ridicată nu este recomandată pentru eșantioanele foarte sensibile, căroră li se poate astfel modifica morfologia.

Astfel o altă metodă de deshidratare este *deshidratarea în solvent HMDS (hexametildisilazan)*.

Acest solvent este coroziv, hiper-inflamabil, hiper-volatil; prin urmare trebuie luate toate măsurile de precauție (se lucrează numai sub hotă aspirantă, cu mănuși, etc). El trebuie conservat la 4⁰C la frigider.

Deshidratarea prin metoda HMDS se face la temperatura camerei cu băi de etanol de grade crescânde (Tab.9.2.2.).

Partea a-IV-a. Cercetarea electronmicroscopică a eșantioanelor.

Tab. 9.2.2. Protocolul deshidratării cu HMDS în preparatele M.E.B.

Substanțe	Număr de băi	Timp (minute)
Etanol 50°	2	5
Etanol 70°	2	10
Etanol 90°	2	15
Etanol 100°	3	20
Etanol 100°-HMDS	1	15
HMDS pur	2	15

Eșantioanele cu HMDS se lasă toată noaptea sub hotă, pentru evaporarea totală a solventului.

Această metodă, noi am utilizat-o pentru deshidratarea eșantioanelor de tipul stalactitelor mucilaginoase, depunerilor, crustelor etc.

e. Metalizarea

Se iau câteva portuare de aluminiu pe care se lipește o lamă adezivă pe ambele fețe peste care se pune lipici conductor carbon (poate fi adus la o vâscozitate convenabilă cu ajutorul diluantului). Eșantioanele se așează apoi pe lipici în poziția care ne interesează, iar marginile lor vor fi apoi acoperite cu lipici carbon pentru o cât mai bună conductibilitate.

După această operațiune de fixare a eșantioanelor pe portuare, acestea sunt introduse sub clopotul cu vid al aparatului de metalizare, la 2,5 cm de catodul de platinare.

Metalizarea se face cu un curent de 10 mA timp de 2 minute și jumătate, la final obținându-se un strat de platină de 50-60 Å grosime.

După metalizare eșantioanele pot fi introduse în camera de vid a microscopului de baleiaj și examinate.

Observațiile în M.E.B. au fost realizate la o tensiune de accelerare de 15kV, iar distanța de lucru a fost de 16mm.

9.3. Prepararea eșantioanelor pentru crio-M.E.B

Metodele clasice, chimice, de preparare a eșantioanelor utilizează substanțe care pot induce apariția de artefacte. Pentru a elimina această dificultate, au fost dezvoltate o serie de criometode, fiind din ce în ce mai utilizate în citochimie, imunomarcaje și în microanalize.

Criometodele constă în solidificarea apei din celule deci în stoparea tuturor reacțiilor biochimice și în imobilizarea constituenților celulari. Astfel noi realizăm prin această metodă echivalentul fixării chimice.

Sursa de artefacte în acest caz constă în cristalizări ale apei. Congelarea apei este, în aparență, o simplă tranziție de la o fază la alta. În realitate însă aspectul fazei solide este diferit în funcție de o serie de factori: - viteza de răcire a sistemului; presiunea la care sistemul este supus pe timpul răcirii; etc. Gheața cristalizată poate să aibă aspecte fie de cristale mari hexagonale, fie de cristale mai mici cubice și chiar suficient de mici (<10 nm) pentru a fi imposibil de observat în microscopie electronică. În criomicroscopie deci vorbim despre *gheața vitrosă* care trebuie obținută în cazul eșantioanelor supuse observării, această fază fiind relativ dificil de obținut și necesitând echipamente și tehnici speciale.

Agenții de răcire folosiți sunt fie gaze lichefiate, fie metale răcite, fiind aleși în funcție de temperatura lor și de conductivitatea lor termică.

În cazul cercetărilor noastre, am folosit metoda de observare directă, observând stalactitele și scurgerile mucilaginoase.

Capitolul 9. Metode de lucru folosite pentru prepararea eşantioanelor.

Pentru o observație directă, eşantionul trebuie trecut prin mai multe etape:

1. Curățirea suprafeței eşantionului cu maximă precauție: fie cu un jet de aer comprimat, fie printr-o periere delicată cu o pensă, fie agitându-l într-un mediu lichid apropiat (pentru eşantioanele hidratate), cu un pH echilibrat. Eşantioanele hidratate trebuie menținute scufundate în lichid până în momentul scufundării în azot.

2. Decuparea eşantionului la dimensiuni ușor inferioare celor ale suportului (L : 15mm; l : 10mm; h : 3mm) și lipirea lui pe suport cu un lipici carbon sau „tissu teck”. Dacă este necesar, se elimină excesul de lichid de la suprafața eşantionului astfel încât să se evite formarea unui strat important de gheață în timpul congelării.

Se fixează apoi port obiectul pe tija de transfer.

3. Scufundarea port obiectului în azot de consistență păstoasă (-210°C) (azotul de consistență păstoasă și de temperatură mai coborâtă se obține prin deschiderea progresivă a vanei pompei de vid până la maximum și menținerea ei așa timp de 5-10 minute) până când lichidul nu mai este efervescent. Se închide apoi capacul port obiectului și se retrage port obiectul în sensul transferului pentru a-l pune imediat sub vid.

Eşantionul este plasat apoi în anticamera microscopului, după care se plasează în coloană.

4. Sublimarea. Se stabilește o tensiune înaltă de 5kV până la saturarea filamentului. Se reperează apoi eşantionul fără a fi prea mult deplasat, după care se reîncălzește platina microscopului până la -80°C timp de aproximativ 20 min. pentru a sublima „bruma” de la suprafața eşantionului.

Trebuie să se aibă în vedere că sistemul are și o anumită inerție, iar sublimarea continuă încă câteva minute după ce apare afișată o nouă răcire a platinei. Astfel eşantionul va fi scos numai după ce am așteptat ca temperatura să fie de -120°C .

5. Metalizarea. Eşantionul va fi transferat apoi în aparatul de metalizare SP 2000 timp de 3 minute la 25mA. După metalizare eşantionul este retransferat în microscop și se începe observarea la 10 kV.

Într-o altă variantă de preparare, după congelarea în azot, eşantionul poate fi introdus în aparatul SP 2000 și fracturat cu ajutorul cușitului special de fracturare. După fracturare se realizează sublimarea 5-10 minute doar pentru a degaja reliefurile de la nivelul fracturii. Se metalizează apoi 3 minute la 25mA și se observă la microscop la 10kV.

Capitolul 10. Aspecte microscopice și electronomicroscopice, analize E.D.S.

În capitolul 6 s-a realizat o descriere generală, macroscopică a siturilor cercetate în cadrul acestei teze, după care s-a realizat localizarea lor în cadrul cavității Kiesberg.

În acest capitol vom prezenta structura microscopice și electronomicroscopice a tuturor formațiunilor studiate, iar pe baza ei cât și a tuturor datelor pe care le avem, în capitolul următor, vom încerca explicarea mecanismelor care au stat și stau la baza formării lor.

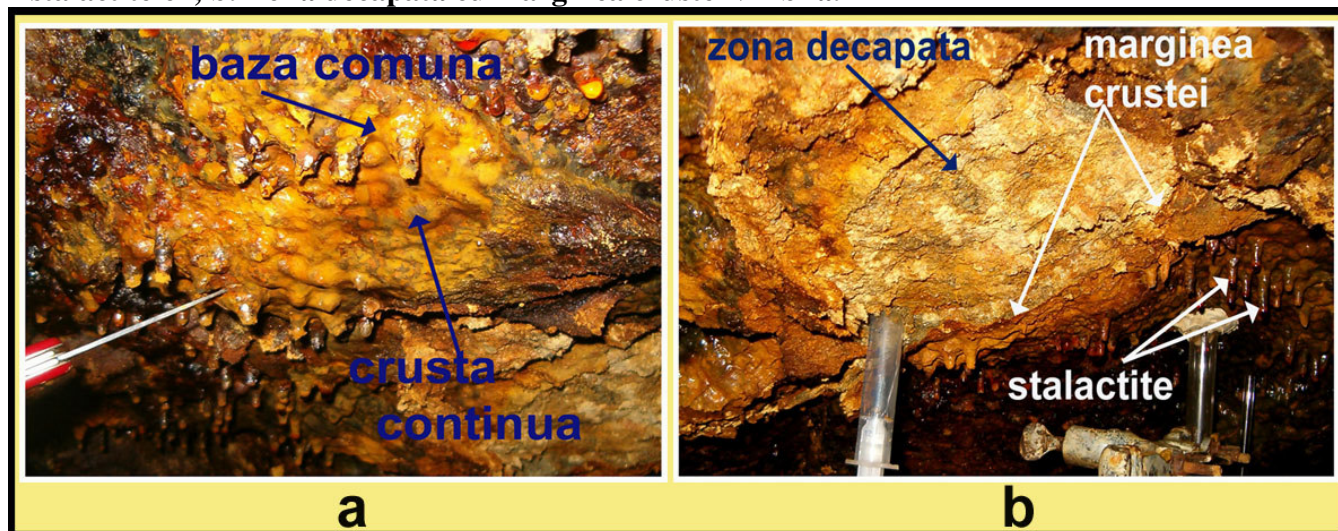
10.1. Arhitectura microscopice a „stalactitelor policrome”

Pe stalactitelor policrome au fost realizate observații la lupa binoculară (*Fig. 10.1.2.a, b.*), în M.E.B. pe secțiuni prin acestea și în M.E.T. pe mănunchiuri de filamente izolate sub lupa binoculară din interiorul picăturilor roșii din vârful stalactitelor.

De la primele observații asupra acestor formațiuni se remarcă faptul că în zonele în care se găsesc, bolta este acoperită de o crustă continuă de aceeași natură minerală cu cea a stalactitelor. Această crustă reprezintă de fapt baza lor comună și continuă (*Fig.10.1.1.a, b.*).

În zonele de creștere a stalactitelor policrome, apa de percolație care traversează bolta cavității prin fisurație fină este puternic încărcată cu săruri dizolvate (capitolul 7). Această soluție care are culori ce variază de la portocaliu la roșu rubiniu are un pH ce variază între 0,5-1,5 și o tensiune superficială mare. Astfel ea formează pe suprafața bolții cavității un film continuu de aproximativ 0,5mm grosime. În acest film de soluție se găsesc bacteriile chemolitotrofe și ciupercile microscopice rezultând astfel un biofilm.

Fig. 10.1.1. a. Crustă continuă pe bolta cavității ce reprezintă baza comună a stalactitelor; b. Zonă decapată cu marginea cruste vizibilă.



La interfața aer-soluție, datorită faptului că biofilmul este destul de stabil fiind alimentat extrem de lent de apa de percolație și datorită concentrației mari de substanțe dizolvate, acestea precipită formând un strat (lamină) continuu de hidroxid feric (*Fig.10.1.2. b.*). Acest strat sau lamină are grosimi cuprinse între câteva zeci și câteva sute de microni.

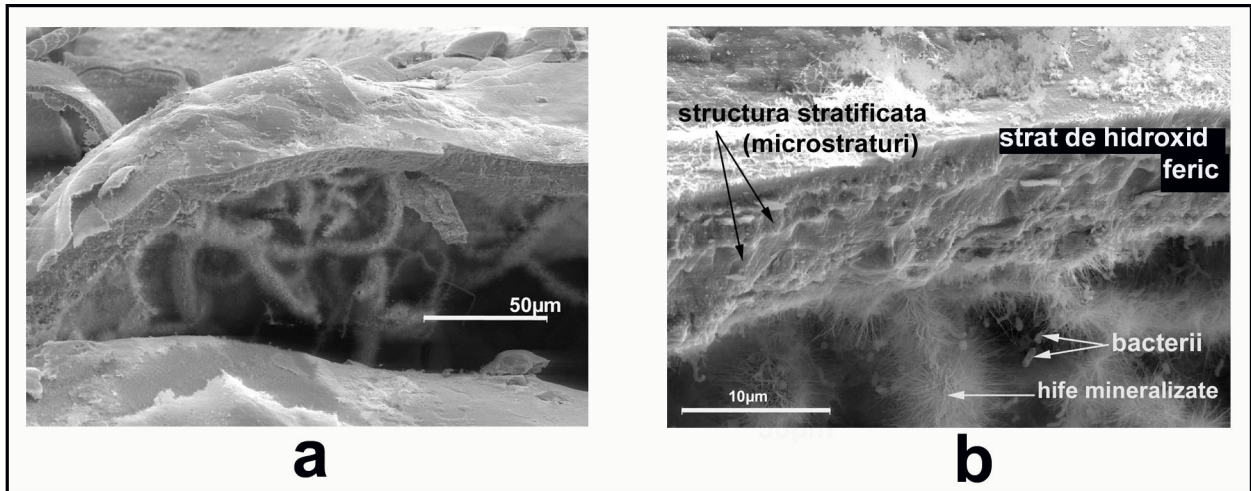
Capitolul 10. Aspecte microscopice și electronomicroscopice, analize E.D.S.

Fig. 10.1.2. a. Imagine de ansamblu la lupa binoculară cu o stalactită policromă și secțiune prin aceasta; b. Secțiune printr-o stalactită policromă.



El se formează discontinuu, lent (în aproximativ 30 de zile sau mai mult), având la rândul lui o structură în microstraturi (microlamine) (Fig. 10.1.3. a, b).

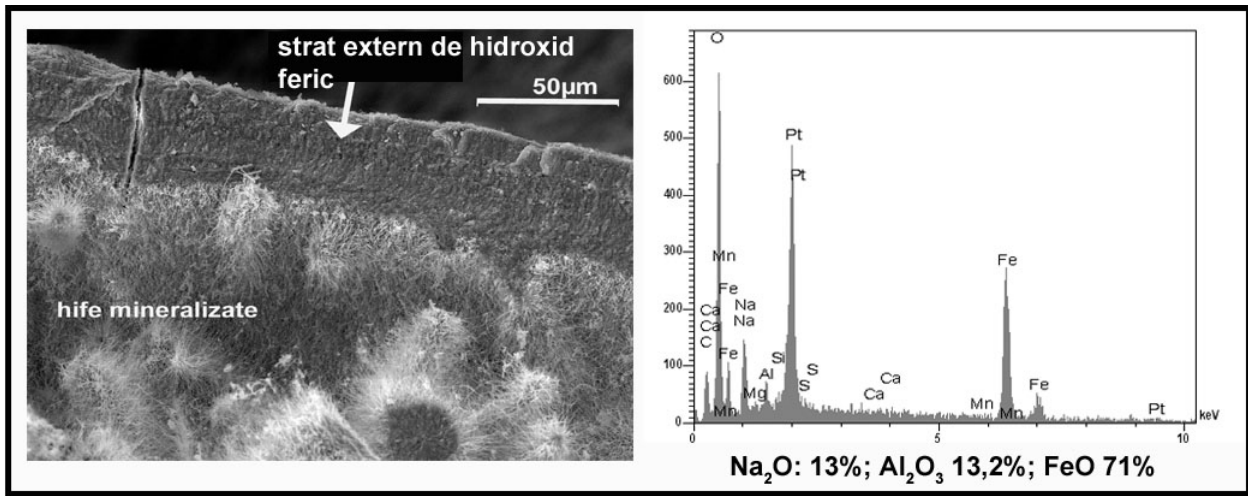
Fig. 10.1.3. a. Vedere de ansamblu cu stratul de hidroxid feric și hifele mineralizate; b. Vedere la o mărire superioară.



Pe parcursul formării acestui strat la exteriorul biofilmului, prin precipitarea hidroxidului feric, în interiorul biofilmului are loc, de asemenea, depunerea de hidroxid feric la exteriorul hifelor de ciuperci care dau aspect fibrilar interiorului crustei și stalactitelor (Fig. 10.1.4.).

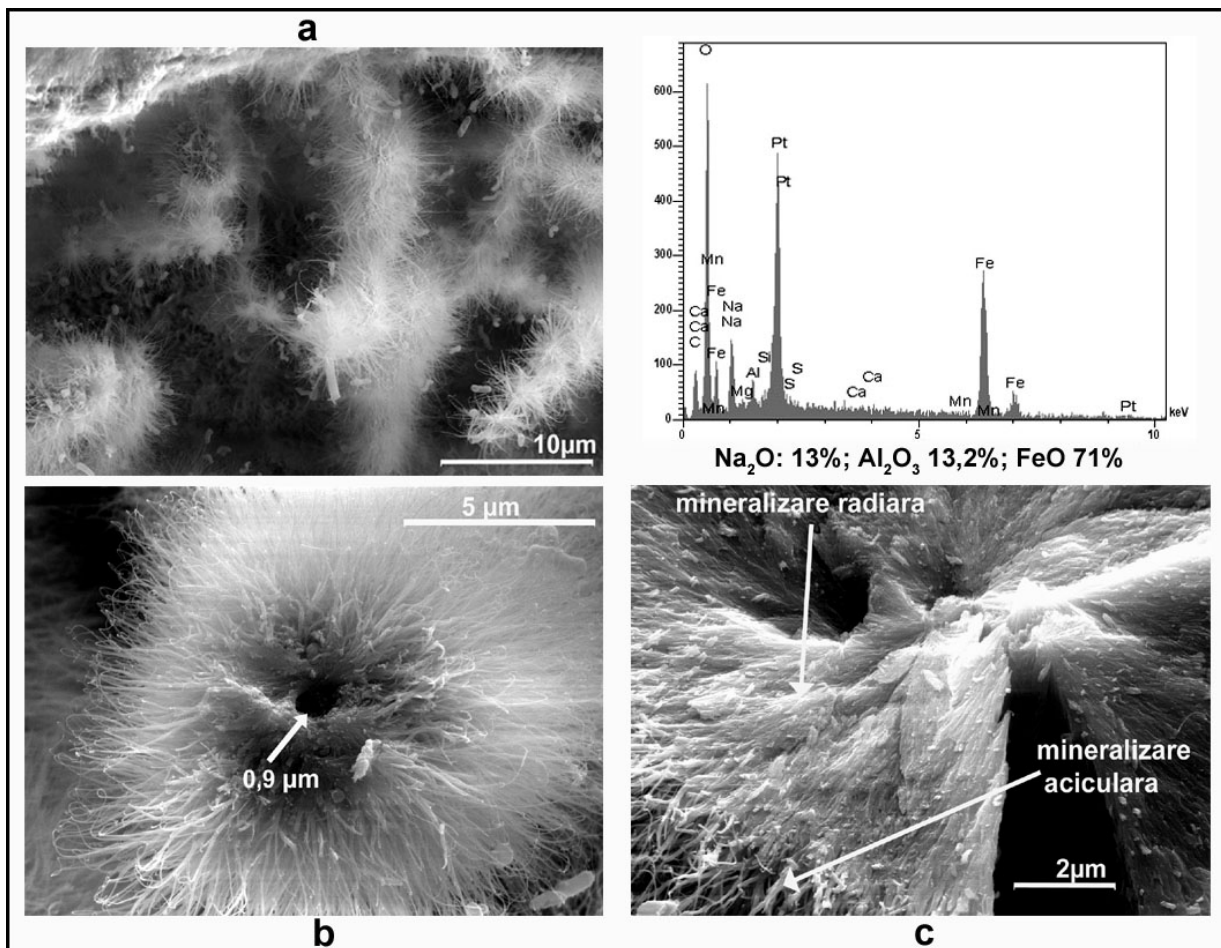
Partea a-IV-a. Cercetarea electronomicroscopică a eșantioanelor.

Fig. 10.1.4. Vedere de ansamblu cu stratul extern de hidroxid feric și hifele de Ciuperci mineralizate (la interior). Spectru E.D.S.



Mineralizarea hifelor de ciuperci se realizează la exteriorul lor. Pe peretele hifal, mineralizarea este radiară, iar spre exterior ia o formă aciculară, hifele având aspect plumos (pufos) (Fig. 10.1.5. a., b.), (Fig. 10.1.5. c., d.).

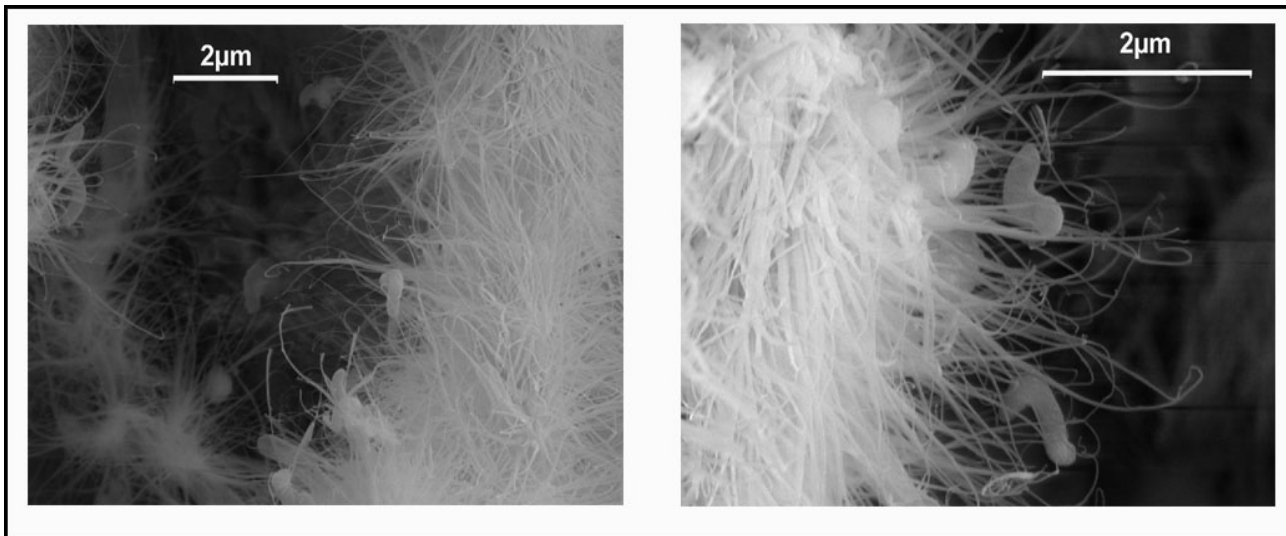
Fig. 10.1.5. a., b., Hife mineralizate cu aspect plumos (pufos) și bacterii; c. Mineralizație aciculară la exteriorul hifelor și radiară la interiorul acestora.



Capitolul 10. Aspecte microscopice și electronmicroscopice, analize E.D.S.

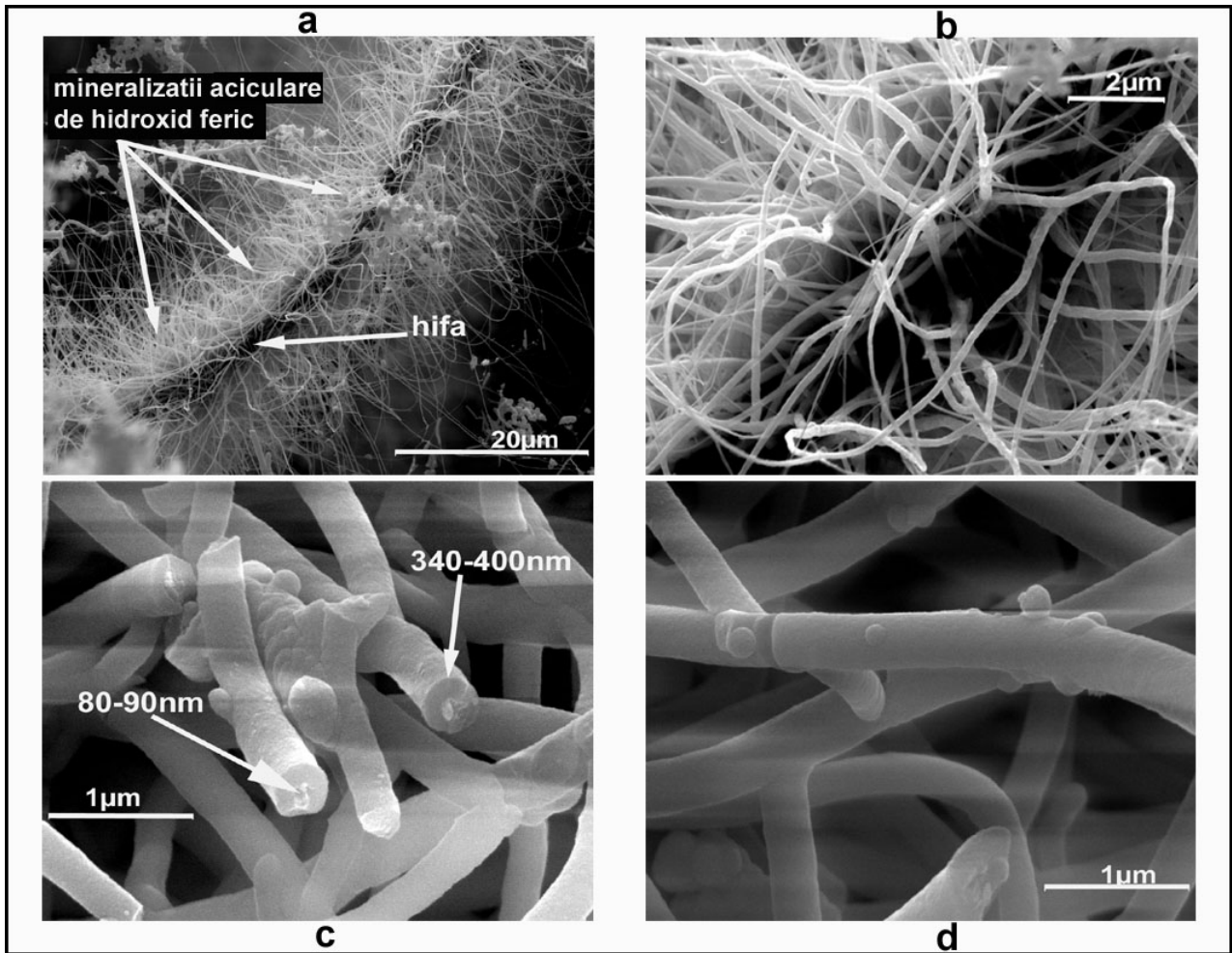
Atât baza cât și corpul stalactitelor sunt permanent îmbibate cu soluție de percolație în care se găsește Fe^{2+} , prin urmare în aceasta există permanent *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Pentru acesta hifele mineralizate reprezintă un adevărat suport (Fig. 10.1.5. a., b.; Fig. 10.1.6.).

Fig. 10.1.6. Mineralizația aciculară de la exteriorul hifelor cu bacterii.



Partea a-IV-a. Cercetarea electronmicroscopică a eșantioanelor.

Fig. 10.1.7. a. Vedere de ansamblu asupra unei hife cu mineralizații aciculare de hidroxid feric; b., d. Mineralizație aciculară ramificată; c. Aciculi de hidroxid feric secționați transversal (vizibil canalul central).



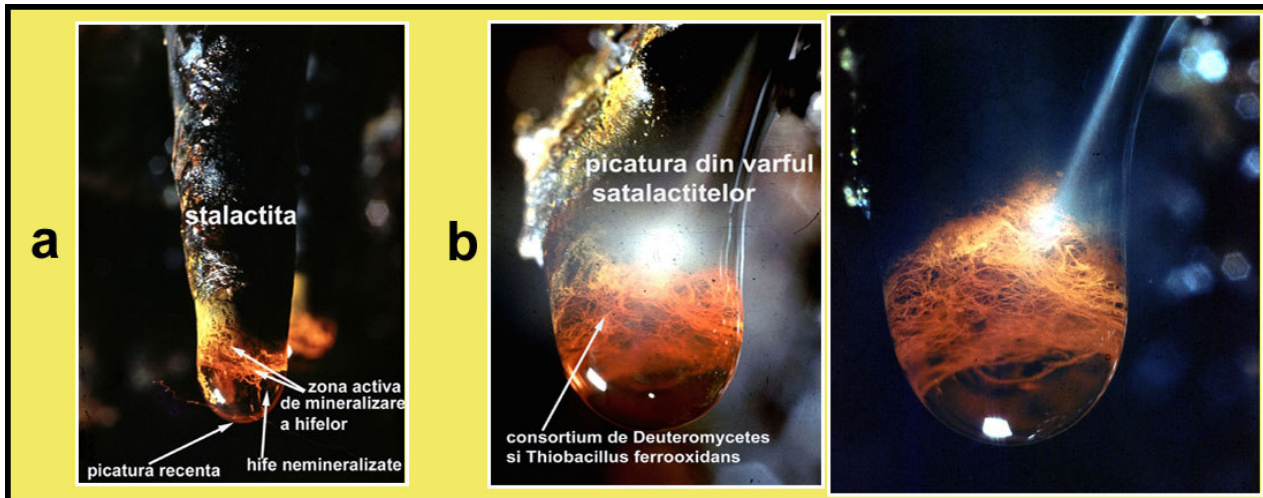
Mineralizația aciculară este foarte fină iar aciculii de hidroxid feric pot fi ramificați având un canal central (*Fig. 10.1.7. a., b.,c.,d.*).

După formarea, la exteriorul biofilmului, a stratului de hidroxid feric, pe suprafața lui apare un nou biofilm și astfel procesul se reia.

Stalactitele policrome, s-au format în locurile în care biofilmul continuu de pe bolta cavității a întâlnit neregulați. În aceste zone neregulate, din biofilm se formează picături ce atârnă și care au aceeași evoluție cu cea descrisă mai sus.

Capitolul 10. Aspecte microscopice și electronmicroscopice, analize E.D.S.

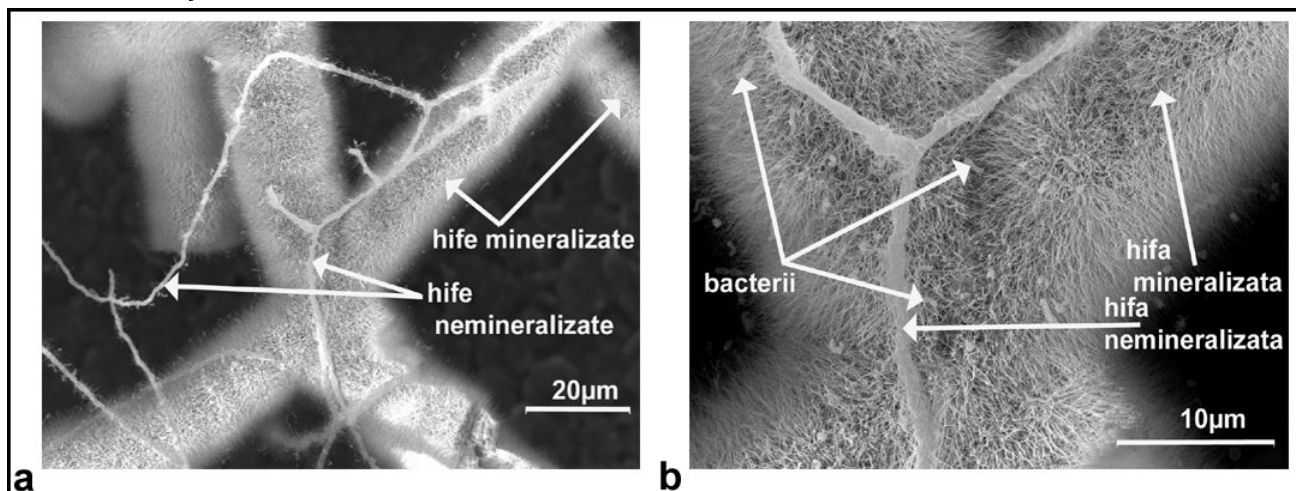
Fig.10.1.8. a. Stalactită policromă cu picătură, vedere de ansamblu asupra zonei active de mineralizare a hifelor; b. Picătură de la capătul stalactitelor cu hife vii de ciuperci (foto Mihai Ciuprina).



Astfel în interiorul stalactitelor, în masa continuă de soluție, printre hifele mineralizate se găsesc bacterii chemosintetizante (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) care-și desfășoară metabolismul, iar la capătul stalactitelor în picături se găsesc Ciuperci vii asociate cu *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Zona de mineralizare a hifelor se găsește la baza picăturii (Fig. 10.1.8. a., b.).

În M.E.B. observăm o mare diferență în ceea ce privește dimensiunea între hifele mineralizate și cele nemineralizate din picătura de la capătul stalactitelor (Fig. 10.1.9. a.,b.).

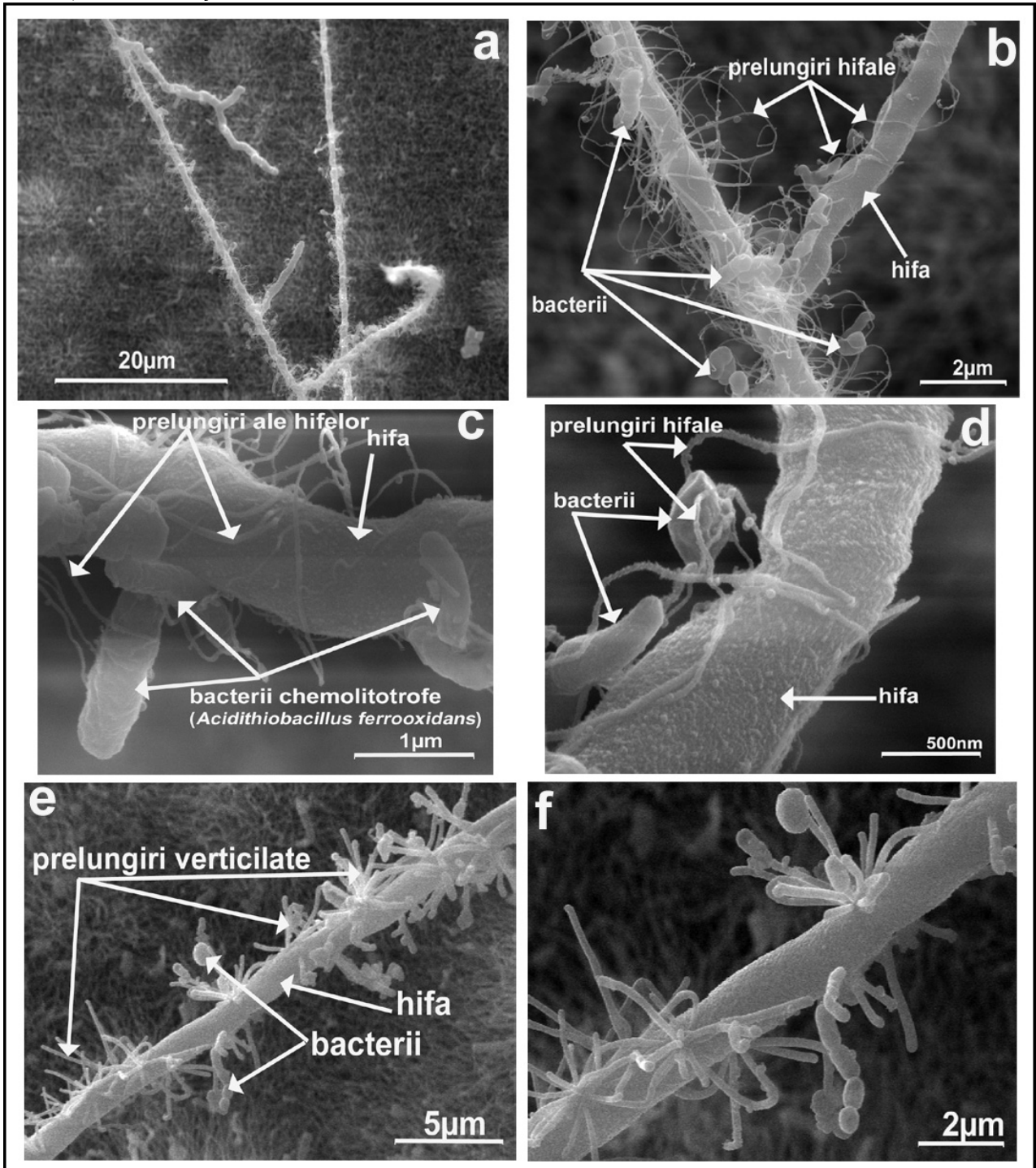
Fig.10.1.9. a. Vedere de ansamblu cu hife mineralizate și hife vii; b. Hife vii, hife mineralizate și bacterii.



În interiorul acestei picături, hifele vii de ciuperci prezintă la exterior o serie de prelungiri foarte fine, care au morfologie diferită în funcție de specie: unele sunt lungi și uneori răscucite în jurul hifei, altele sunt scurte și verticilate. Prin aceste prelungiri ciupercile realizează un contact direct cu *Acidithiobacillus ferrooxidans*, această relație fiind probabil o relație mutualistă (Fig. 10.1.10. a., b., c., d., e., f.).

Partea a-IV-a. Cercetarea electronomicroscopică a eșantioanelor.

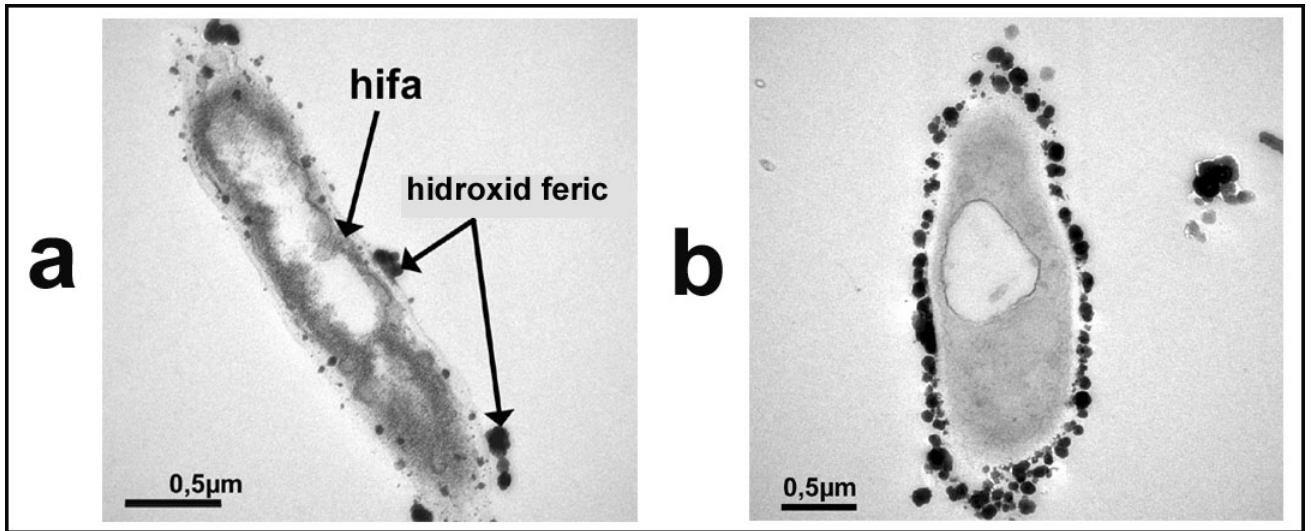
Fig.10.1.10. a. Vedere de ansamblu cu hife vii ramificate; b., c., d. Hife cu prelungiri hifale lungi neregulate care vin în contact cu bacterii (diferite mărimi); e., f. Hife cu prelungiri scurte, verticilate și bacterii.



Din picăturile de la capătul stalactitelor au fost izolate hife de Ciuperci, au fost fixate în fixator Trump și au fost realizate preparate în M.E.T. Astfel, de la prima examinare a secțiunilor se observă depunerea de hidroxid feric la exteriorul peretelui celular (Fig. 10.1.11. a., b.).

Capitolul 10. Aspecte microscopice și electronmicroscopice, analize E.D.S.

Fig. 10.1.11. a., b. Hife vii secționate la diferite nivele cu hidroxid feric globular depus la exteriorul celulei.

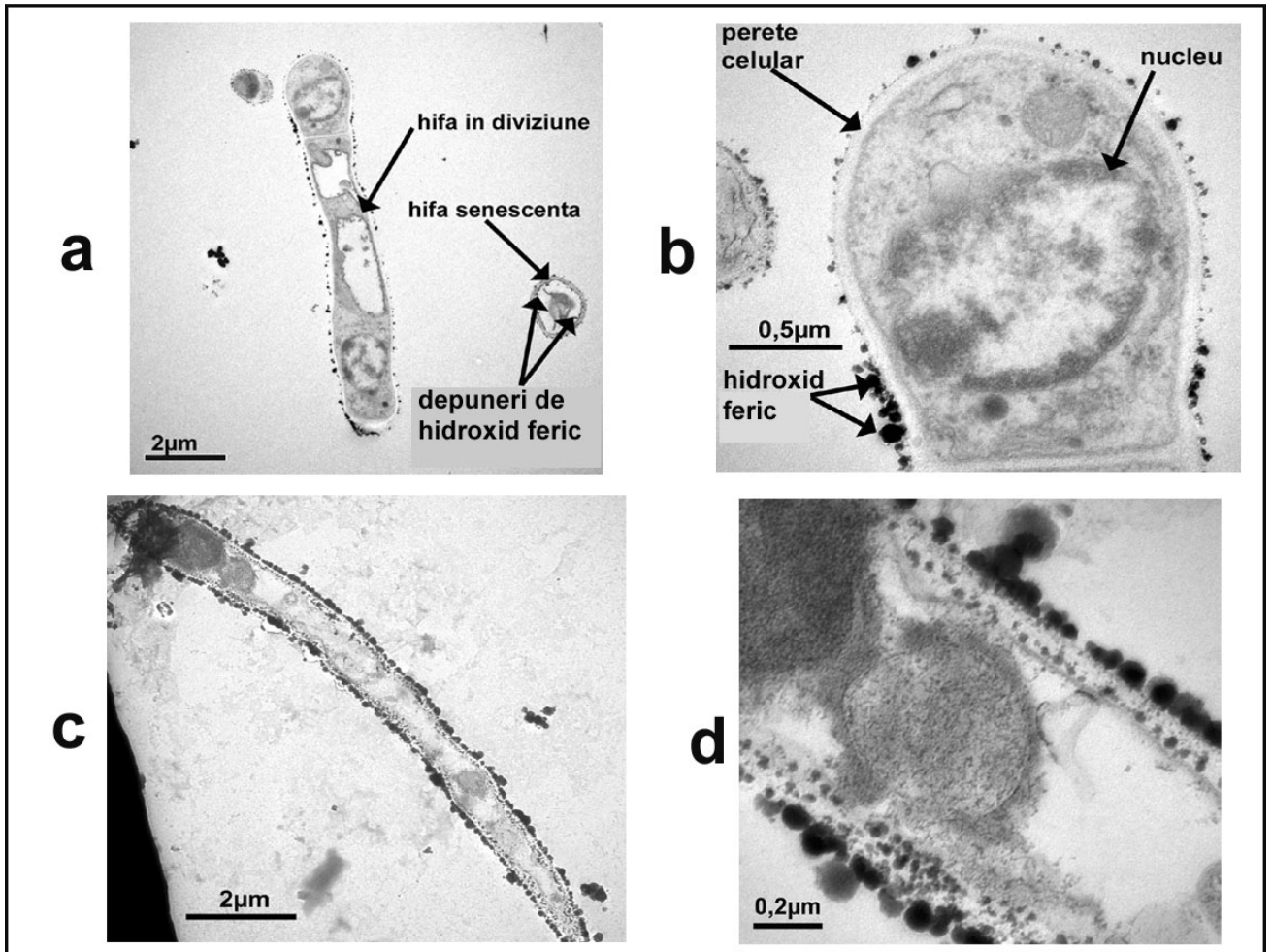


Hidroxidul feric de la exterior, în microscopie electronică de transmisie are formă globulară, putând acoperi în timp în totalitate hifele la exterior (*Fig. 10.1.11., Fig. 10.1.12.*).

În cazul hifelor senescente se observă o mineralizație de hidroxid feric sub formă aciculară spre interior (*Fig. 10.1.12. a.*).

Partea a-IV-a. Cercetarea electronomicroscopică a eșantioanelor.

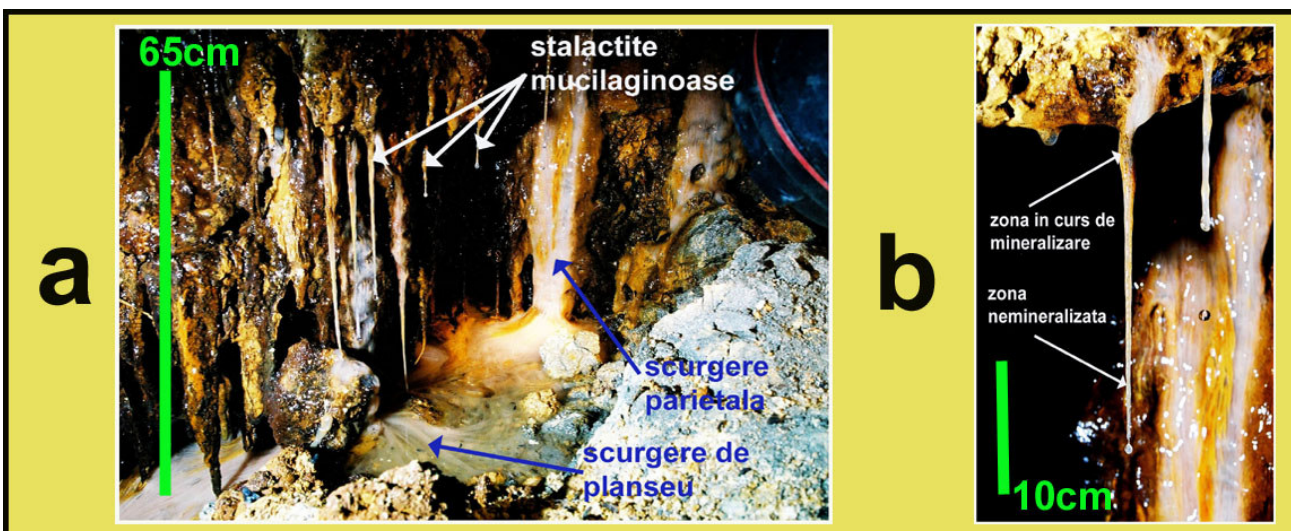
Fig. 10.1.12. a. Hifă în diviziune. Secțiune transversală printr-o hifă senescentă cu mineralizații aciculare de hidroxid feric spre interior; b. Hifă în diviziune cu mineralizații sferice de hidroxid feric; c., d. Hifă cu mineralizații sferice de hidroxid feric (diferite mărituri).



10.2. Arhitectura electronmicroscopică a formațiunilor mucilaginoase (stalactite, scurgeri parietale și scurgeri de planșeu)

Formațiunile mucilaginoase reprezintă consorții de microorganisme chemolitotrofe și heterotrofe foarte bine legate într-o masă compactă de mucopolizaharide extracelulare. În această matrice de mucopolizaharide se depune hidroxidul feric ce rezultă în urma oxidării Fe^{2+} de către bacteriile chemolitotrofe (capitolul 11). Această depunere are loc de la bază spre vârf și din centru spre margine în cazul stalactitelor, iar în cazul scurgerilor de la margini spre zona centrală (Fig. 10.2.1. a., b.).

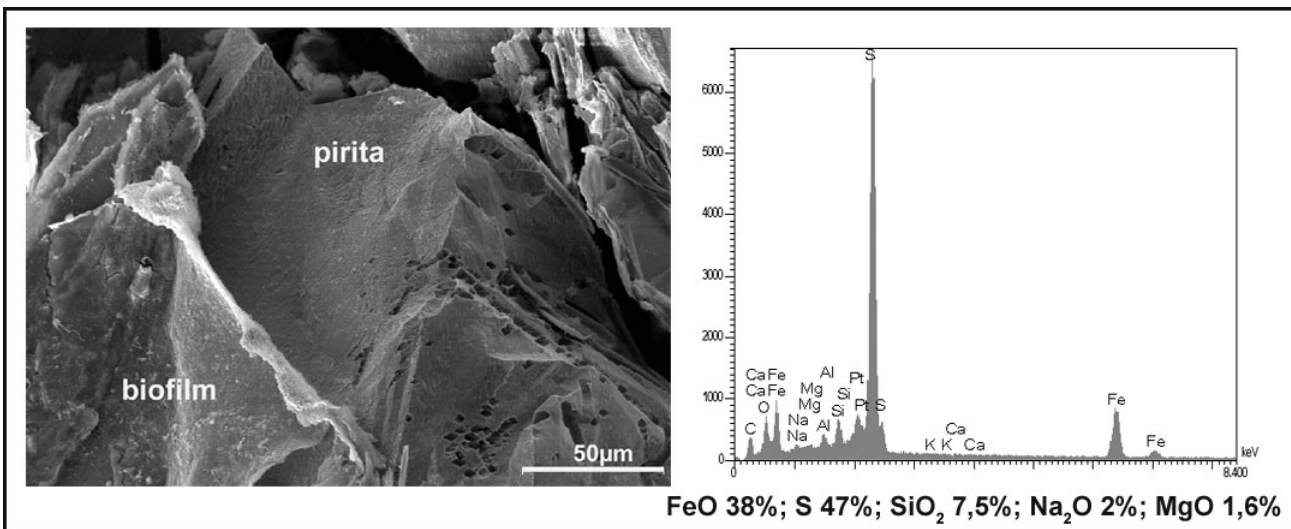
Fig. 10.2.1. a. Vedere de ansamblu cu stalactitele, scurgerile parietale și scurgerile de planșeu mucilaginoase; b. Stalactitele mucilaginoase.



În M.E.B. au fost realizate observații atât asupra părții albe, nemineralizate a consorțiului de microorganisme cât și asupra zonei în curs de mineralizare (galben ruginie) (capitolul 6).

Substratul furnizor de energie pentru aceste consorții de microorganisme este *pirita* (capitolul 11) care se găsește în cantitate mare în zăcământ (Fig. 10.2.2.; Fig. 10.2.3. b.).

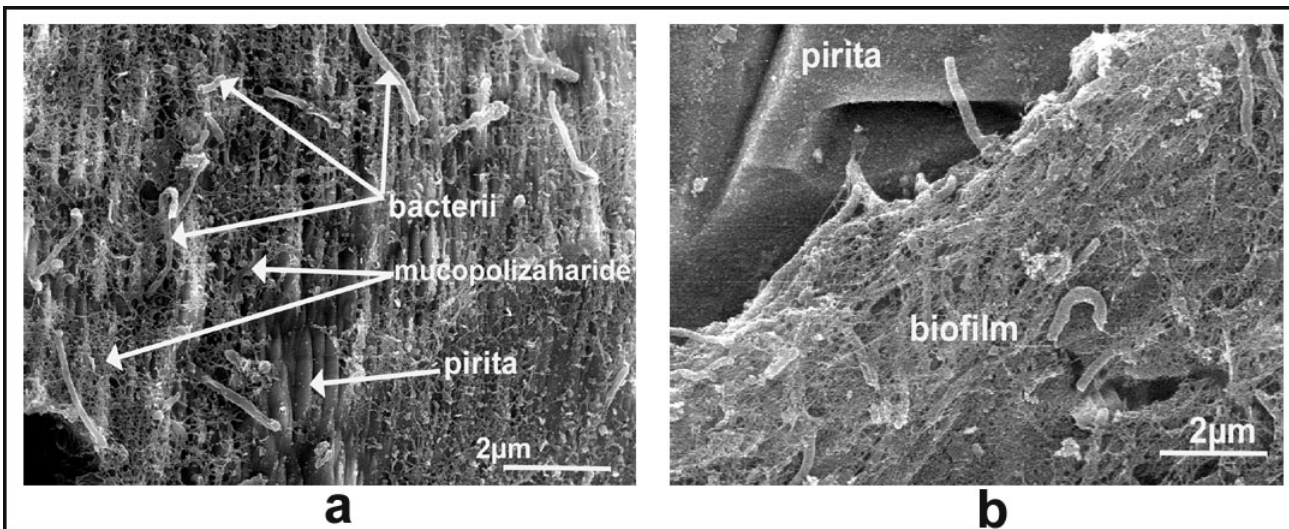
Fig. 10.2.2. Vedere de ansamblu cu un cristal de pirită acoperit de un biofilm compact. Spectru E.D.S. pe cristalul de pirită.



Partea a-IV-a. Cercetarea electronmicroscopică a eșantioanelor.

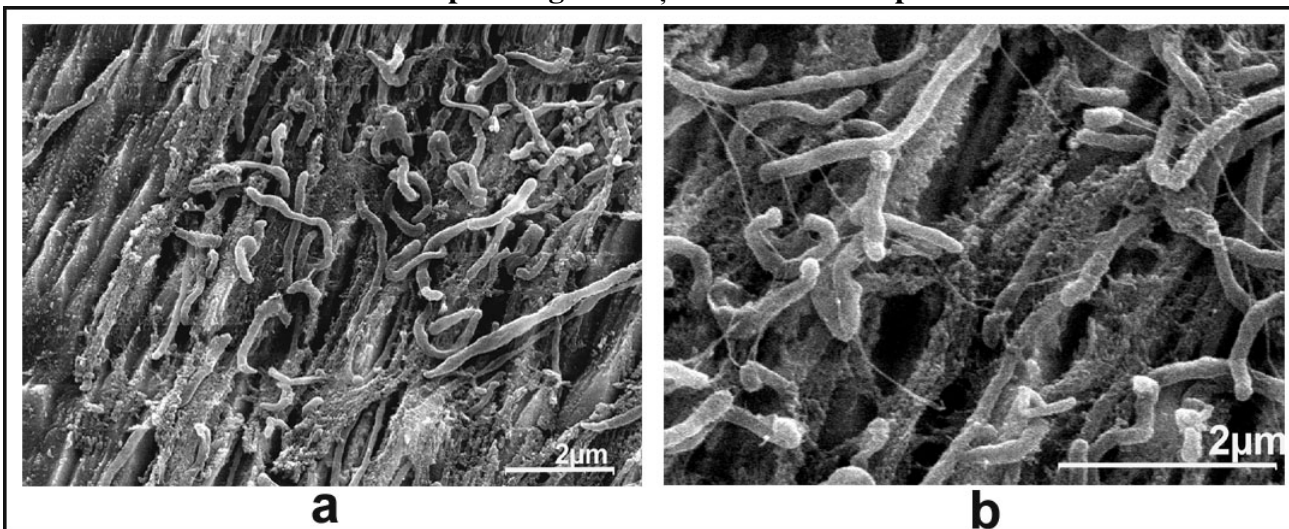
Pirita este colonizată de bacteriile chemolitotrofe care formează biofilme la suprafața cristalelor (Fig. 10.2.3. a.).

Fig. 10.2.3. a. Biofilm lax care aderă intim la suprafața cristalelor de pirită; b. Biofilm compact ce învelește grosier cristalul de pirită.



Datorită mucopolizaharidelor extrem de bogate de la exteriorul celulelor bacteriene, biofilmele sunt foarte compacte și învelesc total cristalele creând un mediu propice pentru reacțiile de oxidare de la suprafața acestora. Pe suprafața cristalelor de pirită există un biofilm mai lax care este foarte activ în oxidare, bacteriile chemolitotrofe acționând în special la nivelul neregularităților pe care le prezintă cristalele (Fig. 10.2.4. a., b.).

Fig. 10.2.4. a. Biofilm lax la suprafața cristalelor de pirită; b. Detaliu cu bacteriile chemolitotrofe care aderă intim pe neregularitățile cristalului de pirită.

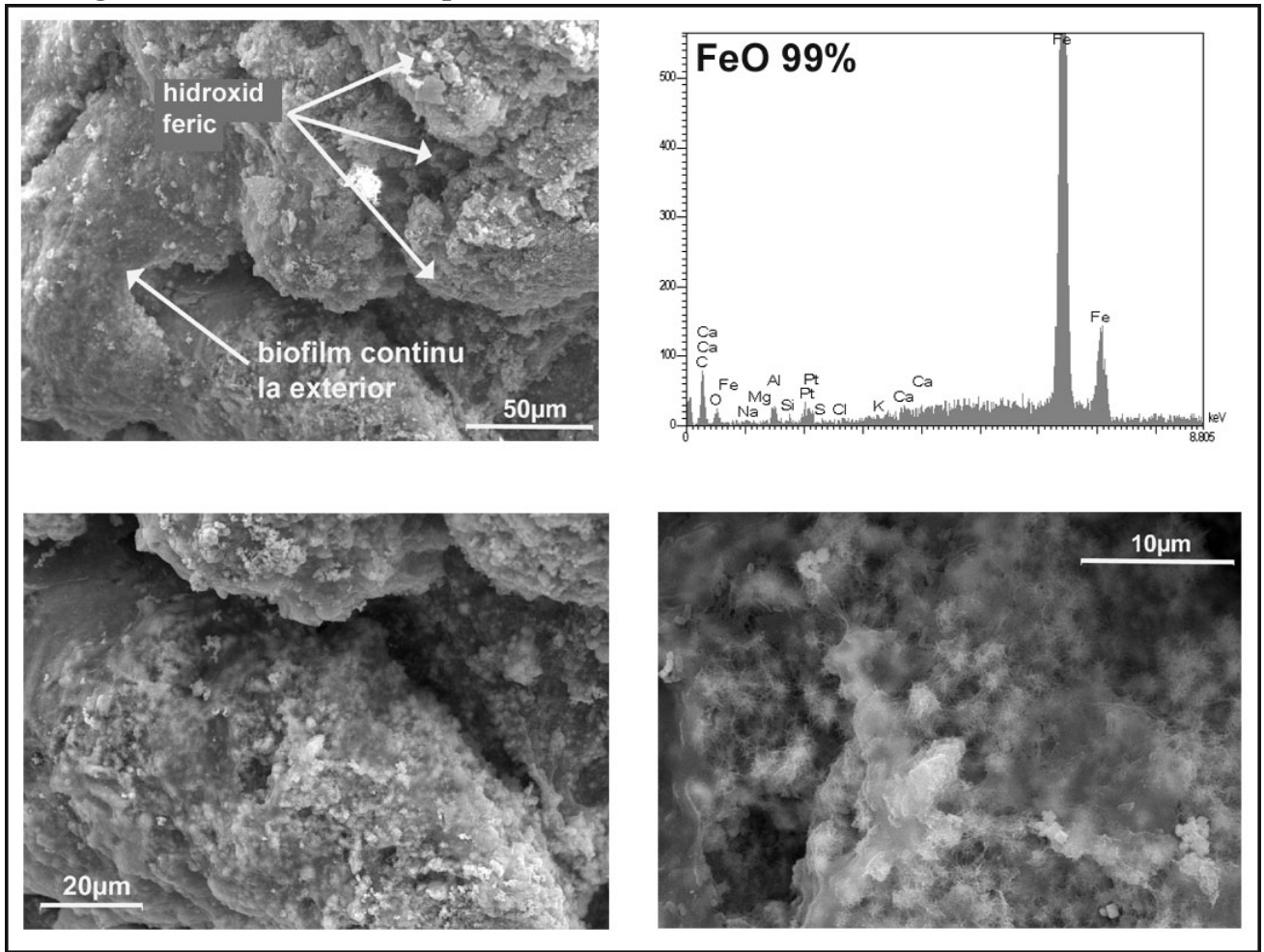


În urma oxidării Fe^{2+} de la suprafața cristalelor de pirită (sursa de energie a chemolitotrofelor) rezultă Fe^{3+} care se depune pasiv și activ în biofilmele de microorganisme sub formă de hidroxid feric sau oxid de fier (Fig. 10.2.5.). Această mineralizare se realizează, așa cum

Capitolul 10. Aspecte microscopice și electronmicroscopice, analize E.D.S.

am precizat mai sus, de la bază spre vârf și din centru spre margine în cazul stalactitelor, iar în cazul scurgerilor de la margini spre zona centrală (Fig. 10.2.1. b.).

Fig. 10.2.5. Mineralizații de hidroxid feric cu biofilm la exterior, la baza stalactitei mucilaginoase (diferite mărimi). Spectru E.D.S.



La exteriorul zonei mineralizate, sau în curs de mineralizare, există permanent un biofilm bacterian foarte compact care formează un adevărat înveliș (Fig. 10.2.6. a., b., c., d.).

Partea a-IV-a. Cercetarea electronmicroscopică a eșantioanelor.

Fig. 10.2.6. a., b. Mucopolizaharide mineralizate la interior și biofilm compact la exterior; c. Biofilm bacterian compact; d. Bacterie din biofilm.

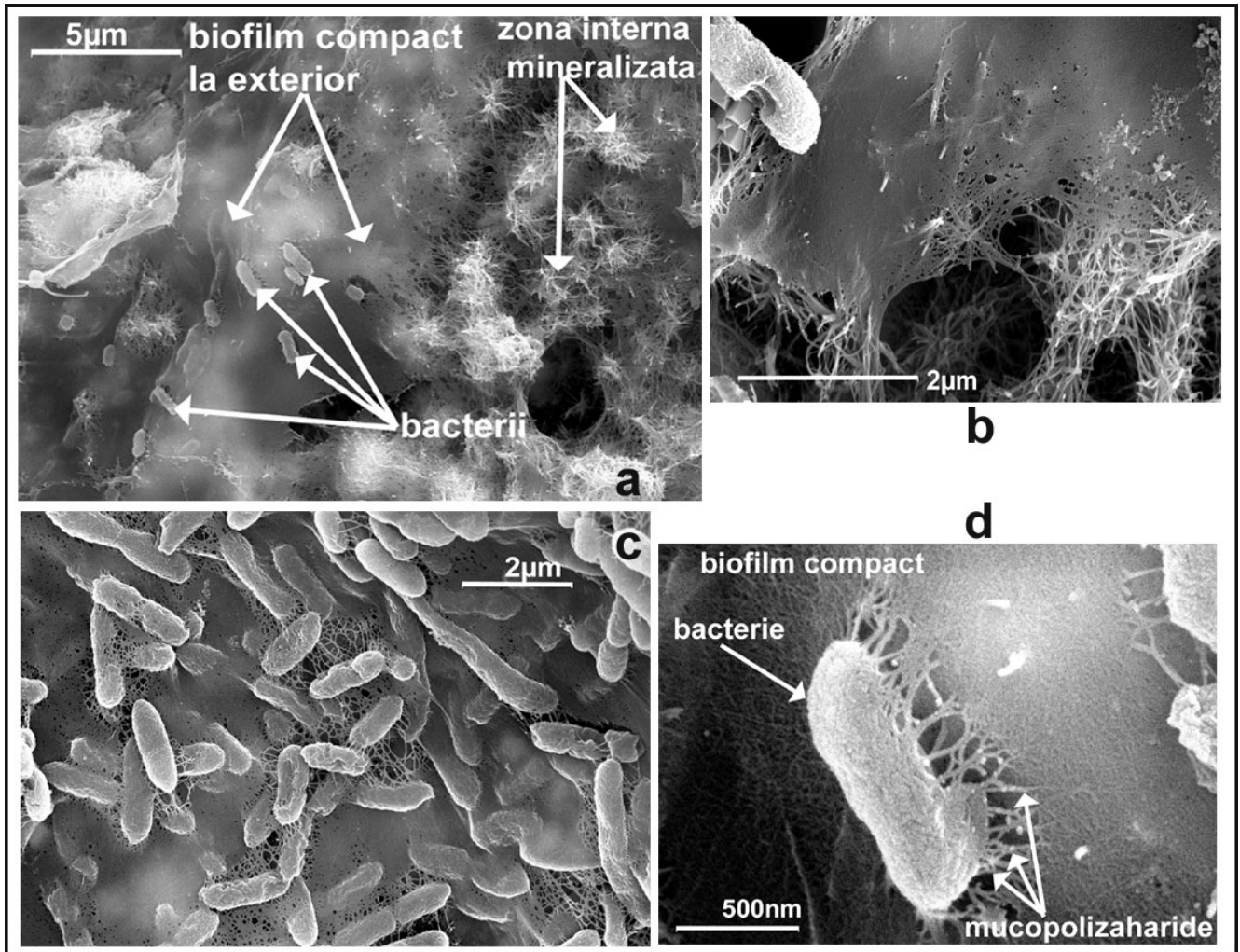
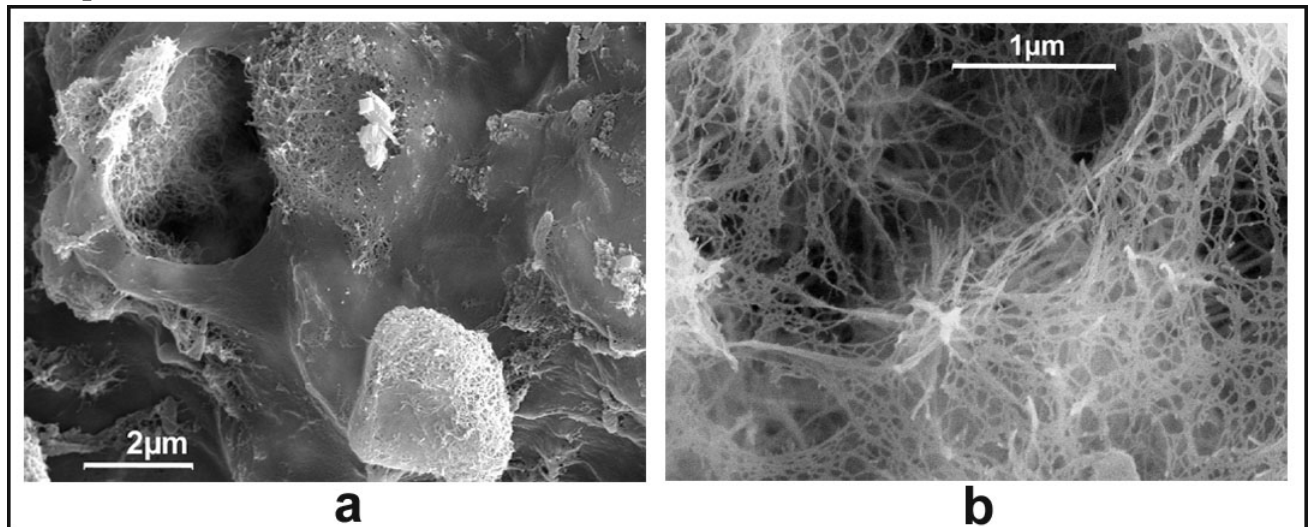


Fig. 10. 2. 7. a. Ansamblu cu o zonă mineralizată și biofilm la exterior; b. Detaliu cu mucopolizaharide mineralizate.

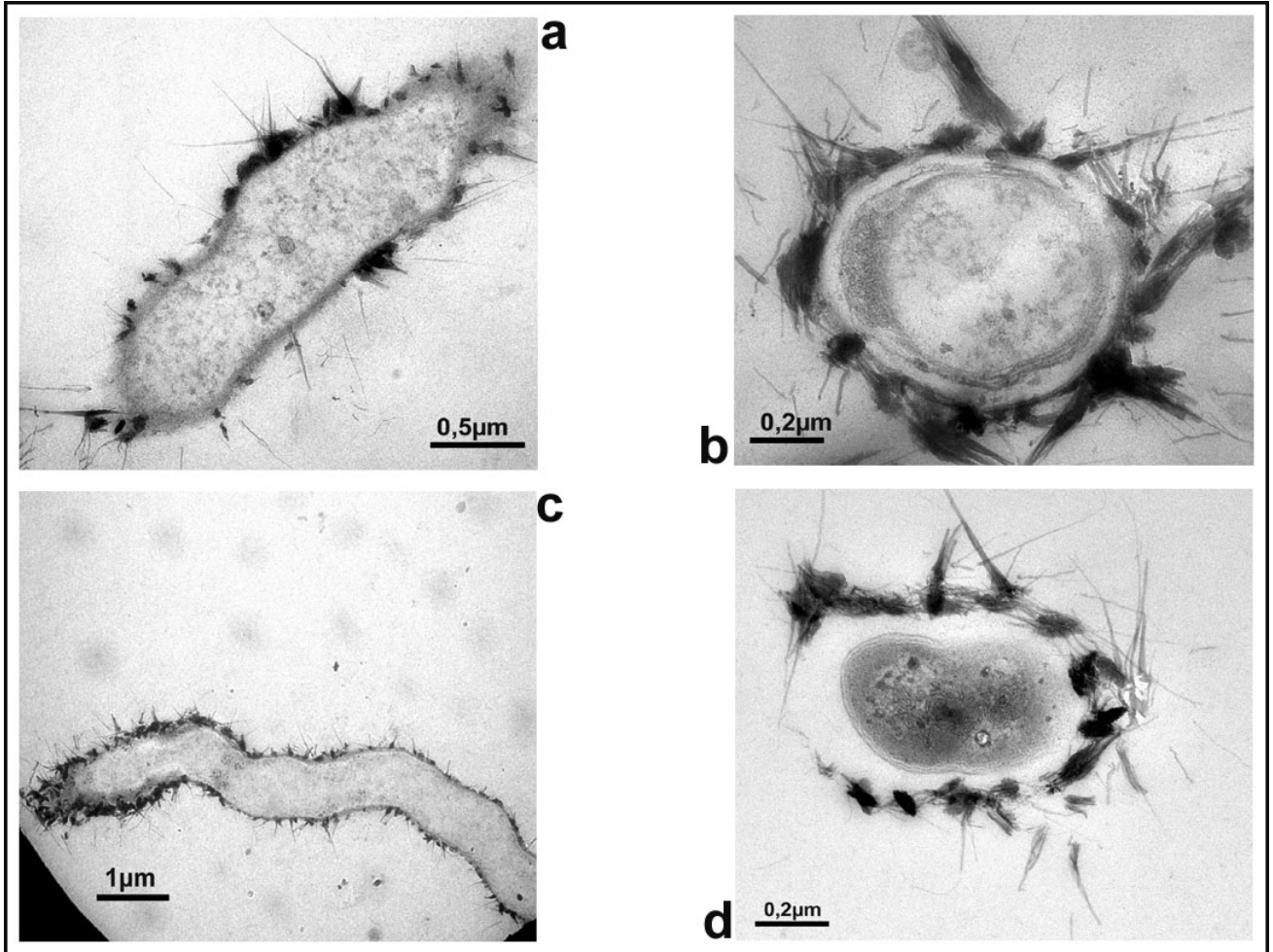


Capitolul 10. Aspecte microscopice și electronmicroscopice, analize E.D.S.

În zona mineralizată care se află la interior, filmul de polizaharide este relativ deșirat și mineralizat cu cristale de hidroxid feric extrem de fine aciculare (Fig. 10.2.7. a., b.).

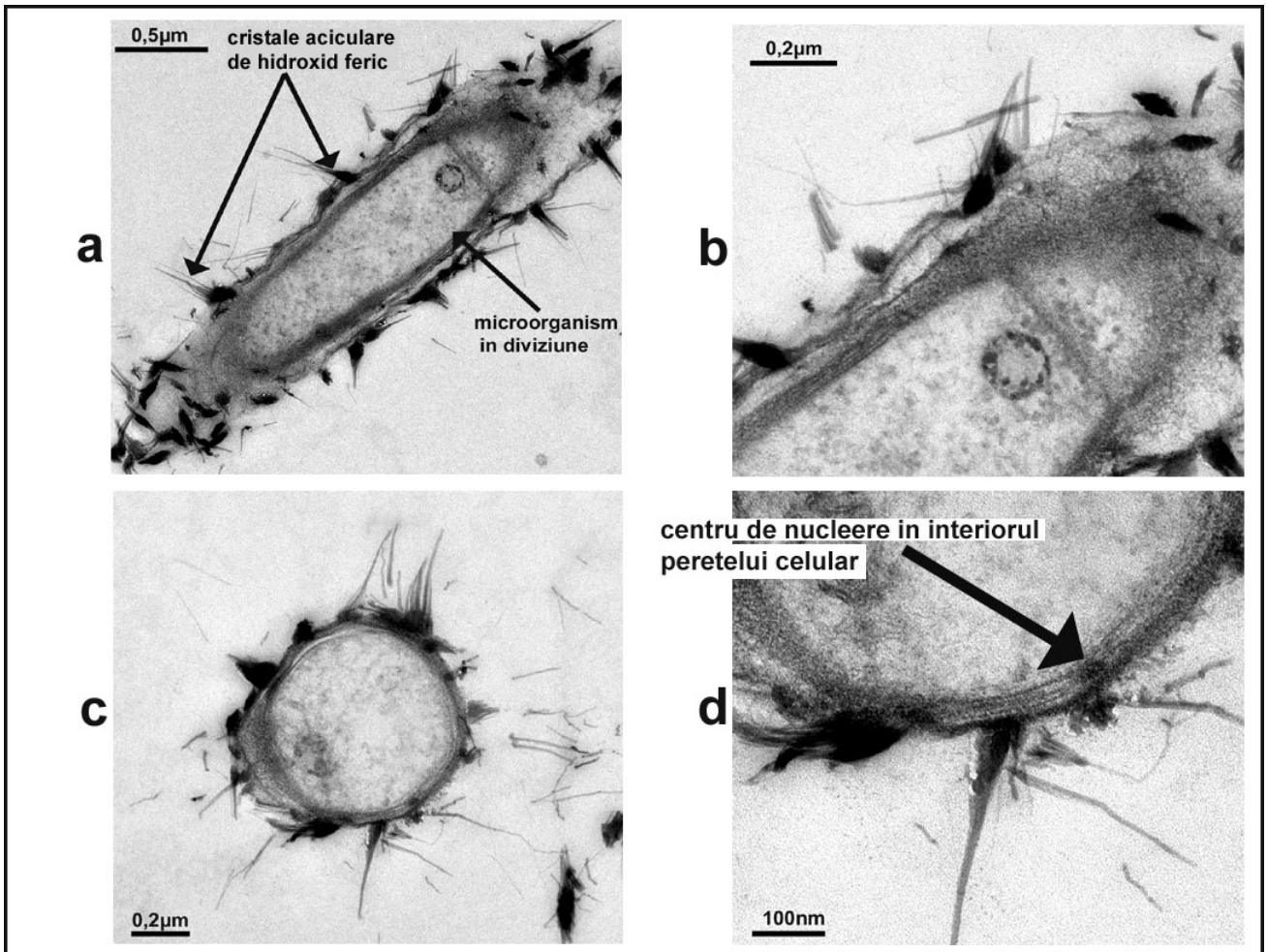
În secțiunile ultrafine realizate la baza stalactitelor mucilaginoase se observă un număr mare de microorganisme vii înconjurate de cristale fine aciculare de hidroxid feric dispuse la exteriorul celulei (Fig. 10.2.8. a., b., c., d.), (Fig. 10.2.9. a., b., c., d.).

Fig. 10.2.8. a., b. Microorganisme cu cristale aciculare de hidroxid feric la exteriorul peretelui celular; c. Hifă de Ciuperci cu cristale de hidroxid feric la exterior; d. Microorganism cu cristale aciculare de hidroxid feric la exteriorul capsulei.



Partea a-IV-a. Cercetarea electronmicroscopică a eșantioanelor.

Fig. 10.2.9. a., c. Microorganism cu cristale aciculare de hidroxid feric; b., d. Detaliu cu periferia celulară cu cristale.



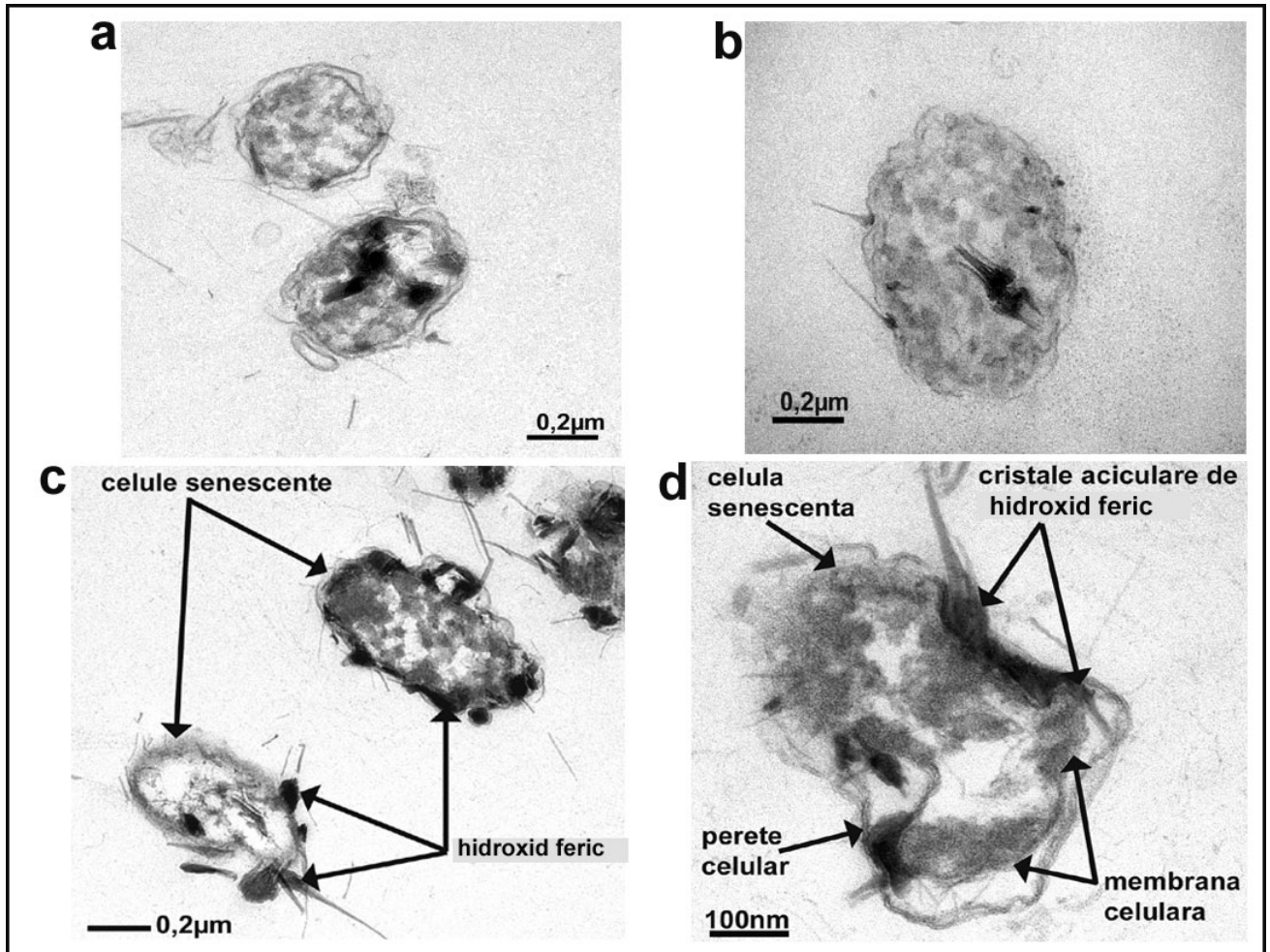
La unele microorganisme observăm faptul că mineralizarea a avut loc în zona peretelui celular existând uneori centre de nucleere a cristalelor aciculare chiar în peretele celular (*Fig. 10.2.9. d.*).

Alte microorganisme prezintă o mineralizare la exteriorul capsulei (*Fig. 10.2.8.c.*).

În cazul celulelor senescente, se observă o puternică mineralizare în interiorul celulei, celula deformându-se puternic (*Fig. 10.2.10. a., b., c., d.*).

Capitolul 10. Aspecte microscopice și electronomicroscopice, analize E.D.S.

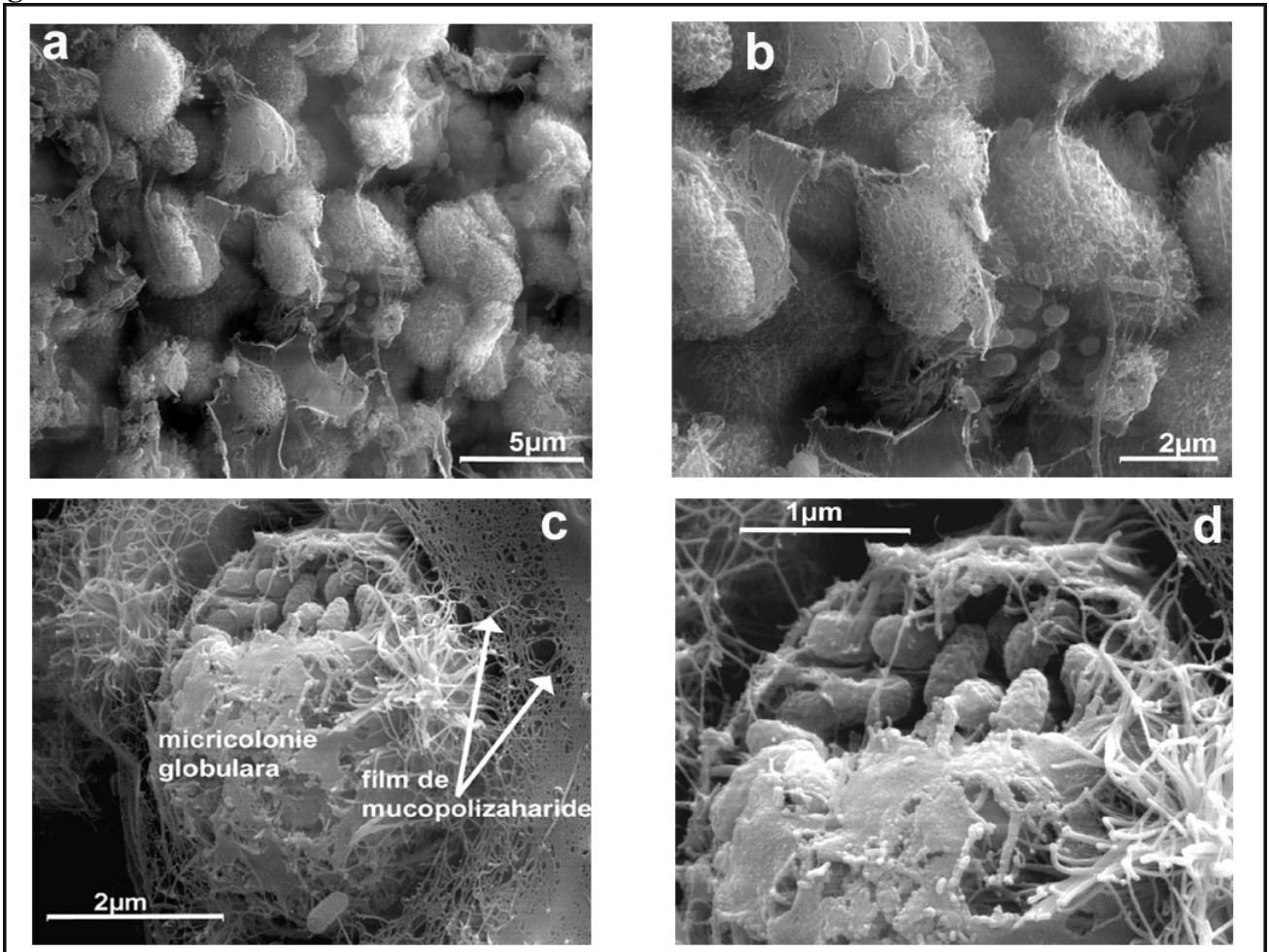
Fig. 10.2.10. a., b., c. Celule senescente cu cristale de hidroxid feric în interior; d. Detaliu cu celulă senescentă.



În zonele centrale ale formațiunilor mucilaginose au fost observate adesea atât în M.E.B. cât și în M.E.T. microcolonii globulare formate din câteva zeci de celule bacteriene înconjurate de o masa compactă de mucopolizaharide care se mineralizează cu timpul (Fig. 10.2.11. a., b., c., d.). În ea se formează cristale fine aciculare de hidroxid feric luând același aspect deșirat (Fig. 10.2.12. a., b., c., d., e., f.).

Partea a-IV-a. Cercetarea electronmicroscopică a eșantioanelor.

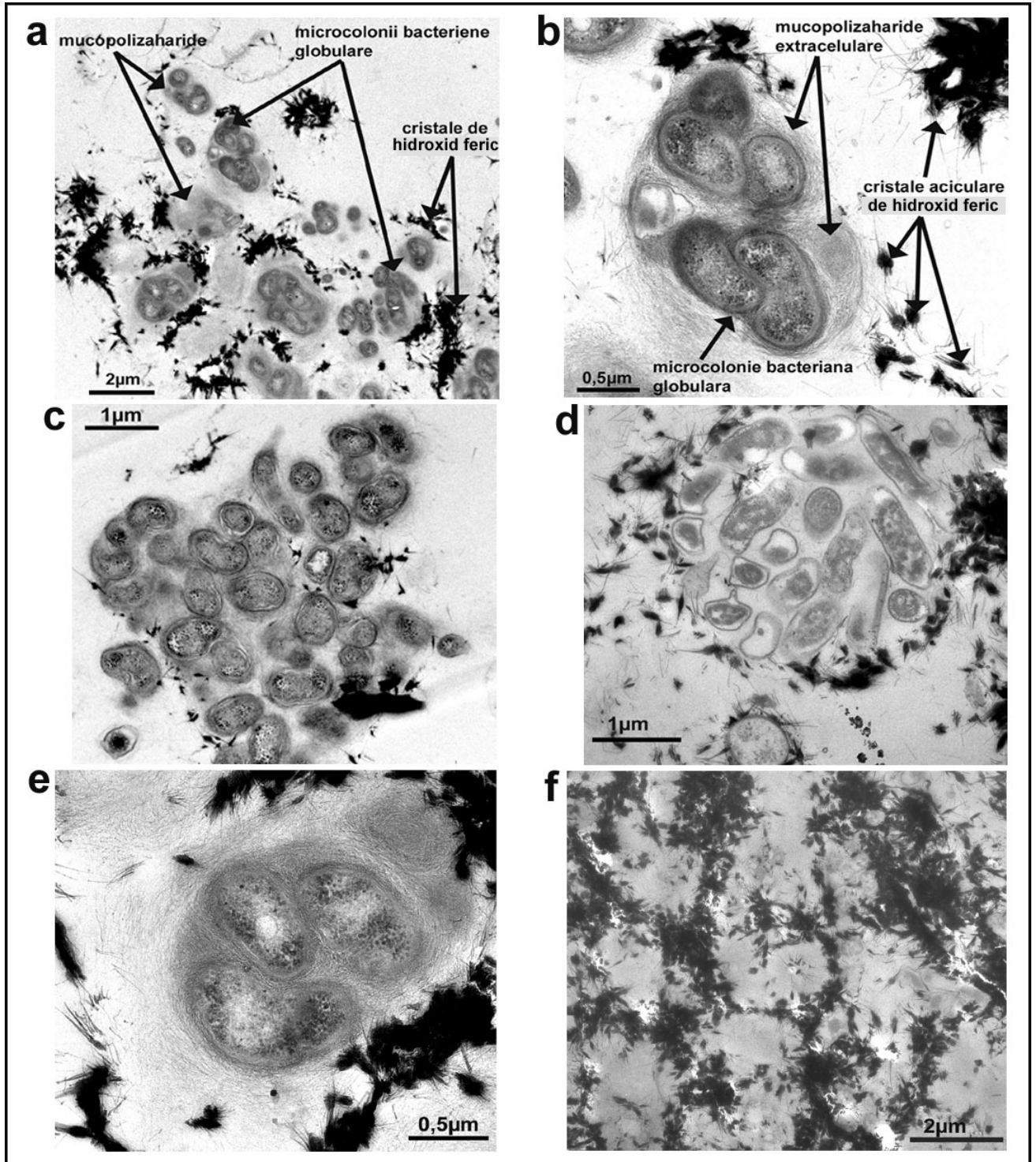
Fig 10.2.11. a., b. Microcolonii bacteriene globulare; c., d. Microcolonii bacteriene globulare – detaliu.



În zonele complet mineralizate se pot observa orificii în masa de mucopolizaharide mineralizate, acestea reprezentând locul vechilor celule sau a vechilor microcolonii globulare bacteriene care s-au dezorganizat ((Fig. 10.2.12. f.; Fig. 10.2.13. a., b., c., d.).

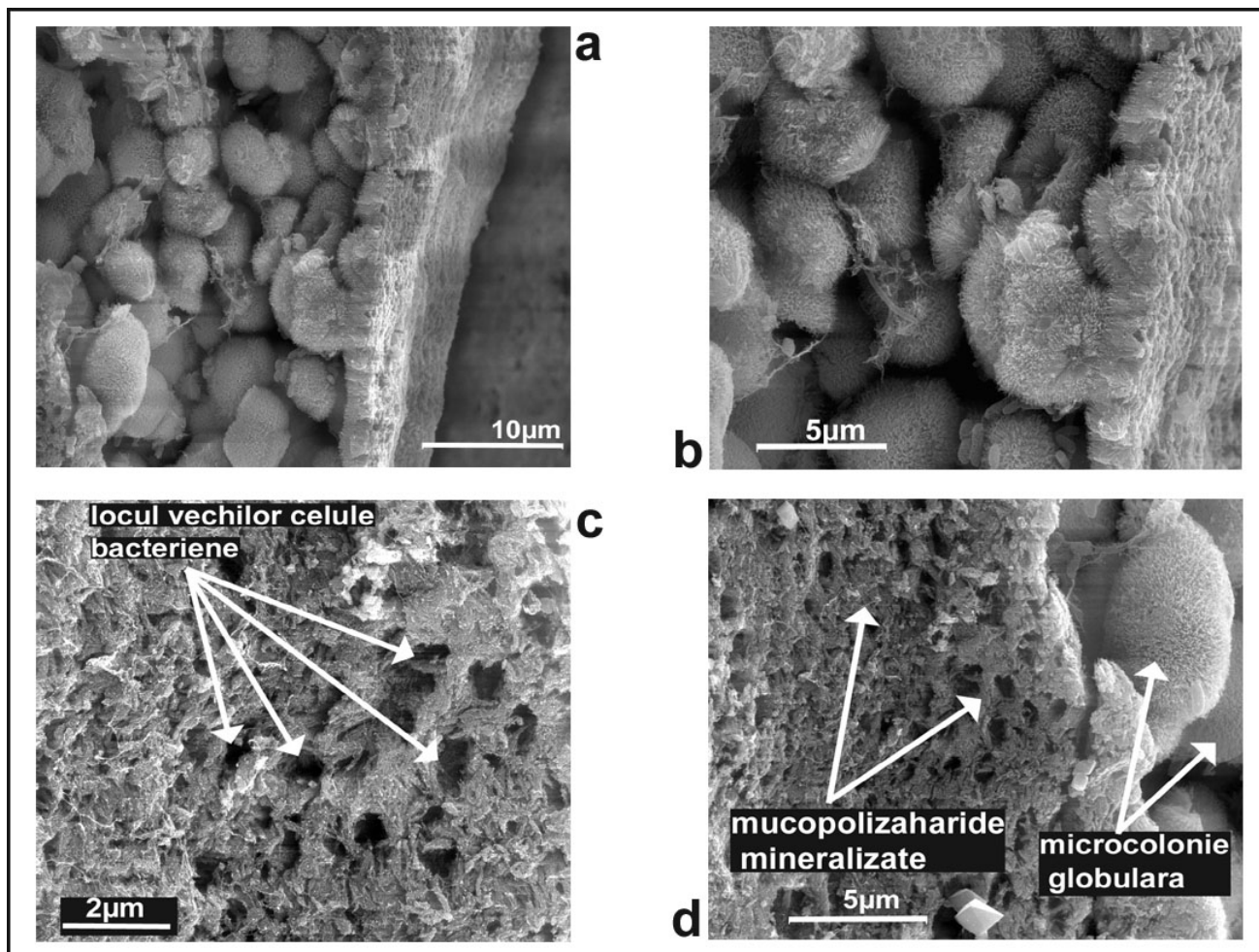
Capitolul 10. Aspecte microscopice și electronmicroscopice, analize E.D.S.

Fig. 10.2.12. a., b., c., d., e. Microcolonii globulare bacteriene cu hidroxid feric în jurul lor; f. Zonă cu microcolonii globulare bacteriene complet mineralizată (în locul microcoloniilor vor rămâne orificii).



Partea a-IV-a. Cercetarea electronmicroscopică a eșantioanelor.

Fig. 10.2.13. a., b. Microcolonii bacteriene globulare total mineralizate; c., d. Microcolonii bacteriene total mineralizate în secțiune cu locul fostelor celule bacteriene vizibil.

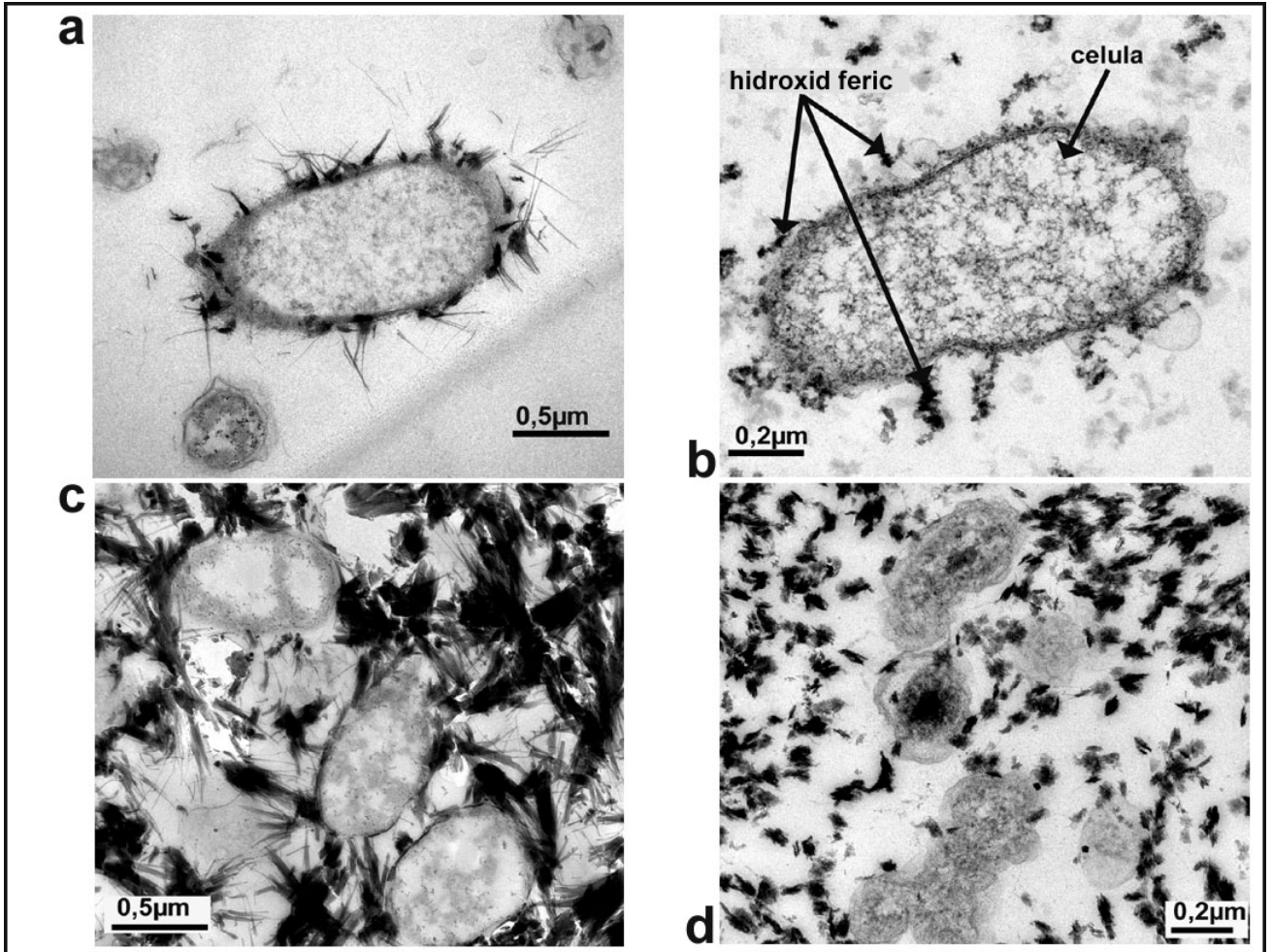


În M.E.T. se observă o diferență netă de cristalizare a hidroxidului feric în biofilmele microbiene la nivelul stalactitele mucilaginoase și a scurgerile mucilaginoase parietale și de planșeu.

Astfel, în stalactitele mucilaginoase, hidroxidul feric este cristalizat în masa de mucopolizaharide sub forma unor cristale fine aciculare (*Fig. 10.2.8.; Fig. 10.2.9.; Fig.10.2.10.; Fig. 10.2.12.; Fig. 10.2.14. a., c.*), iar în cazul scurgerilor mucilaginoase parietale și de planșeu se află rar sub formă de cristale aciculare, cel mai adesea fiind întâlnit sub forma unor cristale fusiforme sau neregulate (*Fig. 10.2.14. b., d.; Fig. 10.2.15. a., b., c., d.*).

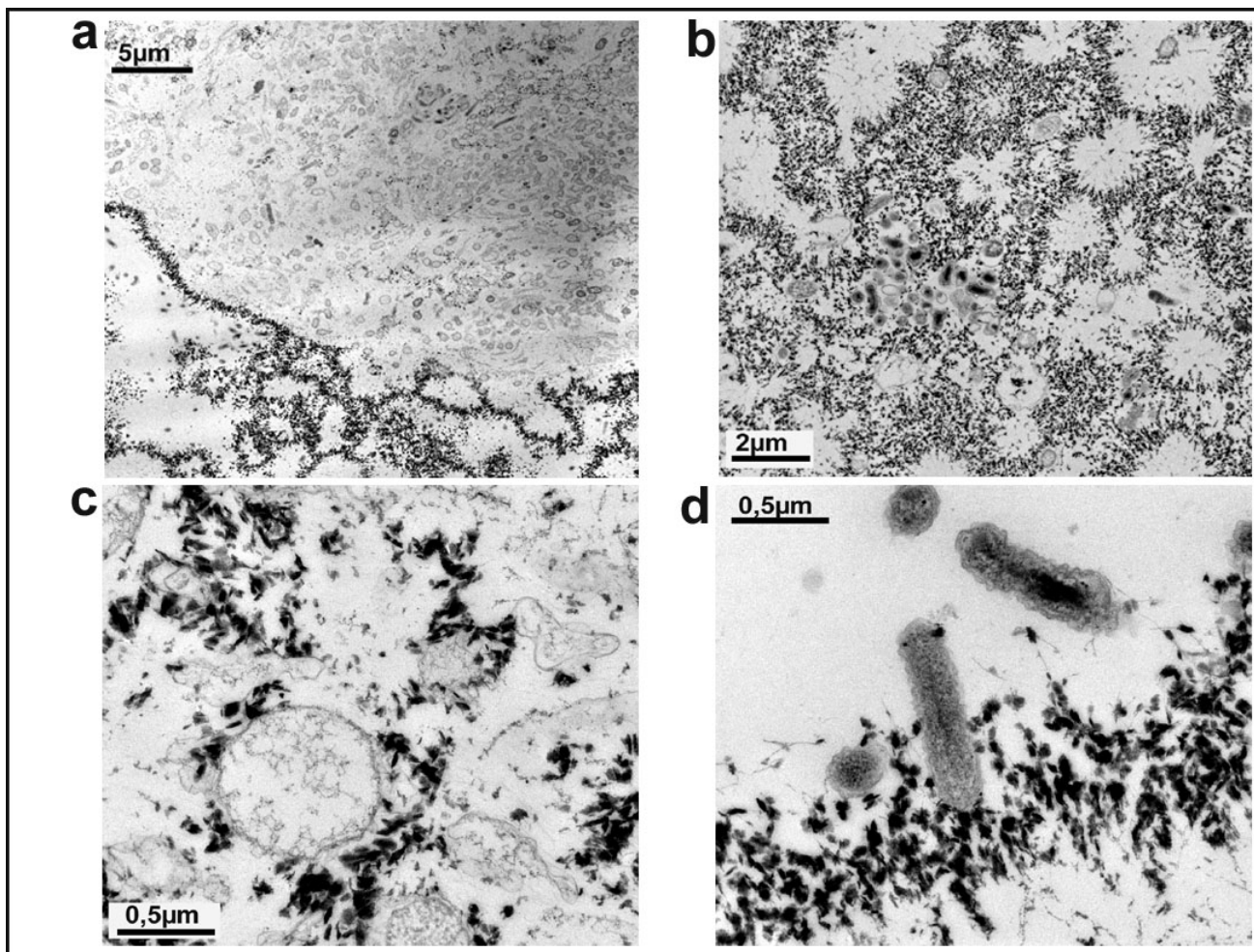
Capitolul 10. Aspecte microscopice și electronmicroscopice, analize E.D.S.

Fig. 10.2.14. a., c. Stalactite mucilaginoase: microorganismе înconjurate de cristale aciculare de hidroxid feric; b., d. Scurgeri mucilaginoase de planșeu: microorganismе înconjurate de cristale mici de formă neregulată.



Partea a-IV-a. Cercetarea electronmicroscopică a eșantioanelor.

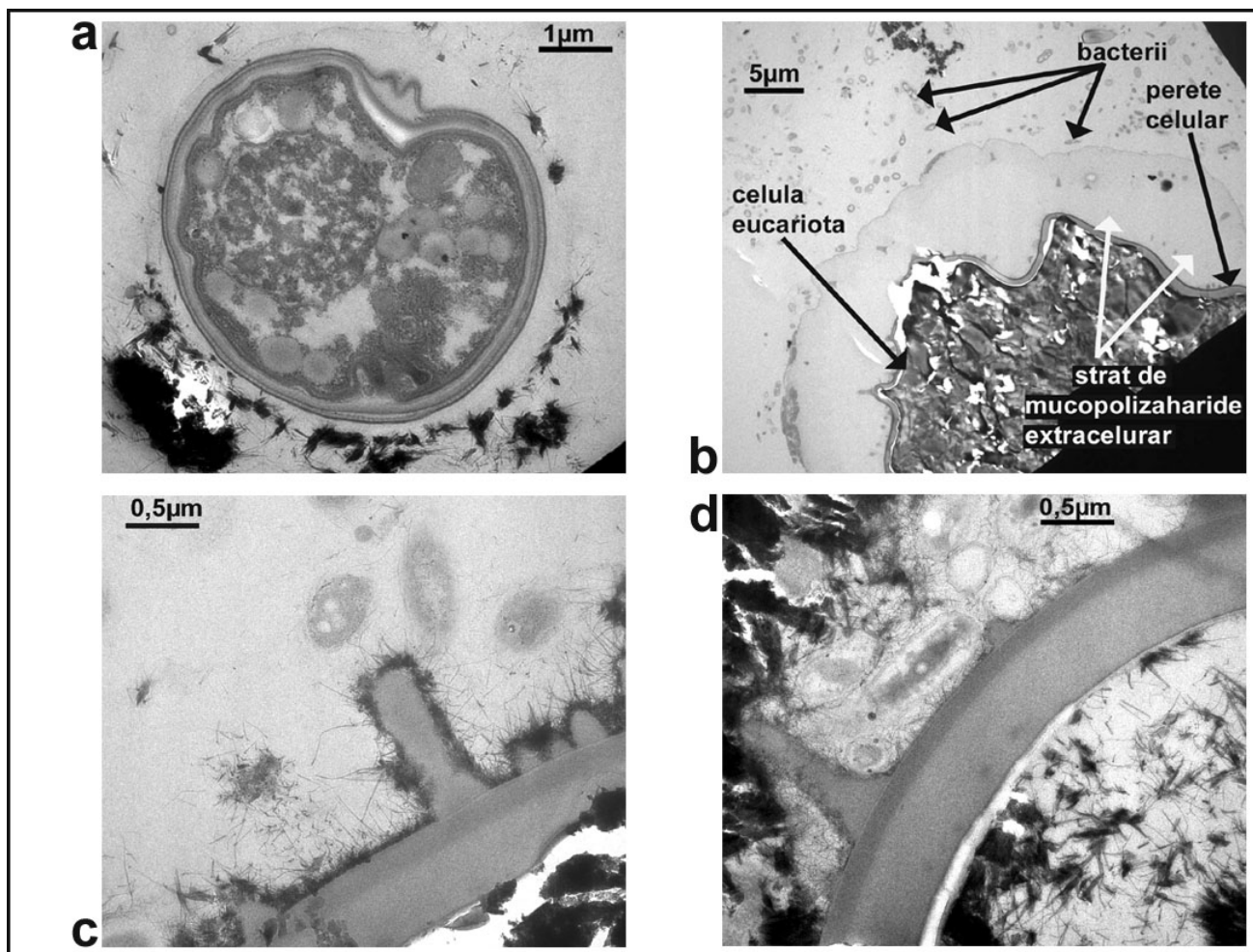
Fig. 10.2.15. a., b., c., d. Imagini de ansamblu și de detaliu cu microorganisme și mineralizații de hidroxid feric în scurgerile parietale și de planșeu mucilaginoase.



În stalactitele mucilaginoase, în zona de trecere de la partea bazală parțial mineralizată cu hidroxid feric, spre mijlocul stalactitei întâlnim adesea, în microscopie electronică de transmisie, microorganisme eucariote. Acestea prezintă hidroxid feric sub formă de cristale aciculare depus la exteriorul celulei (*Fig. 10.2.16. a.*). Tot în această zonă putem întâlni și chisturi (forme de rezistență) de eucariotelor, uneori observându-se doar pereții chistali cu structura omogenă, cu bacterii împrejur și hidroxid feric acicular (*Fig. 10.2.16. b., c., d.*).

Capitolul 10. Aspecte microscopice și electronmicroscopice, analize E.D.S.

Fig. 10.2.16. a. Celulă eucariotă capsulată cu hidroxid feric acicular la exteriorul capsulei; b. Celulă eucariotă capsulată senescentă cu hidroxid feric la interior; c., d. Peretele unui chist de celulă eucariotă cu bacterii și hidroxid feric acicular.



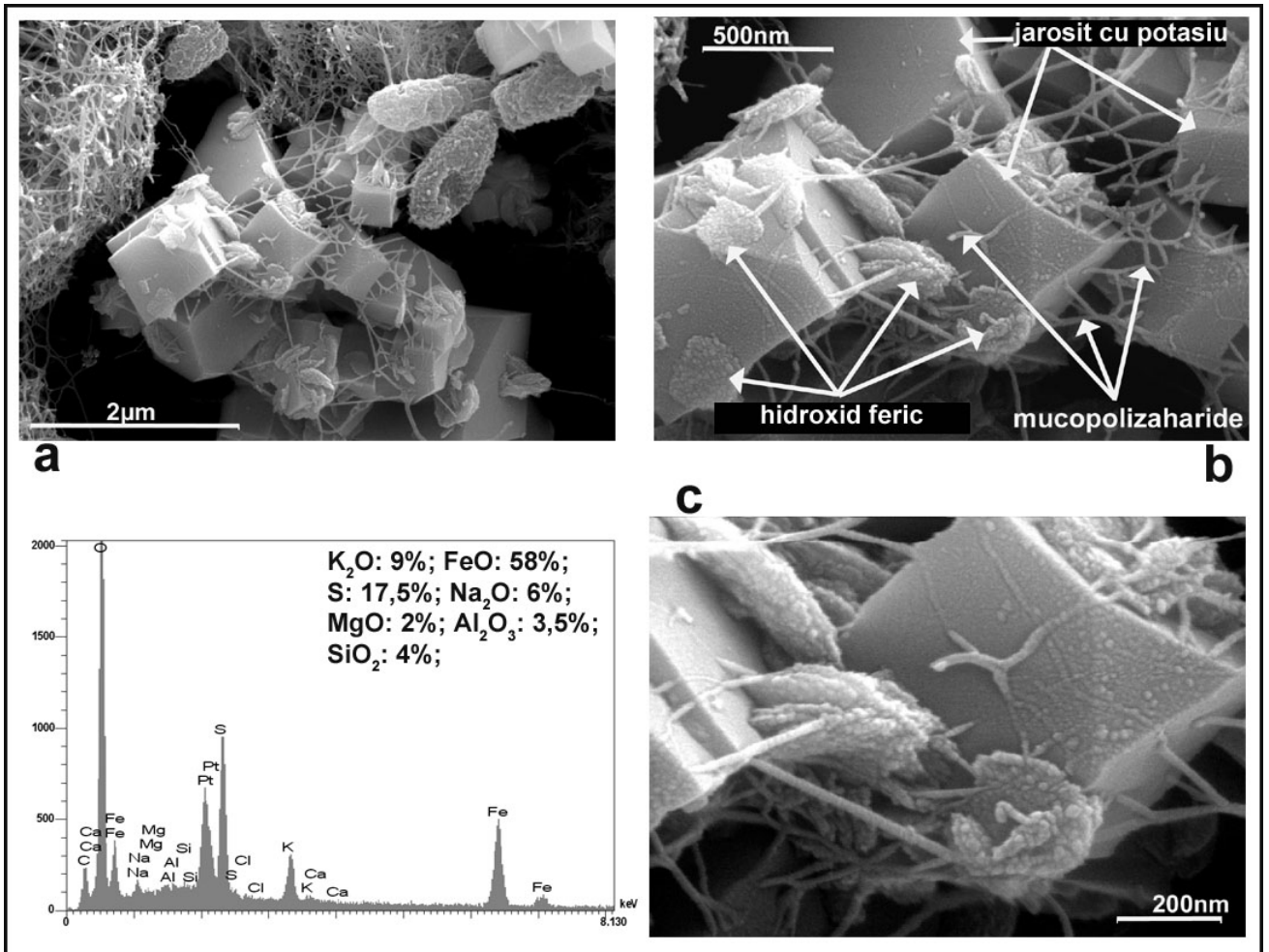
Fe^{3+} , care rezultă din oxidarea bacteriană a Fe^{2+} rezultat din pirită, pe lângă faptul că se depune sub formă de hidroxid poate cauza oxidarea piritei reziduale. Din această reacție rezultă Fe^{2+} și SO_4^{2-} . În prezența sulfatului și a altor ioni, hidroxidul feric se transformă în *jarosit* mai insolubil (capitolul 11).

În formațiunile mucilaginoase din mina Kiesberg, hidroxidul feric este întâlnit în general la baza și în centrul stalactitelor mucilaginoase și la marginea scurgerilor mucilaginoase, adică aproape de sursa de fier (peretele cavității). Jarositul, în schimb, a fost observat în special în zonele în curs de mineralizare, adică la mijlocul stalactitelor mucilaginoase și a scurgerilor mucilaginoase (capitolul 11).

Jarositul cu potasiu este un cristal pe sistem trigonal-piramidal cu două vârfuri opuse (Fig. 10.2.17. a., b., c.; Fig.10.2.18. a., b., c., d.). Acesta a fost observat în toate cazurile adică atât în stalactitelor mucilaginoase, cât și în cazul scurgerilor de planșeu și a celor parietale.

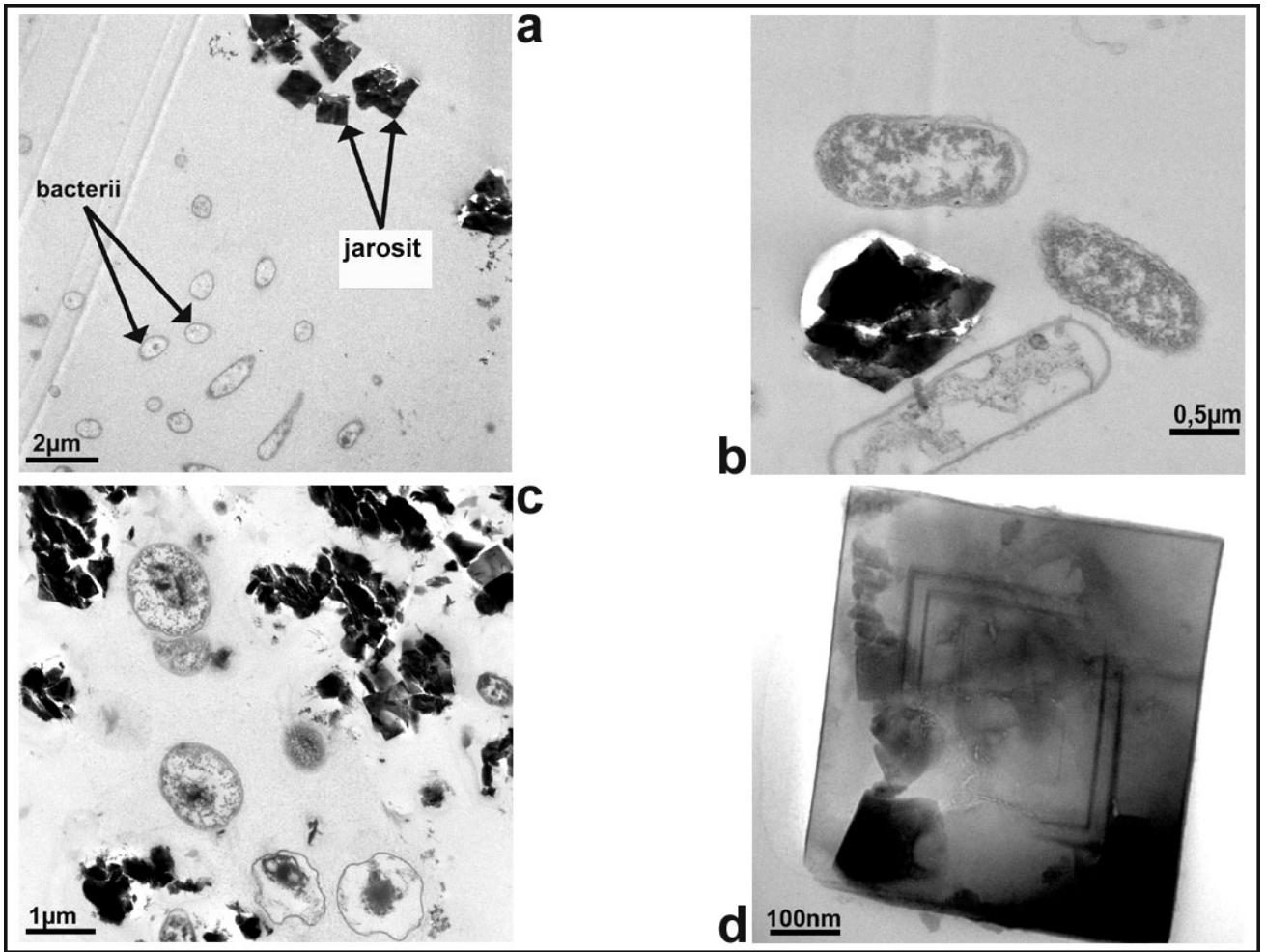
Partea a-IV-a. Cercetarea electronmicroscopică a eșantioanelor.

Fig. 10.2.17. a. Grup de cristale cubice de jarosit cu potasiu și bacterii; b., c. Cristale cubice de jarosit cu resturi de hidroxid feric și mucopolizaharide pe suprafața lor. Spectru analiză E.D.S. pe cristalul de jarosit.



Capitolul 10. Aspecte microscopice și electronmicroscopice, analize E.D.S.

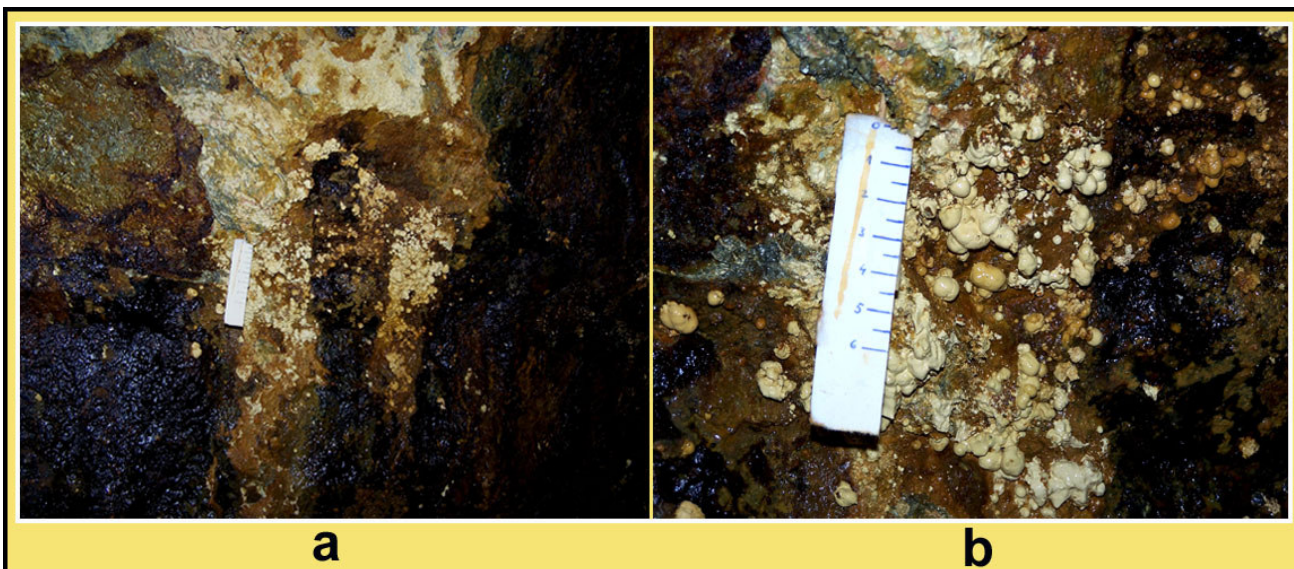
Fig. 10.2.18. a., b., c. Microorganisme și jarosit cu potasiu secționate; d. Detaliu cu jarosit cu potasiu (M.E.T.).



Jarositul cu potasiu a fost găsit în cantități însemnate și în Sala 2., aproape de nișa cu formațiuni mucilaginoase (*Fig. 6.2.1.*). Aici jarositul formează un depozit de culoare alb-gălbui. Acest depozit se prezintă sub forma unor semisfere de 0,2-0,8cm diametru cu dezvoltare pulverulentă pe perete pe o suprafață de aproximativ 1m² (*Fig. 10.2.19 a., b.*).

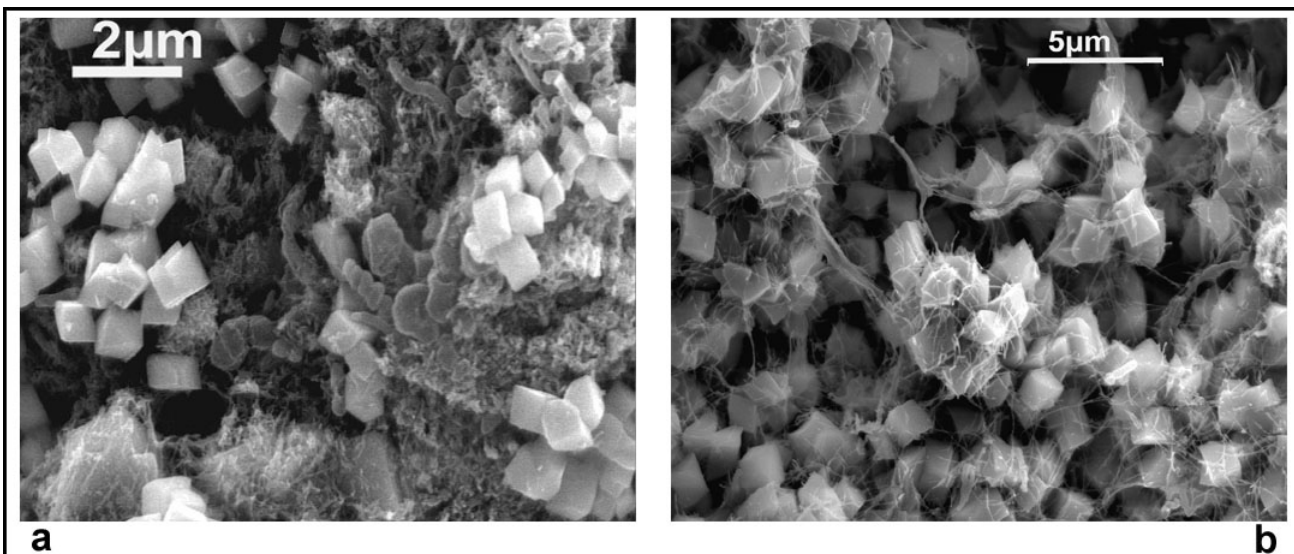
Partea a-IV-a. Cercetarea electronmicroscopică a eșantioanelor.

Fig. 10.2.19. Depozit de jarosit pe peretele Sălii 2. a. Ansamblu cu depozitul de jarosit; b. Detaliu.



În M.E.B. microcristalele de jarosit din acest depozit sunt legate între ele printr-o rețea de mucopolizaharide bacteriene, în unele sectoare fiind bine vizibile și celulele bacteriene (Fig. 10.2.20. a., b.).

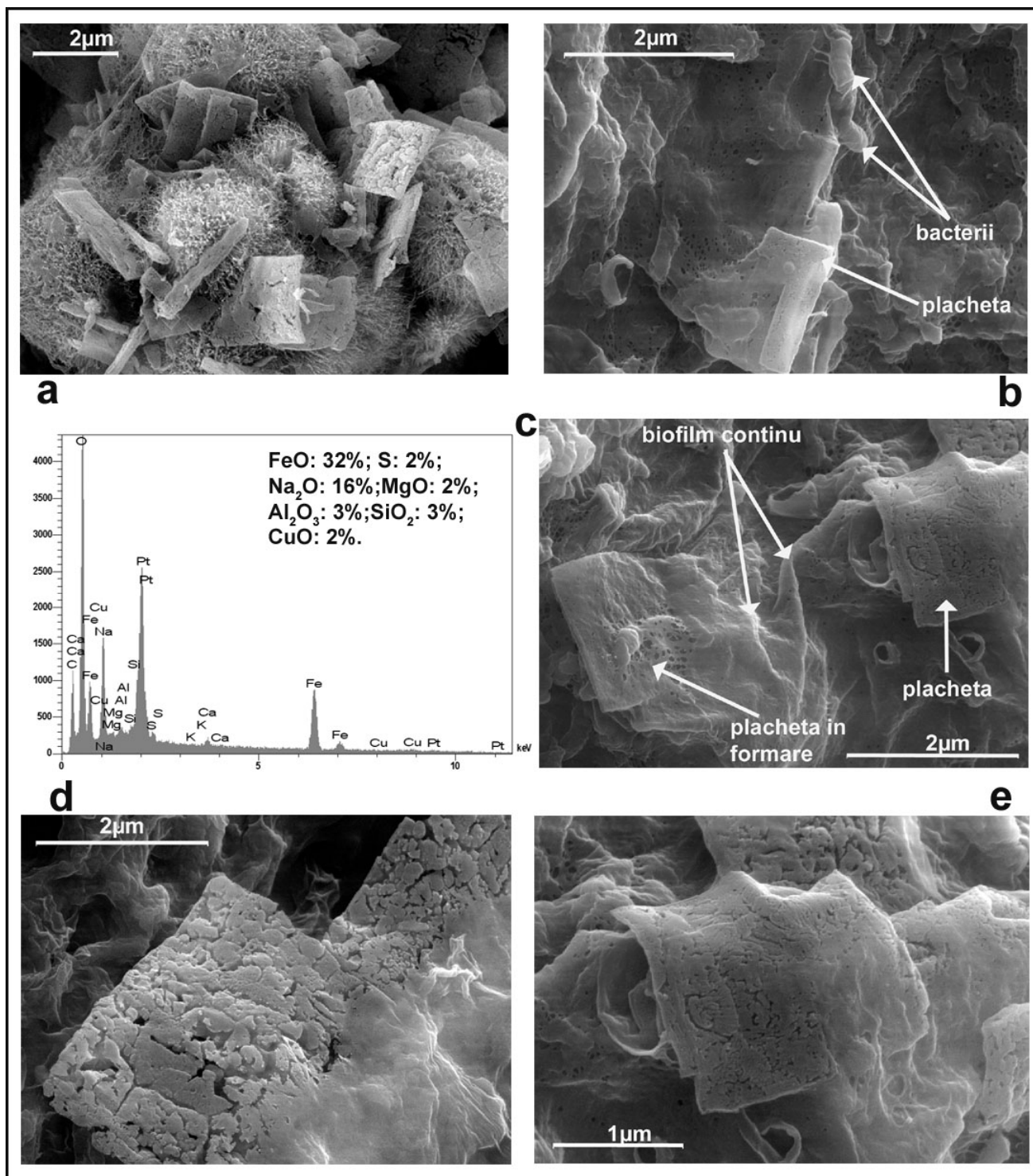
Fig. 10.2.20. a. Cristale de jarosit cu potasiu în depozit și bacterii; b. Depozit de cristale de jarosit cu potasiu legate prin mucopolizaharidele bacteriene.



O altă formațiune minerală de forma unor plachete pătrate este cea întâlnită în cazul scurgerilor mucilaginoase de planșeu. Aceasta se formează, pornind de la filmul compact de mucopolizaharide bacteriene (Fig. 10.2.21. a., b., c., d., e.).

Capitolul 10. Aspecte microscopice și electronmicroscopice, analize E.D.S.

Fig. 10.2.21. a. Ansamblu cu plachete și mucopolizaharide; b., c., d., e. Detaliu cu plachete în formare (diferite mărituri).

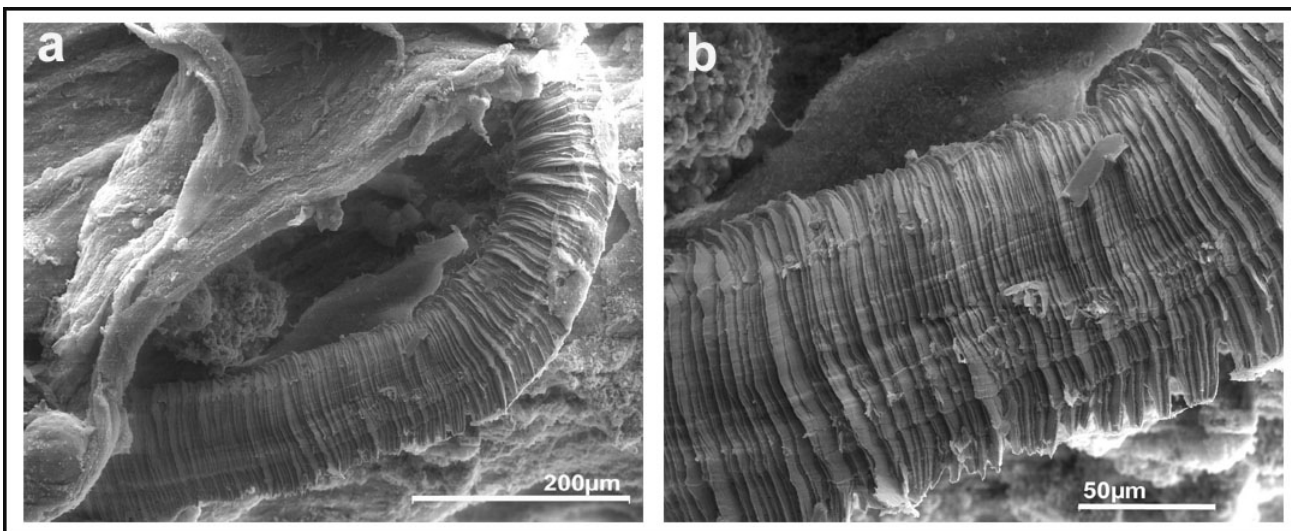


Din spectrul E.D.S. făcut pe aceste plachete, observăm prezența în cantitate mare a Fe, Na, C și O, restul elementelor fiind în cantități mici (Capitolul 11). Această compoziție se apropie de compoziția chimică a unui carbonat.

Partea a-IV-a. Cercetarea electronmicroscopică a eșantioanelor.

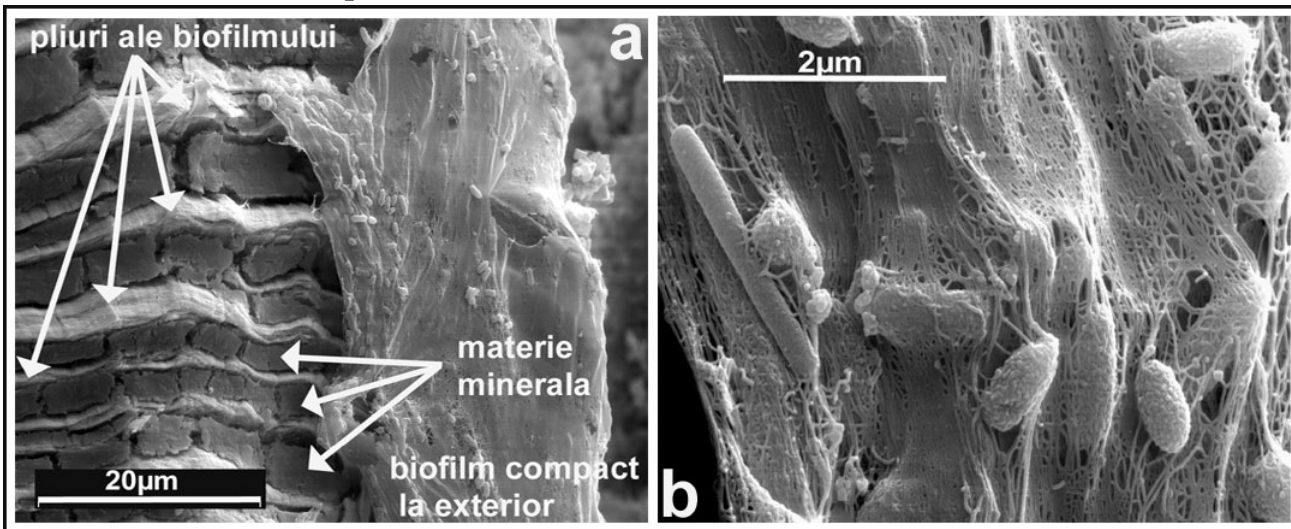
O altă formațiune minerală microscopică extrem de interesantă în formă de vierme polichet a fost întâlnită de noi în prima treime, de la vârf spre bază, a unei stalactite mucilaginoase aflată în plin metabolism. Din cauza formei, am denumit-o “vermicul” (Fig. 10.2.22. a., b.).

Fig 10.2.22. a., b. Ansamblu cu vermiculul (diferite mărimi).



Din punct de vedere structural, această formațiune este constituită din subunități sub forma unor pliuri între care este depusă materie minerală. La exteriorul formațiunii se găsește un biofilm compact (Fig. 10.2.23. a., b.).

Fig. 10.2.23. a. Aspecte cu structura formațiunii vermicurare: pliuri ale biofilmului mumificat cu materie minerală între ele, iar la exteriorul formațiunii biofilmul compact; b. Detaliu cu biofilmul compact de la exterior.



La mărimi superioare putem observa că aceste pliuri reprezintă de fapt un biofilm compact mumificat, care s-a pliat ca o draperie de la fereastră care este lăsată ușor în jos, având pliuri atât pe lungimea cât și pe lățimea ei (Fig. 10.2.24. a., b., Fig. 10.2.25. a., b.).

Capitolul 10. Aspecte microscopice și electronmicroscopice, analize E.D.S.

Fig. 10.2.24. a. Pliuri mari în structura vermiculului ; b. Pliuri mari și micropliuri. Compoziția chimică (spectru E.D.S.).

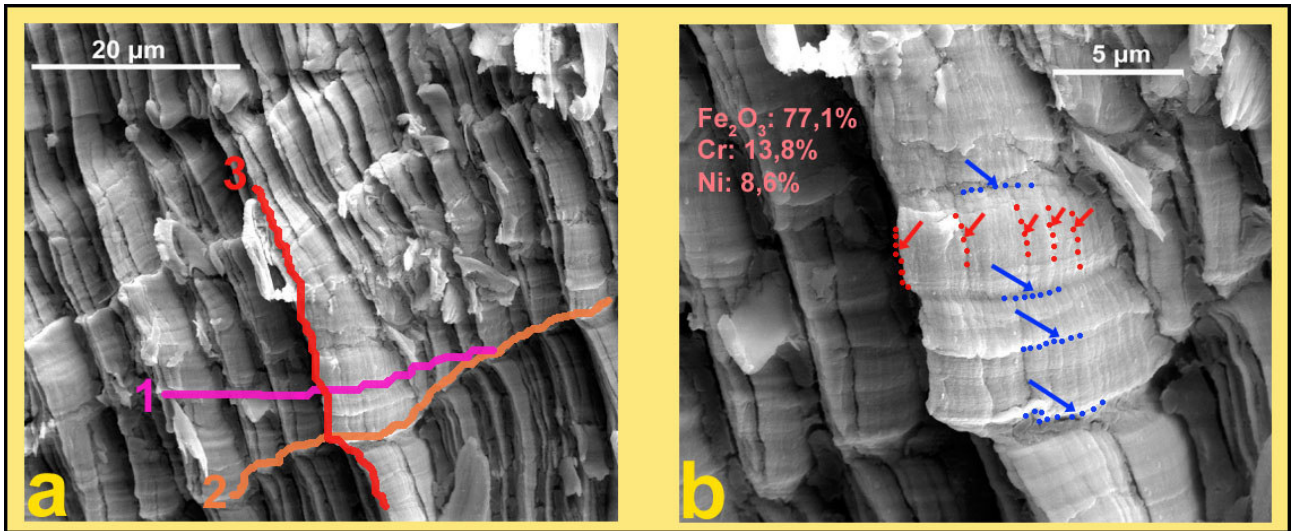
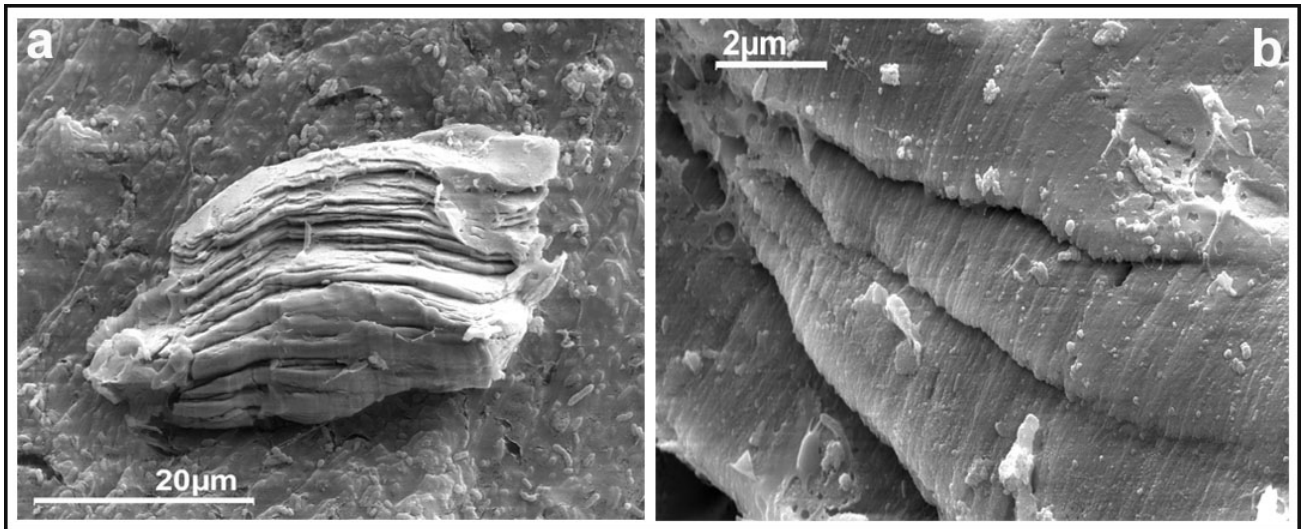


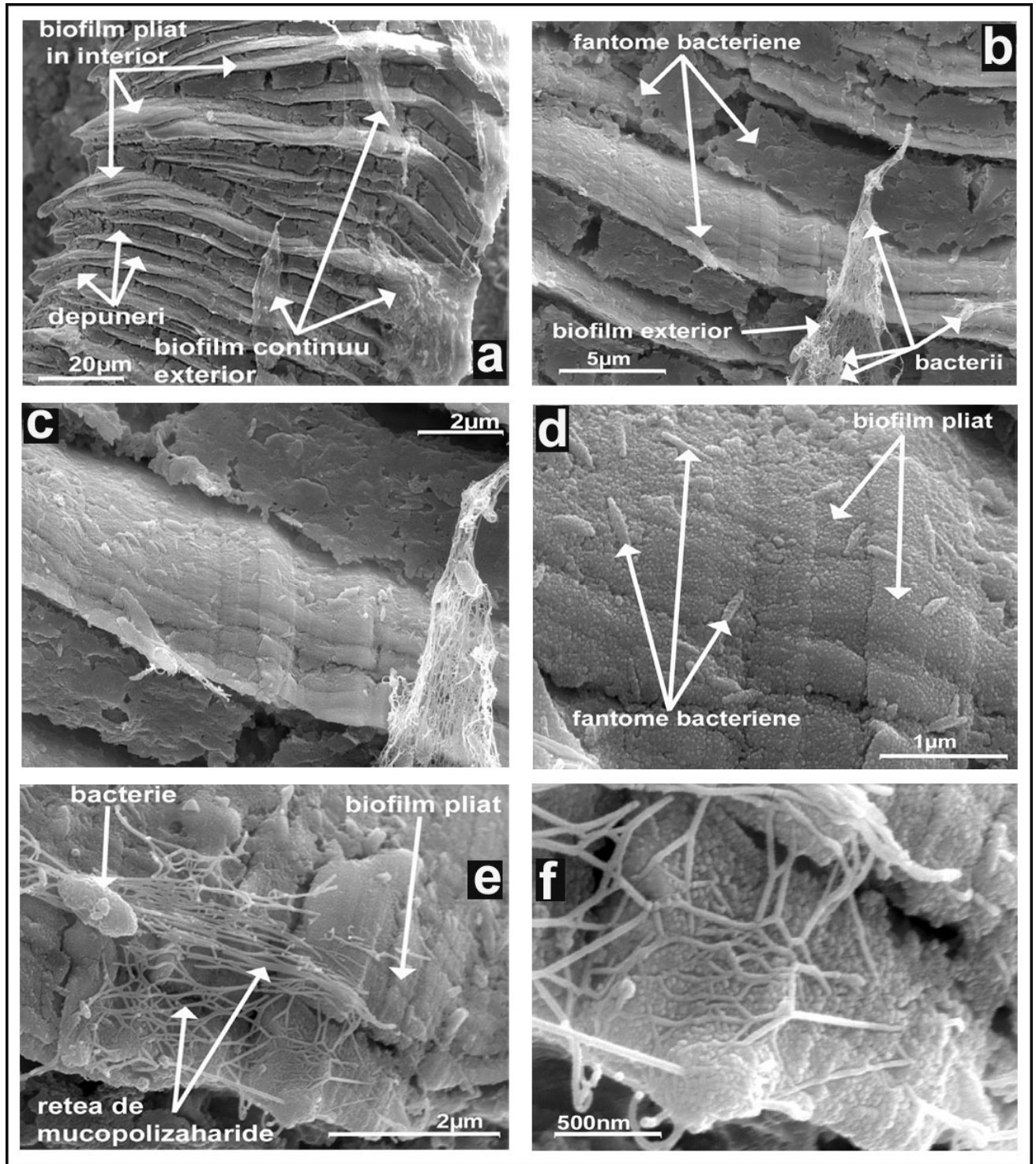
Fig. 10.2.25. a. Vermicul în formare cu pliurile de biofilm mumificat în formă de draperie pliată; b. Detaliu cu pliurile.



În aceste pliuri se observă cu ușurință fibrilele de mucopolizaharide și bacteriile mumificate (Fig. 10.2.26. a., b., c., d.). În unele zone se observă o continuitate între biofilmul din jurul formațiunii și pliurile din interiorul acesteia (Fig. 10.2.26. e., f.), (Fig. 10.2.27. a., b.).

Partea a-IV-a. Cercetarea electronomicroscopică a eșantioanelor.

Fig. 10.2.26. a. Ansamblu de structură – vermicul; b. Detaliu de structură; c. Pliu de biofilm mumificat și depuneri minerale; d. Detaliu cu pliul de biofilm și celulele bacteriene mumificate; e. Legătura între biofilmul exterior și pliul de biofilm care intră în structura formațiunii vermiculare; f. Detaliu cu această legătură.

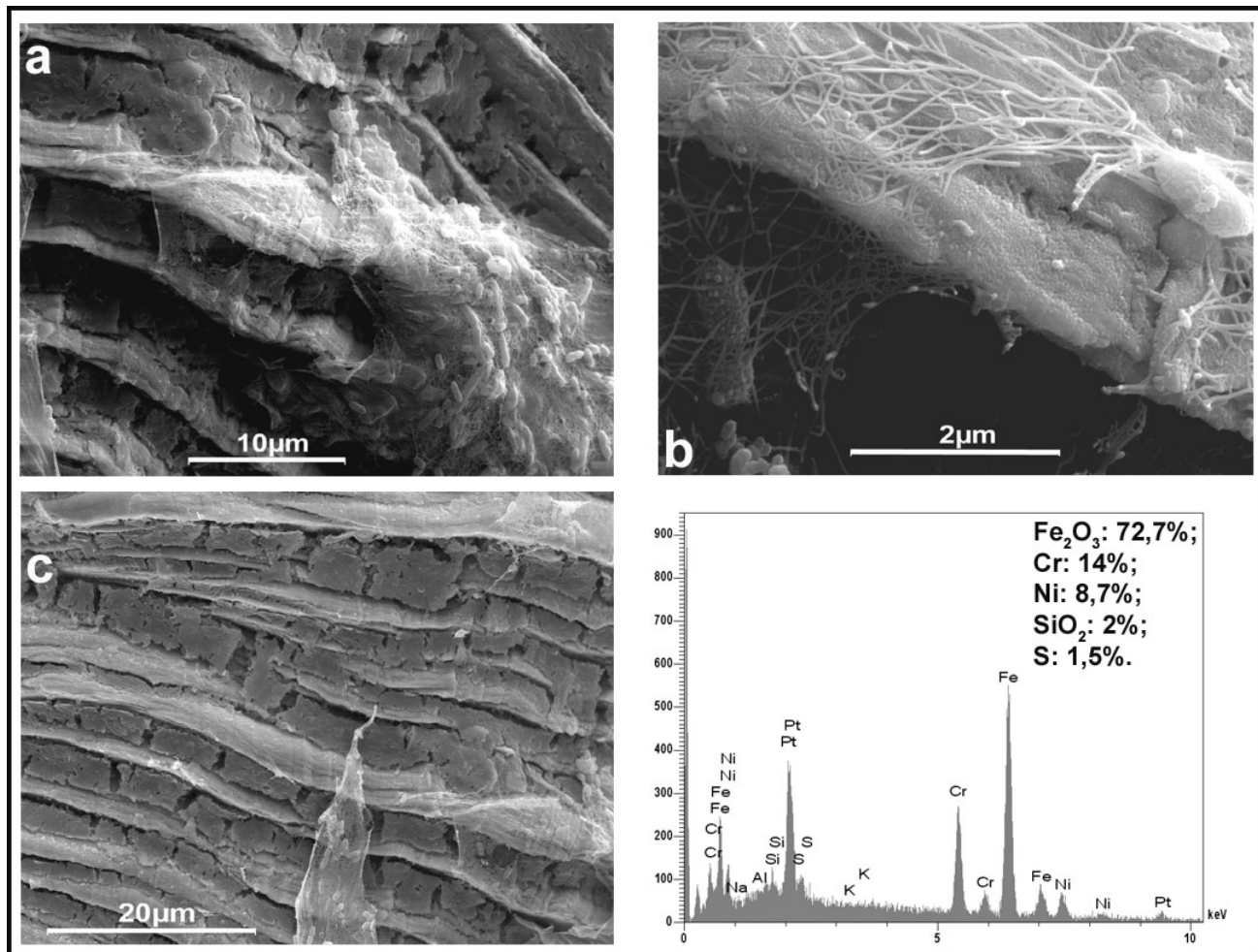


Prin analize de microsondă E.D.S., în M.E.B., s-a determinat o compoziție chimică foarte interesantă în sensul că întreaga formațiune de origine biogenă este formată din Fe în proporție de

Capitolul 10. Aspecte microscopice și electronmicroscopice, analize E.D.S.

aproximativ 70%, Ni 9% și Cr 15% (Fig. 10.2.27. c.). Mineralul constitutiv nu a fost încă identificat.

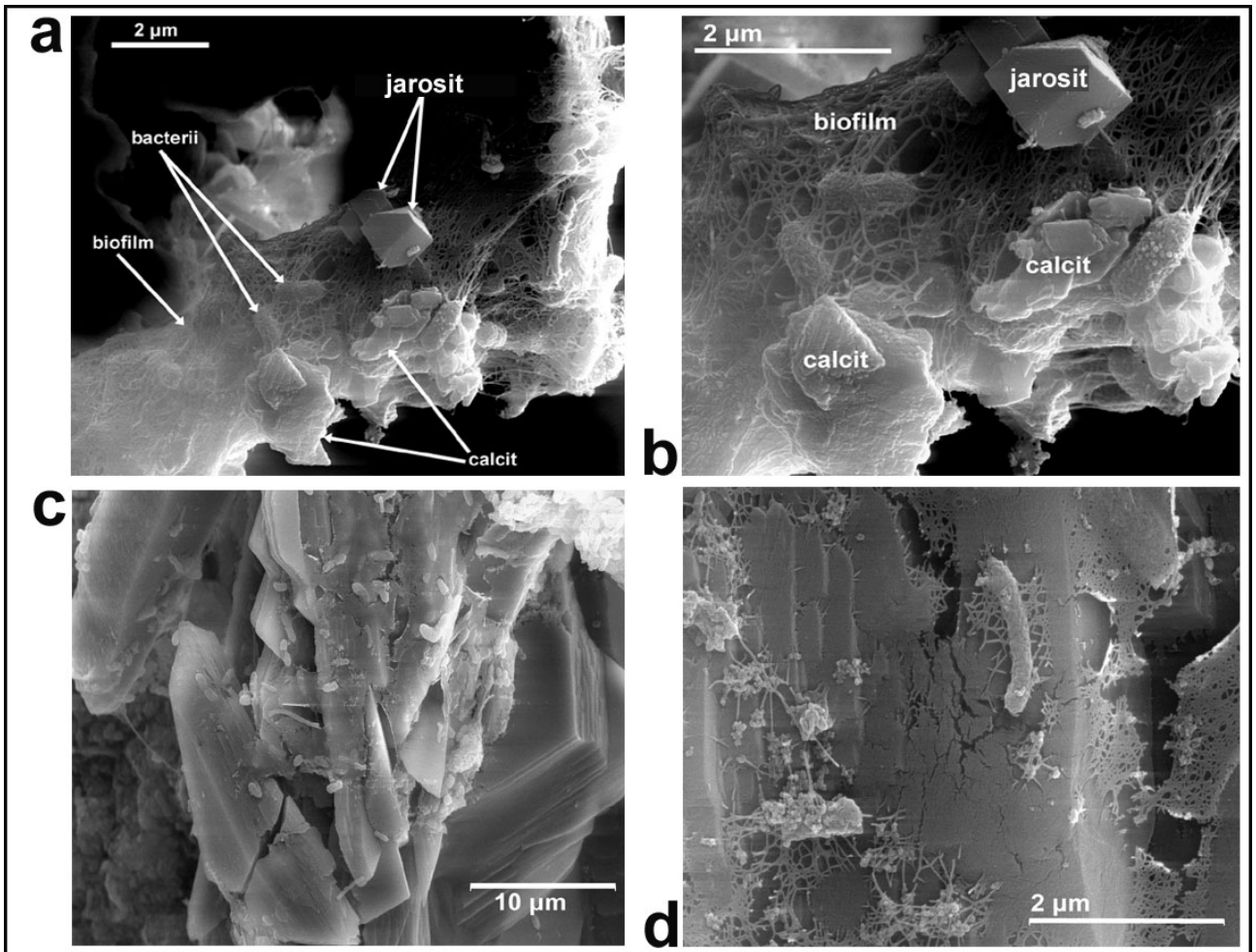
Fig. 10.2.27. a. Legătură între biofilmul exterior și pliu intern; c. Detaliu cu pliu, bacterie și mucopolizaharide extracelulare; c. Ansamblu cu structura formațiunii vermiculare; Spectru E.D.S. pe aceasta.



În voalul bacterian care învelește vermiculul a fost observată prezența jarositului cu potasiu, dar și a unor depuneri de calcit (Fig. 10.2.28. a., b.). Calcitul a fost identificat, sub formă unor mici cristale diseminate în masa de mucopolizaharide, și în apropierea vermiculului, în corpul stalactitei mucilaginoase (Fig. 10.2.28. c., d.).

Partea a-IV-a. Cercetarea electronmicroscopică a eșantioanelor.

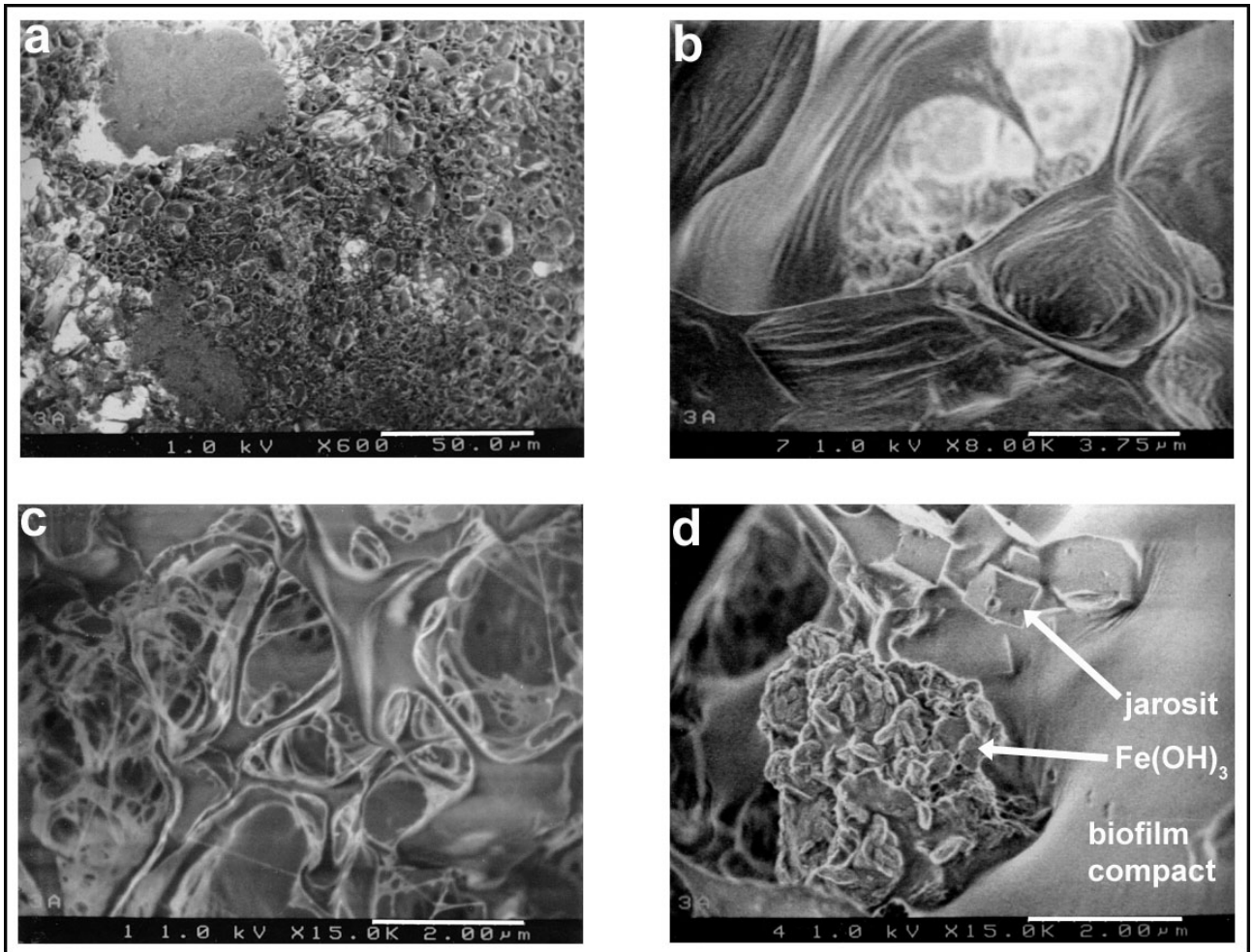
Fig. 10.2.28. a., b. Cristale de jarosit cu potasiu și depuneri de calcit în voalul bacterian care acoperă la exterior vermiculul; c., d. Cristale de calcit cu bacterii și mucopolizaharide din corpul stalactitei mucilaginose în apropierea vermiculului.



Formațiunile mucilaginose au fost examinate și în crio-M.E.B. Avantajul constă în faptul că proba nu este deshidratată, iar mucopolizaharidele biofilmului nu sunt franjurate, biofilmele având aspect compact (*Fig. 10.2.29.*).

Capitolul 10. Aspecte microscopice și electronmicroscopice, analize E.D.S.

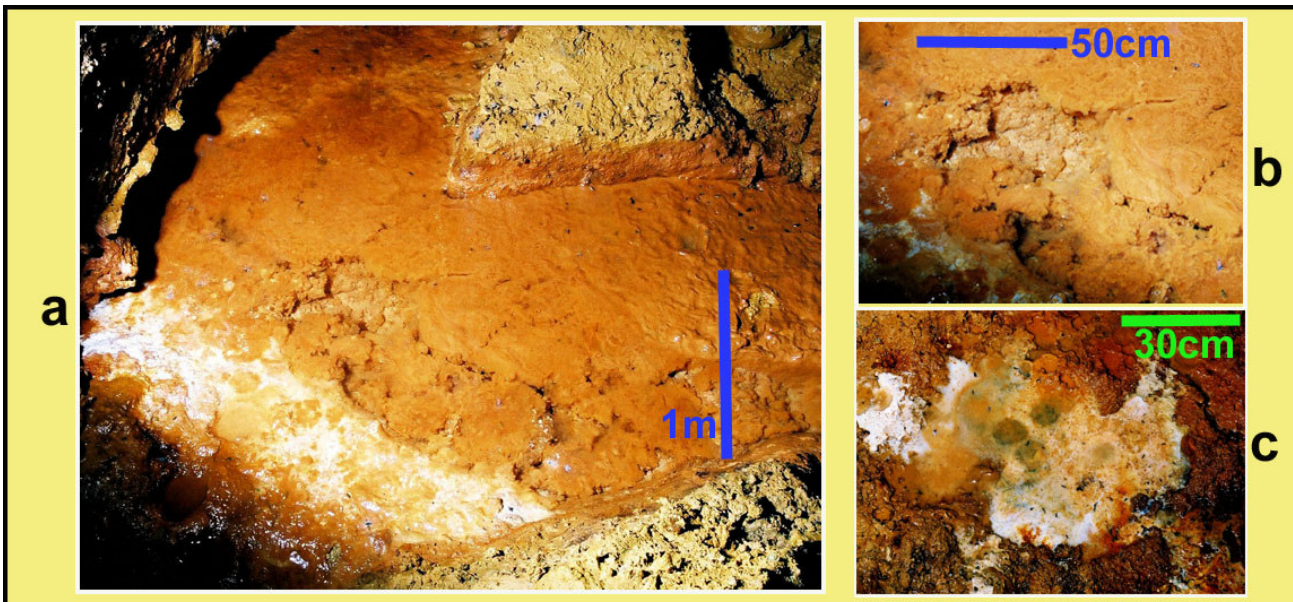
Fig. 10.2.29. a. Vedere generală cu biofilmul; b., c. Aspecte cu mucopolizaharide veziculare; d. Biofilmul compact cu depuneri de hidroxid feric și jarosit.



10.3. Arhitectura electronmicroscopică a bălții cu depuneri (depunere roșie și depunere albă)

Balta cu depuneri se găsește în unul din cele mai profunde sectoare ale cavității Kiesberg și reprezintă un bazin în care sunt drenate o mare parte din apele din această cavitate. În balta cu depuneri putem distinge două tipuri de depuneri: depuneri roșii, feruginoase; și depuneri albe, aluminate (capitolul 6) (Fig. 6.2.3.1. a., b.; Fig. 10.3.1. a., b., c.).

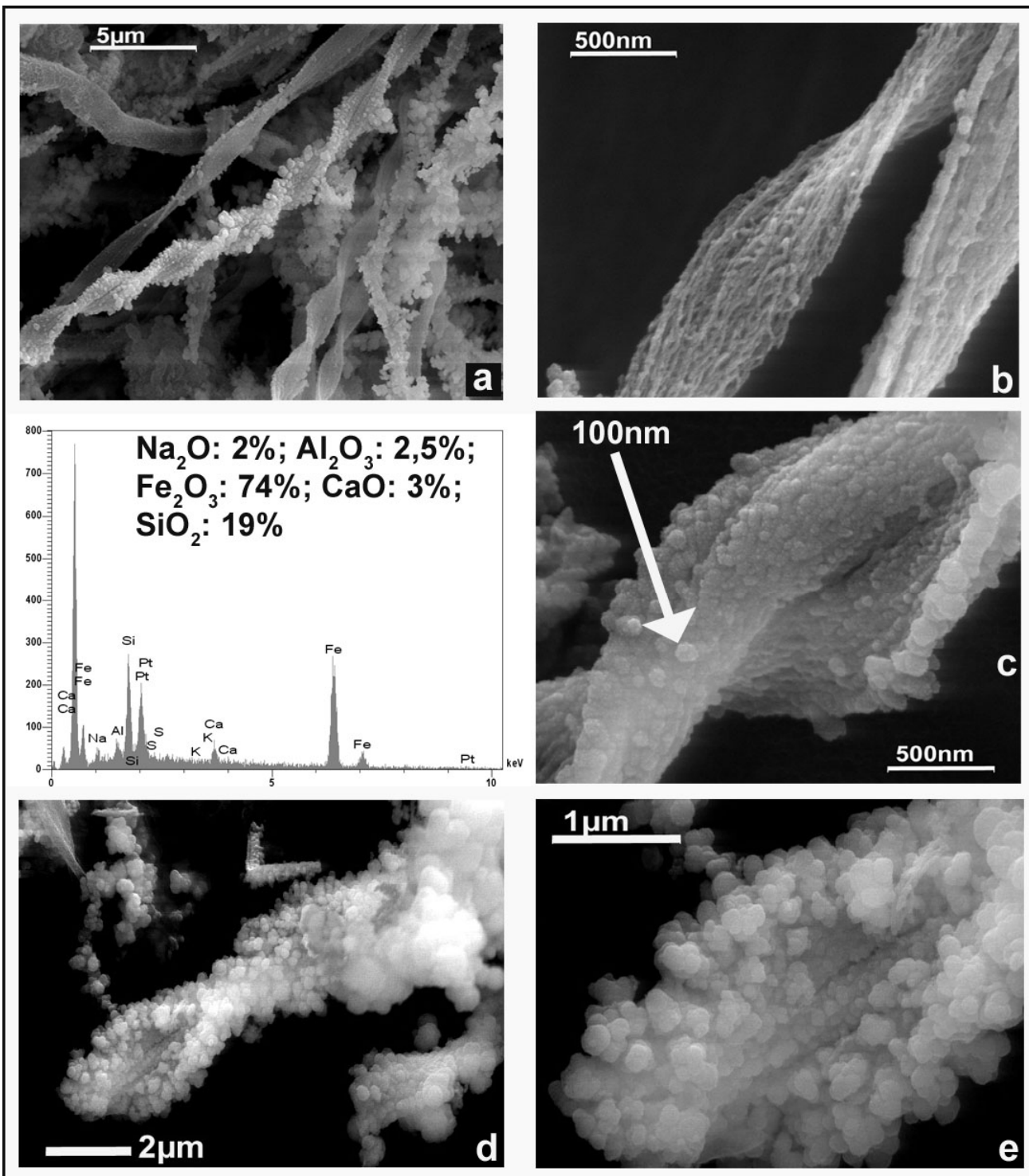
Fig. 10.3.1. a Vedere de ansamblu cu depunere roșie și albă; b. Depunere roșie; c Depunere albă.



În M.E.B., depunerea roșie apare formată dintr-un ansamblu de filamente spiralete ce prezintă pe suprafața lor mici formațiuni globulare cu diametrul de aproximativ 100nm bogate în fier (Fig. 10.3.2. a., b., c., d., e.).

Capitolul 10. Aspecte microscopice și electronmicroscopice, analize E.D.S.

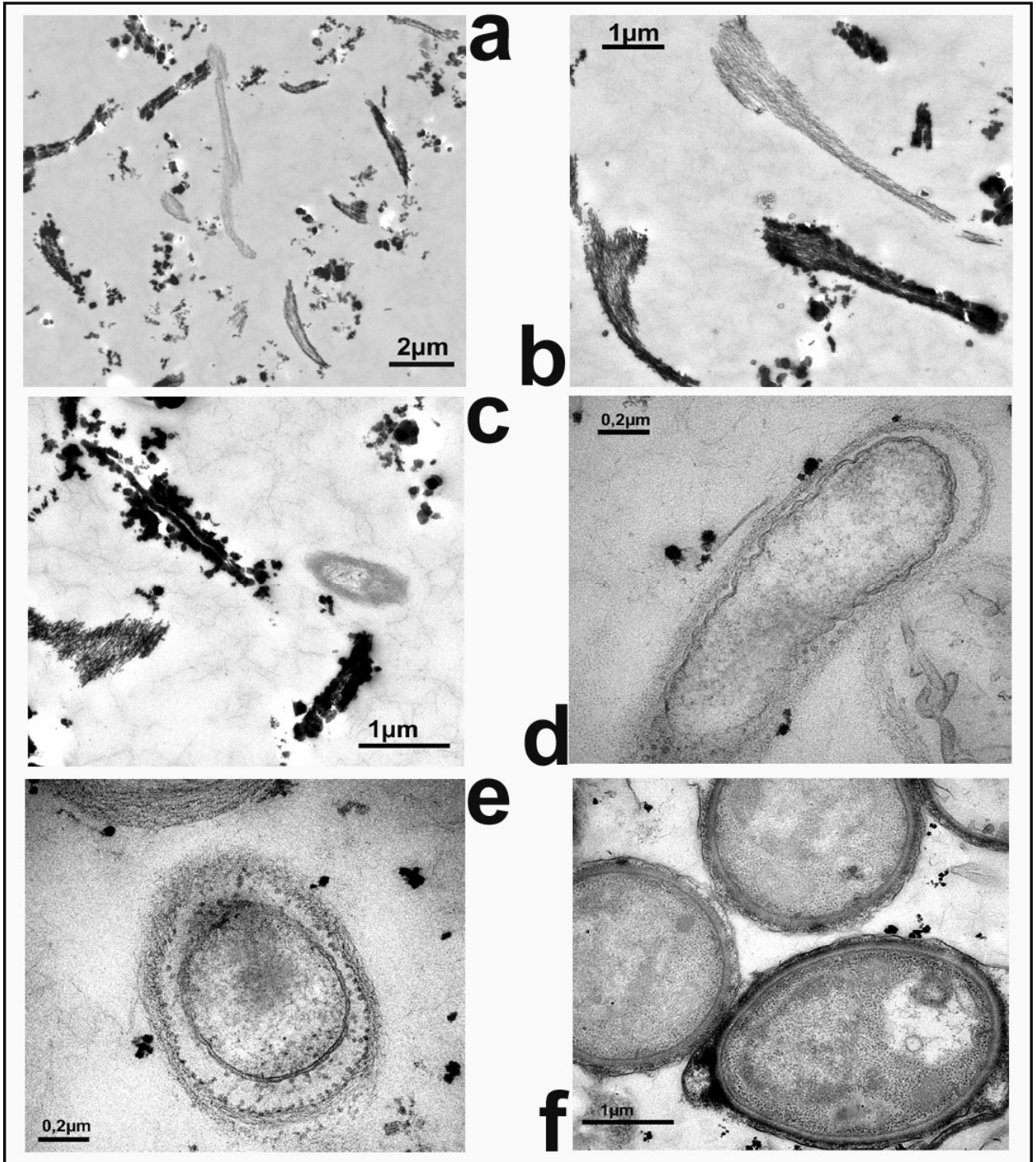
Fig. 10.3.2. a. Filamente spiralate, imagine de ansamblu; b., c., d., e. Spirale – detaliu. Spectru E.D.S.



În M.E.T. a fost observată o mineralizare fină pe aceste filamente spiralate (Fig. 10.3.3. a., b., c.), cât și o densitate mare de microorganisme atât bacterii cât și hife de Ciuperci (Fig. 10.3.3. d., e., f.).

Partea a-IV-a. Cercetarea electronomicroscopică a eșantioanelor.

Fig. 10.3.3. a., b., c. Mineralizare fină pe filamentele spiralate; d. Bacterii; e., f. Hife de Fungi.

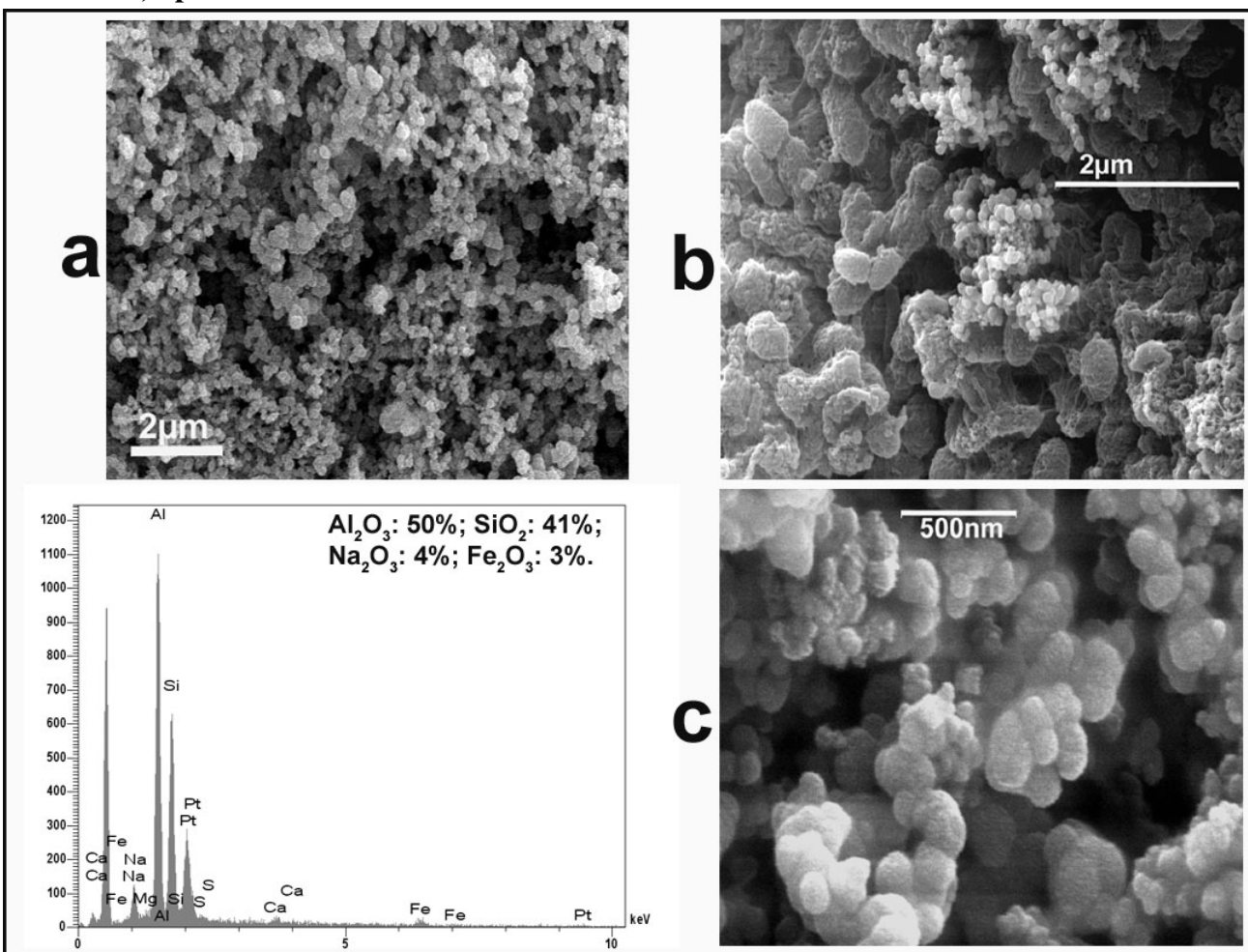


Depunerea albă, mult mai puțin extinsă, ca suprafață, în comparație cu cea roșie, reprezintă o depunere aluminată fiind rezultatul alterării mineralelor aluminosilicate de tipul feldspaților (capitolul 11).

La nivel microscopic se prezintă ca un ansamblu de sferule mici aluminatate (Fig. 10.3.4. a., c.), în unele zone observându-se și un număr mare de microorganisme (Fig. 10.3.4. b.).

Capitolul 10. Aspecte microscopice și electronmicroscopice, analize E.D.S.

Fig. 10.3.4. a., c. Sferule aluminatate; b. Ansamblu de microorganisme și sferule aluminatate; Spectru E.D.S.



10.4. Arhitectura electronmicroscopică a formațiunilor constituite din materiale de alterare

Structuri aluminatate, foarte asemănătoare cu cele observate în cazul depunerii albe din baltă, întâlnim și în alte zone ale cavității Kiesberg. Spre exemplu, în Sala 2. întâlnim două formațiuni de culoare alb-albăstruie: o scurgere parietală și o stalactită cu depunere stalagmitică (capitolul 6.) (Fig. 6.2.1., Fig. 6.2.4.1., Fig. 6.2.4.2.).

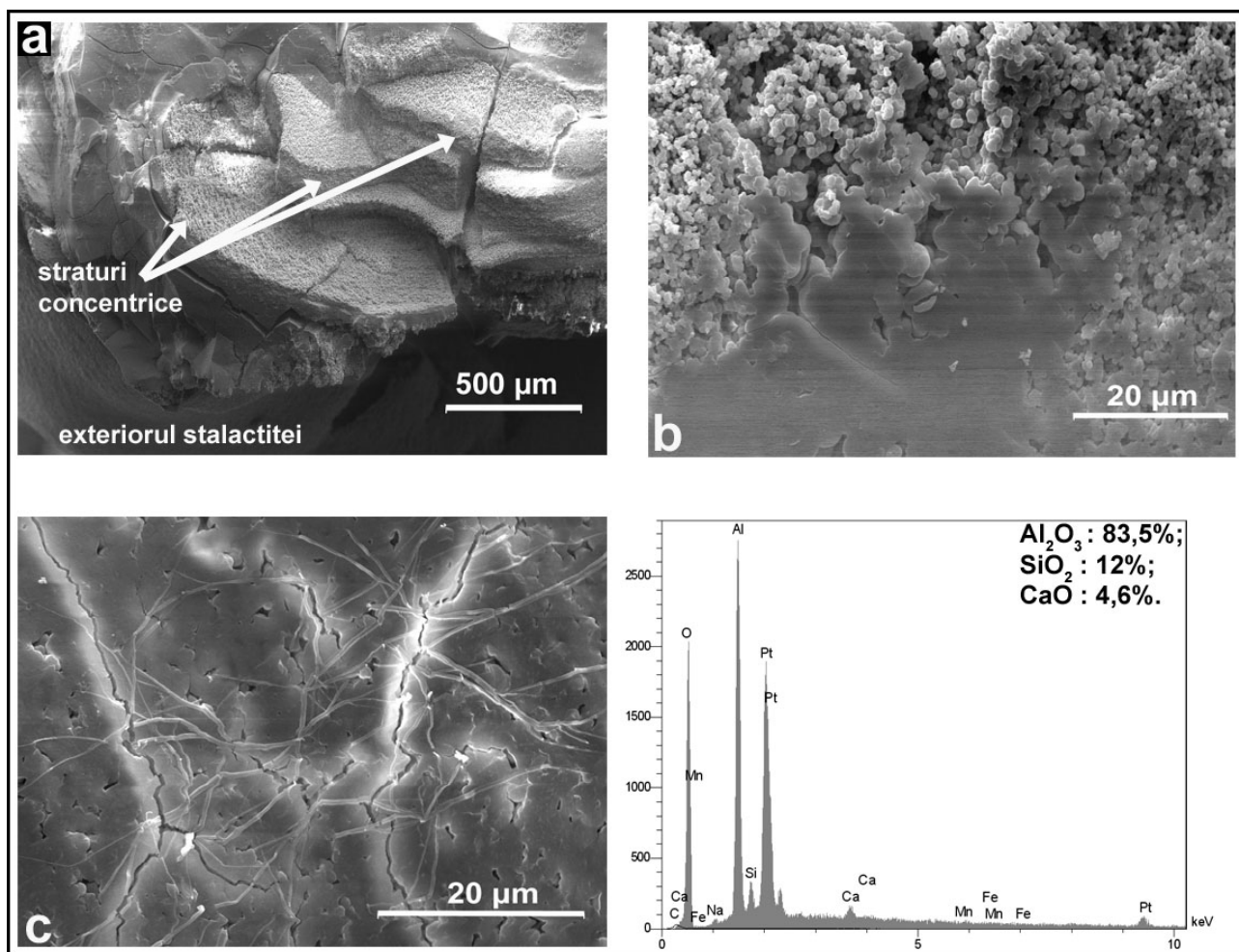
La nivel electronmicroscopice, structura și compoziția chimică, obținută prin analize E.D.S., a acestor formațiuni este foarte asemănătoare.

În cazul stalactitei albe, de la o primă observație pe corpul stalactitei se observă faptul că este constituită, de la exteriorul stalactitei spre interior din straturi depuse concentric (Fig. 10.4.1. a.).

Ca și în cazul depunerii albe, descrise mai sus, observațiile în M.E.B. realizate pe corpul stalactitei albe arată faptul că aceasta este constituită din mase de mici sferule ce s-au depus în straturi concentrice. La îmbinarea straturilor între ele sferulele devin coalescente formând o crustă pe care în unele zone există formațiuni filamentoase ramificate asemănătoare hifelor de fungi (Fig. 10.4.1. a., b., c.). Din punct de vedere chimic, sferulele reprezintă aluminosilicați (până la mai mult de 80 % Al₂O₃) cu Ca; caracterul lor amorf fiind arătat prin difractogramă.

Partea a-IV-a. Cercetarea electronmicroscopică a eșantioanelor.

Fig. 10.4.1. a. Vedere de ansamblu cu structura internă în straturi concentrice a stalactitei albe; b. Sferulele care alcătuiesc corpul stalactitei, trecerea acestora în mase compacte (cruste) la îmbinarea straturilor concentrice; c. Filamente ramificate, asemănătoare fungilor pe aceste cruste; Spectru E.D.S.



Din punct de vedere chimic, sferulele reprezintă aluminosilicați cu Ca.

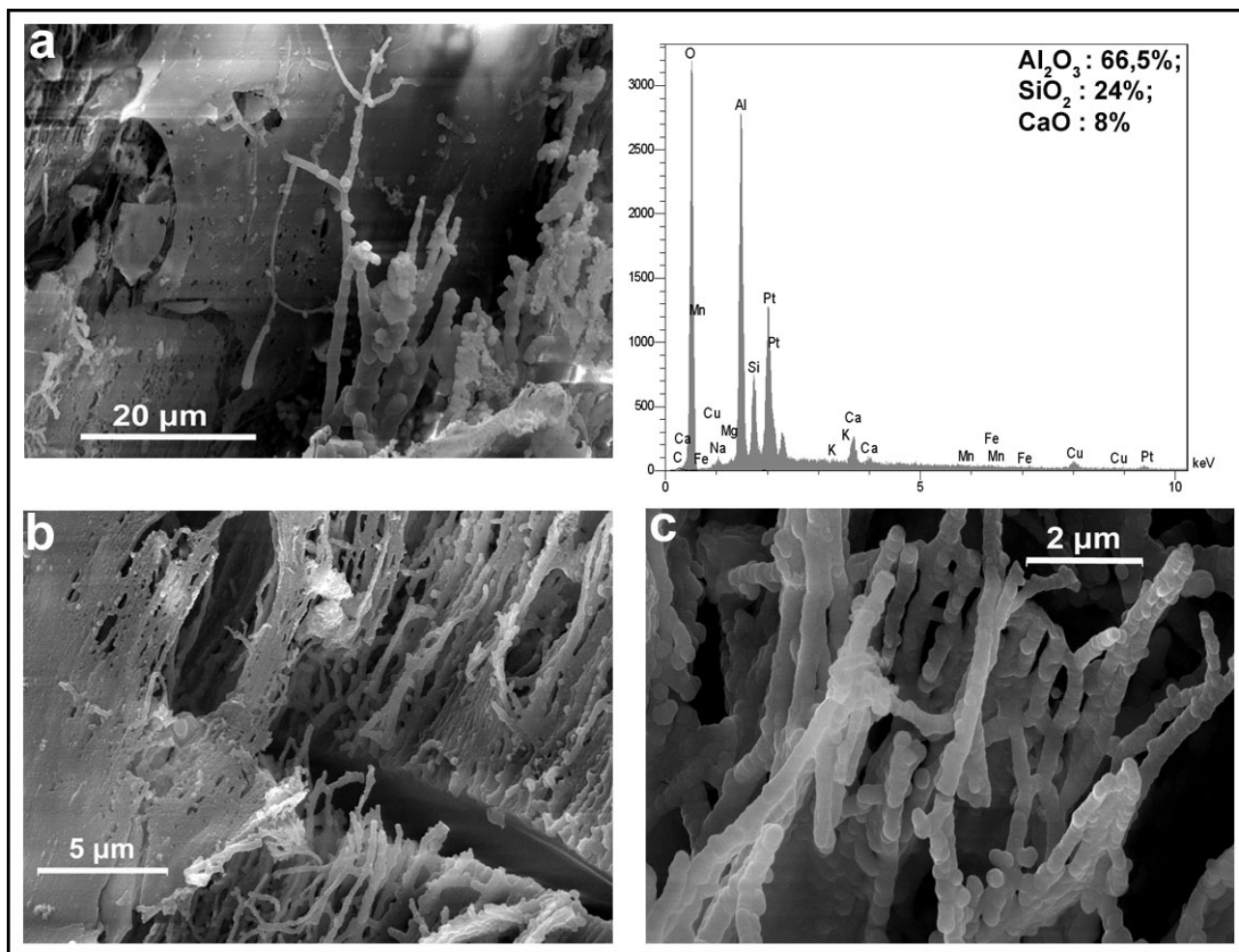
La baza stalactitei, dar și în cazul scurgerii parietale albe structura și compoziția chimică este puțin mai complicată, decât în cazul corpului stalactitei, în sensul că apar două tipuri de structuri:

a. structuri filamentoase, filamentele sunt ramificate, asemănătoare hifelor de fungi, constituite din sferule care se unesc între ele (*Fig. 10.4.2. a., c.*). Această structură filamentoasă alternează cu structuri plachetare, în foetaj, formate prin unirea filamentelor (*Fig. 10.4.2. b.*).

Din punct de vedere chimic sunt asemănătoare cu cele precedente.

Capitolul 10. Aspecte microscopice și electronmicroscopice, analize E.D.S.

Fig. 10.4.2. a., c. Filamente ramificate formate din sferule coalescente; b. Imagine cu filamentele ramificate care alternează cu structuri plachetare, în foetaj, formate prin unirea filamentelor. Spectru E.D.S.

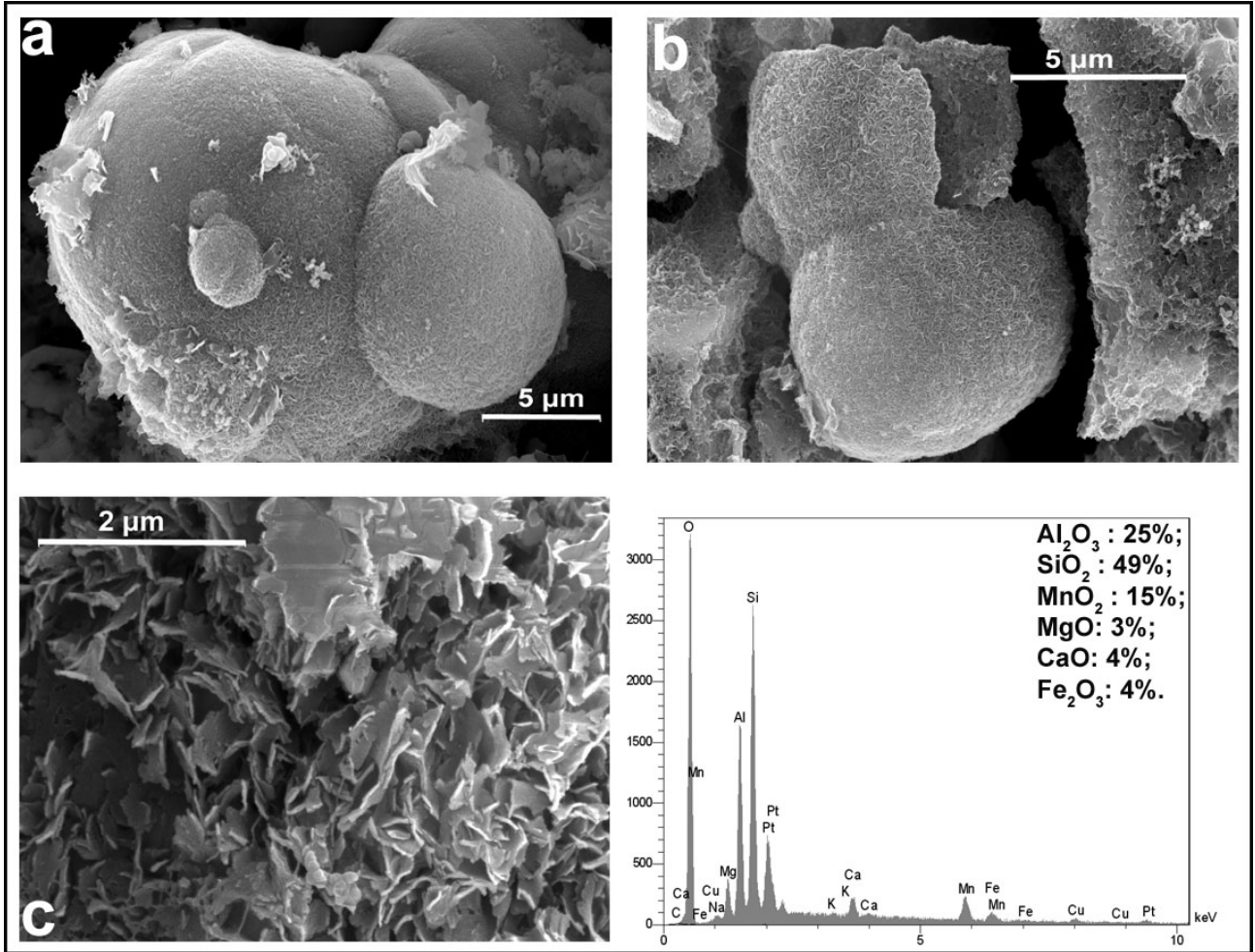


b. structuri sferoide mari, goale pe dinăuntru (Fig. 10.4.3. a., b.), constituite în totalitate din plachete subțiri de mici dimensiuni (Fig. 10.4.3. c.).

Spre deosebire de structurile filamentose și sferulele observate mai sus, compoziția chimică a acestor structuri plachetare (în foetaj) mici este mai complexă (Fig. 10.4.3.). Habitusul și compoziția chimică aduce aminte de minerale argiloase.

Partea a-IV-a. Cercetarea electronmicroscopică a eşantioanelor.

Fig. 10.4.3. a., b. Structuri sferoide mari goale pe dinăuntru; c. Suprafața structurii sferoide constituită din plachete subțiri, de dimensiuni mici. Spectru E.D.S.



Partea a-V-a. Mecanisme metabolice care stau la baza apariției formațiunilor studiate

Capitolul 11. Procese și mecanisme metabolice

În acest capitol prezentarea pornește de la sursa de energie pentru fiecare din comunitățile de microorganisme studiate, continuând apoi cu metabolizarea acestor surse de energie, rezultatul metabolismului și formarea diverselor tipuri de mineralizații. La sfârșitul acestui capitol, într-o schemă generală, sunt cuprinse procesele chimice și biochimice care se desfășoară în siturile luate în studiu (*Fig. 11.1.*).

11.1. Mecanismele metabolice care stau la baza formării stalactitelor policrome

Stalactitele policrome împreună cu baza lor comună reprezintă formațiuni ce se găsesc pe boltă în anumite sectoare ale cavității Kiesberg ocupând suprafețe de câțiva metri pătrați (capitolul 6.) În aceste sectoare apa de percolație traversează prin fisurație extrem de lent bolta cavității încărcându-se cu o cantitate mare de minerale, transformându-se într-o soluție relativ vâscoasă de culoare roșie rubinie. În analizele chimice efectuate (capitolul 7.) s-a observat faptul că pH-ul acestei soluții este cuprins între 0,5 și 2, iar elementele chimice determinate se găsesc în concentrații mari. Fisurile fiind foarte fine iar viscozitatea soluției relativ ridicată, acest sistem de curgere este relativ stabil, filmul de soluție formându-se chiar și în perioadele de secetă.

În acest film de soluție, din punct de vedere microbiologic, au fost identificate două categorii de microorganisme: *bacterii chemolitotrofe* și *fungi*, iar datorită pH-ului foarte scăzut și a concentrației mari de elemente, nu au fost determinate bacterii heterotrofe, singurele heterotrofe fiind ciupercile (capitolul 8.).

Astfel, la baza formării și creșterii stalactitelor policrome stă această comunitate de microorganisme, formată printr-o asociere strânsă între *Acidithiobacillus ferrooxidans*, microorganism autotrof, producător primar, și speciile de *fungi* ca heterotrofi, între aceste microorganisme existând o relație mutualistă (capitolul 10.). Această comunitate de microorganisme este dezvoltată în toată masa de soluție de percolație acidă care acoperă bolta cavității ca un film continuu în zona stalactitelor policrome, rezultând astfel un biofilm (*Fig.11.1.1.*).

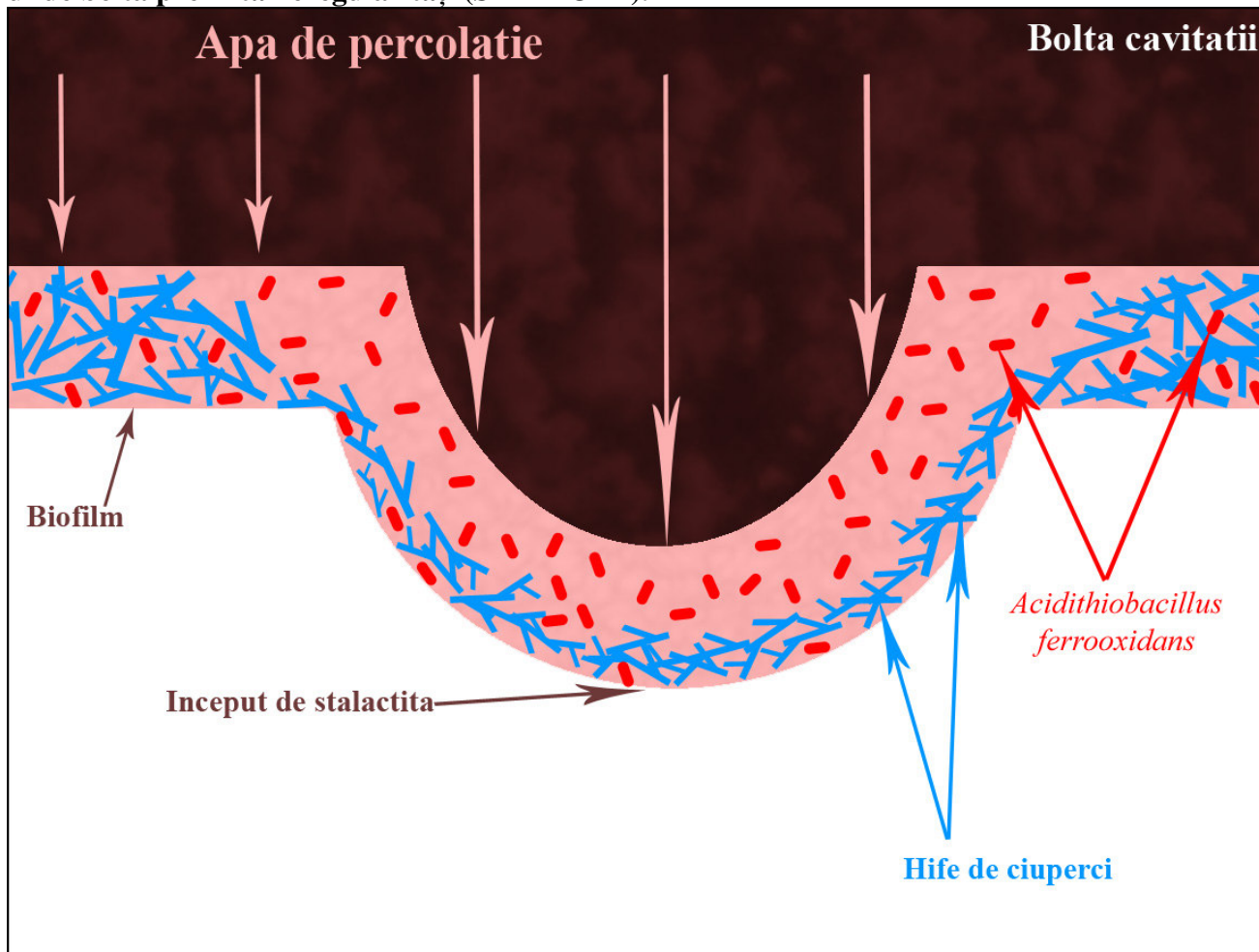
Asupra soluțiilor acide miniere, în ultimele decenii, au fost realizate foarte multe studii microbiologice (Banks *et al.*, 1997; Schrenk *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2001, etc), aceste soluții acide reprezentând în zonele miniere o importantă sursă de poluare.

În general, în apele de drenaj miniere cu aciditate mare *A. ferrooxidans* este o specie comună, izolată și cunoscută încă din 1950 ca un oxidator al sulfurilor metalice (vezi capitolul 1). De asemenea, fungii din genul *Penicillium* sunt eucariote heterotrofe care sunt relativ des întâlnite pe substanțele organice din apele acide (Baker *et al.*, 2004, López-Archilla *et al.* 2004, etc).

În literatura de specialitate, consultată de noi până în prezent, nu a fost întâlnită o astfel de asociere între *A. ferrooxidans* și cele șase specii de *Penicillium*, într-un consorțiu în care există relații strânse de natură trofică și care în final formează formațiuni stalactitice caracteristice.

Capitolul 11. Procese și mecanisme metabolice.

Fig. 11.1.1. Schemă cu biofilmul de pe bolta cavității cu un început de stalactită în zona unde bolta prezintă neregularități (STADIUL I).



Stalactitele se formează în zonele în care biofilmul întâlnește neregularități pe bolta cavității, formând picături (Fig.11.1.1.).

Datorită concentrației foarte mari a soluției de percolație, la exteriorul biofilmului apare o precipitare foarte lentă a hidroxidului feric într-un strat (lamină) compact continuu (capitolul 10), acesta având la rândul lui o structură în microstraturi. În același timp are loc depunerea de hidroxid feric și în interiorul biofilmului și anume la nivelul hifelor de ciuperci. Astfel pe bolta cavității rezultă o crustă continuă – baza comună a stalactitelor policrome – cu stalactite policrome în zonele cu neregularități.

După ce biofilmul a fost complet mineralizat, la exteriorul lui se formează un nou biofilm și procesul astfel se reia (Fig.11.1.2.; Fig.11.1.3; Fig.11.1.5.).

Partea a-V-a. Mecanisme metabolice care stau la baza apariției formațiunilor studiate.

Fig. 11.1.2. Biofilm total mineralizat pe care apare un alt biofilm viu (STADIUL II).

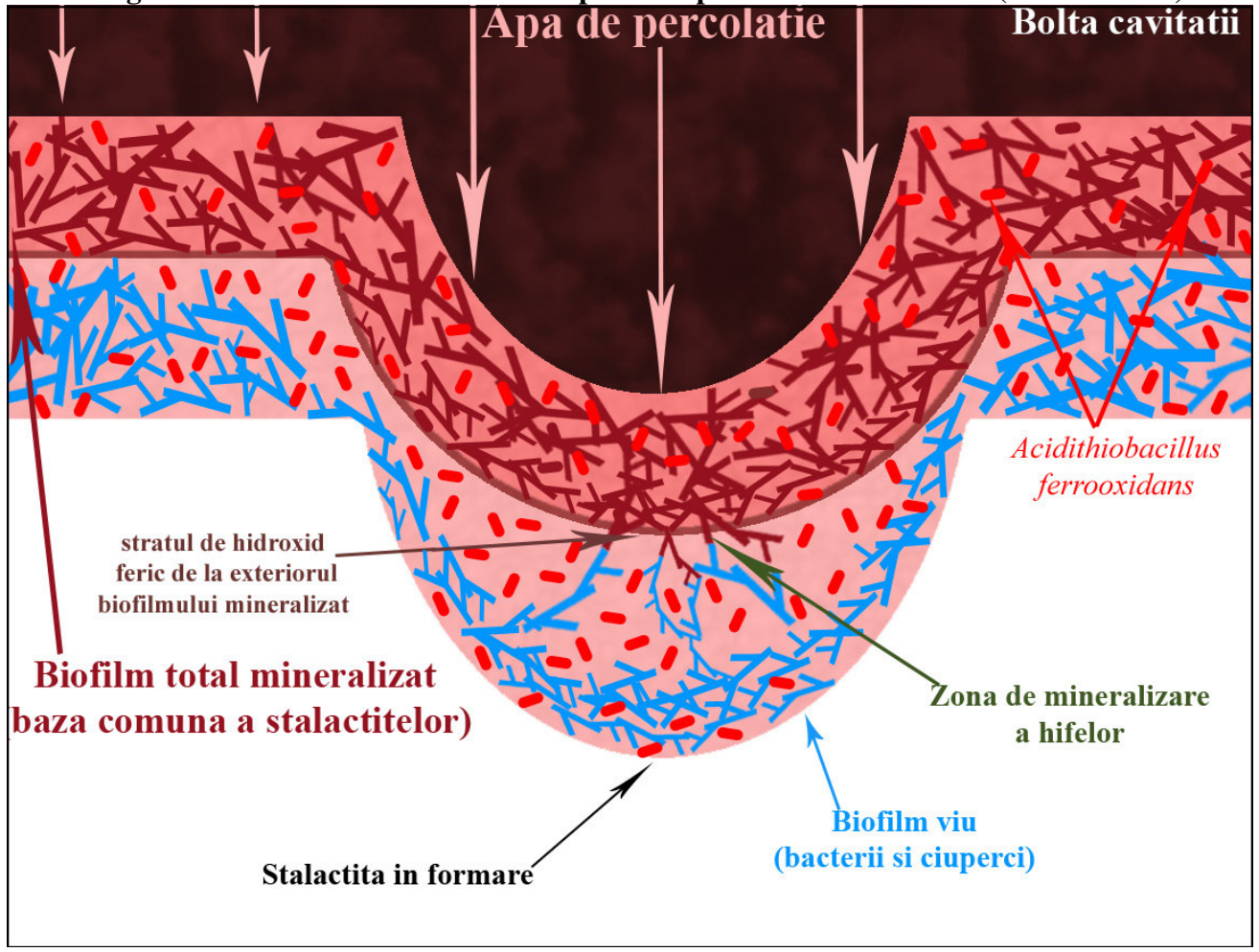
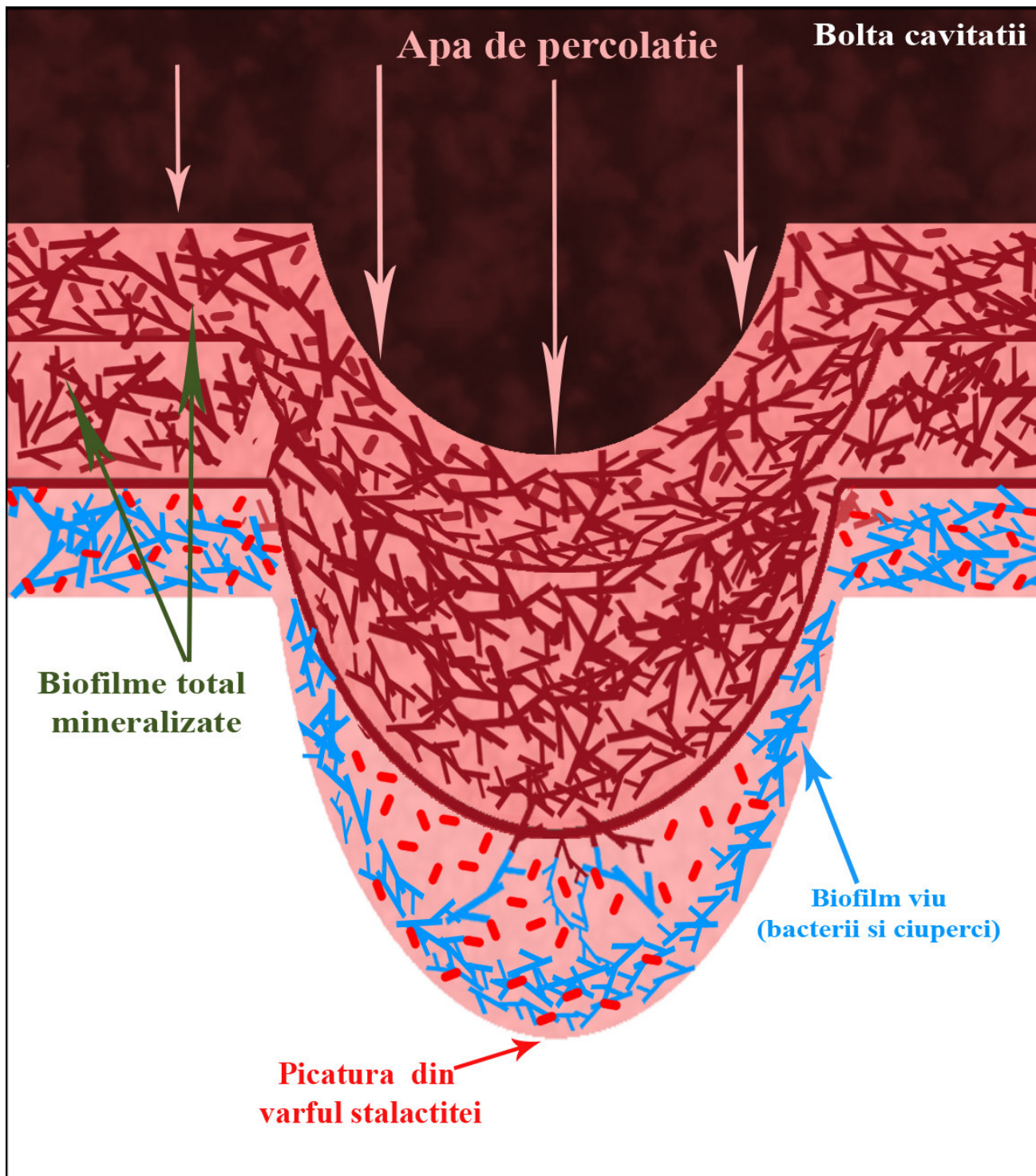


Fig. 11.1.3. Stalactită policromă în creștere (STADIUL III).



Metabolismul acestui sistem viu, format din bacterii autotrofe chemosintetizante de tipul *Acidithiobacillus ferrooxidans* și *Fungi (Penicillium)* ca și organisme heterotrofe, este destul de simplu, având la bază oxidarea sulfurilor metalice din stratul de rocă metamorfică din bolta cavității.

Microfisurile din bolta cavității care alimentează stalactitele policrome sunt permanent umplute cu apă și sunt colonizate cu bacterii chemolitotrofe, unele atașate la mineralele de pirită,

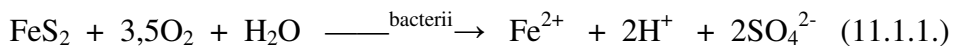
Partea a-V-a. Mecanisme metabolice care stau la baza apariției formațiunilor studiate.

calcopirită, marcasită etc, ce se găsesc în masa de rocă, altele libere în soluția din microfisuri. Astfel soluția de percolație din microfisurile din roca bolții cavității este încărcată cu *Acidithiobacillus ferrooxidans*, la care se adaugă și ciupercile, în biofilomele de pe bolta cavității și în stalactite.

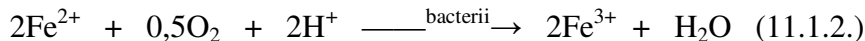
Biosolubilizarea metalelor în microfisurile din masa de rocă, se poate realiza în două moduri: prin - biosolubilizare directă și - biosolubilizare indirectă (capitolul 2) (G. Zarnea, 1994).

Biosolubilizarea directă se realizează enzimatic, iar microorganismele sunt într-un contact intim cu cristalul de pirită (Ehrlich, 1996).

Oxidarea microbiană a piritei de către bacteriile atașate la cristal este cel mai bine rezumată de reacția (Fig.11.1.4., R_I):



Fe^{2+} generat în această reacție este mai departe oxidat de către bacteriile neatașate la pirită care se găsesc în număr mare în toată masa de soluție de percolație care ajunge pe bolta cavității și în care se formează consorțiul de *A. ferrooxidans* și *Penicillium* (Fig.11.1.1.) (Fig.11.1.4., R_{II}):



Rapoartele molare observate de diverși autori în cazul Fe^{2+} oxidat la CO_2 asimilat, ilustrează că mari cantități de fier trebuie oxidate pentru a satisface necesarul de energie pentru creșterea organismelor chemosintetizante de tipul *A. ferrooxidans*. Din rezultatele experimentale ale lui Beck (1960) (capitolul 1.) aproximativ 100 moli Fe^{2+} trebuie să fie oxidați pentru a fixa un mol de CO_2 de către *A. ferrooxidans*.

În capitolul 8 am văzut că populația de *A. ferrooxidans* este dominantă reprezentând 80% din populația totală de microorganisme din stalactitele policrome, iar în M.E.B., în capitolul 10, am observat un număr mare de bacterii chemosintetizante, fie asociate cu hifele de ciuperci în picăturile din vârful stalactitelor, deci imobile, fie libere (mobile) în soluția de percolație în zona hifelor mineralizate (Fig. 10.1.5. a., b.; Fig. 10.1.6.; Fig. 10.1.10; Fig. 11.1.5.). Astfel, pentru întreținerea metabolismului acestui consorțiu, ce are ca rezultat final formarea și creșterea crustelor și stalactitelor policrome pe bolta cavității, sunt mobilizate și consumate cantități foarte mari de Fe^{2+} din masa de rocă de deasupra cavității.

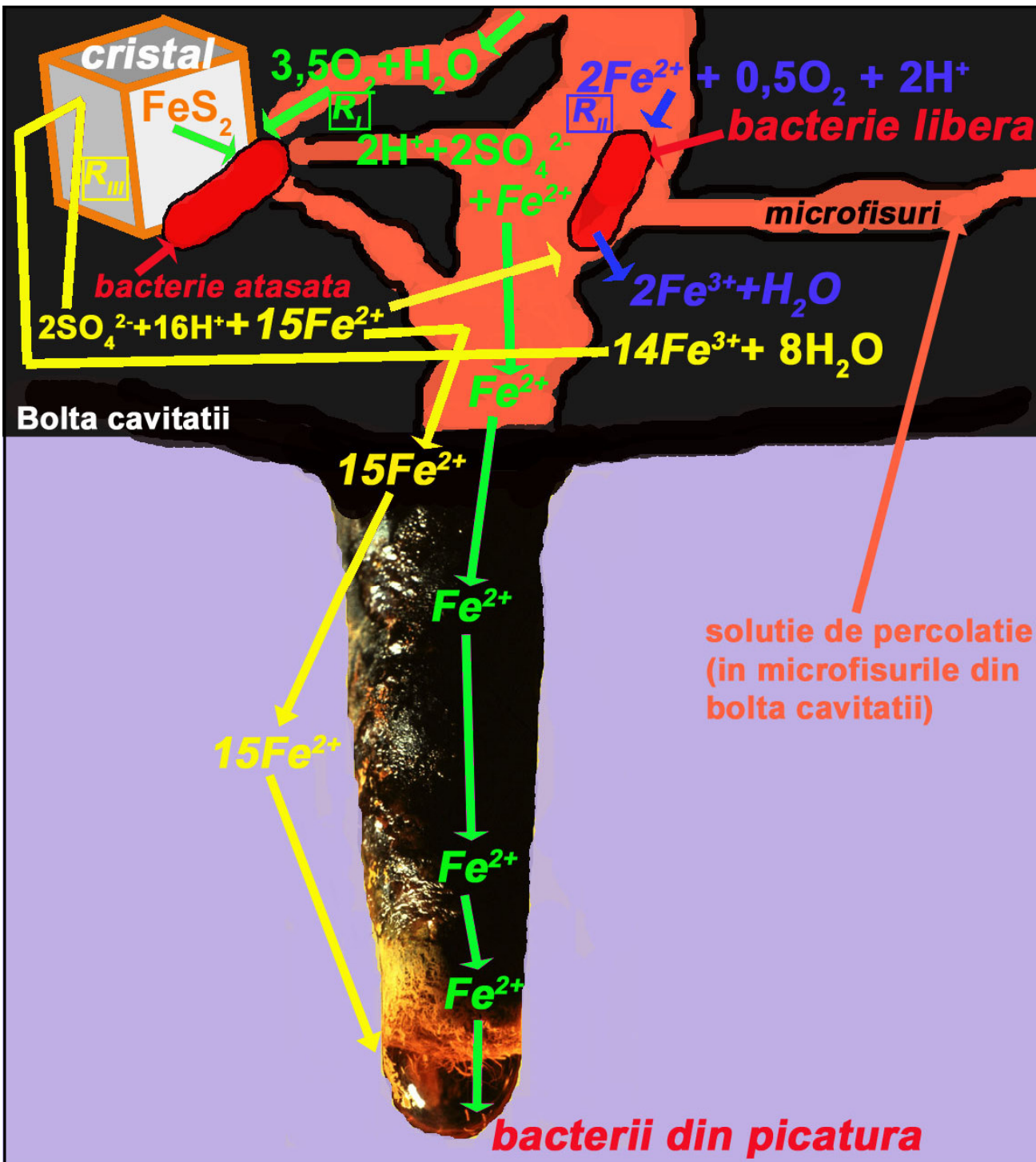
Fe^{3+} rezultat din oxidarea Fe^{2+} de către bacteriile neatașate din microfisurile rocii, cauzează apoi oxidarea chimică a piritei reziduale (Fig.11.1.4., R_{III}), sporind și mai mult cantitatea de pirită oxidată și cantitatea de Fe^{2+} disponibil bacteriilor chemolitotrofe (paragraful 11.2.):



Aceasta reprezintă *biooxidarea indirectă* a piritei.

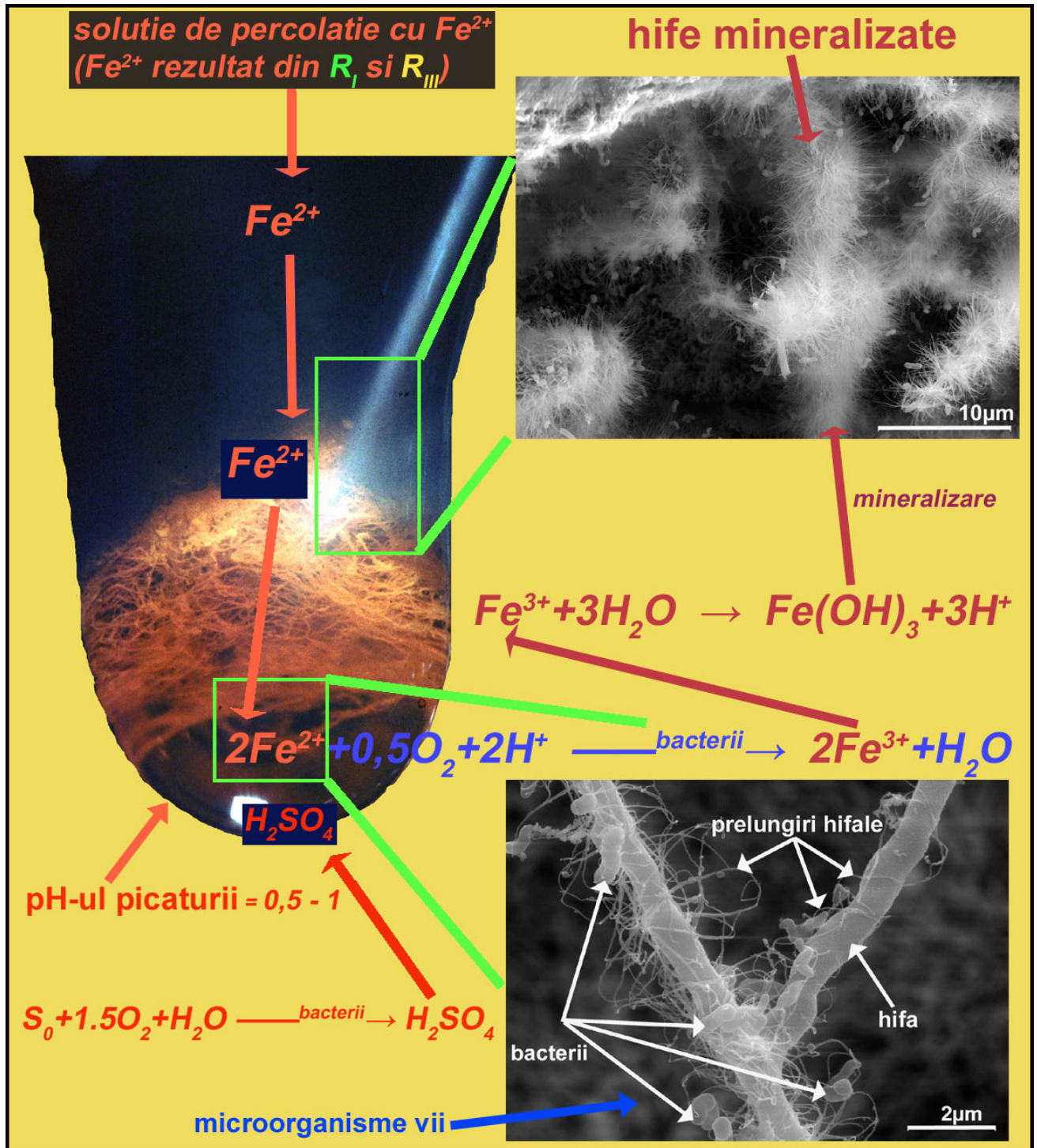
Capitolul 11. Procese și mecanisme metabolice.

Fig. 11.1.4. Schemă cu reacțiile care au loc în microfisurile din masa de rocă (în schemă reprezentarea microfisurilor este exagerată intenționat pentru a fi mai bine vizibile): R_I reacția de oxidare a piritei, ce are loc la nivelul bacteriilor atașate la cristal; R_{II} reacția de oxidare a Fe^{2+} la nivelul bacteriilor libere din soluția din microfisuri, având ca rezultat Fe^{3+} ; R_{III} oxidarea chimică a piritei reziduale de către Fe^{3+} , având ca rezultat Fe^{2+} utilizat în continuare de bacteriile chemolitotrofe.



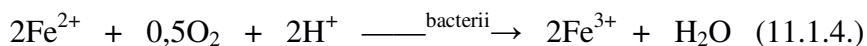
Partea a-V-a. Mecanisme metabolice care stau la baza apariției formațiunilor studiate.

Fig. 11.1.5. Reacțiile care se desfășoară în picătura din vârful stalactitelor: -oxidarea Fe^{2+} de către bacteriile din consorțiul viu din picătură; Mineralizarea hifelor de Fungi prin depunerea de hidroxid feric (la baza picăturii).

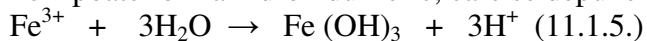


La nivelul picăturii de la capătul stalactitei, unde are loc creșterea stalactitei (alungirea ei) (Fig. 11.1.5.), Fe^{2+} rezultat din pirită prin biosolubilizare directă și indirectă, așa cum am văzut mai sus, este oxidat la Fe^{3+} de către celulele de *A. ferrooxidans* asociate hifelor de Fungi.

Capitolul 11. Procese și mecanisme metabolice.



Fe^{3+} poate forma hidroxidul feric, care se depune mineralizând hifele consorțiului:



Mineralizarea este mai degrabă pasivă, prin acumularea hidroxidului feric, în mediu acid, în macromoleculele hifelor și se realizează atât la exteriorul lor cât și la interior (vezi capitolul 10).

Asocierea intimă (mutualistă) între bacterii și ciuperci se realizează prin prelungirile hifale (capitolul 10). Prin acestea, hifele preiau direct producția organică de metabolism bacterieni, dar și bacteriile beneficiază de unii ioni și precursori organici simpli proveniți de la Fungi.

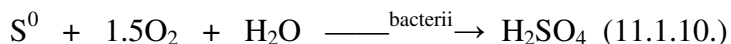
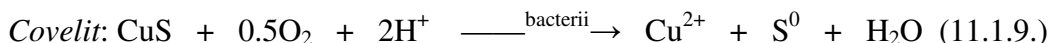
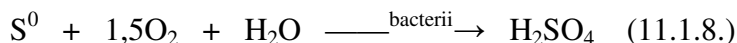
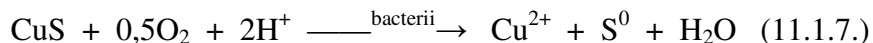
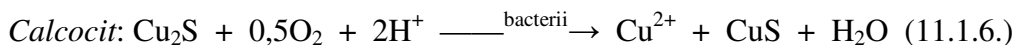
Silverman și Ehrlich, 1964 afirmă faptul că *A. ferrooxidans* atunci când poate folosi NH_4^+ și unii aminoacizi ca surse de azot este foarte versatil în atacul sulfurilor metalice.

Ei au constatat că atunci când *A. ferrooxidans* dispune de aceste surse de azot din NH_4^+ și din aminoacizi, poate oxida arsenopirita ($\text{FeS}_2\text{FeAS}_2$), bornit (Cu_5FeS_4), calcocit (Cu_2S), calcopirita (CuFeS_2), covelit (CuS), enargit ($3\text{Cu}_2\text{S} \cdot \text{As}_2\text{S}_5$), galenă (PbS), milerit (NiS), pirită (FeS_2), marcasit (FeS_2), sfalerit (ZnS) și tetraedrit ($\text{Cu}_8\text{Sb}_2\text{S}_7$).

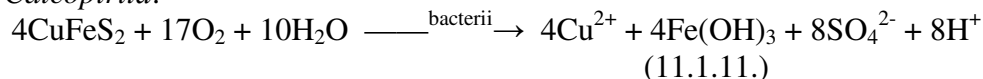
Pe lângă Fe^{2+} din pirită, bacteriile chemosintetizante de tipul *A. ferrooxidans* din cadrul consorțiului din stalactitele policrome folosesc ca sursă de energie și *sulfur* din sulfurile din roca bolții cavității. Metabolismul S^0 , spre exemplu, aduce o cantitate mai mare de energie decât Fe^{2+} (Ehrlich, 1995).

Este probabil că atomii de fier și cei de sulf din pirită sunt oxidați simultan dar numai după ce sulfurile sunt disociate din rețeaua cristalină a mineralelor (Lundgren, Valkova-Valchanova și Reed, 1986).

În analizele chimice efectuate de noi pe soluția de percolație au fost determinate cantități importante de cupru, astfel, pe lângă pirită, în microfisurile din bolta cavității, *A. ferrooxidans* abordează probabil și o gamă largă de sulfuri de cupru (capitolul 2.):

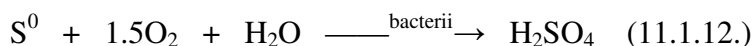


Calcopirita:



Unii cercetători au afirmat că *A. ferrooxidans* a oxidat sulfurul din calcopirita prin atac direct înainte de a oxida Fe^{2+} în soluție la Fe^{3+} .

S^0 produs în aceste reacții poate fi convertit de *A. ferrooxidans* (cunoscut ca fiind capabil să oxideze S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, formiat) la acid sulfuric acidifiind soluția de percolație (Fig. 11.1.5):



Acesta menține un mediu acid favorabil bacteriilor și în plus poate solubiliza o serie de oxizi ai cuprului: *azurit: Cu}_3(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_2*, *crisocol: CuSiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}*, *tenorit: CuO* (vezi capitolul 2).

Pentru măsurarea respirației biofilmului din stalactitele policrome a fost realizat un experiment in situ (în cavitate) cu ajutorul unui manometru de sticlă în formă de U cu volum

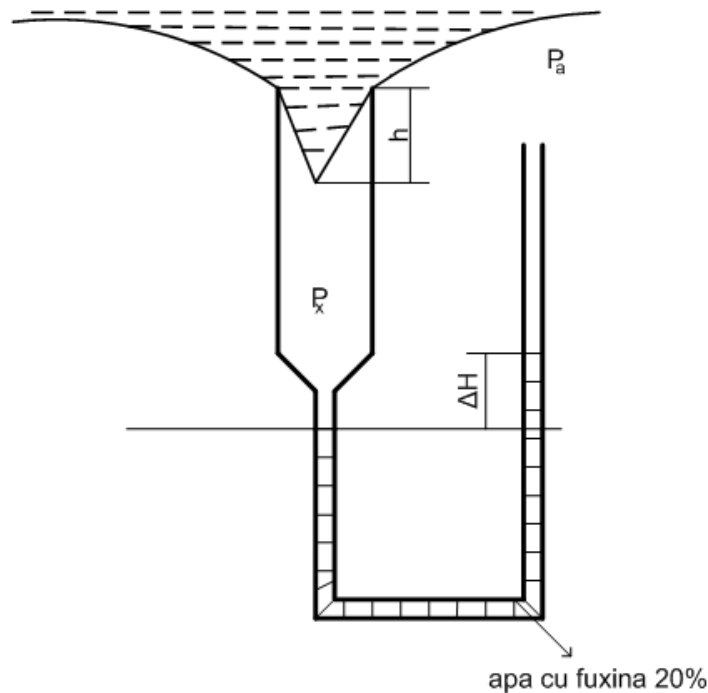
Partea a-V-a. Mecanisme metabolice care stau la baza apariției formațiunilor studiate.

cunoscut. Manometrul a fost fixat pe un suport, iar în zona curburii a fost pusă apă distilată sterilă colorată cu fuxină Ziehl. A fost aleasă o stalactită policromă în plin metabolism, care a fost introdusă în manometru, iar acesta a fost lipit etanș de bolta cavității (la baza stalactitei). După două săptămâni a fost măsurată diferența de nivel a coloanei de apă cu fuxină și a fost calculat volumul de gaz produs (Fig. 11.1.6., Fig. 11.1.7.).

Fig. 11.1.6. a. Manometru instalat pe stalactită (prima zi); b. Nivelul lichidului în manometru după două săptămâni.



Fig. 11.1.7. Schema generală a manometrului pentru măsurarea respirației unei stalactite policrome în plin metabolism.



Capitolul 11. Procese și mecanisme metabolice.

Specificarea mărimilor fizice care intervin:

- V_x volumul de gaz generat la presiunea interioară din eprubetă, în cm^3 ;
 - V_a volumul de gaz la presiune atmosferică;
 - T_x temperatura din interiorul eprubetei, în $^\circ\text{C}$;
 - T_a temperatura din mediul exterior, în $^\circ\text{C}$;
 - P_x presiunea de gaz din interiorul eprubetei, în N/cm^2 ;
 - P_a presiunea atmosferică, în N/cm^2 ;
 - D diametrul tubului piezometric, în cm ;
 - ΔH denivelarea înregistrată la piezometru, în cm ;
 - γ densitatea lichidului din piezometru, în N/cm^3 ;
 - A_l aria laterală a stalactitei, asemuită cu un con, în cm^2 ;
 - h înălțimea stalactitei, în cm ;
 - R raza bazei stalactitei, care se consideră egală cu raza interioară a eprubetei, în cm .
- volumul de gaz generat în timpul „t”,

$$V_x = \frac{1}{2} \frac{\pi \cdot D^2}{4} \Delta H$$

- presiunea din interiorul eprubetei,

$$P_x = P_a + \gamma \cdot \Delta H$$

- legea gazelor,

$$\frac{P \cdot V}{T} = \text{konst.}$$

- atunci, pentru $T_x = T_a$:

$$\frac{P_x \cdot V_x}{T_x} = \frac{P_a \cdot V_a}{T_a}; \quad (P_a + \gamma \cdot \Delta H) \cdot V_x = P_a \cdot V_a; \quad V_a = \frac{(P_a + \gamma \cdot \Delta H) \cdot V_x}{P_a}$$

$$V_a = \frac{1}{2} \frac{\pi \cdot D^2}{4} \cdot \Delta H + \frac{1}{2} \frac{\gamma \cdot \Delta H \cdot \pi \cdot D^2}{P_a \cdot 4}$$

- termenul al doilea din relația precedentă reprezintă practic corecția datorată diferenței de presiune introdusă de coloana piezometrică.

În cazul nostru măsurătorile pe manometru sunt:

$D=0,3\text{cm}$;

$\Delta H=0,9\text{cm}$;

$\gamma=9810 \cdot 10^{-6} \text{N/cm}^3$;

$P_a=10 \text{N/cm}^2$;

$R=0,6\text{cm}$;

$h=1,6\text{cm}$.

$$V_a = \frac{1}{2} \frac{\pi \cdot D^2}{4} \Delta H + \frac{1}{2} \frac{\gamma \cdot \Delta H \cdot \pi \cdot D^2}{P_a \cdot 4} = \frac{1}{2} \frac{\pi \cdot 0,3^2}{4} \cdot 0,9 + \frac{1}{2} \frac{9810 \cdot 10^{-6} \cdot 0,9 \cdot \pi \cdot 0,3^2}{10 \cdot 4} =$$

$$= (0,032 + 3,12 \cdot 10^{-5}) \text{cm}^3$$

Termenul de corecție reprezintă 0,98‰ din volumul de gaz determinat la presiunea din interiorul eprubetei. Se poate estima:

$$V_a \approx 0,032 \text{cm}^3$$

Partea a-V-a. Mecanisme metabolice care stau la baza apariției formațiunilor studiate.

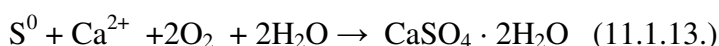
Suprafața ariei laterale a conului:

$$Al = \pi \cdot R \cdot \sqrt{R^2 + h^2} = \pi \cdot 0.6 \cdot \sqrt{0.6^2 + 1.6^2} = 3.22 \text{ cm}^2$$

Astfel din calcule se observă producerea unui volum de 0,032 cm³ de gaz în urma metabolismului microorganismelor din picătura din vârful stalactitei.

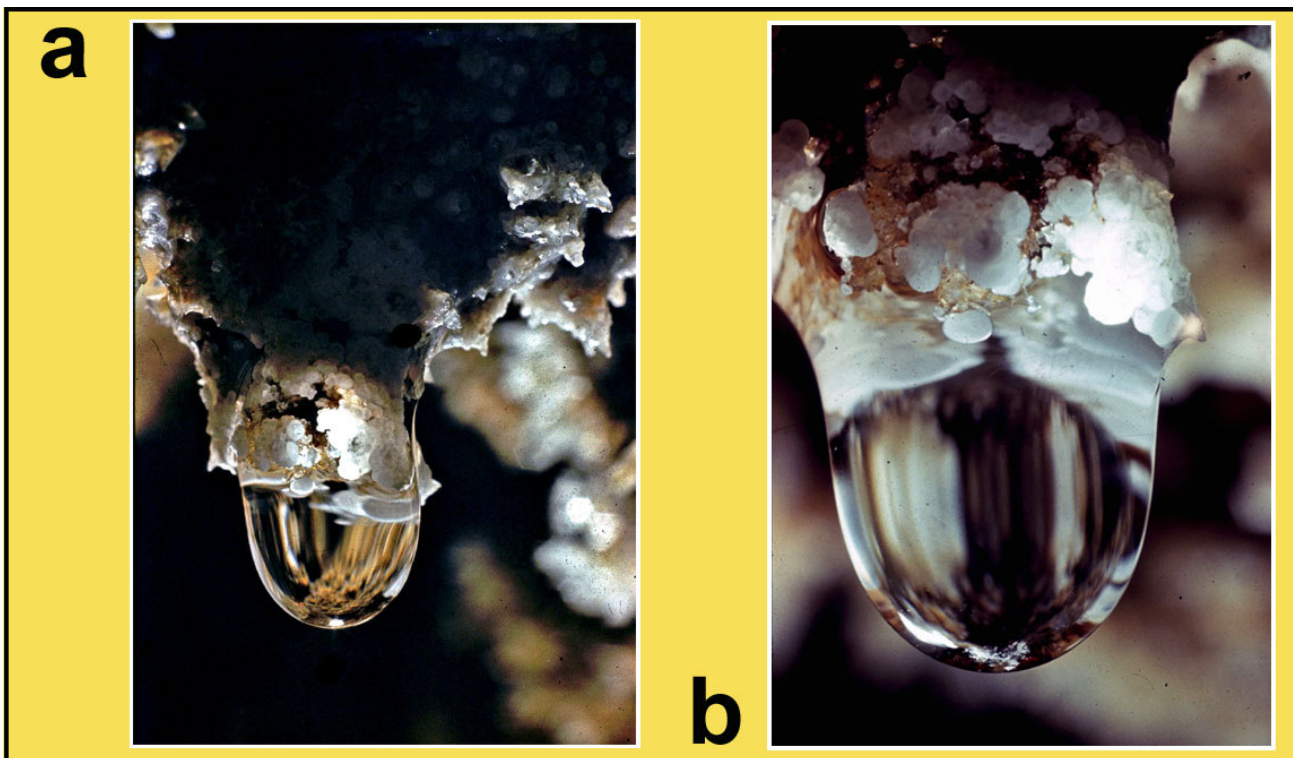
Trebuie precizat faptul că picătura cu microorganisme din vârful stalactitei are un volum limitat și probabil metabolismul microorganismelor este diminuat de condițiile din interiorul manometrului. Dacă imaginăm însă, toată suprafața biofilmului de pe bolta cavității din zona cu stalactite policrome plus stalactitele, putem concluziona că metabolismul general al acestui consorțiu format din *Acidithiobacillus ferrooxidans* și *Fungi* din genul *Penicillium* este relativ intens.

În perimetrul în care se găsesc stalactitele policrome, în unele zone, pot fi observate depuneri de gips prin oxidarea S⁰ din soluția de percolație (Fig. 11.1.8.).



Acest fenomen este comun și în alte cavități, în special în picăturile mici de apă cu S⁰, de pe tavane. Oxidarea chimică a S⁰ la gips poate avea loc chimic conform ecuației (11.1.13.), dar acest proces este extrem de lent. În prezența lui *Acidithiobacillus ferrooxidans*, procesul este grăbit de câteva sute de ori (Martin, 1994).

Fig.11.1.8. a., b. Precipitare de gips în picătură (foto Mihai Ciuprina).



În cazul acestor precipitări de gips, se observă absența hifelor din picătură, iar precipitarea are loc la baza picăturii. În acest caz nu se formează stalactite.

Capitolul 11. Procese și mecanisme metabolice.

Totalitatea datelor acumulate de noi până în prezent, referitor la stalactitele policrome, ne permit să tragem la final câteva concluzii (Fig. 11.1.):

- sunt formațiuni de dimensiuni mici care se află pe bolta cavității doar în anumite sectoare ale acesteia.

- între stalactitele policrome, bolta cavității este acoperită de o crustă care reprezintă baza lor comună și care are aceeași origine cu stalactitele.

- se formează în zonele cu neregularități ale bolții prin procese biologice și chimice.

- procesele biologice și chimice se desfășoară în soluția de percolație care le alimentează din microfisurile din bolta cavității.

- soluția de percolație se formează în microfisurile din bolta cavității și conține concentrații mari de substanțe dizolvate din rocă. Viteza ei de curgere este lentă și de aceea, în perioadele ploioase este mai diluată, mai puțin vâscoasă și se scurge mai repede, iar în perioadele secetoase este mai concentrată și se scurge mai lent.

- la baza formării și creșterii lor stă o comunitate de microorganisme constituită printr-o asociere intimă între o populație dominantă de *A. ferrooxidans* (80%) ca microorganism autotrof și șase specii de *Penicillium* (20%) ca organisme heterotrofe. *A. ferrooxidans*, prin oxidarea piritei din microfisurile bolții cavității și a produșilor rezultați din oxidarea acesteia, realizează producția primară de substanță organică. De la sezoanele ploioase la cele secetoase în soluția de percolație populațiile de *A. ferrooxidans* și *Penicillium* suferă anumite variații numerice care se datorează mai mult diferențelor de concentrație a diferitelor substanțe.

- în urma metabolismului chemolitotrof al lui *A. ferrooxidans* rezultă hidroxid feric, care se depune la interiorul și la exteriorul hifelor de *Penicillium* mineralizându-le cât și la exteriorul soluției de percolație într-o lamină cu o structură în microstraturi (ce arată ciclicitatea procesului). Hifele mineralizate formează scheletul intern al stalactitei, iar laminele de hidroxid feric formează învelișul extern cu prelungiri și în interiorul acesteia.

- procesul biologic care stă la baza formării și creșterii lor este permanent, adică se desfășoară pe tot parcursul anului.

- fiind constituite din hidroxid feric depus pe celule de microorganisme, sunt formațiuni foarte friabile.

11.2. Procese ce se desfășoară în formațiunile mucilaginoase

Formațiunile mucilaginoase din cavitatea Kiesberg, așa cum le-am descris în capitolele anterioare, reprezintă un consorțiu format din populații de microorganisme autotrofe chemosintetizante, care utilizează pentru reducerea CO₂ electronii din elementele reduse din roca din pereții și bolta cavității, la care se adaugă populațiile de heterotrofe. Organismele heterotrofe sunt procariote și eucariote care trăiesc pe seama substanțelor organice dizolvate venite de la autotrofele chemosintetizante, sau din alte sectoare ale cavității.

Astfel de formațiuni mucilaginoase sau „*filamente acide*” sau „*snotite*” (în cazul stalactitelor), cum au mai fost denumite, nu sunt caracteristice doar pentru cavitatea studiată de noi ci sunt relativ des întâlnite în cavitățile sulfuroase și feruginoase artificiale (mine) și naturale (peșteri). Consorțiile de microorganisme pot fi diferite unele de altele, în ceea ce privește alcătuirea lor, în funcție de factorii de mediu: climatul cavității, temperatura apelor în care acestea se găsesc, compoziția chimică a rocii în care se află cavitatea și din care apele preiau diverse minerale etc.

Cel mai des întâlnite și mai cunoscute tipuri de formațiuni mucilaginoase, în literatura de specialitate, sunt cele din *cavitățile hidrotermale*.

Zonele hidrotermale din foarte multe zone de pe Terra sunt cunoscute de oameni încă din cele mai vechi timpuri și au fost utilizate în scopuri terapeutice. În aceste zone de-a lungul timpului

Partea a-V-a. Mecanisme metabolice care stau la baza apariției formațiunilor studiate.

au fost descoperite cavități naturale unele dintre acestea având origine epigea ca și cavitățile naturale „normale” din roci calcaroase, altele având origine hipogea (de jos în sus) mai puține la număr, existând probabil multe nedescoperite încă. Cavitățile hidrotermale sunt în general cavități formate în roci calcaroase alimentate cu ape termale sau mezotermale cu temperaturi ce variază între 18-50⁰C de origine profundă, uneori din zone vulcanic active, conținând în general cantități mari de sulf sau hidrogen sulfurat.

Comunitățile de microorganisme ce formează „snotite” sau formațiuni mucilaginoase, în aceste cavități, sunt formate din procariote (din Domeniile Eubacteria și Archaea) chemosintetizant obligate (ca unele specii de *Acidithiobacillus*), chemosintetizant facultative (filamentoase de tip *Beggiatoa*, *Thiothrix*, etc) a căror metabolism se bazează pe utilizarea *hidrogenului sulfurat* (H_2S) și a *sulfului* (capitolul 2). Alături de aceste procariote autotrofe la alcătuirea acestor consorții pot participa și diverse categorii de eucariote (ciuperci, protiste și nevertebrate) rezistente la concentrații mari de hidrogen sulfurat și la acidități mari.

Câteva exemple de astfel de cavități în care se găsesc „snotite” sau formațiuni mucilaginoase sunt:

-peștera Lechuguilla din Parcul Național Carlsbad, New Mexico, Statele Unite ale Americii, este cea mai mare și mai cunoscută cavitate de acest gen. Este mai bine cunoscută din 1986 și este a cincea cavitate ca mărime din lume cu o lungime de peste 150km și o adâncime de 500m. Din punct de vedere științific are o foarte mare importanță atât din punct de vedere biospeologic cât și din punct de vedere mineralogic-geologic conținând o varietate imensă de speleoteme sulfurate fiind considerată la ora actuală una din cele mai frumoase cavități de pe Terra (Cunningham *et al.*, 1995).

-Cueva de Villa Luz din Platoul Tabasco din Mexic descoperită în 1987 de Jim Pisarowicz și Warren Netherton, bine cunoscută din punct de vedere biospeologic, având comunități bacteriene mucilaginoase foarte bine dezvoltate, dar și comunități de nevertebrate și vertebrate endemice (Northup *et al.*, 1997).

-Frassassi din Italia cunoscută de asemenea din punct de vedere biospeologic din aceleași considerente ca și Cueva de Villa Luz (Vlăsceanu *et al.*, 2000).

-Avenul lui Adam, Băile Herculane, România, este o peșteră cu acces pe verticală alimentată cu aburi sulfuroși. În această cavitate a fost descoperită o galerie numită „galeria cu aburi” în care se găsesc snotite și formațiuni mucilaginoase. Datorită faptului că în această galerie după 1980 temperatura este foarte ridicată (în jur de 60⁰C) aceste snotite au fost puțin studiate (Bleahu *et al.*, 1976).

-Movable din Dobrogea, România, cavitate hipogea descoperită în 1986 de către Cristian Lascu. Este bine cunoscută prin faptul că în apele mezotermale (18-20⁰C) din galeriile inferioare bogate în hidrogen sulfurat există o comunitate complexă de organisme (nevertebrate) care are ca unică sursă de energie substanța organică produsă de producătorii primari reprezentați de comunitățile mucilaginoase de microorganisme de la suprafața apei. Procariotele chemosintetizante din aceste comunități realizează oxidarea hidrogenului sulfurat și a compușilor cu sulf (Vlăsceanu *et al.* 1997).

Alte tipuri de formațiuni mucilaginoase se găsesc în cavități în general artificiale (mine vechi abandonate) aflate în masive de roci vulcanice sau metamorfice bogate în sulfuri metalice ca și în cazul studiului nostru. În aceste cavități formarea și dezvoltarea comunităților microbiene mucilaginoase are la bază oxidarea sulfurilor metalice din masa de rocă. Principalele specii autotrofe chemosintetizante din aceste comunități sunt reprezentanți ai genului *Acidithiobacillus*, iar ca heterotrofi, Eubacterii heterotrofe, Actinomicetes și o serie de eucariote ca diverse specii Fungi și de Protiste, foarte rar micronevertebrate de tipul Nematodelor. Astfel, din punct de vedere al biodiversității, acestea sunt mai sărace în specii în comparație cu formațiunile mucilaginoase din

Capitolul 11. Procese și mecanisme metabolice.

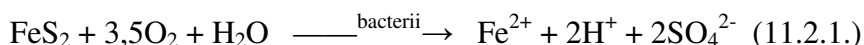
cavitățile hidrotermale, dar pot realiza în fluxurile de apă subterană biomase impresionante cum este cazul unei mine din Țara Galilor. Aceasta este mina Cae Coch, o veche mină de pirită închisă de peste 70 de ani, unde biovolumul acestor filamente mucilaginoase depășește 100m³ (Johnson, 1999; Hallberg *et al.*, 2006). Consorțiile mucilaginoase de microorganisme din apele din mina Cae Coch sunt foarte asemănătoare cazului nostru (vezi capitolul 8) (Johnson, 1999; Hallberg *et al.*, 2006).

Formațiunile mucilaginoase din mina Kiesberg, așa cum le-am descris în capitolele 6 și 8, reprezintă un consorțiu de microorganisme (imense colonii bacteriene) ce se dezvoltă într-o nișă (o veche galerie parțial prăbușită) în peretele Sălii 1. într-un curs continuu de apă. Debitul acestui curs de apă este destul de variabil pe timpul anului depinzând de cantitatea de precipitații din exterior.

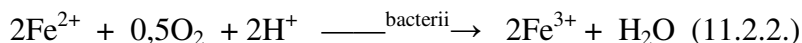
Rezultatele analizelor chimice au arătat un pH acid (2,81), mari cantități de sulfat (2810,5 mg/l), în comparație cu celelalte eșantioane, ceea ce arată existența unei oxidări intense a tuturor formelor de sulf redus de către bacteriile chemosintetizante ale consorțiului mucilaginos. De asemenea observăm cantități destul de mari de calciu (376,4 mg/L⁻¹) și cantități de câteva ori mai mici de sodiu și potasiu față de celelalte eșantioane. Având în vedere faptul că, în preparatele de microscopie electronică, am observat existența unor mari cantități de jarosit cu potasiu și carbonați cu sodiu (capitolele 10 și 11), putem deduce cauza acestei diferențe de concentrație a celor două elemente față de celelalte eșantioane.

La baza formării, creșterii și dezvoltării acestui consorțiu stă, așa cum am văzut și în cazul stalactitelor policrome, oxidarea sulfurilor metalice din stratul de rocă metamorfică în care a fost săpată cavitatea Kiesberg. Astfel, cristalele de pirită și calcopirită din peretele și bolta nișei cu formațiuni mucilaginoase sunt colonizate de *Acidithiobacillus ferrooxidans* care formează un biofilm lax pe suprafața acestora. În determinările noastre microbiologice, la pH-ul puțin mai mare de 2 din cazul formațiunilor mucilaginoase, *A. ferrooxidans* poate fi ușor confundat cu *Acidithiobacillus thiooxidans*.

În M.E.B. am observat faptul că suprafața cristalelor de pirită nu este perfect netedă, ci prezintă o serie de neregularități, la care celulele de *A. ferrooxidans* aderă intim prin mucopolizaharidele extracelulare (Fig. 11.2.1.). La nivelul suprafeței neregulate a cristalului, *A. ferrooxidans* atașat la aceasta, inițiază oxidarea piritei.



Peste biofilmul lax, pe care *A. ferrooxidans* îl formează pe suprafața cristalului, se află un biofilm mult mai compact format din *A. ferrooxidans* și celelalte specii de acidithiobacili. Acest biofilm compact, nu este atașat la suprafața cristalului, iar bacteriile care îl formează preiau rapid Fe²⁺ rezultat din oxidarea piritei de către bacteriile atașate (Fig. 11.2.1.), (Fig. 11.2.2.).

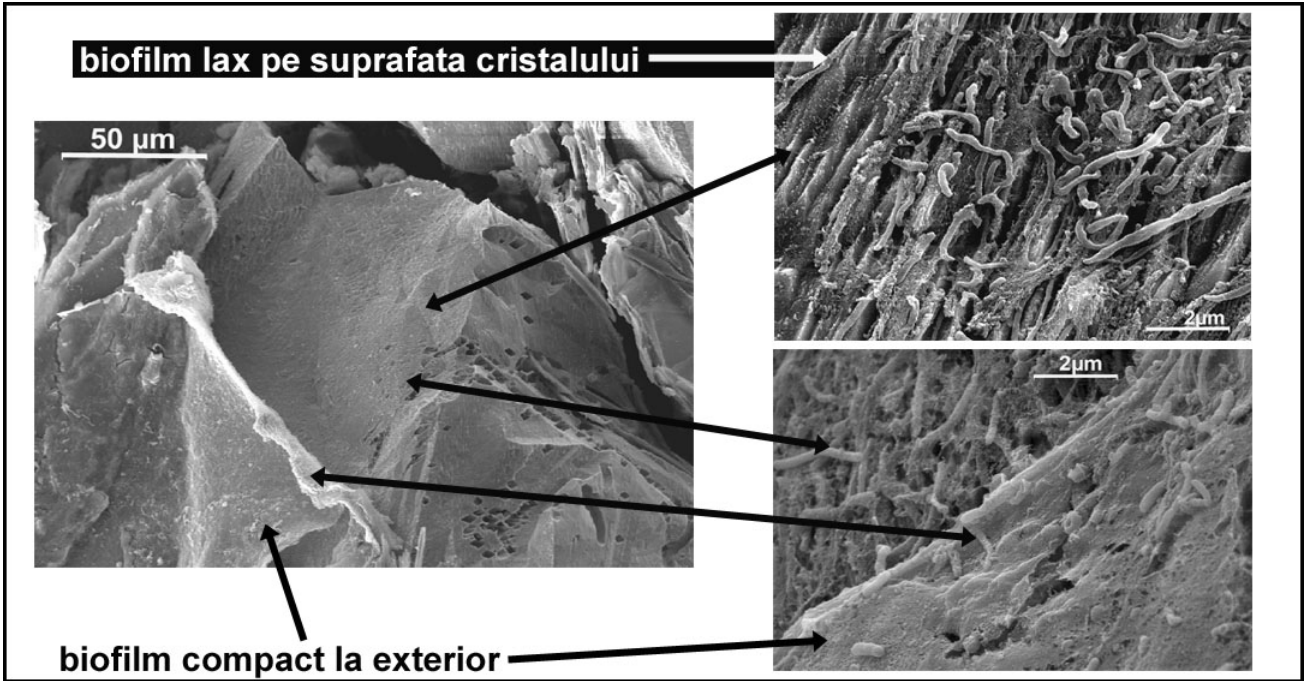


Fe³⁺ rezultat cauzează apoi oxidarea chimică a piritei reziduale crescând astfel cantitatea de Fe²⁺ disponibilă microorganismelor chemolitotrofe ale consorțiului (Fig. 11.2.2.):



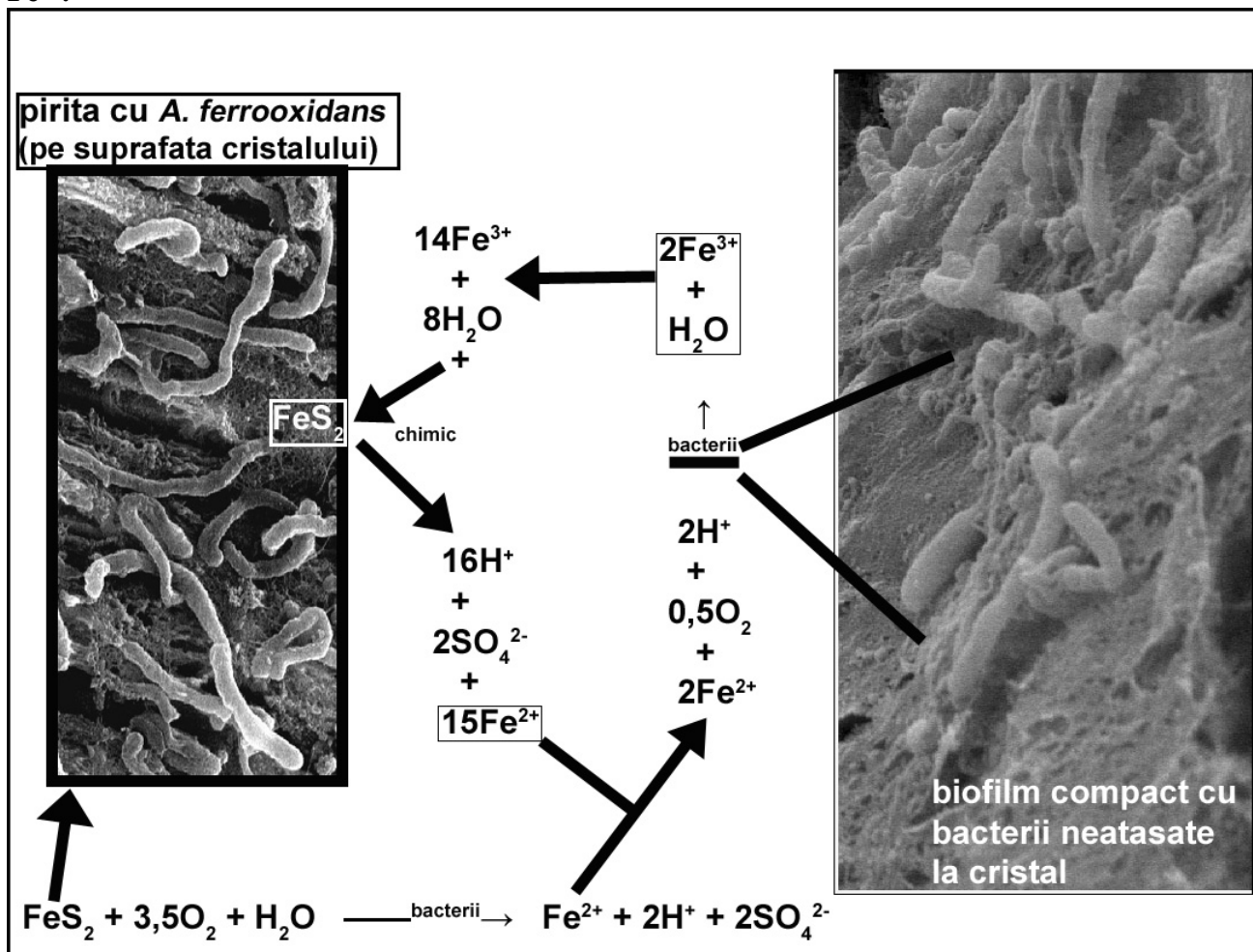
Partea a-V-a. Mecanisme metabolice care stau la baza apariției formațiunilor studiate.

Fig 11.2.1. Cristal de pirită cu biofilm lax de *A. ferrooxidans* pe suprafață și biofilm compact la exterior.



Capitolul 11. Procese și mecanisme metabolice.

Fig 11.2.2. Oxidarea biologică a piritei de către bacteriile de pe suprafața cristalului. Oxidarea Fe^{2+} de către bacteriile din biofilmul compact. Oxidarea chimică a piritei de către Fe^{3+} .



Un model interesant de bioleșiere a piritei de către *A. ferrooxidans* a fost propus de Valerié Tonazzio în 1998 prin teza sa de doctorat, în care au fost realizate modelări morfo-chimice ale suprafeței mineralelor, urmărindu-se rolul fundamental al fazelor superficiale oxidate.

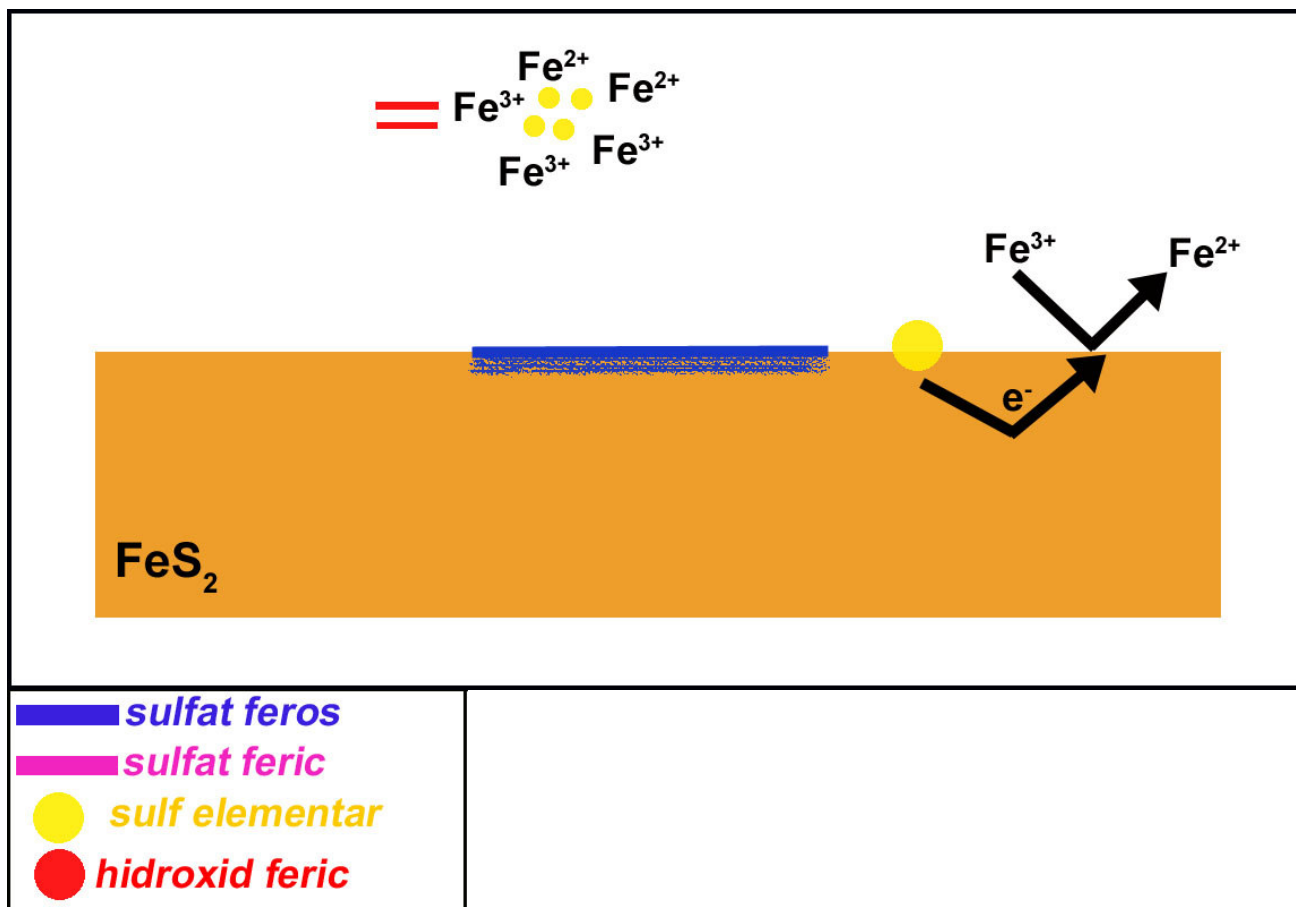
Obținerea unor astfel de rezultate a fost posibilă prin aplicarea unor tehnici de analiză combinate care includ: observații în câmp apropiat (AFM), observații în microscopie confocal, spectroscopie și topografie de suprafață pe mineral (Raman de câmp apropiat, sondă de analize chimice etc).

Astfel în cadrul acestui studiu, la început, cristalele de pirită au fost sterilizate prin autoclavare, după care a fost studiată suprafața lor și starea lor de oxidare. Ulterior, pe astfel de cristale de pirită s-au realizat inoculări cu *Acidithiobacillus ferrooxidans* observându-se evoluția în timp a stărilor lor de suprafață.

Prin acest experiment autorii au constatat următoarele: suprafața mineralului steril este netedă și are doar o fracțiune de S^0 , iar siturile fazei oxidate sunt vizibile, iar soluția din jurul cristalului conține toate fazele superficiale în stare solubilă Fe^{2+} , Fe^{3+} oxidant, polisulfură, SO_4^{2-} , sau sub formă de particule coloidale (S_8 , FeOOH) (Fig. 11.2.3.).

Partea a-V-a. Mecanisme metabolice care stau la baza apariției formațiunilor studiate.

Fig. 11.2.3. Starea inițială a sistemului pirită / soluție, după autoclavare, înaintea inoculării (după Valerié Tonazzio, 1998).



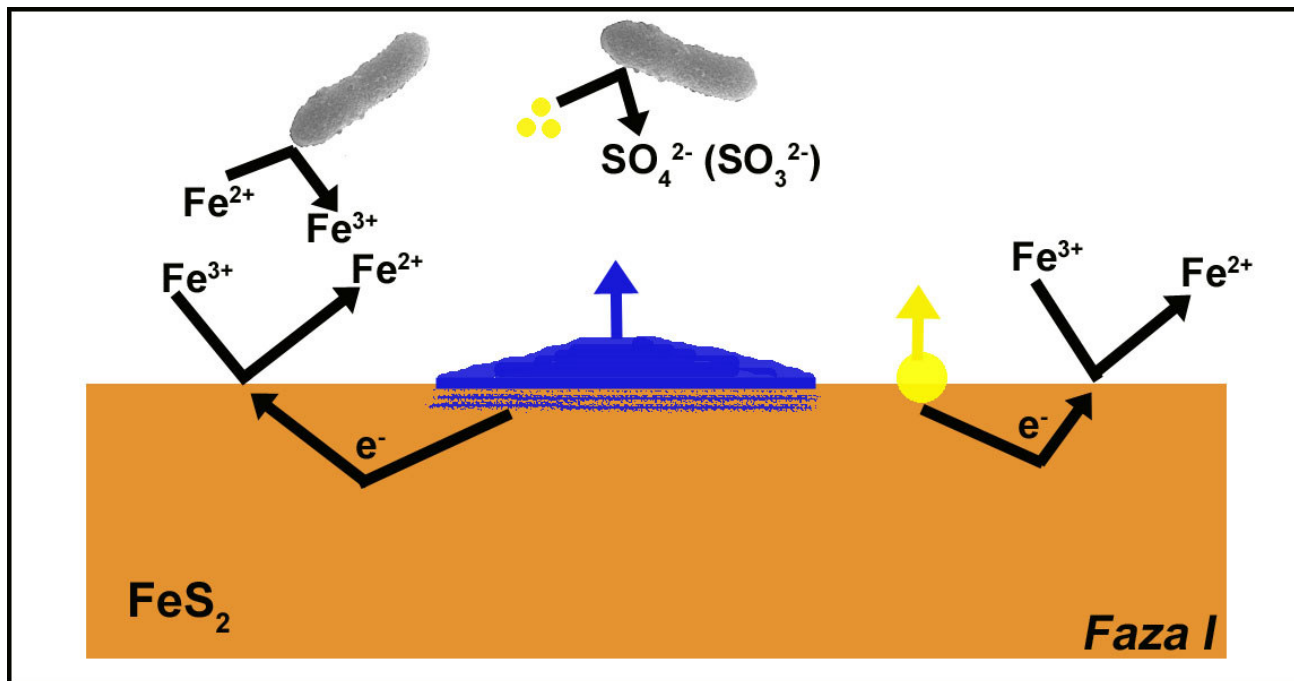
După inocularea cristalelor sterile cu *Acidithiobacillus ferrooxidans*, procesul de bioleșiere se realizează în mai multe etape sau faze (Tonazzio, 1998).

Faza I: Bacteriile din preajma cristalului utilizează substraturile direct disponibile în soluție (Fe^{2+} , S^0 și polisulfuri ?) care rezultă de la solubilizarea fazelor oxidate ale mineralului prin autoclavare (Fig. 11.2.4.). Metabolizarea S aduce un aport superior de energie față de oxidarea Fe^{2+} .

Solubilizarea fazelor de suprafață aduce în soluție o cantitate non neglijabilă de Fe(III) , completată prin oxidarea bacteriană a Fe^{2+} din primele zile ale bioleșierii, care contribuie, de asemenea, la creșterea cantității de oxidant chimic (Fe(III)) în soluție. Astfel, oxidarea chimică a pirităi prin Fe(III) debutează din primele momente ale bioleșierii inițiind disoluția mineralului. Rezultă S^0 , polisulfuri, sulfat feros, sulfat feric, oxid de fier cât și compuși polifazici (polisulfuri și S_8 înglobat în grupurile sulfat).

Capitolul 11. Procese și mecanisme metabolice.

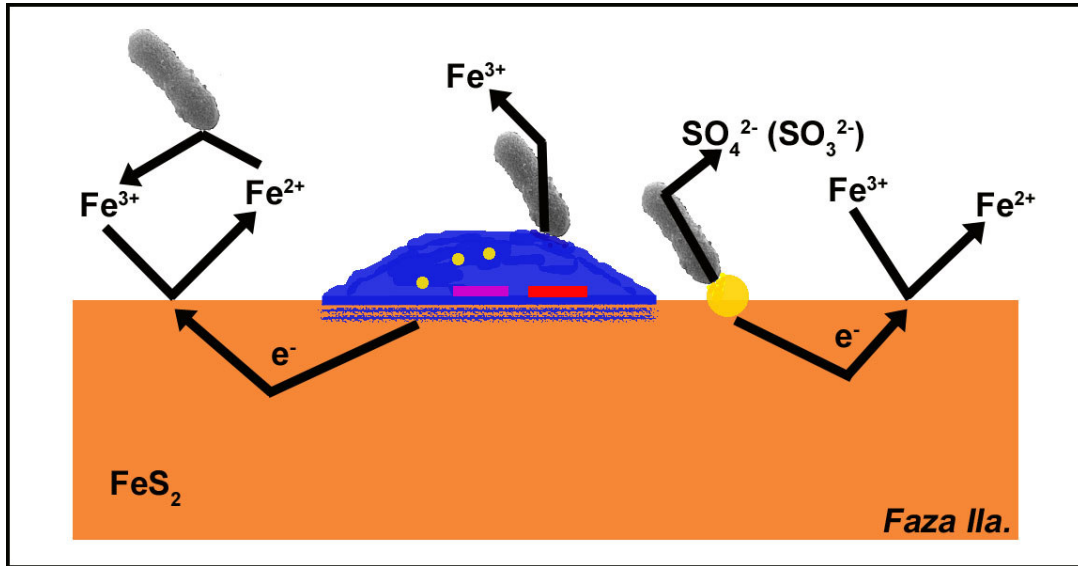
Fig. 11.2.4. Faza I a bioleșierii : - bacteriile oxidează preferențial substraturile aflate în soluție ; - pirita este oxidată chimic de către Fe^{3+} (formarea de S_8 și FeSO_4 în principal) (după Valerié Tonazzio, 1998).



Faza II : Bacteriile venite în contact cu mineralul, metabolizează substraturile solide (S^0 și sulfat feros în principal) nou formate la suprafața cristalului) (Fig. 11.2.5.a.). Este posibil ca, în ipoteza în care, polisulfurile nu reprezintă un substrat asimilabil pentru bacterii să se oxideze la S^0 sub acțiunea Fe^{3+} și să fie indirect consumate de către bacterii.

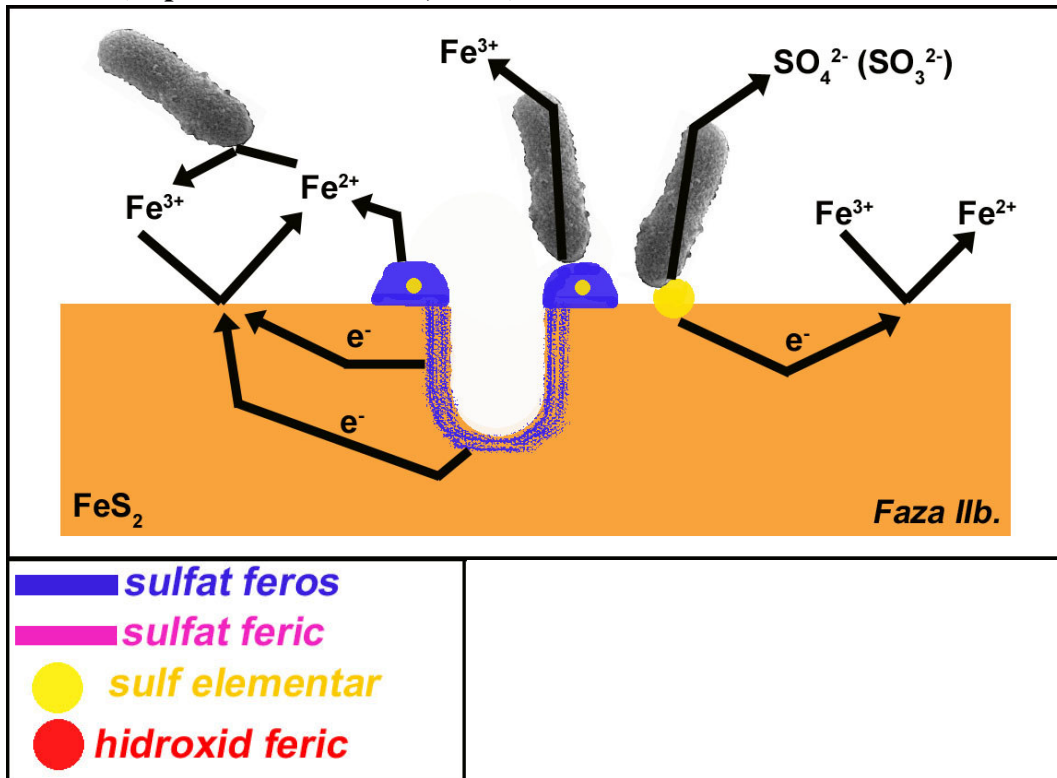
Partea a-V-a. Mecanisme metabolice care stau la baza apariției formațiunilor studiate.

Fig. 11.2.5. a. Bioleșierea piritei de către *A. ferrooxidans* - Faza IIa – corespunzătoare stadiului după adsorbția celulelor pe mineral – bacteriile metabolizează direct substraturile solide de la suprafață (S_8 , $FeSO_4$ în principal) (după Valerié Tonazzio, 1998).



Coroziunea perforantă este inițiată având la bază substraturile metabolizabile (Fig. 11.2.5.b.). Apariția zonelor de coroziune corespunde cu zonele de dezvoltare a siturilor S^0 și sulfatului feros – singurele substraturi asimilabile de către microorganisme.

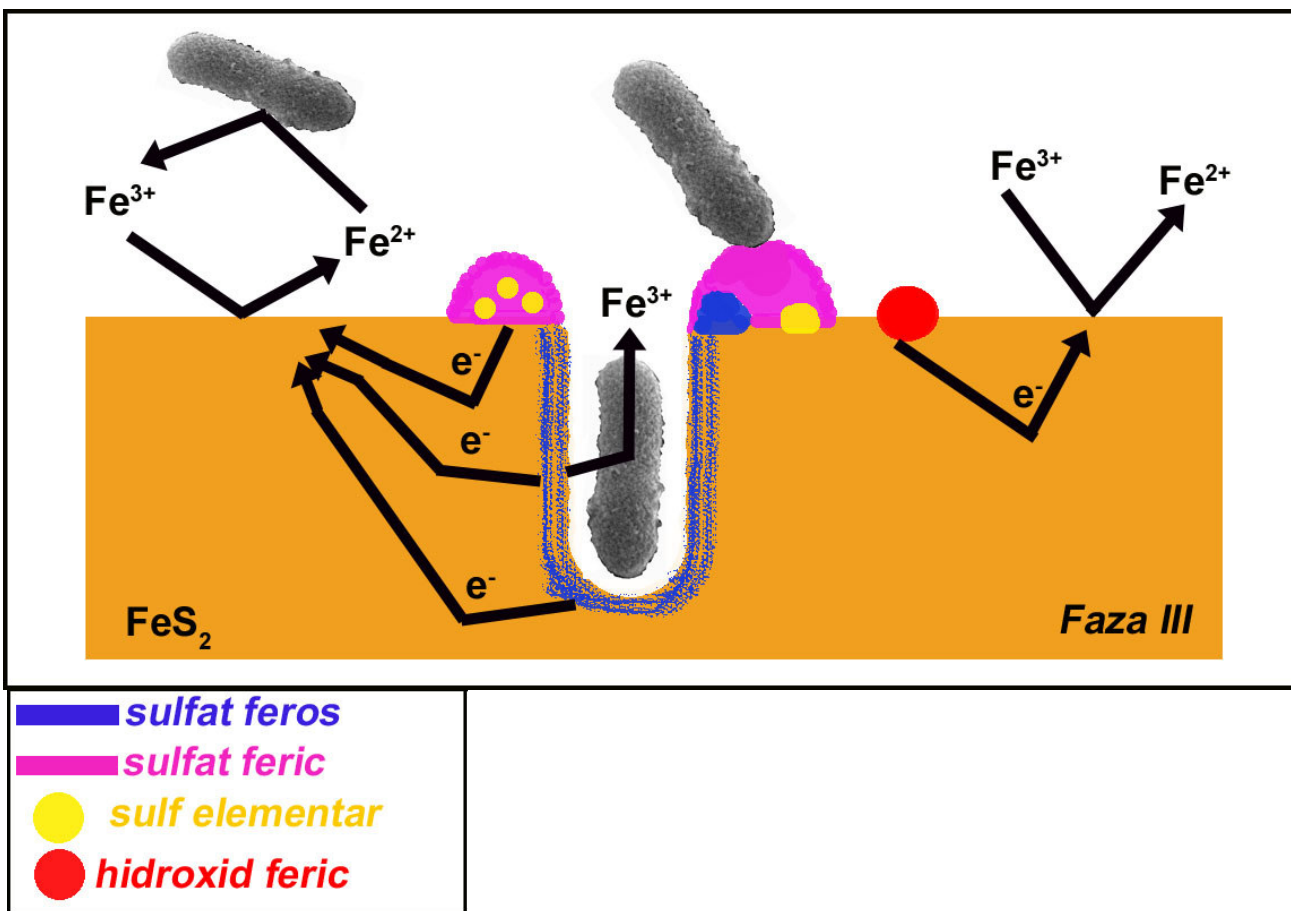
Fig. 11.2.5. b. Coroziunea piritei prin disoluție, având la bază fazele oxidate metabolizabile (după Valerié Tonazzio, 1998).



Capitolul 11. Procese și mecanisme metabolice.

Faza III : Acum Fe(III) în soluție este în cantitate mare, iar oxidarea chimică a mineralului devine preponderentă. Dezvoltarea treptată a depozitelor de sulfat feric și hidroxid feric (care nu reprezintă un substrat pentru bacterii) la suprafața mineralului împiedică accesul celulelor bacteriene la substraturile metabolizabile de suprafață (S^0 , $FeSO_4$). Aceasta reprezintă debutul fazei staționare în corозиunea bacteriană (Fig. 11.2 6.).

Fig.11.2.6. Creșterea porului de oxidare, oxidarea chimică începând și în interiorul mineralului (după Valerié Tonazzio, 1998).



Prin apariția la suprafața mineralului a substraturilor neasimilabile, de tipul sulfatului feric și a hidroxidului feric, aceasta poate fi protejată de apariția de noi pori de corозиune. Corозиunea va continua doar în zonele inițiate înainte (alungirea și lărgirea porilor existenți).

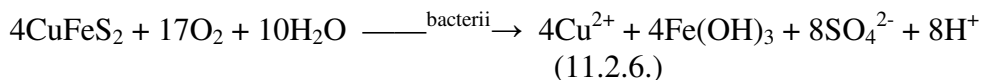
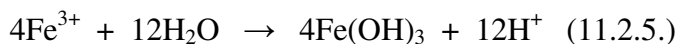
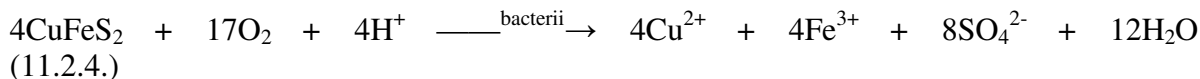
Trebuie să precizăm faptul că în schemele acestui model, anumite elemente au fost reprezentate intenționat exagerat în raport cu altele pentru a fi mai bine vizibile

În concluzie, observăm din acest model, un veritabil sinergism între procesele chimice și microbiene ce intervin în bioleșierea sulfurilor în prezență de *A. ferrooxidans*. Starea de suprafață a sulfurii, condiționează și orientează procesele de bioleșiere în natură (Valerié Tonazzio, 1998).

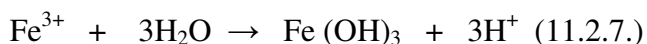
Acest model de bioleșiere a piritei poate fi întru totul aplicabil în cazul consorțiilor de microorganisme studiate de noi.

În cazul nostru, după cum am văzut, Zăcământul Policarpus conține pe lângă pirită și cantități importante de calcopirită, deci la baza metabolismului formațiunilor mucilaginoase poate sta și oxidarea calcopiritei:

Partea a-V-a. Mecanisme metabolice care stau la baza apariției formațiunilor studiate.



Fe^{3+} rezultat, pe lângă oxidarea chimică a piritei reziduale, se depune sub formă de hidroxid feric în mucopolizaharidele consorțiului de microorganisme.



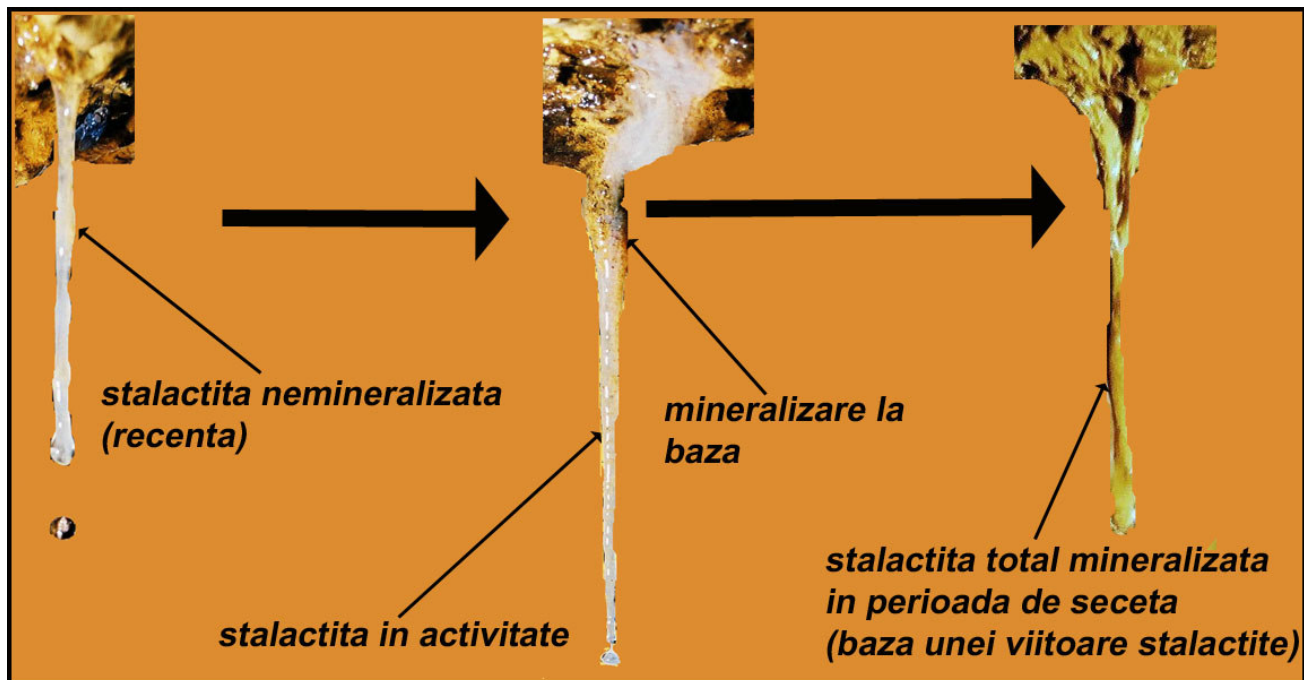
O parte din hidroxidul feric coboară spre mijlocul stalactitei unde alături de sulfat și de alți ioni participă la formarea jarositului.

Depunerea hidroxidului feric, se realizează aproape de locul formării Fe^{3+} adică de la margine spre centru în cazul curgerilor mucilaginoase parietale și de planșeu și de la bază spre vârf și din centru spre periferie în cazul stalactitelor mucilaginoase.

Așa cum am văzut în capitolul 10, există o diferență la nivel microscopic, în ceea ce privește depunerea de hidroxid feric, între stalactitele mucilaginoase și scurgerile mucilaginoase. În cazul stalactitelor hidroxidul feric se depune sub forma unor cristale aciculare, iar în cazul scurgerilor sub formă de cristale neregulate, această diferență datorându-se probabil vitezei diferite de cristalizare în cele două situații (*Fig. 10.2.14.*).

În urma acestor mineralizări, în cazul scurgerilor rezultă cruste de hidroxid feric la marginea acestora, iar în cazul stalactitelor mucilaginoase rezultă bazele lor solide de culoare de la maro deschis până la ruginiu închis (*Fig 11.2.7.*), (*Fig 11.2.9.*).

Fig. 11.2.7. Evoluția depunerii de hidroxid feric la baza stalactitei.

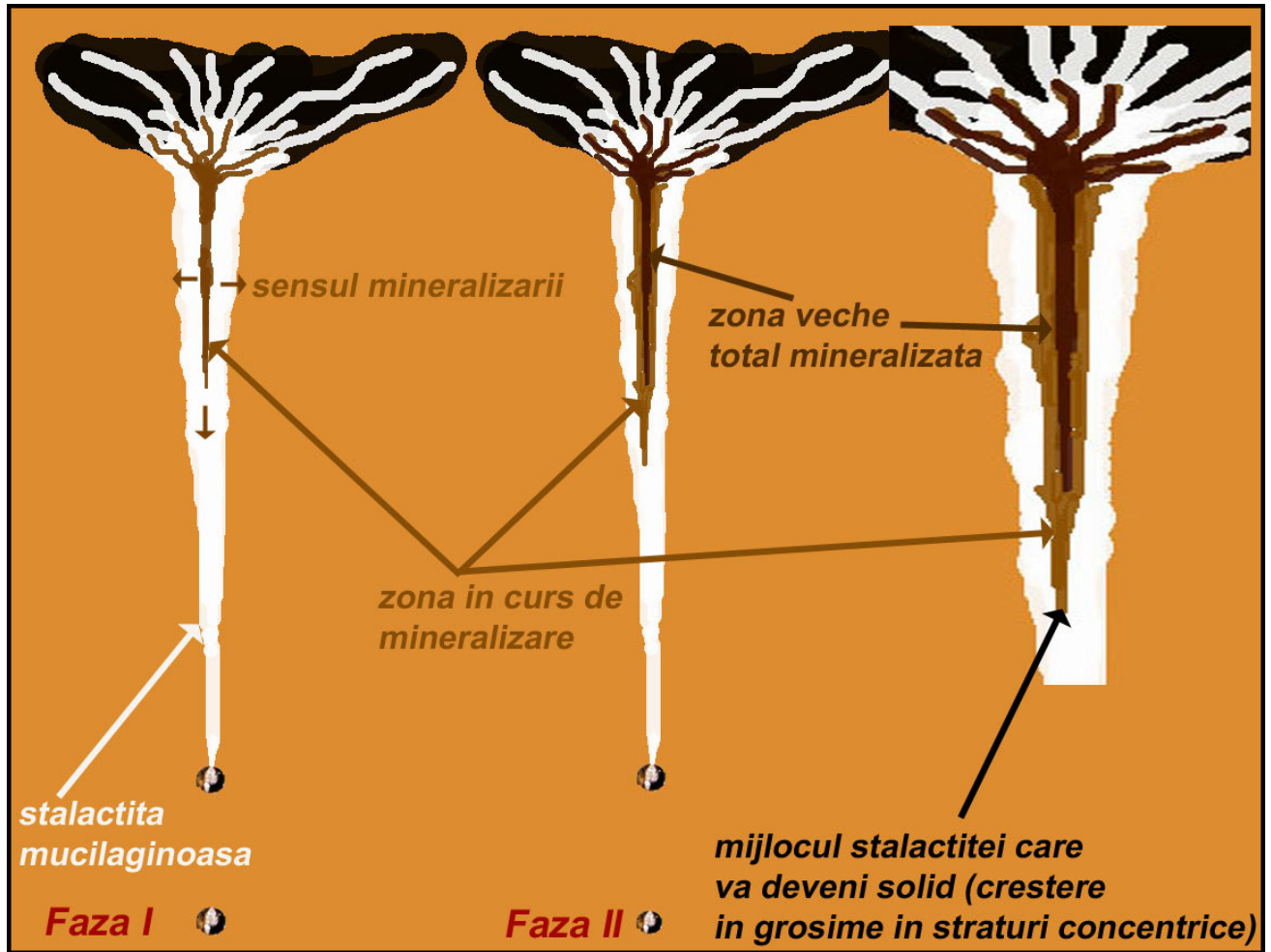


În perioadele de secetă, când debitul apei în cavitate este foarte mic, formațiunile mucilaginoase sunt în cantitate mică și de obicei în aceste perioade putem observa pe bolta nișei doar baza solidă (Fig 11.2.7.).

Când debitul apei crește, pe aceste formațiuni solide apar alte stalactite mucilaginoase care cresc și se dezvoltă. Acestea depun în continuare hidroxid feric la baza lor, din centru spre margine, adică în jurul vechilor baze solide mărindu-le atât în lungime cât și în grosime (Fig 11.2.8.).

Partea a-V-a. Mecanisme metabolice care stau la baza apariției formațiunilor studiate.

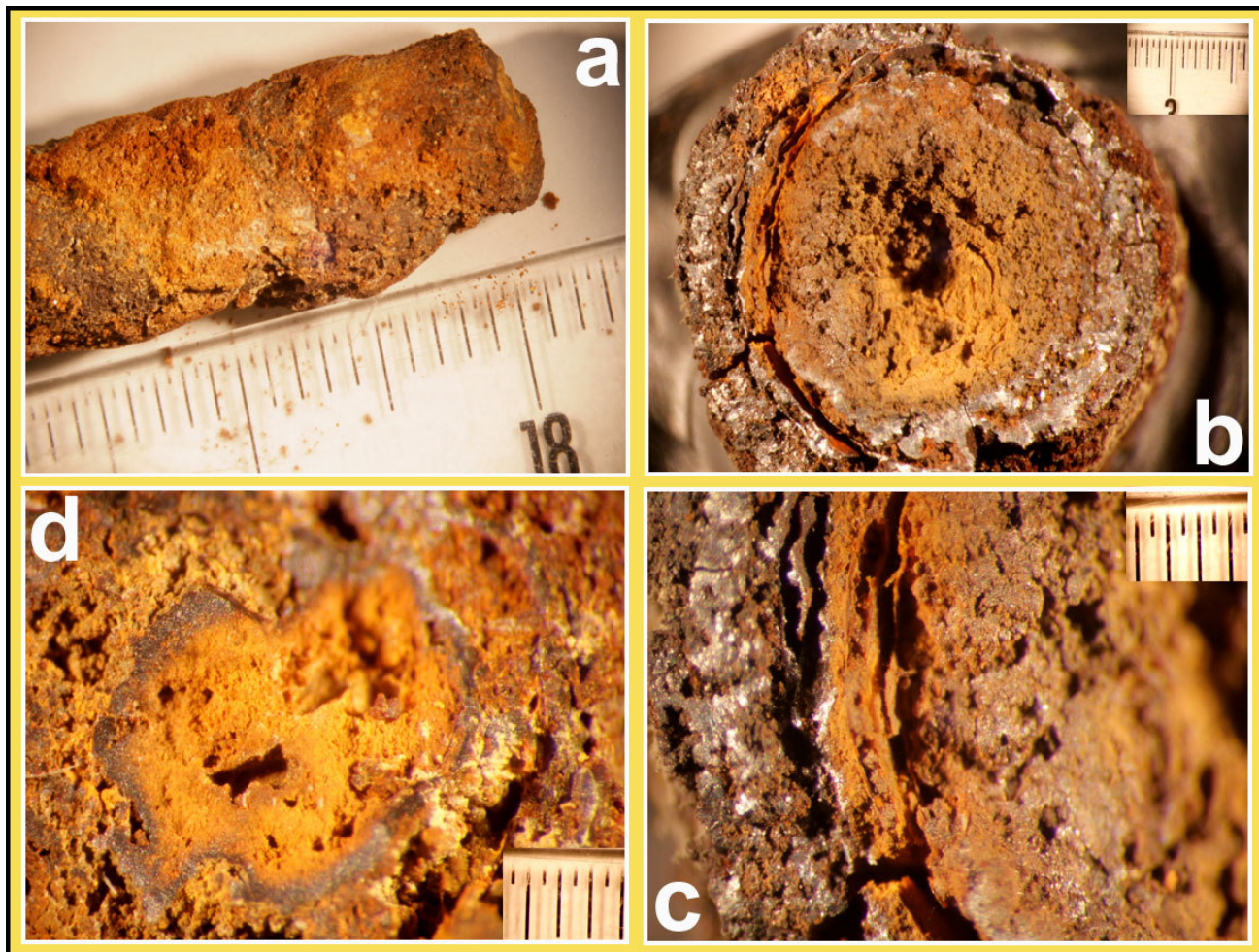
Fig.11.2.8. Depunerea în etape a hidroxidului feric la baza stalactitelor mucilaginoase. Creșterea concentrică în grosime a zonelor mineralizate.



Datorită faptului că această alternanță a perioadelor de secetă cu perioade bogate în precipitații se realizează de mai multe ori pe an, în fiecare an (are loc ciclic), baza solidă a unei stalactite mucilaginoase prezintă o creștere în grosime sub formă de inele concentrice. Acestea sunt bine vizibile la lupa binoculară în secțiune transversală (Fig 11.2.9.).

Capitolul 11. Procese și mecanisme metabolice.

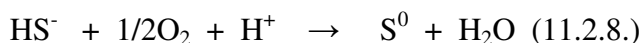
Fig. 11.2.9. a. Vedere de ansamblu la lupa binoculară cu baza total mineralizată a unei stalactite mucilaginoase; b., c., d. Secțiuni transversală prin stalactita mucilaginoasă total mineralizată (diferite mărituri). În aceste secțiuni transversale este bine vizibilă structura în straturi concentrice.



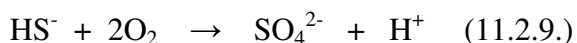
Pe lângă oxidarea Fe^{2+} din pirită, bacteriile chemolitotrofe din formațiunile mucilaginoase oxidează și jumătatea cu sulf a sulfurii (Fig.11.2.10.). Majoritatea acidithiobacililor oxidează sulfurile până la sulfat indiferent de nivelul presiunii oxigenului (de exemplu *Acidithiobacillus thiooxidans*) (Ehrlich, 1994).

În cazul nostru, din analizele chimice realizate pe eșantioane din apa nișei cu formațiuni mucilaginoase observăm o mare cantitate de sulfat ca rezultat al acestui metabolism (2810,5 mg/l).

În zonele în care presiunea oxigenului este mai mică (sub saturație), pH-ul intern al lui *A. thioparus* devine ușor alcalin și poate produce S^0 din sulfură (Sokolova și Karavaiko, 1968).



În zonele în care oxigenul este la saturație *A. thioparus* va oxida sulfura până la sulfat (van den Ende și van Gemerden, 1993).

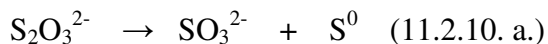


Acidithiobacillus ferrooxidans are capacitatea să oxideze anaerob S^0 , folosind Fe^{3+} ca acceptor final de electroni (Pronk *et al.*, 1991-1992) (capitolul 8).

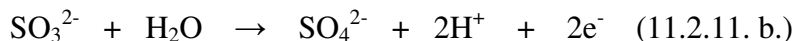
Partea a-V-a. Mecanisme metabolice care stau la baza apariției formațiunilor studiate.

Sulfitul poate fi oxidat în continuare de către bacteriile chemolitotrofe din formațiunile mucilaginoase prin cele două mecanisme descrise în capitolul 2.

În cadrul consorțiului, thiosulfatul este de asemenea oxidat la sulfat (capitolul 2).



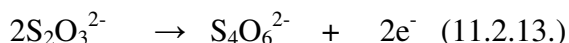
Sulfitul este apoi oxidat la sulfat:



Și sulful este oxidat la sulfat via sulfit:



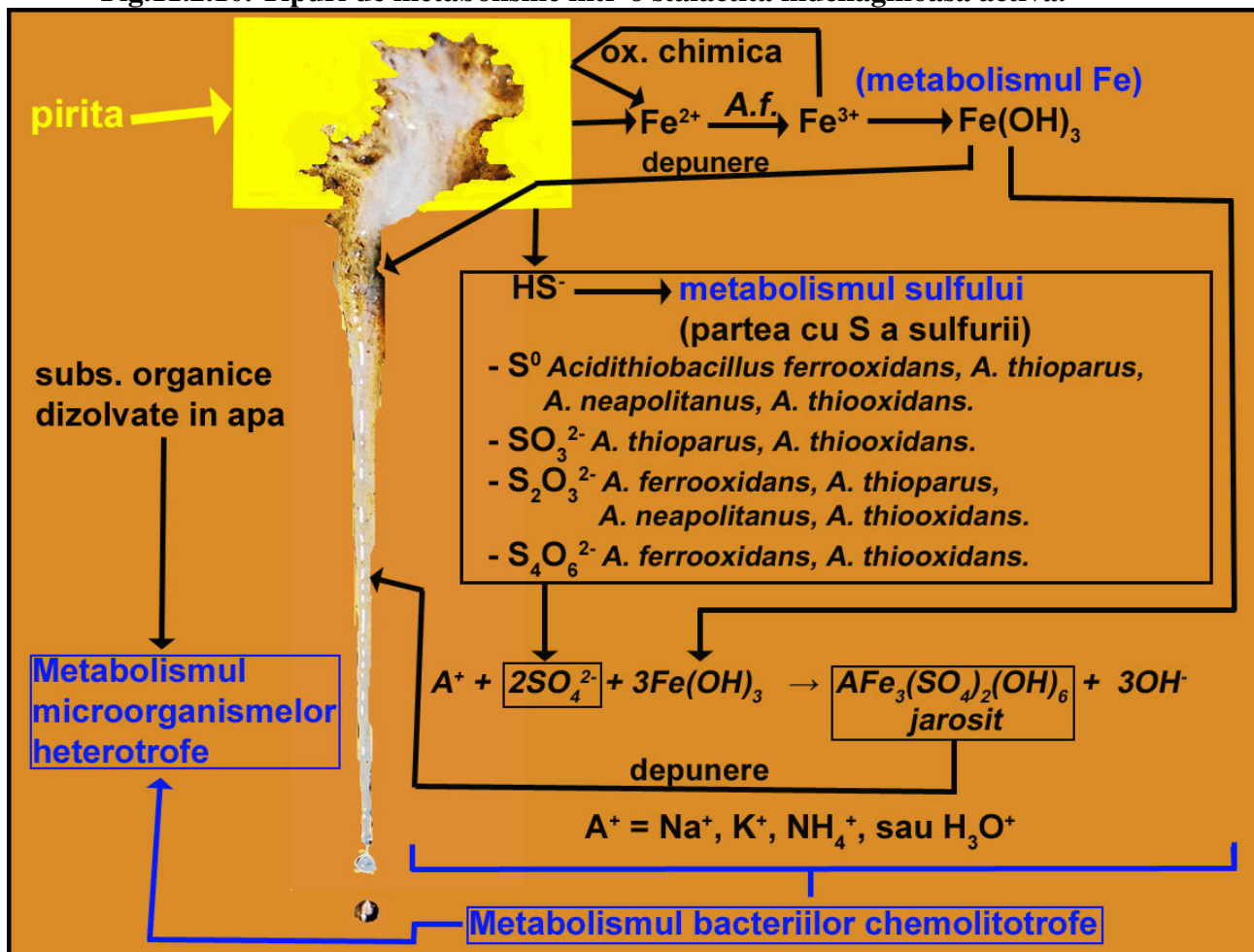
Pronk *et al.* (1990) rezumă dovada care susține un model în care *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* și *A. acidophilus* oxidează tiosulfatul prin formarea tetrationsului într-un pas inițial:



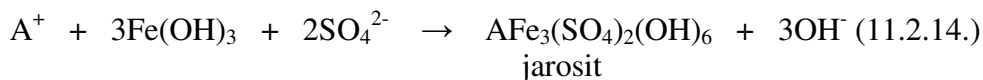
urmat de o serie de pași oxidativi și hidrolitici prin care tetrationsul este transformat în sulfat cu acumulări trecătoare de sulf intermediar din acizii sulfan-monosulfonici (politionați).

În urma tuturor acestor reacții biochimice care presupunem că au loc în formațiunile mucilaginoase rezultă deci importante cantități de sulfat (aproximativ 3g/l) (*Fig 11.2.10.*).

Fig.11.2.10. Tipuri de metabolisme într-o stalactită mucilaginoasă activă.



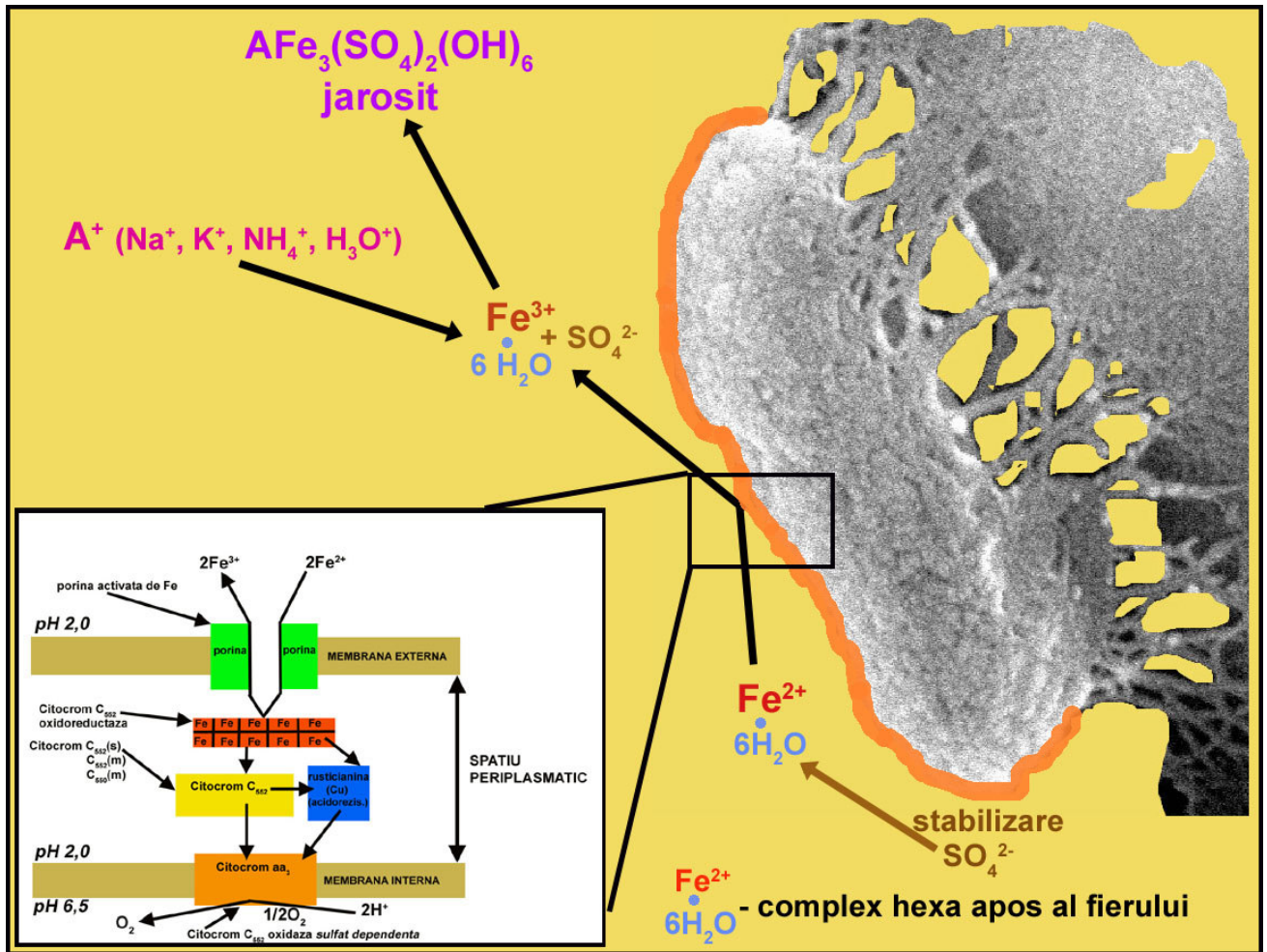
La mijlocul stalactitelor mucilaginoase, sau spre centrul scurgerilor mucilaginoase, sulfatul împreună cu hidroxidul feric care nu s-a depus la baza stalactitelor sau la marginea scurgerilor mucilaginoase și împreună cu ioni de K^+ formează **jarositul** (capitolul 10) (Fig 11.2.10.).



A poate reprezenta Na^+ , K^+ , NH_4^+ , sau H_3O^+ (Ehrlich, 1995).

În capitolul 1 am văzut că încă din 1968 Lazaroff a stabilit necesitatea ionilor sulfat pentru sistemul oxidator al Fe^{2+} la *A. ferrooxidans* (Fig.10.2.3.). Schimbările concentrației SO_4^{2-} precum și a pH – ului afectează valorile vitezei maxime de oxidare a fierului. Un rol al sulfatului în oxidarea Fe de către *A. ferrooxidans* pare să fie acela al stabilizării complexului hexa – apos al Fe (II) care servește ca substrat pentru sistemul său de enzime oxidatoare de Fe (Fig 11.2.11.) (Lazaroff, 1983).

Fig. 10.2.11. Formarea jarositului. Oxidarea Fe^{2+} în prezență de sulfat.



Formarea extinsă a jarositului, în prezență, dar nu în absența de *A. ferrooxidans* sugerează că în oxidarea nonbiologică a $Fe(II)$, H_2O înlocuiește sulfatul în produsul feric (Lazaroff et al, 1982, 1985).

În scurgerile de planșeu mucilaginoase, în capitolul 10, am observat prezența unei formațiuni în formă de plachete pătrate a cărei formare pornește de la biofilmul bacterian (Fig. 10.2.21. a., b., c., d., e.). Compoziția chimică (din spectrul E.D.S.) a acestor plachete se poate caracteriza prin prezența în cantitate mare a Fe, Na, C și O, restul elementelor fiind în cantități mici. Carbonul din spectru reprezintă carbonul organic al biofilmului, iar din proporția de elemente chimice prezente în aceste plachete, calculată de noi, se pare că este vorba de un oxid de fier cu Na: $NaFeO_2 \cdot H_2O$ (JCPDS: 21-1127), verificarea acestei compoziții urmând să o realizăm printr-o analiză Rx.

Tot în zona mediană a stalactitelor mucilaginoase a fost găsită formațiunea minerală numită de noi „vermicul”, cu un conținut ridicat de Fe, Ni, Cr (Fig. 10.2.27) (capitolul 10). În M.E.B., am observat faptul că această formațiune are la bază biofilmul bacterian compact care se pliază formând atât pliuri mari, pronunțate, transversale, cât și pliuri fine longitudinale (Fig. 10.2.24.).

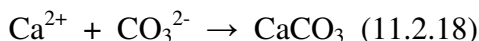
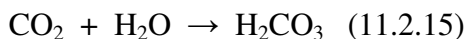
Procesele biologice și chimice care stau la baza formării și creșterii acestei formațiuni, nu am reușit să le deslușim până în prezent, rămânând pentru viitor deschisă cercetărilor noastre această problemă.

Capitolul 11. Procese și mecanisme metabolice.

Putem preciza totuși faptul că, în general Cr și Ni, în medii acide, în prezență de H₂SO₄ rezultat din metabolismul unor bacterii chemilitotrofe ca *A. thiooxidans* și *A. ferrooxidans*, sunt mobilizate din roci în fluxurile de apă (Echrllich 1996). La o anumită distanță de locul mobilizării lor din rocă, acestea se pot depune pasiv, probabil, alături de Fe³⁺, în masele de mucopolizaharide microbiene electronegative compactizate cum este cazul nostru.

Prezența calcitului în voalul bacterian care învelește vermiculul sau în corpul stalactitei, în apropierea vermiculului, (Fig. 10.2.28. a., b., c., d.) este foarte interesantă, având în vedere faptul că mediul este acid, iar stabilitatea calcitului în medii acide este extrem de redusă.

Formarea calcitului poate fi posibilă în interiorul consorțiilor mucilaginoase de microorganisme prin faptul că aici se pot crea mici zone izolate, cu un mediu de reacție diferit față de cel exterior acid. În plus, formarea calcitului în aceste ”microcelule de reacție” poate avea la bază activitatea metabolică a microorganismelor heterotrofe ale consorțiului care folosesc carbonul organic ca sursă de putere reducătoare (Fig.10.2.29. b., c.). Astfel, din activitatea heterotrofelor rezultă CO₂ care se transformă în CO₃²⁻. Acesta reacționează cu ionii de Ca²⁺, care în formațiunile mucilaginoase se află în cantitate mare (376,4 mg/L⁻¹ – cea mai mare cantitate din toate siturile luate de noi în studiu) rezultând astfel calcitul.



Formarea calcitului este posibilă, cum spuneam, numai în interiorul maselor mucilaginoase de microorganisme în care CO₂ poate rămâne captiv și în care mediul de reacție se apropie de alcalinitate. După formare, calcitul rămâne îmbrăcat ca într-o anvelopă în biofilmul compact de bacterii cu mucopolizaharide, astfel fiind protejat de mediul acid din jurul formațiunilor mucilaginoase (Fig. 10.2.28. d.).

Ca și concluzii finale, în legătură cu formațiunile mucilaginoase, putem spune următoarele (Fig. 11.1.):

- reprezintă o asociație de microorganisme, un consorțiu, constituit din populații bacteriene chemolitotrofe, actinomicete, fungi și protiste (acestea neizolate încă, ci doar observate în microscopie) strâns unite într-o masă compactă de mucopolizaharide.
- biomasa formată de acest consorțiu de microorganisme este destul de mare, iar relațiile între diversele populații sunt complexe.
- chemolitotrofele oxidează pirita din pereții Galeriei Kiesberg, dar și Fe²⁺ și compușii cu sulf rezultați din oxidarea acesteia, reprezentând producătorii primari de substanță organică ai consorțiului .
- din metabolismul chemolitotrofelor rezultă Fe³⁺, care formează apoi Fe(OH)₃ și SO₄²⁻.
- Fe(OH)₃ se depune la baza stalactitelor mucilaginoase și la marginea scurgerilor mucilaginoase, în masa de mucopolizaharide rezultând formațiuni dure de culoare ruginiu închis. Fe(OH)₃ care nu s-a depus, împreună cu SO₄²⁻ și ionii de K⁺ formează jarositul care se depune sub formă de cristale în zona mediană a formațiunilor.
- mucopolizaharidele microbiene reprezintă un domeniu cu o suprafață foarte mare de depunere și segregare a unor ioni din apă, astfel pe lângă ionii de fier am observat depunerea și concentrarea ionilor de nichel și crom într-o formațiune cu aspect vermicular. De asemenea,

Partea a-V-a. Mecanisme metabolice care stau la baza apariției formațiunilor studiate.

mucopolizaharidele pot forma medii de reacție izolate de apa din exterior acidă, astfel în unele zone am observat apariția cristalelor de calcit învelate în mucopolizaharide.

- substanța organică rezultată din activitatea chemolitotrofilor, dar și cea care vine odată cu apa din alte sectoare ale cavității este descompusă de către heterotrofi.

- populațiile microorganismelor identificate în formațiunile mucilaginoase, variază numeric foarte mult de la sezoanele ploioase la cele secetoase astfel în sezoanele secetoase ele se reduc foarte mult.

11.3. Procese ce se desfășoară în balta cu depuneri

Balta cu depuneri reprezintă un bazin care se află în unul din cele mai profunde sectoare ale cavității Kiesberg, aici fiind drenate o mare parte din apele din cavitate.

Așa cum am discutat deja în capitolele precedente, acest sistem prezintă două tipuri de depuneri: -depunerea roșie feruginoasă predominantă și -depunerea albă aluminată, ce acoperă doar o mică suprafață.

Apa din balta cu depuneri are o curgere lentă, un pH slab acid spre neutru (6,09). Debitul de alimentare al bălții cu depuneri variază mult în perioadele ploioase față de cele uscate.

În depunerea roșie, sulfații sunt în cantitate relativ mare, iar fierul total determinat este în concentrație de zece ori mai mare ca în celelalte eșantioane, fiind sub formă de hidroxid feric depus pe filamente spiralate de mucopolizaharide bacteriene (capitolul 10) (Fig. 10.3.3., Fig. 10.3.3.a., b., c.).

Fe^{2+} este oxidat, presupunem, de către *Gallionella ferruginea* (capitolul 8), care are, se pare, o dezvoltare foarte mare în depunerea roșie, la Fe^{3+} care se depune sub formă de hidroxid feric pe filamentele ei spiralate (capitolul 1 și capitolul 8). Până în prezent, din cauza unor probleme tehnice, nu am reușit izolarea acestui microorganism, rămânând pentru viitor confirmarea presupunerilor noastre.

Acidithiobacilii oxidează compuși ai sulfului ca: $S_2O_3^{2-}$ *A. thiooxidans*, *A. neapolitanus*; S^0 *A. neapolitanus* și tiocianat *A. thioparus* (Fig. 11.3.1.).

Fiind în unul din cele mai joase sectoare ale cavității Kiesberg, din punct de vedere metabolic, balta cu depuneri reprezintă un adevărat bazin de epurare biologică a apelor drenate aici. Aceste ape care se varsă în balta cu depuneri sunt încărcate cu mari cantități de substanțe organice rezultate din activitatea consorțiilor de microorganisme, din resturile de nevertebrate (insecte) și vertebrate (lilieci) care trăiesc în această cavitate, dar și substanțele organice ce ajung în cavitate din exterior odată cu apele de percolație. La acestea se adaugă și substanțele organice rezultate din activitatea microorganismelor chemosintetizante din balta cu depuneri. Toate substanțele organice sunt descompuse de către microorganismele heterotrofe.

Depunerea albă reprezintă, la nivel microscopic, o aglomerare de microsferule albe aluminat observându-se și celule bacteriene și hife de ciuperci.

Până în prezent, singurele analize chimice realizate pe această depunere au fost analizele E.D.S. din care observăm o abundență a Al (aproximativ 50%) și a Si (40%), la care se adaugă Na (4%) și Fe (3%) (Fig. 10.3.4.).

Prin urmare, depunerea albă reprezintă rezultatul alterării mineralelor aluminosilicate de tipul feldspaților care sunt comune în roci magmatice sau metamorfice.

Solubilizarea feldspaților din roci se realizează în anumite medii atât prin procese chimice cât și prin contribuția organismelor vii.

Încă din 1931, Waksman și Starkey au citat acțiunea CO_2 asupra ortoclazei:

Capitolul 11. Procese și mecanisme metabolice.



CO_2 din această reacție poate fi un produs al respirației sau fermentației.

Un alt exemplu bine cunoscut, studiat din 1979 de către Karavaico *et al.*, este cazul alterării acide a spodumenei ($\text{LiAlSi}_2\text{O}_6$) cu formare de caolinit. S-a observat faptul că în spodumena alterată predomină o serie de microorganisme nesporente heterotrofe din care fac parte bacterii și ciuperci. După studii mai amănunțite s-a precizat faptul că cele mai active microorganisme sunt ciupercile ca: *Penicillium notatum* și *Aspergillus niger*, dar și bacterii ca *Acidithiobacillus thiooxidans* și în general bacteriile care produc cantități mari de mucopolizaharide (Avakyan *et al.* 1986).

De asemenea, a fost demonstrată solubilizarea Si împreună cu alți constituenți din minerale primare ca afiboli și biotit de către acizi formați de diferite ciuperci, levuri și bacterii (Eckhardt, 1980).

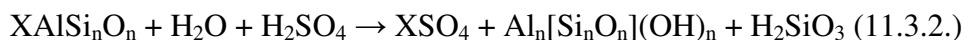
În ultimii ani a fost demonstrat faptul că în special genul *Penicillium sp.* contribuie pe scară largă la solubilizarea și mobilizarea aluminosilicaților (Ullman, 2005).

În cazul nostru, în analizele microbiologice au fost identificate, în depunerea albă, ciuperci în cantități mari, unele dintre ele ca *P. notatum*, *A. niger* și *A. thomii* fiind bine cunoscute, după cum am văzut mai sus, în solubilizarea aluminosilicaților.

În pereții cavității Kiesberg, în zonele în care comunitățile de acidithiobacili sunt bine dezvoltate metabolizând compușii cu sulf, feldspații sunt solubiliizați cu acidul format din activitatea bacteriilor chemolitotrofe. După cum am observat, în toate cazurile studiate de noi în cavitatea Kiesberg, în comunitățile de microorganisme, alături de acidithiobacili ca microorganisme chemolitotrofe se găsesc în număr mare și organisme heterotrofe inclusiv fungi. Astfel, pe lângă acidithiobacili, în solubilizarea aluminosilicaților și acestea au un rol important.

De la locul solubilizării, ei sunt transportați până în balta cu depuneri, depunându-se în zonele cu curgere lentă. Alterarea acestora continuă și mai intens în balta cu depuneri, în depunerea albă, sub acțiunea produșilor metabolici ai ciupercilor identificate de noi aici.

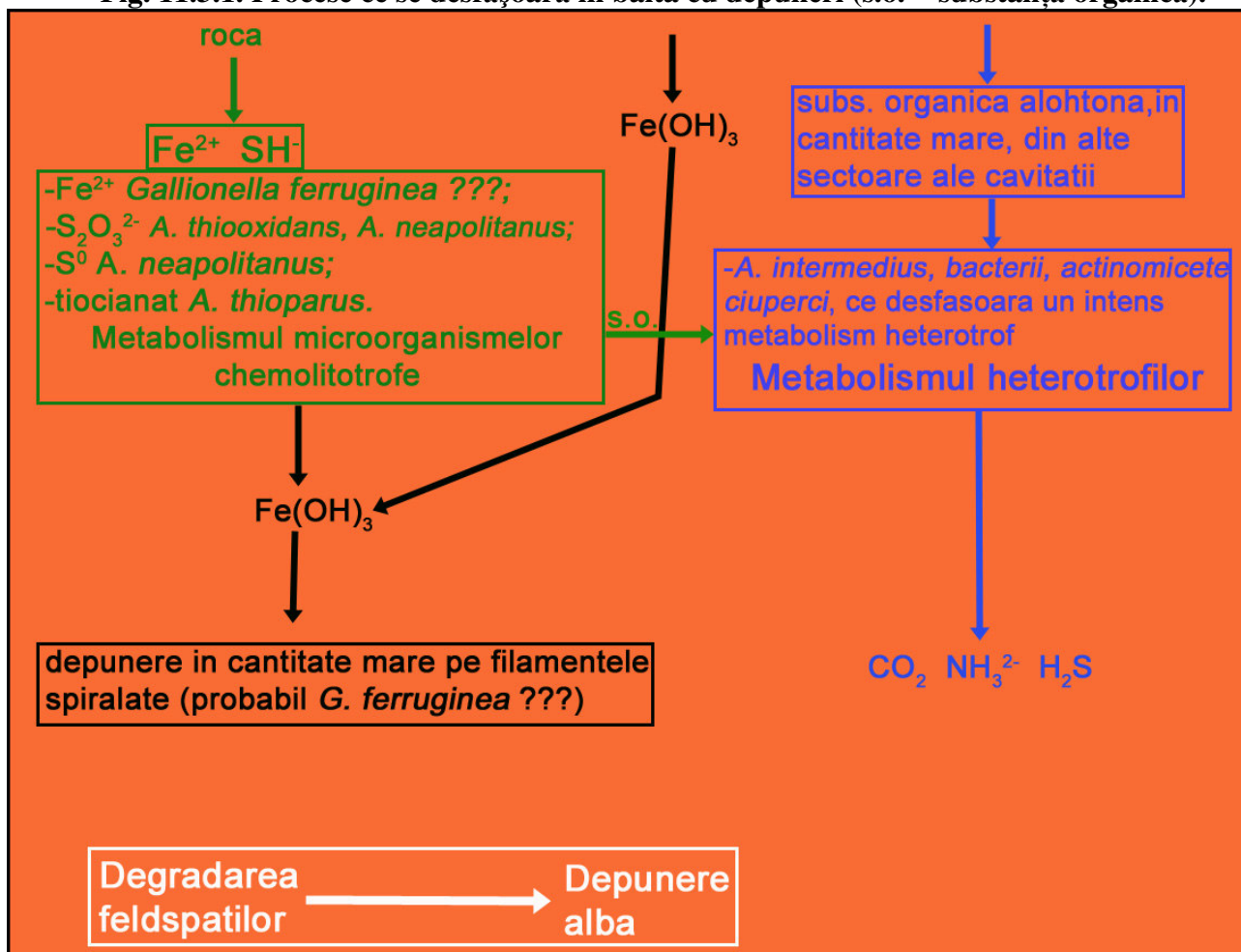
Reacția generală o putem scrie astfel:



În această ecuație generală X poate fi Na^+ , K^+ , Ca^{2+} etc.

Partea a-V-a. Mecanisme metabolice care stau la baza apariției formațiunilor studiate.

Fig. 11.3.1. Procese ce se desfășoară în balta cu depuneri (s.o. = substanță organică).



Ca și concluzii finale, referitor la balta cu depuneri, putem considera următoarele (Fig. 11.1.):

- este un bazin cu apă, cu un pH aproape neutru ce se află în una din cele mai joase zone ale cavității Kiesberg. Rezultată prin drenajul apelor din cavități și prezintă două tipuri de depuneri: depunerea roșie care reprezintă 90% din suprafața bălții și depunerea albă care reprezintă doar 10%.
- în depunerea roșie au fost identificate zece specii de microorganisme dintre care patru sunt bacterii chemolitotrofe, iar restul sunt heterotrofi. După prezența filamentelor spiralate, care formează depunerea roșie presupunem existența bacteriei *Gallionella ferruginea* care oxidează Fe^{2+} . În depunerea albă au fost identificate trei specii de fungi.
- populațiile speciilor de acidithiobacili identificați, realizează oxidarea compușilor cu sulf reduși, rezultați din oxidarea piritei din pereții cavității. În urma activității populațiilor chemosintetizante rezultă substanță organică, care împreună cu substanța organică alohtonă este descompusă de către populațiile de microorganisme heterotrofe.
- heterotrofele sunt dominante, observându-se o creștere a acestora în sezoanele uscate.
- în balta cu depuneri, în depunerea roșie, are loc o intensă activitate chemolitotrofă, dar o și mai intensă activitate heterotrofă, aici realizându-se descompunerea substanțelor organice din cavități, ca într-un bazin de epurare biologică, la un pH aproape neutru.

Capitolul 11. Procese și mecanisme metabolice.

- depunerea albă, în care au fost identificate trei specii de ciuperci, reprezintă o zonă de alterare secundară a feldspațiilor (vezi capitolul 11).

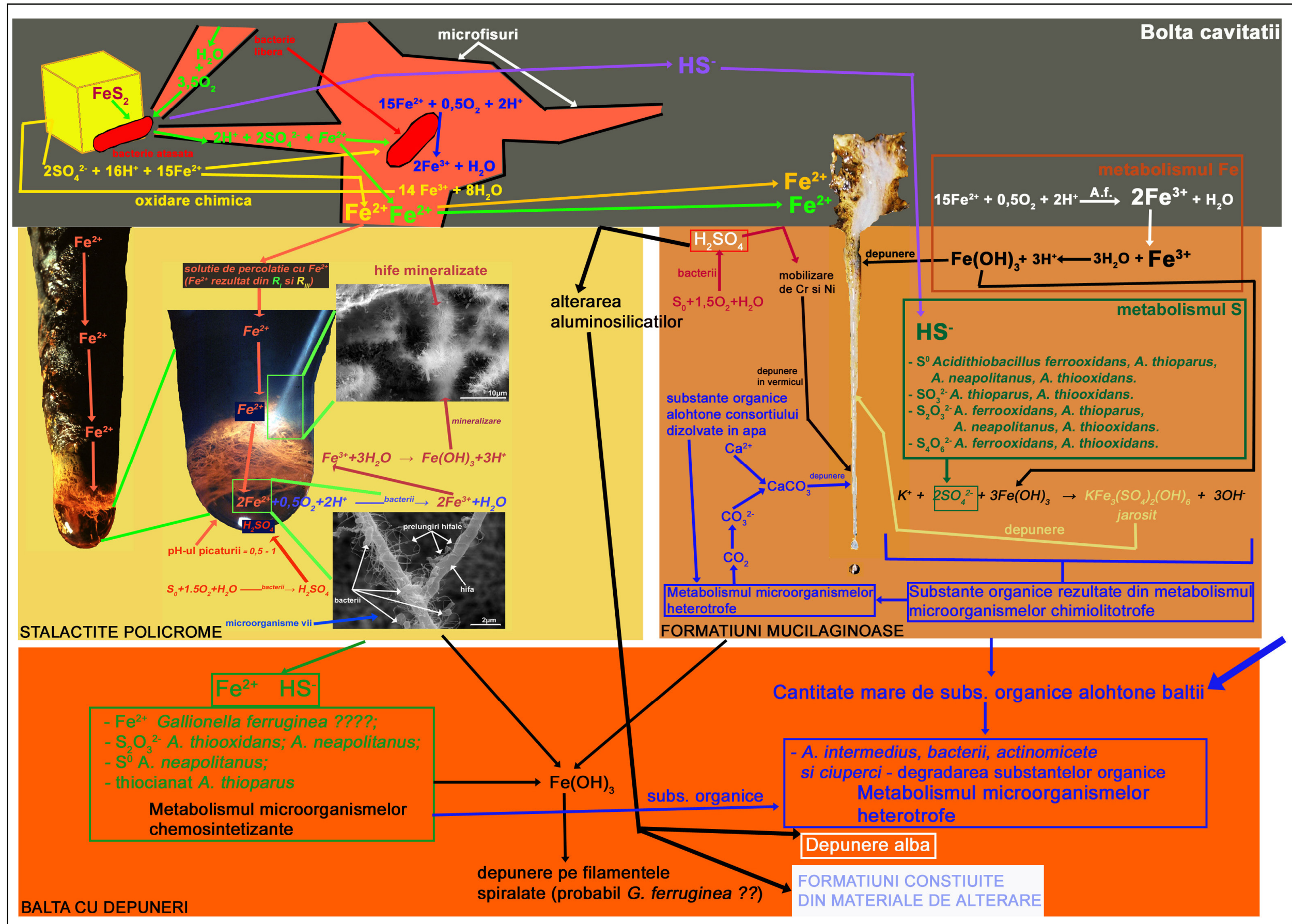
11.4. Procese ce se desfășoară în formațiunile constituite din materiale de alterare

Scurgerea parietală albă și stalactita cu depunere stalagmitică albă, descrise în capitolele anterioare și numite de noi „formațiuni constituite din materiale de alterare” reprezintă, la fel ca și depunerea albă din baltă, rezultatul alterării chimico-biologice a mineralelor aluminosilicate din roca pereților cavității.

După cum spuneam mai sus, mecanismul principal prin care microorganismele contribuie major la mobilizarea și alterarea mineralelor aluminosilicate din roci, este producerea diverselor tipuri de acizi. În ecuația generală (11.3.2.), am observat acțiunea H_2SO_4 , rezultat din oxidarea sulfului de către tiobacili, asupra aluminosilicaților. Aluminosilicații cu K, Fe, Ca, Mg etc. din roci, sunt însă atacați și de alți acizi organici sintetizați de o gamă foarte largă de microorganisme heterotrofe. Acizii organici care conțin grupări funcționale de tipul carboxil ($-COOH$), hidroxil (OH) sau amino (NH_2) rezultă fie din catabolismul substanțelor organice sau sunt secretați de microorganisme (Dévigne, 1980). Aceștia favorizează sechestrarea cationilor polivalenți (Al^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}) sub formă de complexe organometalice solubile (Zarnea, 1994).

Stadiul final al degradării este reprezentat de apariția unor compuși ca SiO_2 , Al_2O_3 , TiO_2 , FeO sau Fe_2O_3 , K_2O , Na_2O , MgO , CaO (argile) (pe care noi le-am identificat în cantități mici și în formațiunile mucilaginoase), sau soluțiile lor. Aceste stadii finale însă, nu sunt întotdeauna atinse, de cele mai multe ori procesele degradative se rezumă la distrugerea parțială a edificiilor chimice ale mineralelor, nefiind exclusă ruperea unor molecule definitorii (tetraedre de SiO_4 , AlO_4 etc.) (Zarnea, 1994). În urma modificării structurii chimice, prin hidroliză, rezultă aluminosilicați mai simpli, bogați în grupări hidroxil (OH), de multe ori amorfi care iau diverse forme lamelare (*Fig. 10.4.2. b.*, *Fig. 10.4.3.*), sferoidale (*Fig. 10.4.1.*, *Fig. 10.4.2*) etc. (Lăcătușu, 2000; Crăciun, 2000; Mârza, 2002).

Fig. 11.1. Vedere generală asupra proceselor ce se desfășoară în siturile analizate.



Partea a-V-a. Mecanisme metabolice care stau la baza apariției formațiunilor studiate.

Partea a-VI-a. Utilizarea practică a consorțiilor în deferizarea și demanganizarea apelor de foraj

Apele freactice reprezintă acumulări de apă în anumite straturi permeabile ale scoarței terestre deasupra unor straturi impermeabile, reprezentând surse extrem de importante pentru alimentarea unor comunități umane.

În concepția clasică este considerat faptul că pe măsură ce apele de suprafață circulă prin straturile permeabile până la locul acumulării în corpuri de apă freatică, ele se debarasează prin fenomene de adsorbție de diferite substanțe chimice reziduale sau microorganisme, având astfel un grad mare de puritate. Astăzi însă, se cunoaște bine faptul că datorită poluării difuze, constante la nivel global, apele subterane conțin o serie de substanțe provenite din industrie și agricultură, dar și microorganisme (Zarnea, 1994).

Pe lângă substanțele poluatoare, ajunse la acest nivel din diverse activități umane, apele subterane mai conțin și în mod natural diverși ioni metalici în cantități destul de mari, aceasta fiind în funcție de geologia straturilor permeabile în care se află corpul de apă. Astfel, în general, în apele freactice în cantități însemnate se află fierul și manganul.

Pentru alimentarea localităților, apele freactice sunt exploatate prin foraje la diferite adâncimi, după care sunt supuse unor procese de tratare pentru potabilizare. În uzinele de tratare, apele provenite din foraje sunt deferizate și demanganizate prin oxigenare puternică, după care sunt filtrate prin filtre de nisip pentru reținerea precipitatelor de hidroxid feric și de mangan (Nitescu, 1977).. La sfârșitul proceselor de tratare, apele sunt supuse și unor procese de dezinfecție, pentru îndepărtarea microorganismelor de obicei prin clorinare (STAS 9295-88, Legea 458).

Deferizarea și demanganizarea apelor de foraj, în stațiile de tratare, prin metoda amintită mai sus are o serie de dezavantaje, deoarece filtrele trebuie să se spele des, acumulându-se cantități mari de nămoluri de hidroxid feric și de mangan. La ora actuală, în Germania se încearcă, cu rezultate bune se pare, o metodă de deferizare și demanganizare *in situ* prin injecții de oxigen direct în corpurile de apă subterană (Rott, *et al.*, 1993; David, 1998; David, *et al.*, 2005; David, 2006). Această metodă este în faza experimentală și există încă suspiciunea colmatării în timp.

Asupra apelor freactice au fost realizate numeroase studii microbiologice (Chapelle, 1993; Fry, *et al.*, 1997; Geldreich, 1990; Madsen, *et al.*, 1993; Massmann, *et al.*, 2003; Moore, *et al.*, 2003). Metode biologice, de îndepărtare a diverșilor ioni din efluenți minieri și ape freactice cu ajutorul microorganismelor, au fost încercate de mai mult timp, reușindu-se rezultate notabile în special cu ionii de arsen (Ferguson, *et al.*, 1972; Wakao, *et al.*, 1988; Mandl, *et al.*, 1992; Fuller, *et al.*, 1993; Ahmann, *et al.*, 1994; Leblanc, *et al.*, 1996; Islam, *et al.*, 2004), dar și cu mai mulți ioni de metale sau nemetale (Tuttle, *et al.*, 1969; Jaynes, *et al.*, 1984; Ferris, *et al.*, 1989; Baker, *et al.*, 2003; Xu, *et al.*, 2003; Gadd, 2004; Lee, *et al.*, 2006; Vanbroekhoven, *et al.*, 2007; etc).

Capitolul 12. Experimentarea în coloane aerate

Experimentul nostru a fost realizat pe coloane experimentale de laborator din plexiglas, în care a fost testată capacitatea consorțiului de microorganisme din stalactitele și scurgerile mucilaginoase, în două trepte, de a oxida fierul și manganul redus din apa de foraj și de a le depune apoi sub formă de oxizi într-un anumit interval de timp. Datele au fost comparate cu cele dintr-o coloană martor, fără microorganisme, în care s-a realizat doar aerare. După fiecare experimentare, din apa de foraj brută și din efluentul din test și martor s-au realizat măsurători ale concentrației de fier și mangan.

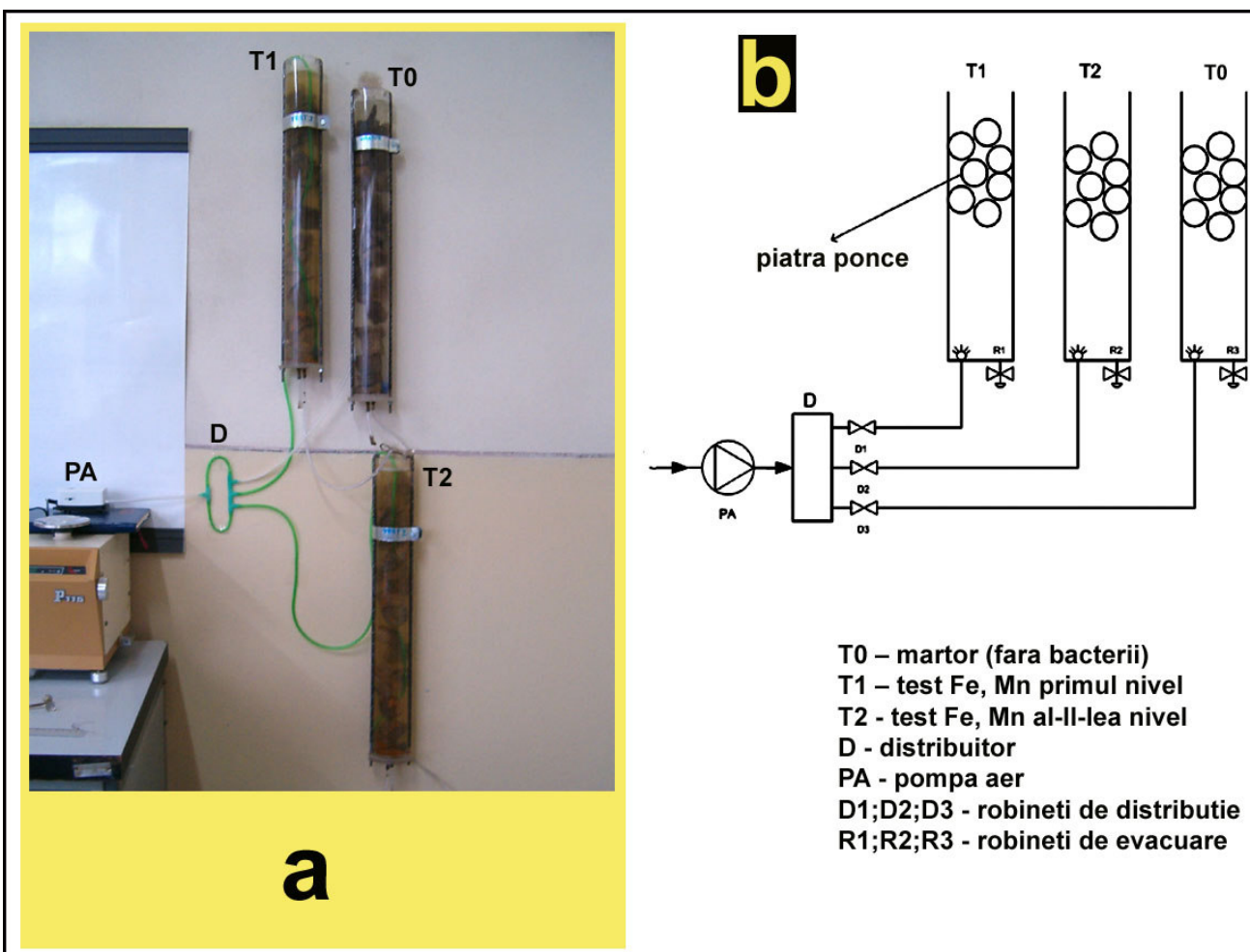
Capitolul 12. Experimentarea în coloane aerate.

12.1. Alcătuirea coloanelor

După cum precizam mai sus, în cadrul acestui experiment au fost utilizate trei coloane cilindrice de plexiglas cu un volum de 3 litri fiecare. Aceste coloane au fost confecționate din tuburi de plastic, care au fost astupate la bază cu bușoane din plexiglas, în fiecare bușon existând câte un orificiu cu furtun pentru evacuarea apei.

Cele trei coloane au fost aerate cu un volum egal și constant de aer. Pentru aceasta s-a utilizat o pompă de aer cu filtru, cu o capacitate de pompare de trei litri pe minut, de tip acvariu. De la această pompă, pornește un furtun care intră apoi într-un distribuitor cu trei ieșiri, aceste ieșiri fiind prevăzute cu robineti pentru a putea eventual opri aerarea pe una sau mai multe din aceste ieșiri. Distribuitorul are rolul de a egaliza cantitatea de aer care intră în cele trei coloane. De la distribuitor, pornesc trei furtunuri până la fundul celor trei coloane, fiecare furtun fiind prevăzut la capăt cu o piatră de aerare pentru a forma bule mici de aer (Fig. 12.1.1. a.,b.).

Fig. 12.1.1. a. Imagine cu instalația experimentală în laborator; b. Schema instalației experimentale.



După montarea coloanelor pe perete și după montarea instalației de aerare în interiorul coloanelor, toate acestea au fost sterilizate cu alcool 90⁰ timp de zece minute.

După sterilizarea cu alcool și după evaporarea peliculei de alcool rămasă pe pereții coloanelor și tuburile de aerare, coloanele au fost umplute cu spărtură de piatră ponce cu porozitate

Partea a-VI-a. Utilizarea practică a consorțiilor în deferizarea și demanganizarea apelor de foraj.

mare, sterilă. Sterilizarea pietrei ponce s-a realizat în etuvă la 190⁰C timp de 60 de minute, iar rolul acesteia este de suport pentru consorțiul de microorganisme care a fost inoculat în două din cele trei coloane.

După introducerea pietrei ponce, coloanele au fost acoperite cu pânză multistrat din bumbac sterilizată în etuvă la fel ca și piatra ponce.

În experimentul nostru, două din cele trei coloane au fost coloanele test (T1 și T2), care au fost inoculate cu consorțiul de microorganisme. Prima coloană (T1) reprezintă prima treaptă de tratare biologică, alimentată direct cu apă brută de foraj, iar coloana a doua (T2) reprezintă a doua treaptă de tratare, alimentată din T1.

Pe lângă coloanele experimentale T1 și T2, a mai fost utilizată și o coloană martor (T0), care a funcționat paralel cu cele două coloane test, dar nu a fost inoculată cu microorganisme, deci a funcționat în condiții de sterilitate (*Fig. 12.1.1. a., b.*). Coloana martor a fost alimentată direct cu apă brută de foraj și a fost utilizată pentru compararea rezultatelor cu cele două coloane test, în coloana martor oxidarea fierului și manganului făcându-se doar chimic, datorită oxigenării.

Apa de foraj utilizată în experiment a fost sterilizată prin filtrare.

12.2. Inocularea și amorsarea coloanelor

După realizarea instalației sterile și montarea coloanelor pe peretele laboratorului (*Fig. 12.1.1. a.*), s-a realizat inocularea celor două coloane test: T1 și T2. Inocularea a fost realizată cu câte 500ml de consorțiu de microorganisme recoltate din scurgerile mucilaginoase din mina Kiesberg.

Recoltarea inoculului s-a realizat în vase de sticlă sterile, iar inocularea pe cele două coloane a fost făcută cu cel mult 24 de ore de la recoltarea din teren.

După inoculare, coloanele T1 și T2 au fost umplute cu apă de foraj sterilă, timp de 48 de ore realizându-se *amorsarea coloanelor*.

Prin amorsarea coloanelor, înțelegem fixarea inoculului activ, adică a consorțiului mucilaginos de microorganisme, la piatra ponce sterilă. Această operațiune este necesară pentru a evita spălarea inoculului la golirea coloanelor, dar și pentru a evita antrenarea lui în apa de foraj în timpul aerării.

Amorsarea s-a realizat, așa cum spuneam, timp de 48 de ore alternându-se intervale de aerare ușoară de 30 minute, cu intervale de stagnare a aerării de 10 minute. După cele 48 de ore de amorsare a celor două coloane test T1 și T2, s-a trecut la experimentul propriu zis.

12.3. Experimentarea și măsurarea parametrilor

Experimentul a urmărit observarea capacității de oxidare a fierului și manganului în cele două coloane test (T1 și T2) inoculate cu microorganisme, în comparație cu un martor (T0) steril în care cele două elemente sunt oxidate doar chimic sub influență oxigenului introdus de noi în instalație într-un interval de timp de 25 de minute. Astfel, a fost introdusă, în același timp, apă de foraj sterilă în coloana T1 (prima treaptă de tratare biologică) și în coloana martor T0 aerându-se timp de 25 de minute în cantități egale cele două coloane.

În stațiile de tratare, apele provenite din foraje sunt deferizate și demanganizate printr-o oxigenare puternică, consumatoare de energie. Din punct de vedere economic, un interval de 25 de minute de aerare este considerat rentabil de aceea, în aceste teste și noi am folosit acest interval de aerare.

Capitolul 12. Experimentarea în coloane aerate.

După 25 de minute de funcționare deci, au fost recoltate probe de apă din efluentul lui T1 și T0, iar efluentul lui T1 a fost introdus în T2 (a-II-a treaptă de tratare biologică). Acesta a fost aerat de asemenea 25 de minute după care s-a recoltat probă de apă pentru analiză și din efluentul tubului T2. A doua treaptă de tratare T2 a fost utilizată pentru a se observa dacă după cele 25 de minute optime de tratare din T1, concentrația fierului și manganului continuă să scadă, în cazul în care s-ar prelungi astfel perioada de aerare (peste limita rentabilității).

Înainte de recoltarea efluenților coloanelor test și martor au fost stocate de fiecare dată în vase separate, sterile, timp de 10 minute, aceste vase având rolul de decantoare.

Între perioadele de testare, coloanele sunt umplute cu apă de foraj și sunt aerate douăzeci de minute pe oră pentru a fi menținut activ consorțiul testat.

Testarea după modelul de mai sus a fost realizată timp de șase zile, iar analizele concentrației fierului și manganului au fost realizate imediat după recoltare cu un spectrometru de absorbție atomică (vezi capitolul 7).

Având în vedere faptul că apa de foraj a fost stocată într-un rezervor închis, dar în care se puteau totuși realiza și unele oxidări chimice ale celor două elemente analizate, de fiecare dată, pe lângă probele pentru analiză din T1, T2 și T0, s-a recoltat probă și din apa de foraj din rezervor (R).

Rezultate analizelor fierului și manganului în acest interval de șase zile sunt înscrise în (Tab. 12.3.1.).

Tab. 12.3.1. Rezultatele analizelor fierului și manganului în experimentul cu coloane aerate.

Fe				Mn			
T ₁	T ₂	T ₀	R	T ₁	T ₂	T ₀	R
0,44	0,23	0,82	0,954	0,551	0,405	0,617	0,815
0,44	0,24	0,82	0,95	0,54	0,455	0,74	0,823
0,595	0,275	0,73	1,305	0,649	0,439	0,718	0,809
0,216	0,182	0,606	0,64	0,536	0,428	0,708	0,835
0,327	0,278	0,528	0,93	0,58	0,506	0,74	0,8
0,17	0,14	0,24	0,26	0,48	0,36	0,71	0,82

Partea a-VI-a. Utilizarea practică a consorțiilor în deferezarea și demanganizarea apelor de foraj.

Fig. 12.3.1. Reprezentarea grafică a rezultatelor analizelor chimice ale fierului din cele șase zile de experiment.

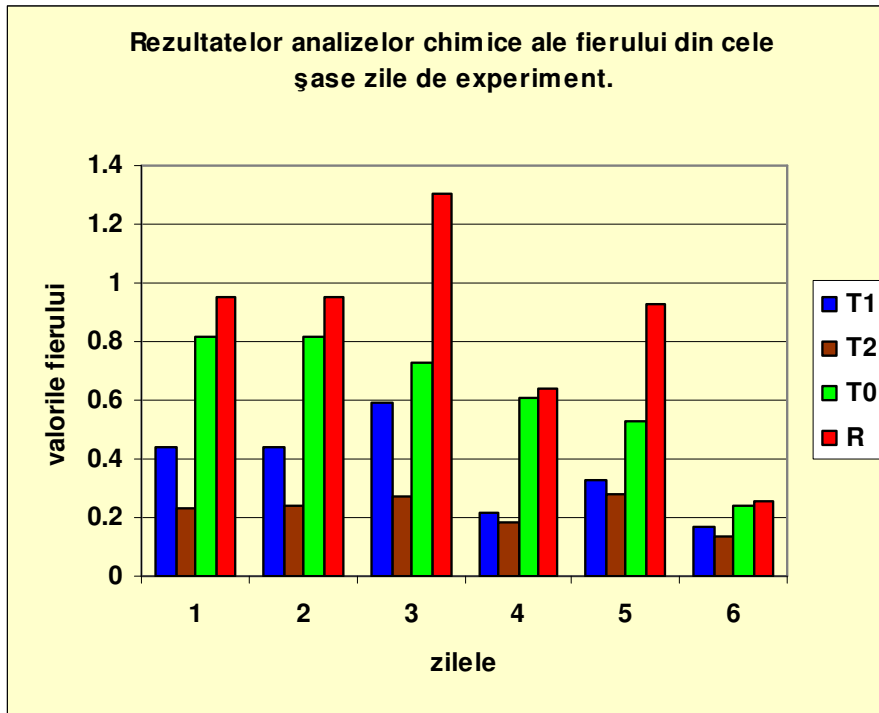
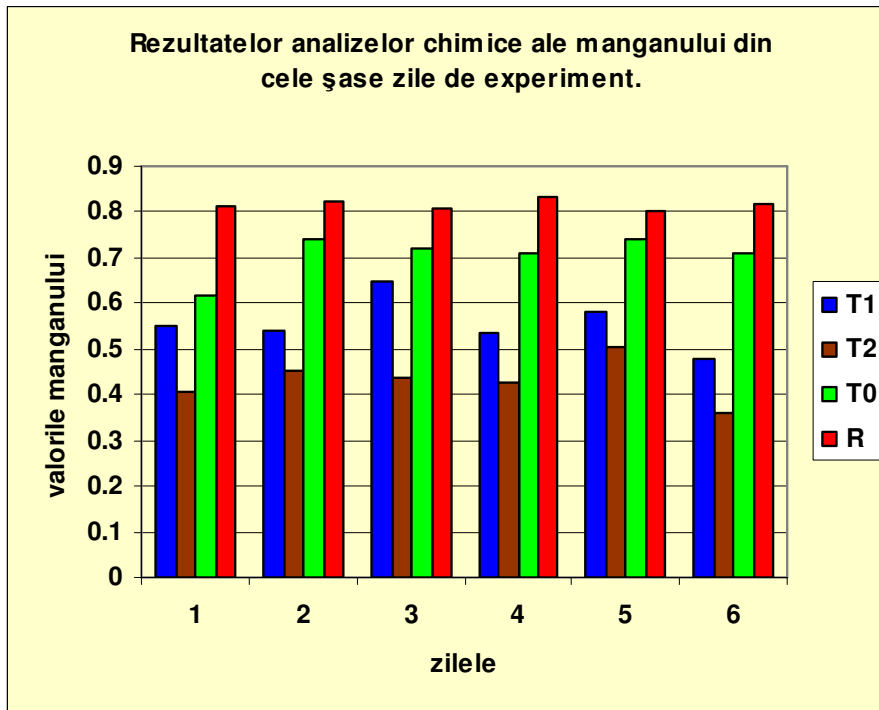


Fig. 12.3.2. Reprezentarea grafică a rezultatelor analizelor chimice ale manganului din cele șase zile de experiment.



Capitolul 12. Experimentarea în coloane aerate.

Din rezultatele obținute în urma analizelor prezentate în *Tab. 12.3.1.* și reprezentate în *Fig. 12.3.1.* și *12.3.2.* se observă faptul că atât în coloanele test cât și în martor cantitatea de fier oxidată a fost mai mare decât cea de mangan, în intervalul de testare de 25 de minute.

Pe de altă parte, în coloana martor sterilă, în care oxidările celor două elemente au fost doar chimice, la sfârșitul experimentului, concentrația fierului și manganului în efluent este sensibil mai mare decât în coloanele test, unde oxidarea a fost biologică și chimică.

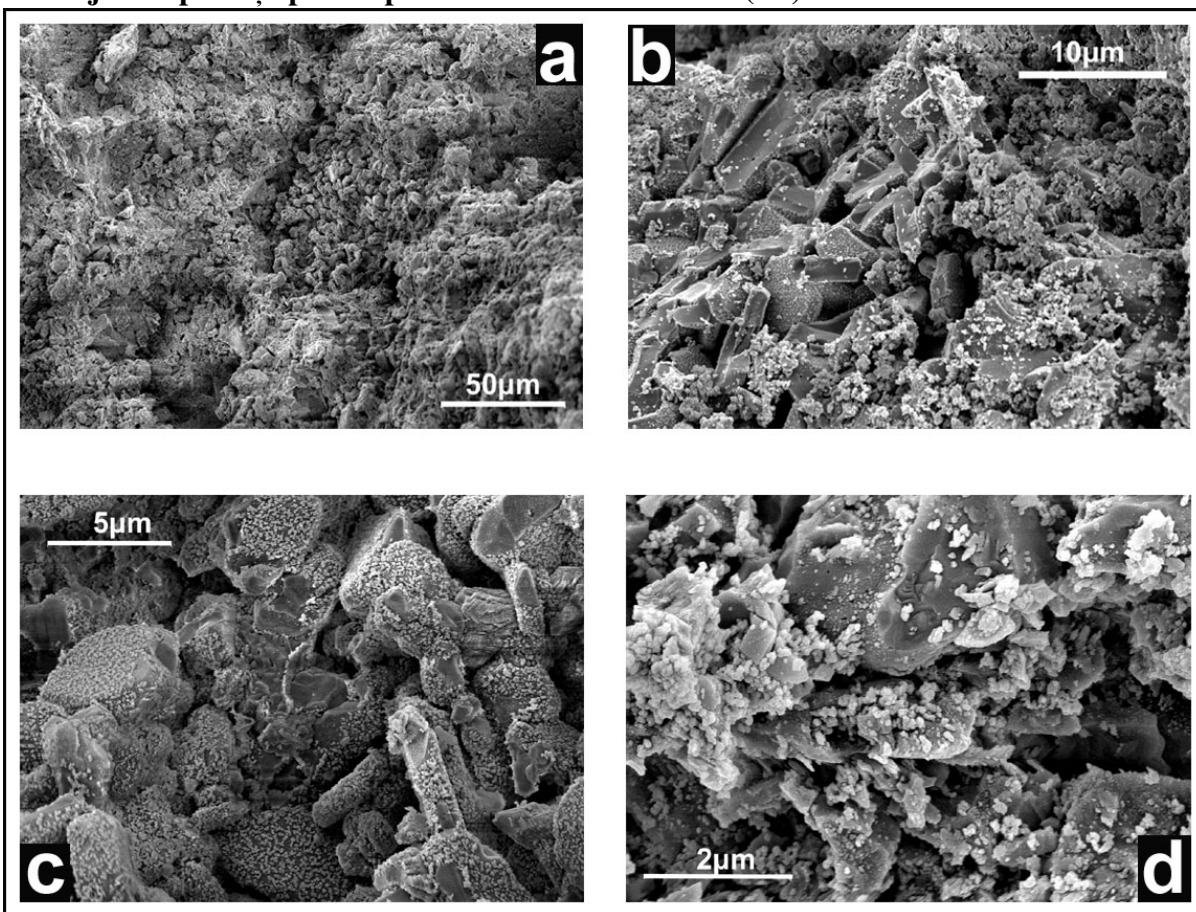
În concluzie deci, Consorțiul de microorganisme provenit din scurgerile mucilaginoase din mina Kiesberg accelerează destul de mult oxidarea fierului și manganului din apa de foraj față de oxidarea chimică doar cu aer insuflat, într-un interval de timp de experimentare și condiții de aerare identice.

12.4. Aspecte electronomicroscopice ale pietrei ponce din coloanele experimentale

După funcționarea coloanelor experimentale timp de 30 de zile, din fiecare a fost recoltată piatră ponce în condiții sterile și a fost fixată cu fixator Trump pentru microscopie electronică. Din fiecare eșantion de piatră ponce recoltat, s-au realizat preparate pentru microscopia electronică de baleiaj (vezi capitolul 9), observându-se apoi depunerile de oxid de fier și de mangan, cât și dezvoltarea biofilmului bacterian în porii pietrei ponce (a substratului).

În cazul coloanei martor (T0), sterilă, neinoculată cu microorganisme, se observă doar prezența unor cristale mici de hidroxizi depuse uniform în porii pietrei ponce (*Fig. 12.4.1.*).

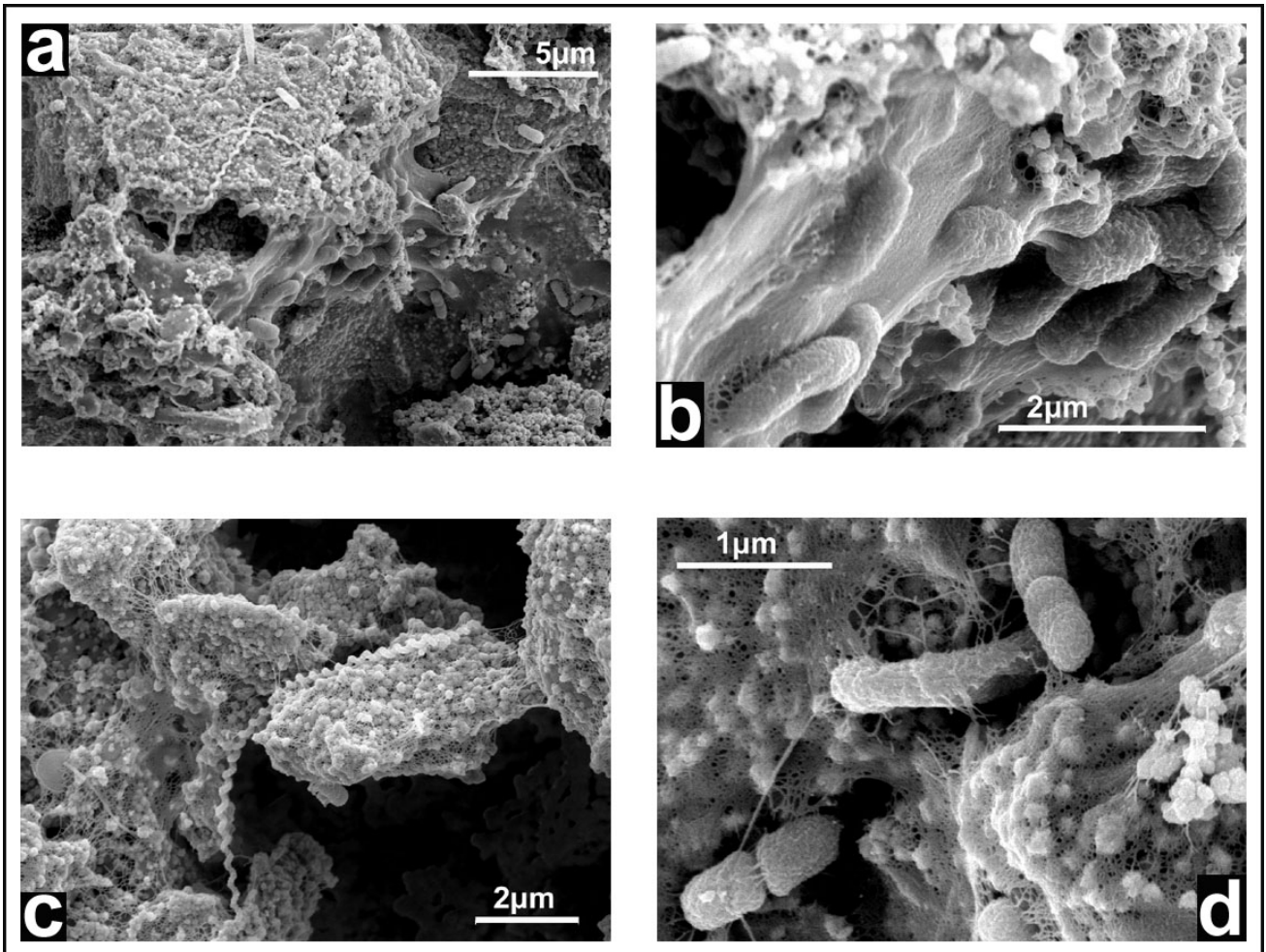
Fig.12.4.1. a., b., c., d. Imagini cu diferite grandismente în microscopie electronică de baleiaj cu suprafața pietrei ponce din coloana martor (T0).



Partea a-VI-a. Utilizarea practică a consorțiilor în deferizarea și demanganizarea apelor de foraj.

În coloanele test (T1 și T2) observăm o dezvoltare foarte bună a biofilmului în porii pietrei ponce, în masa de mucopolizaharide depunându-se mai rapid cantități însemnate de hidroxid feric (Fig. 12.4.2.).

Fig.12.4.2. a., b., c., d. Imagini cu diferite mărimi în microscopie electronică de baleiaj cu suprafața pietrei ponce acoperită cu biofilm bacterian din coloanele test (T1și T2).



Biofilmul are o dezvoltare invazivă pe piatra ponce, celulele fiind bine legate între ele prin intermediul mucopolizaharidelor extracelulare.

După un anumit timp de funcționare a sistemului, care poate fi de câțiva ani după depunerile observate în mina Kiesberg, piatra ponce folosită ca suport pentru microorganisme va fi total colmatată astfel încât ea ar trebui înlocuită.

12.5. Concluziile experimentului

În urma acestui experiment de laborator executat la scară mică putem trage mai multe concluzii:

-în aceleași condiții experimentale, într-un interval de timp de 25 de minute, fierul este oxidat mai rapid decât manganul atât chimic, cât și prin procese combinate biologice și chimice, iar oxidarea celor două elemente continuă și după intervalul de 25 de minute;

Capitolul 12. Experimentarea în coloane aerate.

-prin procesele combinate biologice și chimice din T1 și T2 fierul și manganul este oxidat mai rapid decât prin procesele pur chimice din T0;

-această metodă biologică, de îndepărtare a ionilor de fier și de mangan, are o rentabilitate relativ scăzută, în ideea aplicării ei la scară industrială, deoarece este nevoie de un volum relativ mare de substrat (piatră ponce sau materiale ceramice poroase) ce trebuie schimbat periodic. Totuși, acest experiment, deschide noi drumuri în testarea eficienței consorțiilor microbiene din mina Kiesberg pentru îndepărtarea altor ioni din apele de foraj sau uzate. Pe de altă parte, înțelegerea modului de depunere a hidroxidului feric în biofilmele bacteriene are implicații deosebite în înțelegerea modului de colmatare a filtrelor longitudinale de nisip, folosite în tehnologia clasică de deferizare a apelor de foraj de adâncime, sau în colmatarea straturilor în subteran în tehnologia de deferizare subterană.

Concluzii generale

Prin această teză de doctorat, în mina Kiesberg din S-W-tul României, s-a început cercetarea unor interesante asociații microbiene formate dintr-o varietate mare de microorganisme. Aceste consorții de microorganisme, au la bază compușii anorganici reduși, aflați în cantități mari în roca în care a fost săpată cavitatea, iar rezultatul metabolizării acestora este formarea de compuși oxidați, mai stabili care se depun în cantități mari la exteriorul celulelor vii formând structuri minerale, în totalitate de origine biogenă.

După cum s-a putut observa din această teză, cercetările noastre de până acum sunt doar cercetări de început, existând, pe viitor, încă multe determinări de făcut și presupuneri de confirmat. Lipsa unor determinări a avut la bază fie unele dificultăți întâlnite în teren, care trebuie pe viitor diminuate, fie o serie de probleme tehnice din laborator.

Astfel, din datele acumulate până acum în cadrul acestei teze, putem trage următoarele concluzii:

I. În microfisurile rocii în care a fost săpată cavitatea Kiesberg:

1. microorganisme chemolitotrofe de tipul acidithiobacililor, oxidează, direct și indirect, cantități importante de pirită și alte sulfuri metalice;

2. prin mediul acid pe care îl creează, declanșează alterarea unor minerale ale rocii, având ca rezultat mobilizarea unor elemente ca Ni, Cr, etc., sau transformarea altor minerale cum sunt aluminosilicații în forme mai simple, hidratate, solubile și mobile. Acestea sunt transportate de către apă în alte sectoare ale cavității unde sunt depuse (depunere albă din balta cu depuneri, formațiuni constituite din materiale de alterare).

II. "Stalactitele policrome":

1. reprezintă rezultatul asocierii dintre *Acidithiobacillus ferrooxidans*, care formează o populație chemolitotrofă dominantă (80%), și șase specii de fungi din genul *Penicillium*;

2. cantități mari de Fe^{2+} sunt oxidate de către *A. ferrooxidans*, rezultând $Fe(OH)_3$ care se depune la exteriorul hifelor de *Penicillium* mineralizându-le, sau la exteriorul biofilmului, formând o lamină de $Fe(OH)_3$ multistratificată. Hifele mineralizate formează scheletul intern al stalactitei, iar laminele de hidroxid feric formează învelișul extern cu prelungiri și în interiorul acesteia;

3. procesul biologic care stă la baza formării și creșterii lor este permanent, adică se desfășoară pe tot parcursul anului, stalactitele policrome fiind alimentate permanent prin bolta cavității cu soluție de percolație printr-un sistem de fisuri fine;

4. în perioadele sărace în precipitații, viteza de curgere a soluției de percolație este mult mai lentă, aceasta fiind mai concentrată. Astfel, variațiile numerice ale populațiilor de microorganisme de la perioadele bogate în precipitații la cele uscate se datorează mai mult unui efect inhibitor pe care îl au diverși ioni din soluția hiperconcentrată din perioadele uscate;

5. s-a observat existența unei tendințe de creștere a numărului microorganismelor direct proporțional cu precipitațiile în cazul tuturor speciilor identificate cu excepția lui *P. griseo-azureum*, care are o tendință de creștere invers proporțională;

6. deși atât *Acidithiobacillus ferrooxidans* cât și genul *Penicillium* sunt organisme des întâlnite în apele acide de drenaj minier, până în acest moment, noi nu am identificat în literatura de specialitate formațiuni minerale asemănătoare care să aibă la origine o astfel de asociere mutualistă între *A. ferrooxidans* și *Penicillium*.

III. "Formațiunile mucilaginoase":

1. reprezintă consorții de microorganisme, formate dintr-un număr de șaptesprezece specii cu încadrare sistematică diferită, cuprinzând microorganisme chemolitotrofe, dar și heterotrofe, reunite într-o masă compactă de mucopolizaharide;

2. substanța organică autohtonă, de la producătorii primari (acidithiobacilii), împreună cu substanța organică alohtonă, venită cu apa din alte sectoare ale cavității este descompusă de microorganismele heterotrofe. Heterotrofele sunt reprezentate de actinomicete, cât și de doisprezece specii de fungi;

3. populațiile de microorganisme identificate suferă variații numerice destul de mari de la sezoanele bogate în precipitații la cele uscate, debitul apei care alimentează formațiunile mucilaginoase fiind și el foarte variabil în cele două sezoane;

4. atât la debite mari cât și la debite scăzute ale apei, speciile dominante sunt cele de acidithiobacili chemolitotrofi cu peste 60%, iar heterotrofii reprezintă puțin peste 30%;

5. toate speciile determinate în formațiunile mucilaginoase prezintă o tendință de corelații pozitive cu precipitațiile, cu excepția lui *Cladosporium herbarum*, care este singura specie ce prezintă tendințe de corelații negative;

6. metabolismul oxidativ al chemolitotrofelor este foarte intens, oxidând din pirită, pe de o parte Fe^{2+} din care rezultă $\text{Fe}(\text{OH})_3$ care se depune în mucopolizaharidele extracelulare constituind formațiuni minerale de tipul stalactitelor sau crustelor, iar pe de altă parte compușii cu sulf din care rezultă cantități însemnate de SO_4^{2-} ;

7. din $\text{Fe}(\text{OH})_3$ nedepus și din SO_4^{2-} , la care se adaugă ioni de K^+ , rezultă cantități însemnate (chiar sub formă de depozite pe pereții galeriei) de *jarosit*;

8. în biofilmele microbiene compacte din „formațiunile mucilaginoase”, se acumulează alături de Fe și unii ioni ca Ni și Cr, mobilizați din rocă de către H_2SO_4 rezultat din oxidarea S^0 de către acidithiobacilii din microfisurile rocii. Acumularea ionilor de Fe, Ni, Cr în biofilmele bacteriene a condus la formarea unor structuri minerale vermiculare de origine biogenă, astfel de formațiuni *nefiind identificate în literatura de specialitate, până în prezent*;

9. în masa de mucopolizaharide a consorțiului de microorganisme, izolat de mediul exterior acid, din activitatea heterotrofilor rezultă CO_2 și apoi CO_3^{2-} , iar împreună cu ionii de Ca^{2+} din apă rezultă cristale izolate de calcit, care sunt protejate de exterior prin filmul de mucopolizaharide. Astfel de cristale de calcit de origine biogenă, care să apară în medii cu o aciditate mare în interiorul consorțiilor de microorganisme, izolate total de mediul exterior acid prin înveloparea într-o matrice de mucopolizaharide bacteriene, *nu a fost raportată în literatura de specialitate, până în prezent*;

10. consorțiile mucilaginoase de microorganisme sunt relativ comune în mediile bogate în sulfuri metalice, termale sau mezotermale, fiecare având particularități caracteristice determinate de mediul în care au apărut și evoluat.

IV. "Balta cu depuneri":

1. reprezintă un adevărat bazin de epurare, cu un pH care se apropie de neutralitate în care, pe de o parte se continuă metabolismul microorganismelor chemolitotrofe, iar pe de altă parte, la intensitate mare, metabolismul microorganismelor heterotrofe;

2. în cele două tipuri de depuneri: roșie și albă, au fost identificate treisprezece specii din care zece în depunerea roșie și trei în depunerea albă;

3. heterotrofele sunt dominante atât în sezoanele bogate, cât și în cele sărace în precipitații, observându-se totuși o creștere a acestora în sezoanele uscate;

4. ca și metabolism chemolitotrof, are loc, pe de o parte oxidarea Fe^{2+} din care rezultă $\text{Fe}(\text{OH})_3$, care se depune pe filamente organice spiralate (presupunem că de *Gallionella ferruginea*) rezultând depunerea roșie, iar pe de altă parte oxidarea unor compuși ai sulfului;

5. heterotrofele, care se află în număr mare, metabolizează mai ales materia organică de origine alohtonă, care vine, în cantități mari, odată cu apa din toate sectoarele cavității, balta aflându-se în unul din cele mai joase sectoare ale acesteia;

6. depunerea albă, reprezintă o acumulare de produși de alterare a aluminosilicaților în microfisurile rocii, alterarea continuând și în baltă sub influența acizilor organici rezultați din activitatea heterotrofilor, aici fiind identificate trei specii de fungi.

V. "Formațiunile constituite din materiale de alterare":

1. reprezintă, ca și depunerea albă, acumulări de diferite forme (sferoidale, sau plachetare) ale produșilor de alterare chimico-biologică a aluminosilicaților de tipul feldspaților;

2. formele de depunere a acestor materiale de alterare sunt fie sub formă de scurgeri pe pereții cavității, fie sub forma unor speleoteme ca stalactite cu stalagmite;

3. în pereții cavității Kiesberg, în zonele în care comunitățile de acidithiobacili sunt bine dezvoltate metabolizând compușii cu sulf, feldspații sunt solubiliizați cu acidul format din activitatea bacteriilor chemolitotrofe. Pe lângă acidithiobacili, în solubilizarea aluminosilicaților un rol important îl au și fungii;

4. de la locul solubilizării feldspaților, din pereții cavității, produșii de alterare sunt transportați prin fisurile rocii în cavități unde se depun, fie în depunerea albă din balta cu depuneri, în zonele cu curgere lentă, fie sub formă de scurgeri parietale sau stalactite cu stalagmite;

5. alterarea acestora continuă și mai intens în locurile de depunere, sub acțiunea produșilor de metabolism ai unor microorganisme.

VI. Din experimentul de deferizare și demanganizare a apelor de foraj în care s-au folosit microorganisme din formațiunile mucilaginoase:

1. în aceleași condiții experimentale, fierul este oxidat mai rapid decât manganul atât chimic, cât și prin procese combinate biologice și chimice;

2. prin procesele combinate biologice și chimice, fierul și manganul sunt oxidați mai rapid decât prin procesele pur chimice;

3. metodă biologică, de îndepărtare a ionilor de fier și de mangan, propusă de noi, deși nu are o rentabilitate prea mare în ideea aplicării ei la scară industrială, totuși, deschide noi drumuri în testarea eficienței consorțiilor microbiene din mina Kiesberg pentru îndepărtarea altor ioni din apele de foraj sau uzate și conduce la înțelegerea modului de colmatare a filtrelor folosite în tehnologia clasică de deferizare a apelor de foraj de adâncime, sau în colmatarea straturilor în subteran în tehnologia de deferizare subterană.

VII. Pentru viitor se impune continuarea cercetărilor prin:

1. completarea unor determinări microbiologice prin perfecționarea tehnicilor de izolare pe medii de cultură și a tehnicilor de determinări genetice;

2. completarea analizelor pentru determinarea speciilor minerale;

3. completarea măsurătorilor din teren;

4. experimentarea diverselor tipuri de consorții de microorganisme întâlnite în mina Kiesberg și pe alte tipuri de ape cu un conținut ridicat de metale grele.

Bibliografie

- Ahmann, D., Roberts, A. L., Krumholz, F., Morel, F. M. M. (1994) Microbe grows by reducing arsenic. *Nature*, **371**, 750.
- Aminuddin, M. D., Nicholas, J. D. (1974) Electron transfer during sulfide and sulfite oxidation in *Thiobacillus denitrificans*. *J. Gen. Microbiol.*, **82**, 115-123.
- Anbar, A. D., Holland, H. D. (1992) The photochemistry of manganese and the origin of banded iron formation. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **56**, 2595-2603.
- Anderson, K. J., Lundgren, D. G. (1969) Enzymatic studies of the iron-oxidizing bacterium, *Ferrobacillus ferrooxidans*: Evidence for a glycolytic pathway and Krebs cycle. *Can. J. Microbiol.*, **15**, 73-79.
- Aristovskaya, T. V., Zavarzin, G. A. (1971) Biochemistry of iron in soil, In: A. D. McLaren and J. Skujins, eds. *Soil Biochemistry*, Vol. **2** Marcel Dekker, New York, pp. 385-408.
- Arnold, R. G., Olson, T. M., Hoffmann, M. R. (1987) Kinetics and mechanism of dissimilative Fe(III) reduction by *Pseudomonas* sp. 200. *Biotech. Bioeng.*, **28**, 1657-1671.
- Avakyan, Z. A., Pivovarova, T. A., Karavaiko, G. I. (1986) Properties of a new species, *Bacillus mucilaginosus*. *Mikrobiologiya*, **55**, 477-482 (Engl. Transl. Pp. 369-374).
- Baas Becking, L. G. M., Parks, G. S. (1927) Energy relations in the metabolism of autotrophic bacteria. *Physiol. Rev.*, **7**, 85-106.
- Baas Becking, L. G. M., Kaplan, I. R. (1956) The microbiological origin of the sulfur nodules of Lake Eyre. *Trans. Roy. Soc. S. Aust.*, **79**, 62-65.
- Baas Becking, L. G. M., More, D. (1961) Biogenic sulfides. *Econ. Geol.*, **56**, 259-272.
- Bak, F., Pfennig, N. (1987) Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio sulfodismutans* sp. nov. By disproportionation of inorganic sulfur compounds. *Arch. Microbiol.*, **147**, 184-189.
- Baker, B. J., Banfield, J. (2003) Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiology Ecology*, **44(2)**, 139-152.
- Balashova, V. V., Zavarzin, G. A. (1979) Anaerobic reduction of ferric iron by hydrogen bacteria. *Mikrobiologiya*, **48**, 773-778 (Engl. Transl. Pp. 635-639).
- Balashova, V. V., Vedenina, I. Ya., Markosyan, G. E., Zavarzin G. A. (1980) The autotrophic growth of *Leptospirillum ferrooxidans*. *Mikrobiologiya*, **43**, 581-585 (Engl. Transl. pp. 491-494).
- Baltimore, H., Zycha, R., Siepmann. (1969) *Mucorales*, eine beschreibung aller Gattungen und Arten dieser Pilzgruppe, Verlag von J. Cramer.
- Banks, D., Younger, P. L., Arnesen R-T., Iversen E. R., Banks, S. B. (1997) Mine-water chemistry: the good, the bad and the ugly. *Environ. Geology*, **32(3)**, 157- 174.
- Báthory, L. (1973) Procesul de refacere a industriei metalurgice în România după primul război mondial (1919-1924), în „*Studia Universitatis Babeş-Bolyai*”, **XVIII, 2**, p. 109-144.
- Báthory, L. (1968) Dezvoltarea industriei extractive a metalelor prețioase după Unirea Transilvaniei cu România, 1918-1939, în „*Anuarul Institutului de Istorie și Arheologie*”, Cluj, **XI**, p. 159-170.
- Bărbat, T. (1940) Recherches magnétiques dans la région de Cârnecea-Calina (Département de Caraș), pendant l'année 1934, în „*Comptes Rendus des Séances de l'Institut Géologiques de Roumanie*”, **XXIII**, p. 117-123; Idem, Recherches magnétiques dans la région d'Oravița (Prisaca-Ogașul Coșovița), département de Caraș, în Ibidem, **XXIV**, p. 4-10.
- Berner, R. A. (1962) Experimental studies of the formation of sedimentary iron sulfides. In: M. L. Jensen, ed. *Biogeochemistry of Sulfur Isotopes*. Yale University Press, New Haven, pp. 107-120.
- Berthelin, J., Kogblevi, A. (1974) Influence de l'engorgement sur l'altération microbienne des miné raux dans les sols. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, **11**, 499-509.

- Biebl, H., Pfennig, N. (1977) Growth of sulfate-reducing bacteria with sulfur as electron acceptor. *Arch. Microbiol.*, **112**, 115-117.
- Blake, R. C., Waskovsky, J., Harrison, A. P. Jr. (1993) Respiratory components in acidophilic bacteria that respire on iron. *Geomicrobiol. J.*, **10**, 173-192.
- Bleahu, M., Decu, V., Negrea, St., Pleșa, C., Povară I., Viehmann, I. (1976) Peșteri din România, Ed. *Științifică și Enciclopedică*, București.
- Bloomfield, C. (1951) Experiments on the mechanism of gley formation. *J. Soil Sci.*, **2**, 196-211.
- Bloomfield, C. (1953) A study of podzolization, Part I. The mobilization of iron and aluminum by Scots pine needles, *J. Soil Sci.*, **4**, 5-16.
- Bonatti, E. (1978) The origin of metal deposits in the oceanic lithosphere. *Sci. Am.*, **238**, 54-61.
- Bontea, V. (1986) Ciuperci parazite și saprofite din România. vol **II**, București, pp.338.
- Booth, G. H. (1971) Microbiological corrosion. *Mills and Boon Limited*, London.
- Booth, C. (1971) The genus *Fusarium*, Institute Kew, England.
- Bowen, H. J. M. (1979) Environmental Chemistry of the Elements. *Academic Press*, London.
- Brierley, J. A. (1985) Thermophilic iron oxidizing bacteria found in copper leaching dumps. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 523-525.
- Brierley, C. L., Murr, L. E. (1973) Leaching: use of thermophilic chemoautotrophic microbe. *Science*, **179**, 488-490.
- Brock, T. D., Brock, K. M., Belly, R. T., Weiss, R. L. (1972) *Sulfolobus*: A new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch. Microbiol.*, **84**, 54-68.
- Brock, T. D., Madigan M. T. (1988) Biology of Microorganisms, **5th ed.** Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Brooks, R. R., Kaplan, I. R. (1972) Biogeochemistry. In: *The Encyclopedia of Geochemistry and Environmental Sciences, Encyclopedia of Earth Sciences Series*. Vol. **IVa**, 74-82 Van Nostrand Reinhold, New York.
- Bromfield, S. M. (1953) Sulfat reduction in partially sterilized soil exposed to air. *J. Gen. Microbiol.*, **8**, 378- 390.
- Buchanan, R. E., Gibbons, N. E. (eds. 1974) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology , **8th ed.** Williams and Wilkins, Baltimore.
- Burdige, D. J. (1993) The biogeochemistry of manganese and iron reduction in marine sediments. *Earth-Sci. Rev.*, **35**, 249-284.
- Burggraf, S., Jannasch, H. W., Nicolaus, B., Stetter, K. O. (1990) *Acheoglobus profundus* sp. nov., represents a new species within the sulfat-reducing archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, **13**, 24-28.
- Caccavo, F. Jr., Blakemore, R. P., Lovley, D. R. (1992) A hydrogenoxidizing , Fe(III)-reducing microorganism from the Great Bay Estuary, New Hampshire. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3211-3216.
- Caccavo, F. Jr., Lonergan, D. J., Lovley, D. R., Davis, M., Stolz, J. F., McInerney, M. J. (1994) *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., hydrogen-and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3752-3759.
- Carlson, L., Lindstroem, E. B., Hallberg, K. B., Touvinen, O. H. (1992) Solid-phase products of bacterial oxidation of arsenical pyrite. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1046-1049.
- Ceapoiu, N. (1968) Metode statistice aplicate în experiențele agricole și biologice, Ed. *Agro-Silvică*, București.
- Chapelle, F.H. (1993) Ground-water microbiology and geochemistry. John Wiley and Sons, New York.

Charles, A. M., Suzuki, I. (1966) Mechanism of thiosulfate oxidation by *Thiobacillus novellas*. *Biochim. Biophys. Acta*, 510-521.

Cholodny, N. (1924) Zur Morfologie der Eisenbakterien *Gallionella* und *Spirophyllum*. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **42**, 35-44.

Cloud, P. E. Jr. (1973) Paleoecological significance of the banded-iron-formation. *Econ. Geol.*, **68**, 1135-1143.

Cioflica, G., Savu, H., Borcoş, M., Stefan, A., Istrate, G. (1973) Alpine Volcanism and Metallogenesis în the Apuseni Mountains. Guide to excursion **3AB**, Symposium "Volcanism and Metallogenesis". Inst Geol. And Geophys., Bucharest, 70 p.

Cioflica, G., Vlad, N. S. (1973) Contributions a la connaissance des types structuraux de pyrometasomatites laramiens de Roumanie. *Rév.roum.géol., géophys., géogr., ser.géol.*, **17(1)**, 3-13, Bucureşti.

Ciulca, S. (2006) Metodologii de experimentare în agricultură și biologie. *Ed. Agroprint*, Timișoara.

Codarcea, Al. (1931) Studiul geologic și petrografic al regiunii Ocna de Fier-Bocșa Montană (jud.Caraș, Banat). *An.Inst.Geol.Rom.*, **XV**, 1-424, Bucureşti.

Codarcea, Al. (1967) Mineralogie, *Ed Didactică și Pedagogică*, Bucureşti.

Cohen, Y., Krumbein, W. E., Shilo, M. (1977) Solar Lake (Sinai). Stromatolitic cyanobacterial mats. *Limnol.Oceanogr.*, **22**, 635-656.

Coleman, M. L., Hedrick, D. B., Lovley, D. R., Whrite, D. C., Pye, K. (1993) Reduction of Fe(III) in sediments by sulfat-reducing bacteria. *Nature (Lond.)*, **361**, 436-438.

Colmer, A. R., Temple, K. L. (1950) An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. *J. Bacteriol.*, **59(3)**, 317-28.

Constantinof, D. (1957-1959) planșa nr. **5** – sc. 1:50 000, *arhiva Caransebeș*.

Crăciun, C. (2000) Mineralele argiloase din sol. Implicații în agricultură, *Editura G.N.P. Minischool* Bucureşti.

Crerar, D. A., Knox, G. W., Means, J. L. (1979) Biogeochemistry of bog iron in the New Jersey Pine Barrens. *Chem. Geol.*, **24**, 111-135.

Cunningham, K. I., Northup, D. E., Pollastro, R. M., Wright, W. G., LaRock, E. J. (1995) Bacteria, fungi and biokarst in Lechuguilla Cave, Carlsbad Caverns National Park, New Mexico. *Environ. Geol.*, **25**, 2-8.

David, I. (1998) Grundwasserhydrologik, Stromungs-und Transportvorgänge, Braunschweig, Wiesbaden, Vieweg.

David, I. (2006) In situ treatment of groundwater containing high iron concentration, Institute of Numerical Methods and Informatics in Civil Engineering Petersenstrabe, Darmstad.

David, I., Wilhelm, U., Manuel, S. (2005) Entwicklung und Bereitstellung eines Mathematisch-Numerischen Prognoseinstrumentariums zur Simulation subterrestrischer Aufbereitungsprozesse im Grundwasser, gefordert durch die Fritz und Margot Faudi-Stiftung, Frankfurt am Main, Bewilligungs-Nr.64, Darmstadt.
water. *IAHS Pub.*, **220**, 439-447.

Davis, E. A., Johnson, E. J. (1967) Phosphorylation coupled to the oxidation of sulfide and 2-mercaptoethanol in extracts of *Thiobacillus thioparus*. *Can. J. Microbiol.*, **13**, 873-884.

Dévigne, J-P. (1968) Precipitation du sulfure de plomb par un micrococcus tellurique. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **267**, 935-937.

Dévigne, J-P. (1973) Une métalogenèse microbienne probable en milieux sédimentaires: celle de la galène. *Cah. Geol. No.* **89**, pp. 35-37.

- Din, G. A., Suzuki, I., Lees, H. (1976) Ferrous iron oxidation by *Ferrobacillus ferrooxidans*. Purification and properties of Fe⁺⁺-cytochrome c reductase. *Can. J. Biochem.*, **45**, 1523-1546.
- Din, G. A., Suzuki, I., Lees, H. (1976) Carbon dioxide fixation and phosphoenolpyruvate carboxylase in *Ferrobacillus ferrooxidans*. *Can. J. Microbiol.*, **13**, 1413-1419.
- Domsch, K. H., Gams, W. (1972) Fungi in agricultural soil, *Mills and Boon Limited*, London.
- Donald G., Davis, M., Palmer, V., Arthur N. (1990) Extraordinary Subaqueous Speleothems in Lechuguila Cave, New Mexico, *National Speleological Society*, **52(1)**, 70-86.
- Douca, N. (1986) Istoria exploatării zăcămintelor aurifere din zona Oravița. comunicare susținută la Simpozionul „*Minerit și metalurgie*”, Bocșa.
- Drake, H. L., Akagi, J. M. (1978) Dissimilatory reduction of bisulfite by *Desulfovibrio vulgaris*. *J. Bacteriol.*, **136**, 916-923.
- Drăgan-Bularda, M. (1983) *Lucrări practice de microbiologie generală*, Universitatea „Babeș-Bolyai”, Cluj-Napoca.
- Drăgan-Bularda, M. (2000) *Microbiologie generală, Lucrări practice*, Cluj-Napoca.
- Drăgan-Bularda, M., Kiss, Ș. (1986) *Microbiologia solului*, Univ. Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca.
- Dubina, G. A. (1978) Mechanism of the oxidation of divalent iron and manganese by iron bacteria growing at a neutral pH of the medium. *Mikrobiologiya*, **47**, 591-599, (Engl. Transl. 471-478).
- Dubina, G. A. (1978) Functional rol of bivalent iron and manganese oxidation in *Leptotrix pseudoochracea*. *Mikrobiologiya*, **47**, 783-789, (Engl. Transl. 631-636).
- Eckhardt, F. E. W. (1980) Microbial degradation of silicates. Release of cation from aluminosilicate minerals by yeasts and filamentous fungi, pp. 107-116, *In: T. A. Oxley, G. Becker, D. Allsopp, eds. Biodeteration. The Proceedings of the Fourth International Biodeterioration Symposium*, Berlin. Pitman, London.
- Edwards, K. J., Bond, P. L., Gihring, T. M., Banfield, J. F. (2000) An Archaeal Iron-Oxidizing Extreme Acidophile Important in Acid Mine Drainage. *Science*, **287(5459)**, 1796 – 1799.
- Egovora, A. A., Deryugina, Z. P. (1963) The spore forming thermophilic thiobacterium: *Thiobacillus thermophilica. Imschenetskii nov. Spec. Mikrobiologiya*, **32**, 439-446.
- Ehrlich, H. L. (1995) *Geomicrobiology*, Marcel Dekker, Inc., New York Basel, pp.312-602.
- Ehrlich, H. L. (1993) Bacterial mineralization of organic carbon under anaerobic conditions, *In: J-M. Bollag and G. Stotzky, eds. Soil Biochemistry, Vol. 8*. Marcel Dekker, New York, pp. 219-247.
- Ehrlich, H. L., Fox, S. I. (1967) Copper sulfide precipitation by yeasts from acid mine-waters. *Apl. Microbiol.*, **15**, 135-139.
- Ehrlich, H. L., Yang, S. H., Mainwaring, J. D. (1973) Bacteriology of manganese nodules. VI. Fate of copper, nickel and cobalt, and iron during bacterial and chemical reduction of the manganese (IV). *Z. Allg. Mikrobiol.*, **13**, 39-48.
- Ellis, M. B. (1976) *More Dematiaceous Hyphomycetes*, *Elsevier Biomedical Press*. London.
- Emerson, D., Ghiorse, W. C. (1993) Ultrastructure and chemical composition of the sheath of *Leptothrix discophora* SP-6. *J. Bacteriol.*, **175**, 7808-7818.
- Emerson, D., Ghiorse W. C. (1993) Role of disulfide bonds in maintaining the structural integrity of the sheath of *Leptothrix discophora* SP-6. *J. Bacteriol.*, **175**, 7819-7827.
- Ernst, J. F., Winkelmann, G. (1977) Enzymatic release of iron from sideramines in fungi NADH: sideramine oxidoreductase in *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta*, **500**, 27-41.

Fauque, G., LeGall, J., Barton, L. L. (1991) Sulfate-reducing and sulfur-reducing bacteria, *In: J.M. Shively and L., L., Barton, eds. Variation in Autotrophic Life. Academic Press, London, pp. 271-337.*

Ferris, F. G., Schultze, S., Witten, T. C., Fyfe, W. S., Beveridge, T. J. (1989) Metal interactions with microbial biofilms in acidic and neutral pH environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1249–1257.

Frankel, R. B., Papaefthymiou, C. G., Blakemore, R. P., O'Brien, W. (1983) Fe₃O₄ precipitation in magnetotactic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **763**, 147-159.

Freney, J. R. (1967) Sulfur-containing organics. *In: A.D. McLaren and G.H. Petersen, eds. Soil Biochemistry, Marcel Dekker, New York, pp. 229-259.*

Freney, J. R., Lazaroff, N., Packer, L. (1977) Sulfate-dependent iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*: Characterization of a new EPR detectable electron transport component on the reducing side of rusticyanin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **246**, 650-654.

Fry, N. K., Fredrickson, J. K., Fishbain, S., Wagner, M., Stahl, D. A. (1997) Population structure of microbial communities associated with two deep, anaerobic, alkaline aquifers. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63(4)**, 1498-1504.

Fukumori, Y., Yano, T., Sato, A., and Yamanaka, T. (1988) Fe(II)-oxidizing enzyme purified from *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **50**, 169-172.

Fuller, C. C., Davis, J. A., Waychunas, G. E. (1993) Surface chemistry of ferrihydrite: Part 2 Kinetics of arsenic adsorption and coprecipitation. *Geochim. cosmochim. Acta*, **57**, 2271–2282.

Gadd, G. M. (2004) Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, **122**, 109-119.

Gale, N. L., Beck, J. V. (1967) Evidence for the Calvin cycle and hexose monophosphate pathway in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.*, **94**, 1052-1059.

Garlick, S., Oren, A., Padan, E. (1977) Occurrence of facultative anoxygenic photosynthesis among filamentous and unicellular cyanobacteria. *J. Bacteriol.*, **129**, 623-629.

Garrity G. M., Bell, J. A., Lilburn, T. G. (2004) Taxonomic outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Springer New York, U.S.A.

Geldreich, E.E. (1990) Microbiological quality of source waters for water supply. pp. 3-31 *in: G. A. McFeters (ed.) Drinking Water Microbiology: Progress and Recent Developments. Springer-Verlag, New York.*

Ghiorse, W. C. (1984) Biology of iron- and manganese-depositing bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **38**, 515-550.

Ghiorse, W. C. (1988) Microbial reduction of manganese and iron. *In: A. J. B. Zehnder, ed. Biology of Anaerobic Microorganisms. Wiley, New York, pp. 305-331.*

Ghiorse, W. C., Ehrlich, H. L. (1992) Microbial biomineralization of iron and manganese. *In: H. C. W. Skinner and R. W. Fitzpatrick (eds.). Biomineralization. Process of Iron and Manganese. Modern and Ancient Environments. Catena Supplement 21. Catena Verlag, Cremlingen, Germany, pp. 75-99.*

Goldschmidt, V. M. (1954) Geochemistry, *Clarendon Press, Oxford, U.K.*, pp. 621-642.

Goldsmith, D. (1997) The hunt for life on Mars. *Penguin Group, Toronto, Canada.*

Gräf, R. (1996) Domeniul bănăţean al StEG, 1855-1920, Reşiţa, *Editura Banatica*, p. 41;

Gräf, R. (1987) Mineritul și metalurgia bănăţeană la mijlocul secolului XIX. comunicare susţinută la *Simpozionul de Istorie Naţională*, Deva.

Guay, R., Silver, M. (1975) *Thiobacillus acidophilus* sp. nov., isolation and some physiological characteristics. *Can. J. Microbiol.*, **21**, 281-288.

Hake, R., Waskovsky, J., Harrison, A. P. Jr. (1992) Respiratory components in acidophilic bacteria that respire on iron. *Geomicro-biol. J.*, **10**, 173-192.

- Hallberg, K. B., Coupland, K., Kimura, S., Johnson, D. B. (2006) Macroscopic Streamer Growths in Acidic, Metal-Rich Mine Waters in North Wales Consist of Novel and Remarkably Simple Bacterial Communities. *Appl Environ Microbiol.*, **72**(3), 2022–2030.
- Hallbeck, L., Pedersen., K. (1990) Culture parameters regulating stalk formation and growth rate of *Gallionella ferruginea*. *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 1675-1680.
- Hallbeck, L., Pedersen., K. (1991) Autotrophic and mixotrophic growth of *Gallionella ferruginea*. *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 2657-2661.
- Hanert, H. (1974) Untersuchungen zur individuellen Entwicklungskinetik von *Gallionella ferruginea* in statischer Mikrokultur. *Arch. Mikrobiol.*, **96**, 59-74.
- Hanert, H. H. (1981) The genus *Gallionella*. pp. 509-515, *In*: M.P. Starr, H. Stolp, H. G. Trueper, A. Balows, H. G. Schlegel, The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolations, and Identification of Bacteria, Springer-Verlag, Berlin.
- Hansen, T. A., van Gernerden, H. (1972) Sulfide utilization by purple sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.*, **86**, 49-56.
- Hansen, T. A., Veldkamp, H. (1973) Rhodopseudomonas sulfidophila nov. spec a new species of the purple nonsulfur bacteria. *Arch. Mikrobiol.*, **92**, 45-58.
- Harder, E. C. (1919) Iron depositing bacteria and their geologic relations. *U. S. Geol. Surv. Prof. Pap.*, **113**, pp. 89.
- Harrison, A. G., Thode, H. (1957) The kinetic isotope effect in the chemical reduction of sulfat. *Trans. Faraday Soc.*, **53**, 1-4.
- Harrison, A. P. Jr. (1986) The phylogeny of iron-oxidizing bacteria. *In*: H. L. Ehrlich and D. S. Holmes, eds. Workshop on Biotechnology for the Mining, Metal-Refining and Fossil Fuel Processing Industries. Wiley, New York, pp. 311-317.
- Harrison, A. P. Jr., Norris, P. R. (1985) *Leptospirillum ferrooxidans* and similar bacteria: some characteristics and genomic diversity. *FEMS Microbiol. Lett.*, **30**, 99-102.
- Heldal, M., Tumyr, O. (1983) *Gallionella* form metalimnion in an eutrophic lake: morphology and X-ray energy-dispersive microanalysis of apical cells and stalks. *Can. J. Microbiol.*, **29**, 303-308.
- Holm, N. G. (1987) Biogenic influence on the geochemistry of certain ferruginous sediments of hydrothermal origin. *Chem. Geol.*, **63**, 45-57.
- Holthuijzen, Y. A., van Breemen, J. F. L., Kuenen, J. G., Konings, W. N. (1986) Electron microscopic studies of carboxysomes of *Thiobacillus neapolitanus*. *Arch. Microbiol.*, **144**, 258-262.
- Holthuijzen, Y. A., van Dissel-Emiliani, F. F. M., Kuenen, J. G., Konings, W. N. (1987) Energetic aspects of CO₂ uptake in *Thiobacillus neapolitanus*. *Arch. Microbiol.*, **147**, 285- 290.
- Huber, H., Stetter, K. O. (1989) *Thiobacillus prosperus* sp. nov., represents a new group of halotolerant metal-mobilizing bacteria isolated from a marin geothermal field. *Arch. Microbiol.*, **151**, 479-485.
- Hutchinson, M., Johnstone, K. I., White, D. (1966) Taxonomy of the acidophilic thiobacilli. *J. Gen. Microbiol.*, **44**(3), 373–381.
- Hutchinson, M., Johnstone, K. I., White, D. (1965) The taxonomy of certain thiobacilli. *J Gen Microbiol.*, **41**(3), 357–366.
- Hutchinson, M., Johnstone, K. I., White, D. (1967) Taxonomy of anaerobic thiobacilli. *J. Gen. Microbiol.*, **47**(1), 17–23.
- Ingledeu, W. J. (1982) *Thiobacillus ferrooxidans*. The bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. *Biochim. Biophys. Acta*, **683**, 89-117.
- Islam, F. S., Gault, A. G., Boothman, C., Polya, D. A., Charnock, J. M., Chatterjee, D., Lloyd, J. R. (2004) Role of metal-reducing bacteria in arsenic release from Bengal delta sediments. *Nature*, **430**, 68-71.

- Ivanov, M. V. (1968) Microbiological Processes in the Formation of Sulfur Deposits. Israel Program for Scientific Translation. U. S. Department of Agriculture and National Science Foundation, Washington, DC.
- Ivarson, C. K., Sojak, M. (1978) Microorganisms and ochre deposition field drains of Ontario. *Can. J. Soil Sci.*, **58**, 1-17.
- Iverson, W. P. (1968) Corrosion of iron and formation of iron phosphide by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Nature*, **217**, pp. 1265–1267.
- Jannasch, H. W., Taylor, C. D. (1984) Deep-sea microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.*, **38**, 487-514.
- Jannasch, H. W., Wirsén, C. O., Molyneux, S. J., Langworthy, T. A. (1988) Extremely fermentative archaeobacteria of the genus *Desulfurococcus* from deep-sea hydrothermal vents. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1203-1209.
- Janssen, P. H., Morgan, H. W. (1992) Heterotrophic sulfur reduction by *Thermotoga* sp. strain FjSS3B1. *FEMS Microbiol. Lett.*, **96**, 213-218.
- Jaynes, D. B., Rogowski, A. S., Pionke, H. B. (1984) Acid Mine Drainage From Reclaimed Coal Strip Mines 1. Model Description. *Water Resources Research*, **20(2)**, 233-242.
- Johnson, D. B., Kelso, W. I. (1983) *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 29 – 69.
- Johnson, D. B., Kelso W. I. (1983) Detection of heterotrophic contaminants in cultures of *Thiobacillus ferrooxidans* and their elimination by subculturing in media containing copper sulfate. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 2969-2972.
- Johnson, D. B., McGinness, S. (1991) A highly efficient and universal solid medium for growing mesophilic and moderately thermophilic, iron-oxidizing acidophilic heterotrophic bacteria. *J. Microbiol. Methods*, **13**, 113-122.
- Johnson, D. B., Paula, Bacelar-Nicolau (1999) Leaching of Pyrite by Acidophilic Heterotrophic Iron-Oxidizing Bacteria in Pure and Mixed Cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65(2)**, 585–590.
- Johnson, D. B., Rolfe, S., Hallberg, K. B., Iversen, E. (2001) Isolation and phylogenetic characterization of acidophilic microorganisms indigenous to acidic drainage waters at an abandoned Norwegian copper mine. *Environ. Microbiol.*, **3(10)**, 630-637.
- Joly, P. (1964) The Genus *Alternaria*. Ed. Lechevalier, Paris.
- Jones J. G., Gardener, S., Simon, B. M. (1984) Reduction of ferric iron by heterotrophic bacteria in lake sediments. *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 45-51.
- Jones G. E., Starkey, R. L. (1957) Fractionation of stable isotope of sulfur by microorganisms and their role in deposition of native sulfur. *Appl. Microbiol.*, **5**, 111-118.
- Jørgensen, B. B. (1990) A thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments. *Science*, **249**, 152-154.
- Kaplan, I. R., Rittenberg, S. C. (1962) The microbiological fractionation of sulfur isotopes. In: M. L. Jensen, ed. Biogeochemistry of Sulfur Isotopes. N.S.F. Symposium, Yale University Press, New Haven, CT, pp. 80-93.
- Kaplan, I. R., Rittenberg, S. C. (1964) Microbiological fractionation of sulfur isotopes. *J. Gen. Microbiol.*, **34**, 195-212.
- Karavaiko, G. I., Avakyan, A. A. (1970) Mechanisms of *Thiobacillus ferrooxidans* multiplication. *Mikrobiologiya*, **39**, 950-952 (Engl. transl. pp. 383-398).
- Karavaiko, G. I., Avakyan, A. A., Krutsko, V. S., Mel'nikova, E. O. (1979) Microbiological investigations on a spodumene deposit. *Mikrobiologiya*, **48**, 502-508 (Engl. transl. pp. 833-836).
- Karavaiko, G. I., Rossi, G. I., Agate, G., Groudev, A. D., Avakzian, S. N. (1988) Biotechnology of metals, Moscow.

Kelly, D. P. (1982) Biochemistry of the chemolithotrophic oxidation of inorganic sulfur. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **298**, 499-528.

Kelly, D. P., Jones, C. A. (1978) Factors affecting metabolism and ferrous iron oxidation in suspensions and batch cultures of *Thiobacillus ferrooxidans*: relevance to ferric iron leach solution regeneration. In: L. E. Murr, A. E. Torma, J. A. Brierley, eds. Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena. Academic Press, New York, pp. 19-44.

Kelly, D. P., Lu, W-P., Poole, R. K. (1993) Cytochromes in *Thiobacillus tepidarius* and the respiratory chain involved in the oxidation of thiosulfate and tetrathionate. *Arch. Microbiol.*, 87-95.

Kelly, D. P., Tuovinen, O. H. (1972) Recommendation that the names *Ferrobacillus ferrooxidans* Leathen and Braley and *Ferrobacillus sulfooxidans* Kinsel be recognized as synonymous of *Thiobacillus ferrooxidans* Temple and Colmer. *Int. J. Syst. Bacterid.*, **22**, 170-172.

Kelly, D. P., Wood, A. P. (2000) Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**, 511-516.

Kenneth, R., Fennell Doroty (1965) The genus *Asppergillus*, Baltimore.

Koh, A. (1983) Methods of bacteriology, F. Gerhard, et al (eds.), Mir, Moscow.

Kovalenko, T. V., Karavaiko, G. I., Piskunov, V. P. (1982) Effect of Fe³⁺ ions in the oxidation of ferrous iron by *Thiobacillus ferrooxidans* at various temperatures. *Mikrobiologiya*, **51**, 156-160 (Engl. transl. pp. 142-146).

Krul, I. M., Hirsch, P., Staley, J. T. (1970) *Toxothrix trichogenes* (Mol) Berger and Bingmann: The organism and its biology. *Antonie v. Leeuwenhoek*, **36**, 409-420.

Kuenen, J. G., Beudeker, R. F. (1982) Microbiology of thiobacilli and other sulfur-oxidizing autotrophs, mixotrophs and heterotrophs. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **B298**, 473-497.

Kuever, J., Kulmer, J., Jannsen, S., Fischer, U., Blotevogel, K.-H. (1993) Isolation and characterization of a new spore-forming sulfate-reducing bacterium growing by complete oxidation of catechol. *Arch. Microbiol.*, **159**, 282-2881.

Laishley, E. J., Krouse, H. R. (1978) Stable isotope fractionation by *Clostridium pasteurianum*. 2. Regulation of sulfite reductases by sulfur amino acids and their influence on sulfur isotope fractionation during SO₃²⁻ and SO₄²⁻ reduction. *Can. J. Microbiol.*, **24**, 716-724.

Lazaroff, N. (1963) Sulfate requirement for iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 78-83.

Lazaroff, N. (1977) The specificity of the anionic requirement for iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Microbiol.*, **101**, 85-91.

Lazaroff, N. (1983) The exclusion of D₂O from the hydration sphere of FeSO₄.7H₂O oxidized by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Science*, **222**, 1331-1334.

Lazaroff, N., Sigal, W., Wasserman, A. (1982) Iron oxidation and precipitation of ferric hydroxysulfates by resting *Thiobacillus ferrooxidans* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 924-938.

Lazaroff, N., Melanson, L., Lewis, E., Santoro, N., Pueschel, C. (1985) Scanning electron microscopy and infrared spectroscopy of iron sediments formed by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Geomicrobiol. J.*, **4**, 231-268.

Lăcătușu, R. (2000) Mineralogia și chimia solului., Editura Universității „Al. I. Cuza” Iași.

Leblanc, M., Achard, B., Othman, D. B., Luck, J. M., Bertrand-Sarfati, J., Personné, J. Ch. (1996) Accumulation of arsenic from acidic mine waters by ferruginous bacterial accretions (stromatolites). *Applied Geochemistry*, **11(4)**, 541-554.

Lee, J. S., Chon H. T. (2006) Hydrogeochemical characteristics of acid mine drainage in the vicinity of an abandoned mine, Daduk Creek, Korea, *Journal of Geochemical Exploration*, **88**, 37-40.

- Lieske, R., 1919, Zur Ernährungphysiologie der Eisenbakterien. *Z. Bakt. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. II*, **49**, 413-425.
- Liu, C-L., Hart, N., Peck, H., D. Jr. (1982) Inorganic pyrophosphate: Energy source for sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfoto-maculum*. *Science*, **217**, 363-364.
- London, J. (1963) *Thiobacillus intermedius* nov. sp. a novel type of facultative autotroph. *Arch. Mikrobiol.*, **46**, 329-337.
- London, J., Rittenberg, S. C. (1964) Path of sulfur in sulfide and thio-sulfate oxidation by thiobacilli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **52**, 1183-1190.
- London, J., Rittenberg, S. C. (1966) Effects of organic matter on the growth of *Thiobacillus intermedius*. *J. Bacteriol.*, **91**, 1062-1069.
- London, J., Rittenberg, S. C. (1967) *Thiobacillus perometabolis* nov. sp., a non-autotrophic thiobacillus. *Arch. Mikrobiol.*, **59**, 218-225.
- Lorinczi Fr. (1969) O specie nouă de *Aspergillus* izolată dintr-o peșteră, *Contr. bot., Univ. Babeș- Bolyai Cluj*, pg. 341 - 347
- Lorinczi Fr., Turcu L. (1966) Micromycete izolate din sol și peșteri. În: *Flora și Vegetația rezervației naturale. Defileul Crișului Repede*. *Contr. bot., Univ. Babeș- Bolyai Cluj*, pp 69 – 82.
- Lorinczi Fr. (1973) Contribuții la cunoașterea utilizării diferitelor surse de azot de către câteva micromycete izolate din sol. *Contr. bot., Univ. Babeș- Bolyai Cluj*, pg 233 – 246,
- Lovley, D. R. (1987) Organic matter mineralization with the reduction of ferric iron: a review. *Geomicrobiol. J.*, **5**, 375-399.
- Lovley, D. R. (1991) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol. Rev.*, **55**, 259-287.
- Lovley, D. R., Phillips, E. J. P. (1986) Organic matter mineralization with the reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 683-689.
- Lovley, D. R., Phillips, E. J. P. (1987) Competitive mechanisms for inhibition of sulfate reduction and methane production in the zone of ferric iron reduction in sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **M**, 2636-2641.
- Lovley, D. R., Phillips, E. J. P. (1988) Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1472-1480.
- Lovley, D. R., Phillips, E. J. P., Roden, E. E., Woodward, J. C. (1993) Enzymatic iron and uranium reduction by sulfate-reducing bacteria. *Marine Geol.*, **113**, 41-53.
- Lundgren, D. G., Dean, W. (1979) Biogeochemistry of iron. In: P, A, Trudinger and D, J, Swaine, eds. *Biogeochemical Cycling of Mineral-Forming Elements*, Elsevier, Amsterdam, pp. 211-251.
- Luther, G. W. III. (1991) Pyrite synthesis via polysulfide compounds. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **55**, 2839-2849.
- Lu, W-P. (1986) A periplasmic location for the thiosulfate-oxidizing multi-enzyme system from *Thiobacillus versutus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **34**, 313-317.
- Lu, W-P., Kelly, D. P. (1983) Purification and some properties of two principal enzymes of the thiosulfate-oxidizing multienzyme system from *Thiobacillus A₂*. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 3549-3564.
- Lu, W-P., Kelly, D. P. (1988) Respiration-driven proton translocation in *Thiobacillus versutus* and the role of the periplasmic thiosulfate-oxidizing enzyme system. *Arch. Microbiol.*, **149**, 297-302.
- Madsen, E. L., Ghiorse, W. C. (1993) Groundwater microbiology: subsurface ecosystem processes. pp. 167-214 in: T.E. Ford (ed.) *Aquatic Microbiology*. Blackwell Scientific Publications, Boston.

- Madsen, E. L., Morgan, M. D., Good, R. E. (1986) Simultaneous photoreduction and microbial oxidation of iron in a stream in the New Jersey Pinelands. *Limnol. Oceanogr.*, **31**, 832-838.
- Mandl, M., Matulova, P., Docekalova, H. (1992) Migration of As III during bacterial oxydation of arsenopyrite in chalcopyrite concentrates by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 429-431.
- Mann, H., Tazaki, T., Fyfe, W. S., Beveridge, T. J., Humphrey, R. (1987) Cellular lepidocrocite precipitation and heavy-metal sorption in *Euglena* sp. (unicellular alga): implications for biomineralization. *Chem. Geol.*, **63**, 39-43.
- Markosyan, G. E. (1973) A new mixotrophic sulfur bacterium developing in acidic media *Thiobacillus organoparus* sp. *Dokl. Akad. Nauk SSSR Ser. Biol.*, **211**, 1205-1208.
- Marnette, E. C., Van Breemen, L. N., Hordijk, K. A. (1993) Pyrite formation in two freshwater systems in the Netherlands. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **57**, 4165-4177.
- Marshall, C. P., Cypionka, H. (1993) Influence of oxygen on sulfate reduction and growth of sulfate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.*, **159**, 168-173.
- Martin, H. W., Brigmon, R. L. (1994) Biogeochemistry of sulfide oxidizing bacteria in freatic karst, *In: Sarovsky, I., D., Palmer, M., V., (Eds.) Breakthroughs in Karst Geomicrobiology and Karst Water Ins.*, Colorado Springs, Colorado.
- Mason, J., Kelly, D. P. (1988) Mixotrophic and autotrophic growth of *Thiobacillus acidophilus* on tetrathionate. *Arch. Microbiol.*, **149**, 317-323.
- Massmann, G., Tichomirowa, M., Merz, C., Pekdeger, A. (2003) Sulfide oxidation and sulfate reduction in a shallow groundwater system (Oderbruch Aquifer, Germany). *Journal of Hydrology*, **278**, 231-143.
- Mărușteri, M., [www. Umftgm.ro/info/carte_statistica.pdf](http://www.Umftgm.ro/info/carte_statistica.pdf) – Noțiuni fundamentale de biostatistică.
- Mârza., I. (2002) Geneza zăcămintelor de origine magmatică. Metalogenia hidrotermală (Ediția a-II-a)., Presa *Universitară Clujeană*, Cluj-Napoca.
- Mc. Dowell, E. M., Trump, B. J. (1976) Histological fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **100**, 405-414, London.
- Mechalas, B. J., Rittenberg, S. C. (1960) Energy coupling in *Desulfovibrio desulfuricans*. *J. Bacteriol.*, **80**, 501-507.
- Meinel, J., Meinel, E. (1967) Experimental Microbiology, (Theory and Practice). *Mir, Moscow*, 347pp.
- Merkle, F. G. (1955) Oxidation-reduction processes in soils, *In: F. E. Bear, ed. Chemistry of the Soil*. Reinhold, New York, pp. 200-218.
- Meulenberg, R., Pronk, J. T., Hazeu, W., Frank, J., Bos, P., Kuenen J. G. (1993) Purification and partial characterization of thiosulfate dehydrogenase from *Thiobacillus acidophilus*. *J. Gen. Microbiol.*, **139**, 2033-2039.
- Mihăescu, G. (2000) Microbiologie generală și virusologie, *Editura Universității din București*, pp. 570-573.
- Miller, J. D. A., Wakerley, D. S. (1966) Growth of sulfate-reducing bacteria by fumarate dismutation. *J. Gen. Microbiol.*, **43**, 101-107.
- Miller, L. P. (1950) Formation of metal sulfides through the activities of sulfate reducing bacteria. *Boyce Thompson Inst. Contr.*, **16**, 85-89.
- Moore, A. M., De Long, C. H., Young, A. T. (2003) Rate and Extent of Aqueous Perchlorate Removal by Iron Surfaces. *Environ Sci. Technol.*, **37(14)**, 3189-3198.
- Mosser, J. L., Mosser, A. G., Brock, T. D. (1973) Bacterial origin of sulfuric acid in geothermal habitats. *Science*, **179**, 1323-1324.

Muntean, V., Ștef, L. C., Drăgan-Bularda, M. (2004) Cercetări enzimologice asupra unor sedimente din râul Mureș, *Romanian Biological Sciences*, vol. **I (3-4)**, 107-114.

Muntean, V., Ștef, L. C., Brăgan-Bularda, M. (2005) Cercetări microbiologice asupra unor sedimente de pe cursul mijlociu al râului Mureș, *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Biologia*, **L(2)**, 175-181.

Nathansohn, A. (1902) Ueber eine neue Gruppe von Schwefelbakterien und ihren Stoffwechsel. *Mitt. Zool. Sta. Neapel*, **15**, 655-680.

Nealson, K. H., Myers, C. R. (1990) Respiration-linked proton translocation coupled to anaerobic reduction of manganese(IV) and iron(III) in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J. Bacteriol.*, **172**, 6232-6238.

Nelson, D. C., Jannasch, H. W. (1983) Chemoautotrophic growth of a marine *Beggiatoa* in sulfide-gradient cultures. *Arch. Microbiol.*, **136**, 262-269.

Nielsen, A. M., Beck, J. V. (1972) Chalcocite oxidation and coupled carbon dioxide fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Science*, **175**, 1124-1126.

Nitescu, S. (1977) Deferizarea și demanganizarea apei, *Editura Tehnică*, București.

Norris, P. R. (1990) Acidophilic bacteria and their activity in mineral sulfide oxidation. In: H. L. Ehrlich and C. L. Brierley (eds.), *Microbial Mineral Recovery*. McGraw-Hill, New York, pp. 3-27.

Northup, Diana E., Reysenbach, A-L., Pace, N. (1997) Microorganisms and speleothems, In: Hill, C. Forti, P. (Eds.), *Cave minerals of the World*, 2nd ed., p.261-266, Natl. Speleol. Soc. Inc., Huntsville, Alabama.

Obuekwe, C. O., Westlake, D. W. S. (1982) Effect of reducible compounds (potential electron acceptors) on reduction of ferric iron by *Pseudomonas* species. *Microbios. Lett.*, **19**, 57-62.

Ottow, J. C. G. (1967) The distribution and differentiation of iron-reducing bacteria in gley soils. *Zbltt. Bakteriolog. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 2.*, **123**, 600-615.

Ottow, J. C. G. (1980) Bacterial mechanism of gley formation in artificially submerged soil. *Nature (Lond.)*, 225:103.

Ottow, J. C. G., von Klopotek, A. (1969) Enzymatic reduction of iron oxide by fungi. *Appl. Microbiol.*, **18**, 41-43.

Pavelescu, L. (1954) Studiu geologic și petrografic al părții centrale și de sud-est a Munților Poiana Ruscă. *An.Com.Geol.*, **XXVII**, 337-373, București.

Pavelescu, L. (1958) Geologia și petrografia regiunii Rușchița. *An.Com.Geol.*, **XXXI**, 259-375, București .

Pavelescu, L., Kissling, Al. (1971) Studiul cristalografic și cristalochimic al fluorinei de la Ocna de Fier. *St.cerc.geol., geofiz., geogr., ser.Geol.*, **16(2)**, 511-513, București

Pavelescu, L., Maier, O., Krätner, H., Mureșan, M., Krätner, F. (1964) Structura și stratigrafia șisturilor cristaline din regiunea Rușchița (Poiana Ruscă). *An.Com.Geol.*, **XXXIV/1**, 115-147, București

Peck, H. D. Jr. (1962) Symposium on metabolism of inorganic compounds. V. Comparative metabolism of inorganic sulfur compounds in microorganisms. *Bacteriol. Rev.*, **26**, 67-94.

Peck, H. D. Jr. (1993) Bioenergetic strategies of the sulfate-reducing bacteria. In: J. M. Odom and R. Singleton, Jr., eds. *The Sulfate-reducing Bacteria: Contemporary Perspectives*. Springer-Verlag, New York, pp. 41-76.

Perry, E. C. Jr., Tan, F. C., Morcy, G. B. (1973) Geology and stable isotope geochemistry of Biwabik Iron Formation, northern Minnesota. *Econ Geol.*, **68**, 1110-1125.

Perry, K. A., Kostka, J. E., Luther, G. V., Nealson, K. H. (1993) Mediation of sulfur speciation by a Black Sea facultative anaerobe. *Science*, **259**, 801-803.

Pfennig, N. (1977) Phototrophic green and purple bacteria: a comparative, systematic survey. *Annu. Rev. Microbiol.*, **31**, 275-290.

Pfennig, N., Biebl, H. (1981) The dissimilatory sulfur-reducing bacteria, *In*: M. P. Starr, H. G. Trueper, H. Stolp, H. G. Trueper, A. Balows, and H. G. Schlegel, eds. *The Prokaryotes, a Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*. Vol. 1. Springer-Verlag, Berlin, pp. 941-947.

Postgate, J. R. (1984) *The Sulfate-Reducing Bacteria*. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Povară, I., Schmidt, N., Petcu, A. (1970) Observations morphospéologique effectuées dans la zone située entre Oravița et Ciclova Montană (Banat). *In*: „Livre du Centenaire Emile G. Racovitza (1868-1968)”, București, p. 621-626

Pronk, J. T., Meulenberg, R., Hazeu, W., Bos, P., Kuenen, J. G. (1990) Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by acidophilic thiobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.*, **75**, 293-306.

Pronk, J. T., Liem, K., Bos, P., Kuenen, J. G. (1991) Energy transduction by anaerobic ferric iron respiration in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2063-2068.

Pronk, J. T., De Bruyn, J. C., Box, P., Kuenen, J. G. (1992) Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ., Microbiol.*, **58**, 2227-2230.

Pronk, J. T., de Bruyn, P., Kuenen, J. G. (1992) Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ., Microbiol.*, **58**, 2227-2230.

Pronk, J. T., Johnson D. B. (1992) Oxidation and reduction of iron by acidophilic bacteria. *Geomicro. J.*, **10**, 149-171.

Rådström, P., Bäckman, A., Ny Qian, Kragbjerg, P., Pålson, C., Olcén, P. (1994) Detection of Bacterial DNA in Cerebrospinal Fluid by an Assay for Simultaneous Detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and Streptococci Using a Seminested PCR Strategy. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 2738-2744.

Rafalet, A. (1963) L'Etude pétrographique des roches métamorphiques au contact des région Sasca Montana et Oravitza (Banat). *In*: „Asociation géologique carpatho-balkanique”, résumés des communications, Varşovia, p. 202-204

Ramirez C. (1982) *Manual and Atlas of the Penicillia*. Elsevier Biomedical Press. London.

Rankama, K., Sahama, T. G. (1950) *Geochemistry*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 657-676.

Rawlings, D. E., Kusano, T. (1994) Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.*, **58**, 39-55.

Rawlings, D. E., Pretorius, I. M., Woods, D. R. (1986) Expression of *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid functions and the development of genetic systems for the thiobacilli, *In*: H. L. Ehrlich and D. S. Holmes, eds. *Workshop on Biotechnology for the Mining, Metal-Refining and Fossil Fuel Processing Industries*. Wiley, New York, pp. 281-287.

Reuter, P., Rabus, R., Wilkes, H., Aeckersberg, F., Rainey, F. A., Jannasch, H. V., Widdel, F. (1994) Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulfate-reducing bacteria. *Nature (Lond.)*, **372**, 455-458.

Roberts, J. L. (1947) Reduction of ferric hydroxide by strains of *Bacillus polymyxa*. *Soil Sci.*, **63**, 135-140.

Roden, E. E., Lovley, D. R. (1993) Dissimilatory Fe(III) reduction by the marine microorganism *Desulfuromonas acetoxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 734-742.

Rodina, Antonina, Gavrilovna (1972) *Methods in Aquatic Microbiology*, (translated, edited and revised by Colwell, RR and Zambruski, MS), University Park Press, Baltimore.

Romanenko, V. I., Kuznetsov, S. I. (1990) *Ecology of Microorganisms in Fresh Water Basins*. Nauka, Leningrad, 191pp.

Rott, U., Meyerhoff, R. (1993) Physical, Chemical and Biological Processes in Consequences of In-Situ-Treatment of Groundwater. *IAHS Pub.*, **220**, 439-447.

Roy, A. B., Trudinger, P. A. (1970) The Biochemistry of Inorganic Compounds of Sulfur. *Cambridge University Press*, Cambridge.

Savu, H. (1977) Genesis of pegmatites from Banat (Romania). *D.S. Inst. Geol. Geofiz.*, **LXIII**, 99-111, București.

Schauder, R., Preuss, A., Jetten, M., Fuchs, G. (1989) Oxidative and reductive acetyl CoA/carbon monoxide dehydrogenase pathway in *Desulfobacterium autotrophicum*. *Arch. Microbiol.*, **151**, 84-89.

Schauder, R., Kroeger, A. (1993) Bacterial sulfur respiration. *Arch. Microbiol.*, **159**, 491-497.

Schedel, M., Trueper, H. G. (1980) Anaerobic oxidation of thiosulfate and elemental sulfur in *Thiobacillus denitrificans*. *Arch. Microbiol.*, **124**, 205-210.

Schrenk, M. O., Edwards, K. J., Goodman, R. M., Hamers, R. J., Banfield, J. F. (1998) Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: Implications for Generation of Acid Mine Drainage. *Science*, **279(5356)**, 1519 – 1522.

Segerer, A., Neuner, A., Kristiansson, J. K., Stetter, K. O. (1986) *Acidianus infernus* gen. nov., sp. nov., and *Acidianus brierleyi* comb. nov.: Facultatively aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulfur-metabolizing archaeobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**, 559-564.

Segerer, A., Neuner, A., Kristjansson, J. K., Stetter, K. O. (1986) *Acidianus infernus* gen. nov., sp. nov., and *Acidianus brierleyi* comb. nov.: Facultatively aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulfur-metabolizing archaeobacteria. *Arch. Microbiol.*, **36**, 559-564.

Seitz, H.-J., Cypionka, H. (1986) Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio desulfuricans* with hydrogen coupled to ammonification of nitrate or nitrite. *Arch. Microbiol.*, **146**, 63-67.

Shturm, L. D. (1948) Sulfate reduction by facultative aerobic bacteria. *Mikrobiologiya*, **17**, 415-418.

Silver, M., Ehrlich, H. L., Ivarson, K. C. (1986) Soil mineral transformation mediated by soil microbes, *In*: P. M. Huang and M. Schnitzer, eds. Interactions of soil minerals with natural organics and microbes. *SSSA Special Publication Number 17. Soil Science Society of America*, Madison, WI, pp. 497-519.

Silverman, M. P., Ehrlich, H. L. (1964) Microbial formation and degradation of minerals. *Adv. Appl. Microbiol.*, **6**, 153-206.

Silverman, M. P., Lundgren, D. G. (1959) Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *J. Bacteriol.*, **77(5)**, 642-7.

Smith, A. L., Kelly, D. P., Wood, A. P. (1980) Metabolism of *Thiobacillus A₂* grown under autotrophic, mixotrophic, and heterotrophic conditions in chemostat culture. *J. Gen. Microbiol.*, **121**, 127-138.

Smith, D. W., Rittenberg, S. C. (1990) On the sulfur-source requirement for growth of *Thiobacillus intermedius*. *Arch. Microbiol.*, **100**, 65-71.

Sokolova, G. A., Karavaiko, G. I. (1968) Physiology and geochemical activity of thiobacilli. English translation. U.S. Department of Commerce. Clearinghouse. *Fed. Sci Tech. Info.*, Springfield, VA.

Sorensen, J., Jorgensen, B. B. (1987) Early diagenesis in sediments from Danish coastal waters: microbial activity and Mn-Fe-S geochemistry. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **51**, 1583-1590.

Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L., Painter, P. L. (1986) The Microbial World. *5th ed. Prentice-Hall*, Englewood Cliffs, NJ.

Starkey, R. L., Robert, L. (1934) Cultivation of Organisms Concerned in the Oxidation of Thiosulfate. *J. Bacteriol.*, **28(4)**, 365-386.

Starkey, R. L. (1945) Precipitation of ferric hydrate by iron bacteria. *Science*, **102**, 532-533.

Starkey, R. L., Halvorson, H. O. (1927) Studies on the transformations of iron in nature. II. Concerning the importance of microorganisms in the solution and precipitation of iron. *Soil Sci.*, **24**, 381-402.

Stetter, K. O. (1988) *Archaeoglobus fulgidus* gen. nov., sp. nov.: a new taxon of extremely thermophilic archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, **10**, 172-173.

Stetter, K. O., Lauerer, G., Thomm, M., Neuner, A. (1987) Isolation of extremely thermophilic sulfate reducers: evidence for a novel branch of archaeobacteria. *Science*, **236**, 822-824.

Stevens, C. J., Dugan, P. R., Tuovinen, O. H. (1986) Acetylene reduction (nitrogen fixation) by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **8**, 351-359.

Strahler, A. N. (1977) Principles of Physical Geology. *Harper & Row*, New York.

Strohl, W. R., Larkin, J. M. (1978) Enumeration, isolation, and characterization of *Beggiatoa* from freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 755-770.

Stumbea, D. (1999) Alterarea supergenă a rocilor și mineralelor., *Editura Universității „Al. I. Cuza” Iași*.

Sugio, T., Hirose, T., Li-Zhen, Y., Tano, T. (1992) Purification and some properties of sulfite: ferric ion oxidoreductase from *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.*, **174**, 4189-4192.

Sugio, T., White, K. J., Shute, E., Choate, D., Blake, R. C. (1992) Existence of a hydrogen sulfide:ferric ion oxidoreductase in iron-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 431-433.

Tabita, R., Lundgren, D. G. (1971) Utilization of glucose and the effect of organic compounds on the chemolithotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.*, **108**, 328-333.

Tabita, R., Lundgren, D. G. (1971) Heterotrophic metabolism of the chemolithotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.*, **108**, 334-342.

Tasaki, M., Kamagala, Y., Nakamura, K., Mikami, E. (1991) Isolation and characterization of a thermophilic benzoate-degrading, sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum thermobenzoicum* sp. nov. *Arch. Microbiol.*, **155**, 348-352.

Taylor, P. D., Palmer, T. J. (1994) Submarine caves in a Jurassic reef (La Rochelle, France) and evolution of cave biotas. *Naturwissenschaften*, **81**, 357-360.

Temple, K. L., Colmer, A. R. (1951) The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium, *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.*, **62**(5), 605-11.

Temple, K. L., LeRoux, N. (1964) Syngeneses of sulfide ores: Desorption of adsorbed metal ions and their precipitation as sulfides. *Econ Geol.*, **59**, 647-655.

Thamdrup, B., Finster, K., Hansen, J. W., Bak, F. (1993) Bacterial disproportionation of elemental sulfur coupled to chemical reduction of iron and manganese. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 101-108.

Tittley, S. R. (1981) Porphyry copper. *Am. Scientist*, **69**, 632-638.

Tonazzio, Valérié (1998) Thèse de doctorat, Université Henri-Poincaré de Nancy, France.

Torrifford, B., Bloomfield, D. C., Kelso, W. I., Pruden, G. (1973) Ochre formation in field drains in pyritic soils. *J. Soil Sci.*, **24**, 453-460.

Tuovinen, O. H., Kelly, D. P. (1972) Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable numbers, and comparison with ¹⁴C₂-fixation and iron oxidation as measures of growth. *Arch. Mikrobiol.*, **88**, 285-298.

Tuovinen, O. H., Kelly, D. P. (1973) Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. II. Toxicity of uranium to growing cultures and tolerance conferred by mutation, other metal cations and EDTA. *Arch. Microbiol.*, **95**, 153-164.

Tuttle, J. H., Dugan, P. R., Randles, C. I. (1969) Microbial Sulfate Reduction and Its Potential Utility as an Acid Mine Water Pollution Abatement Procedure, *Appl. Microbiol.*, **17**(2), 297-302.

- Tuttle, J. H., Ehrlich, H. L. (1986) Coexistence of inorganic sulfur metabolism and manganese oxidation in marine bacteria. *Abstr., Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol.* **1(21)**, p. 168.
- Tuttle, J. H., Holmes, P. E., Jannasch, H. V. (1974) Growth rate stimulation of marine pseudomonads by thiosulfate. *Arch. Microbiol.*, **99**, 1-14.
- Vainshtein, M. B. (1977) Oxidation of hydrogen sulfide by thionic bacteria. *Mikrobiologiya*, **46**, 1114-1116 (Engl, transl. pp. 898-899).
- Vanbroekhoven, K., Van Roy, S., Gielen, C., Maesen, M., Ryngaert, A., Diels, L., Seuntjens, P. (2007) Microbial processes as key drivers for metal (im)mobilization along a redox gradient in the saturated zone. *Environ. Pollution*, **148(3)**, 759-769.
- Van den Ende, F. P., van Gemerden, H. (1993) Sulfide oxidation under oxygen limitation by a *Thiobacillus thioparus* isolated from a marine microbial mat. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **13**, 69-78.
- Van Gemerden, H. (1986) Production of elemental sulfur by green and purple sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.*, **146**, 52-56.
- Vishniac, W., Santer, M. (1957) The thiobacilli. *Bacteriol. Rev.*, **21**, 195-213.
- Vishniac, W. (1952) The metabolism of *Thiobacillus thioparus*. I. The oxidation of thiosulfate. *J. Bacteriol.*, **64**, 363-373.
- Vlad, S. N. (1974) Mineralogeneza skarnelor de la Dognecea, *Ed. Acad. RSR*, București.
- Vlad, S. N. (1994) Skarn from Ocna de Fier (Banat). Compositional and structural investigation. *Rév. roum. ser. géol.*, **38**, 25-32, București
- Vlad, S. N., Borcoș, M. (1997) Alpine metallogenesis of the Romanian Carpathians. *Rom. J. Mineral Deposits*, **78**, 5-20, București.
- Vlăsceanu, Luminița, Popa, R., Kinkle, B. K. (1997) Characterization of *Thiobacillus thioparus* LV43 and its distribution in a chemoautotrophically based groundwater ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3123-3127.
- Vlăsceanu, Luminița, Sârbu, Ș., Engel, A. S. (2000) Acidic cave-wall biofilms located in the Frasassi Gorge, Italy. *Geomicrobiol. J.*, **17**, 125-139.
- Vorreiter, L., Madgwick, J. C. (1982) The effect of sodium chloride on bacterial leaching of low-grade copper ore. *Proc. Australas. Inst. Min. Metall.*, No. **284**, pp. 63-66.
- Wakao, N., Koyatsu, H., Komai, Y., Shimokawara, H., Sakurai, Y., Shiota, H. (1988) Microbial oxidation of arsenic and occurrence of arsenic oxidizing bacteria in acid mine water from sulfur pyrite mine. *Geomicrobiol. J.*, **6**, 11-24.
- Walker, J. C. G. (1987) Was the Archean biosphere upside down? *Nature (Lond.)*, **329**, 710-712.
- Walker, J. C. G., Klein, C., Schidlowski, M., Schopf, J. W., Stevenson, D. J., Walter, M. R. (1983) Environmental evolution of the Archean-Early Proterozoic Earth. In: J. W. Schopf, ed. *Earth's Earliest Biosphere. Its Origin and Evolution*. Princeton University Press, Princeton, NJ, pp. 260-290.
- Walsh, F., Mitchell, R. (1972) An acid-tolerant iron-oxidizing *Metallogenium*. *J. Gen. Microbiol.*, **72**, 369-376.
- Walsh, F., Mitchell, R. (1972) An acid-tolerant iron-oxidizing *Metallogenium*. *J. Gen. Microbiol.*, **72**, 369-376.
- Walsh, F., Mitchell, R. (1972) The pH-dependent succession of iron bacteria. *Environ. Sci. Technol.*, **6**, 809-812.
- Wichlacz, P. L., Unz, R. F., Langworthy, T. A. (1986) *Acidiphilium angustum* sp. nov., *Acidiphilium rubrum* sp. nov.: acidophilic heterotrophic bacteria isolated from acidic coal mine drainage. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**, 197-201.
- Widdel, F., Schnell, S., Heising, S., Ehrenreich, A., Assmus, B., Schink, B. (1993) Ferrous iron oxidation by anoxygenic phototrophic bacteria. *Nature (Lond.)*, **362**, 834-836.

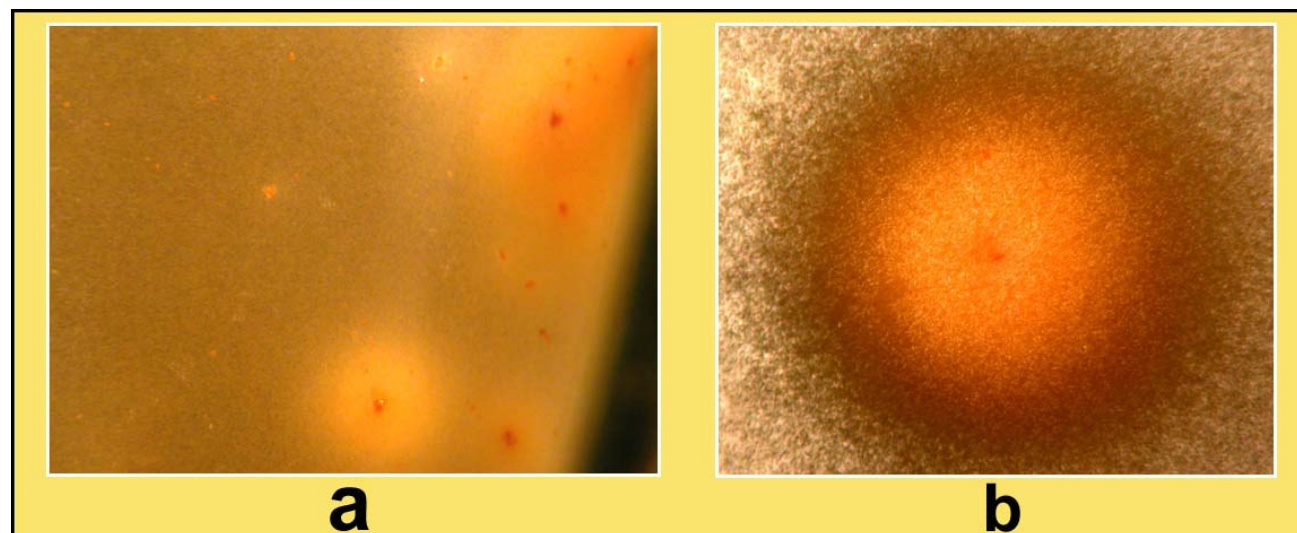
- Widdel, F., Pfennig, N. (1981) Sporulation and further nutritional characteristics of *Desulfotomaculum acetoxidans*. *Arch. Microbiol.*, **129**, 401-402.
- Winogradsky, S. (1888) Ueber Eisenbakterien. *Bot. Ztg.*, **46**, 261-276.
- Winogradsky, S. (1922) Eisenbakterien als Anorgoxydanten. *Z. Bakteriologie. Parasitenkunde. Infektionskrankheiten. Hygiene. Abt. II*, **57**, 1-21.
- Winogradski, S. M. (1952) Soil microbiology (in Russian). *Probl. Met. Izd. AN SSSR*, Moscow, 792 pp.
- Wirsen, C. O., Jannasch, H. W. (1978) Physiological and morphological observations on *Thiovulum* sp. *J. Bacteriol.*, **136**, 765-774.
- Wood, A. P., Kelly, D. P. (1983) Autotrophic, mixotrophic and heterotrophic growth with denitrification by *Thiobacillus* A₂ under anaerobic conditions. *FEMS Microbiol. Lett.*, **16**, 363-370.
- Wood, A. P., Kelly, D. (1991) Isolation and characterization of *Thiobacillus halophilus* sp. nov., a sulfur-oxidizing autotrophic eubacterium from a Western Australian hypersaline lake. *Arch. Microbiol.*, **156**, 277-280.
- Wood, P. (1988) Chemolithotrophy, *In: C. Anthony, ed. Bacterial Energy Transduction*. Academic Press, London, pp. 183-230.
- Zarnea, G. (1994) *Tratat de Microbiologie generală, (în V volume) Editura Academiei Române, București.*
- Zavarzin, G. A. (1972) Heterotrophic satellite of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Mikrobiologiya*, **41**, 369-370 (Engl. trans., pp. 323-324).
- Zillig, W., Yeats, S., Holz, I., Boeck, A., Gropp, F., Rettenberger, M., Lutz, S. (1985) Plasmid-related anaerobic autotrophy of the novel archaeobacterium *Sulfolobus ambivalens*. *Nature (Lond.)*, **313**, 789-791.
- Zycha H., Siepmann R. (1969) *Mucorales, eine beschreibung aller Gattungen und Arten dieser Pilzgruppe. Verlag von J. Cramer.*
- Xu, J., Song, Y., Min, B., Steinberg, L., Logan, B. E. (2003) Microbial Degradation of Perchlorate: Principles and Applications. *Environ. Eng. Sci.*, **20(5)**, 405-422.

ANEXA I

Fig. 8.1.1.1.1. a. Culturi de *Acidithiobacillus ferrooxidans* în baloane Erlenmeyer în mediul 9K lichid; b. Culturi seriale pe mediul 9K lichid.

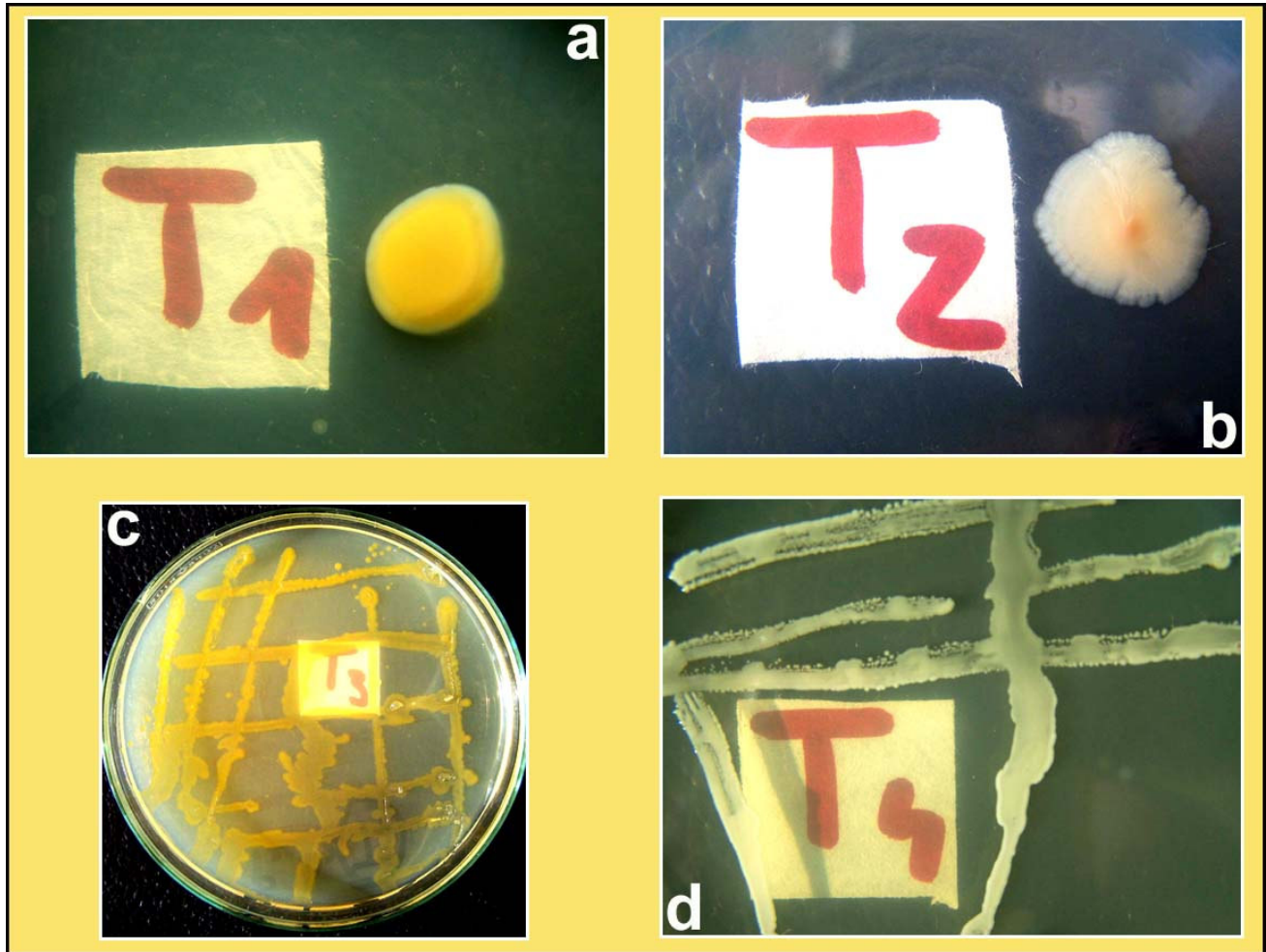


Fig. 8.1.1.1.2. a. Colonii de *Acidithiobacillus ferrooxidans* pe mediul de cultură 9K solid văzute cu ochiul liber; b. Colonie de *A. ferrooxidans* la lupa binoculară (mărire 10 x 4,5).



ANEXA II

Fig. 8.1.1.2.1. a., b., c., d. Tipuri de heterotrofi izolați pe mediul de cultură geloză simplă din balta cu depuneri.



ANEXA III

Fig. 8.1.1.3.1. Actinomicete izolate pe mediul solid Manning din stalactitele mucilaginoase.

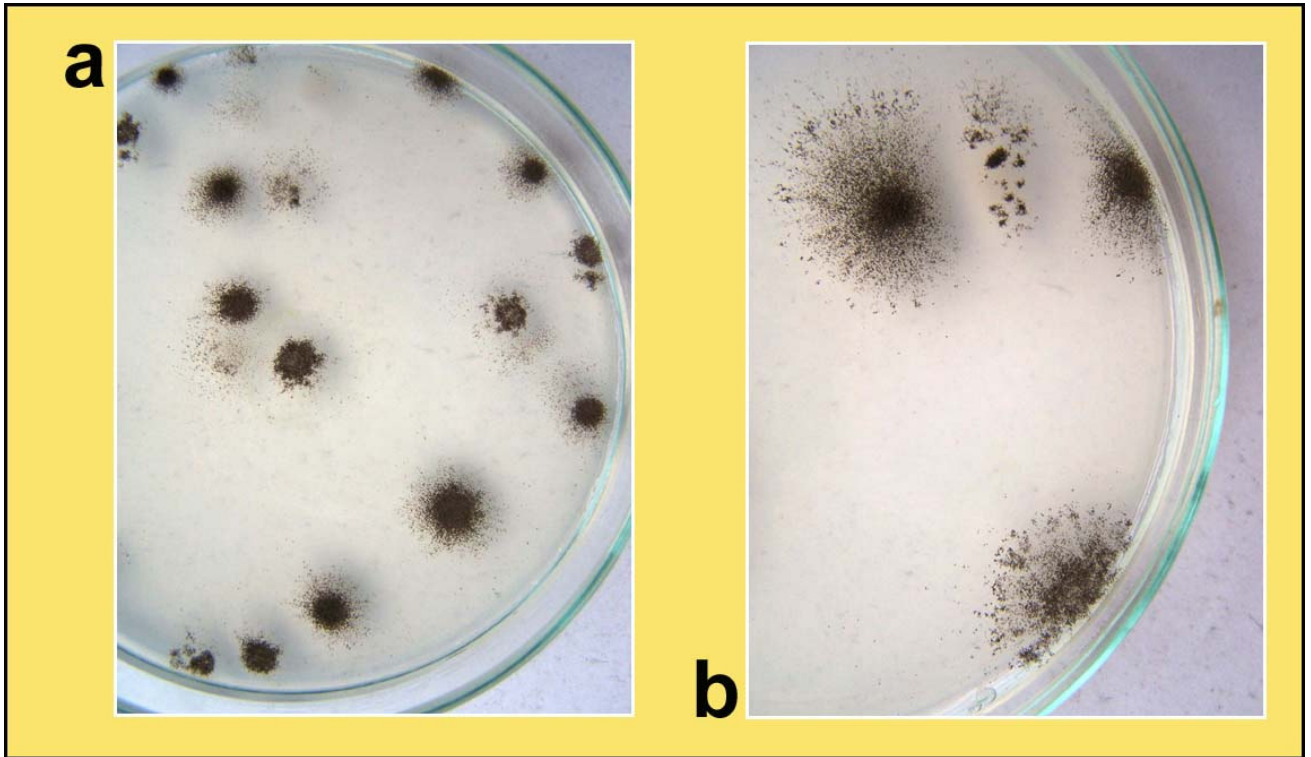


Fig.8.1.1.4.1. a., b. Ciuperci izolate pe mediul de cultură solid Czapeck.



ANEXA IV

Tabelul 8.1.2.1.1. Analiza cantitativă a bacteriilor prin metoda diluțiilor (MPN) (Rodina 1972):

Nr. Carac.	Număr probabil în tuburi test prezente în paralel.			Nr. Carac.	Număr probabil în tuburi test prezente în paralel.			Nr. Carac.	Număr probabil în tuburi test prezente în paralel.		
	3	5	4		3	4	5		3	4	5
000	0,0	0,0	0,0	222	3,5	2,0	1,4	433	-	30,0	-
001	0,2	0,2	0,2	223	4,0	-	-	434	-	35,0	-
002	-	0,5	0,4	230	3,0	1,7	1,2	440	-	25,0	3,5
003	-	0,7	-	231	3,5	2,0	1,4	441	-	40,0	4,0
010	0,3	0,2	0,2	232	4,0	-	-	442	-	70,0	-
011	0,6	0,5	0,4	240	-	2,0	0,4	443	-	140,0	-
012	-	0,7	0,6	241	-	3,0	-	444	-	160,0	-
013	-	0,9	-	300	2,5	1,1	0,8	450	-	-	4,0
020	0,6	0,5	0,4	301	4,0	1,6	1,1	451	-	-	5,0
022	-	0,5	0,6	302	0,5	-	1,4	501	-	-	6,0
030	-	0,7	0,6	310	4,5	1,6	1,1	502	-	-	4,0
031	-	0,9	-	311	7,5	2,0	1,4	503	-	-	6,0
040	-	0,9	-	312	11,5	3,0	1,7	504	-	-	7,5
041	-	1,2	-	313	16,0	3,5	2,0	510	-	-	3,5
100	0,4	0,3	0,2	320	9,5	2,0	1,4	511	-	-	4,5
101	0,7	0,5	0,4	321	15,0	3,0	1,7	512	-	-	6,0
102	1,1	0,8	0,6	322	20,0	3,5	2,0	513	-	-	9,5
103	-	1,0	0,8	323	30,0	-	-	520	-	-	5,0
110	0,7	0,5	0,4	330	25,0	3,0	1,7	521	-	-	7,0
111	1,1	0,8	0,6	331	45,0	3,5	2,0	522	-	-	9,5
112	-	1,1	0,8	332	110,0	4,0	-	523	-	-	12,0
113	-	1,3	-	333	140,0	5,0	-	524	-	-	15,0
120	1,1	0,8	0,6	340	-	3,5	2,0	525	-	-	17,5
121	1,5	1,1	0,8	341	-	4,5	2,5	530	-	-	8,0
122	-	1,3	1,0	350	-	-	2,5	531	-	-	11,5
128	-	1,6	-	400	-	2,5	1,3	532	-	-	14,0
130	1,6	1,1	0,8	401	-	3,5	1,7	533	-	-	17,5
131	-	1,4	1,0	402	-	5,0	2,0	534	-	-	20,0
132	-	1,6	-	406	-	7,0	2,5	536	-	-	20,0
140	-	1,4	1,1	410	-	3,5	1,7	540	-	-	13,0
141	-	1,7	-	411	-	3,5	2	541	-	-	17,0
200	0,9	0,6	0,5	412	-	8,0	2,5	542	-	-	25,0
201	1,4	0,9	0,7	413	-	11,0	-	543	-	-	30,0
202	2,0	1,2	0,9	414	-	14,0	-	544	-	-	35,0
203	-	1,6	1,2	420	-	6,0	2,0	545	-	-	45,0
210	1,5	0,9	0,7	421	-	9,5	2,5	550	-	-	25,0
211	2,0	0,3	0,9	422	-	13,0	3,0	551	-	-	35,0
212	8,0	1,6	1,2	423	-	17,0	-	552	-	-	60,0
213	-	2,0	-	424	-	20,0	-	552	-	-	90,0
220	2,0	1,3	0,2	430	-	11,5	2,5	554	-	-	100,0
221	3,0	1,0	1,2	431	-	16,5	3,0	555	-	-	130,0
				432	-	20,0	4,0				

ANEXA V

Tabelul 8.1.3.1.1.: Identificarea speciilor din genul *Acidithiobacillus* (M., Hutchinson, K., I., Johnstone, D., White, 1969)

Legenda tabelului: A = tipurile „tromtweirii”; B = grupul 1a; C = *Acidithiobacillus novellus*; D = *A. denitrificans*; E = *A. thioparus*; F = *A. neapolitanus*; G = *A. thiooxidans*; H = *A. ferrooxidans*; I = *A. intermedius*; ng = nu cresc.

Cel mai important criteriu din tabel este pH-ul final al culturilor, majoritatea celorlalte teste fiind utilizate pentru confirmare.

Specie		A	B	C	D	E	F	G	H	I
Grup		0	1a	1	2	3	4	5	6	7
Mediu	Criteriu					3,5-4,5	>3	sub1		1,9-2,2
+ S ₆ /S ₅	pH final	>6,6	6,5-5	6,6-5	6,6-5	6,6-3,5	3,5-2,8	<2	<2	>2<2,8
S ₆ /S ₅	% tiosulfat oxidat	<90%	<50%	<30%	<90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%
S ₀ + 6% tiosulfat	% tiosulfat	<10%	<10%	<10%	<10%	<10%	>10%	>10%	<10%	<10%
S ₆ /S ₅ + 4% fosfat	inhibiție	+/-	+	+	+	+	-	-	+	+
S ₆ /S ₅ + 5% NaCl	inhibiție	+	+	+	+	+	-	+/-	+	+
+ sulf	pH final	ng.	6,1-6,25	ng.	5,15	4,6-4,1	3,2-3,8	<2	<2	>2<2,8
S ₈	creștere	+	+	-	+	+/-	-	-	-	-
condiții anaerobe	formare de gaz	-	-	-	+	-	-	-	-	-
S ₇	oxidarea tiocianatului	-	-	-	+	+	-	-	-	-
S ₀ + O ₂ 5% ditionat	schimbare pH	-	-	-	-	+/-	-	+	-	-
fier	oxidare fier	-	-	-	-	-	-	-	+	-
mediul nutrit. cu agar	creștere	+	+	+	-	-	-	-	-	+
citrat	creștere	+	-	-	-	-	-	-	-	+
tiosulfat agar	depozit de S	-	-	+	+	+	+	+	-	+

ANEXA VI

Tabelul 8.1.4.1. Valorile limită ale coeficienților de corelație r_{\max} pentru diferite grade de libertate și probabilități de transgresiune α (testul bilateral) (după Erna Weber, 1961).

GL (n-2)	$\alpha = 10\%$	$\alpha = 5\%$	$\alpha = 1\%$	$\alpha = 0,5\%$	$\alpha = 0,1\%$
1	0,988	0,997	1,000	1,000	1,000
2	0,900	0,950	0,990	0,995	0,999
3	0,805	0,878	0,959	0,974	0,991
4	0,729	0,811	0,917	0,942	0,974
5	0,669	0,755	0,875	0,906	0,951
6	0,621	0,707	0,834	0,870	0,925
7	0,582	0,666	0,798	0,836	0,898
8	0,549	0,632	0,765	0,805	0,872
9	0,521	0,602	0,735	0,776	0,847
10	0,497	0,576	0,708	0,750	0,823
11	0,476	0,553	0,684	0,726	0,801
12	0,457	0,532	0,661	0,703	0,780
13	0,441	0,514	0,641	0,683	0,760
14	0,426	0,497	0,623	0,664	0,742
15	0,412	0,482	0,606	0,647	0,725
16	0,400	0,468	0,590	0,631	0,708
17	0,389	0,456	0,575	0,616	0,693
18	0,378	0,444	0,561	0,602	0,679
19	0,369	0,433	0,549	0,589	0,665
20	0,360	0,423	0,537	0,576	0,652
25	0,323	0,381	0,487	0,524	0,597
30	0,296	0,349	0,449	0,484	0,554
35	0,275	0,325	0,418	0,452	0,519
40	0,257	0,304	0,393	0,425	0,490
45	0,243	0,288	0,372	0,403	0,465
50	0,231	0,273	0,354	0,384	0,443
60	0,211	0,250	0,325	0,352	0,408
70	0,195	0,232	0,302	0,327	0,380
80	0,183	0,217	0,283	0,307	0,357
90	0,173	0,205	0,267	0,290	0,338
100	0,164	0,195	0,254	0,276	0,321
125	0,147	0,174	0,228	0,248	0,289
150	0,134	0,159	0,208	0,227	0,264
200	0,116	0,138	0,181	0,197	0,230
300	0,095	0,113	0,148	0,161	0,188
400	0,082	0,098	0,128	0,140	0,164
500	0,074	0,088	0,115	0,125	0,146
600	0,067	0,080	0,105	0,114	0,134
700	0,062	0,074	0,097	0,106	0,124
800	0,058	0,069	0,091	0,099	0,116
900	0,055	0,065	0,086	0,093	0,109
1000	0,052	0,062	0,081	0,089	0,104

Tabelul 8.1.4.2. Coeficienți de corelație pentru diferite niveluri de încredere

Numărul de parametrii	Grade de libertate	80%	90%	95%	99%	99,9%
3	1	0,951	0,988	0,997	1,000	1,000
4	2	0,800	0,900	0,950	0,990	0,999
5	3	0,687	0,805	0,878	0,959	0,991
6	4	0,608	0,729	0,811	0,917	0,974
7	5	0,551	0,669	0,755	0,875	0,951
8	6	0,507	0,621	0,707	0,834	0,925
9	7	0,472	0,582	0,666	0,798	0,898
10	8	0,443	0,549	0,632	0,765	0,972
11	9	0,419	0,521	0,602	0,735	0,847
12	10	0,398	0,497	0,576	0,708	0,823
13	11	0,380	0,476	0,553	0,684	0,801
14	12	0,365	0,457	0,532	0,661	0,780
15	13	0,351	0,441	0,514	0,641	0,760
16	14	0,338	0,426	0,497	0,623	0,742
17	15	0,327	0,412	0,482	0,606	0,725
18	16	0,317	0,400	0,468	0,590	0,708
19	17	0,308	0,389	0,456	0,575	0,693
20	18	0,299	0,378	0,444	0,561	0,679
21	19	0,291	0,369	0,433	0,549	0,665
22	20	0,284	0,360	0,423	0,537	0,652
23	21	0,277	0,352	0,413	0,526	0,640
24	22	0,271	0,344	0,404	0,515	0,629
25	23	0,265	0,337	0,396	0,505	0,618
26	24	0,260	0,330	0,388	0,496	0,607
27	25	0,255	0,323	0,381	0,487	0,597
28	26	0,250	0,317	0,374	0,479	0,588
29	27	0,245	0,311	0,367	0,471	0,579
30	28	0,241	0,306	0,361	0,463	0,570
31	29	0,237	0,301	0,355	0,456	0,562
32	30	0,233	0,296	0,349	0,449	0,554
42	40	0,202	0,257	0,304	0,393	0,490
62	60	0,165	0,211	0,250	0,325	0,408
122	120	0,117	0,150	0,178	0,232	0,294

Rezumat

Pereții vechii mine de sulfuri aurifere Kiesberg din S-V-tul României, sunt alimentați cu apă meteorică care percolează de la suprafață traversând microfisurile rocii până la cavitate. Acești pereți sunt colonizați de asociații microbiene diversificate. Funcționarea acestor Consorții se bazează pe oxidarea mineralelor, în special a sulfurilor foarte abundente în rocă, iar aceasta conduce la formarea de compuși minerali oxidați care se depozitează în cantitate mare la exteriorul celulelor vii formând acumulări de diverse tipuri. Înțelegerea funcționării acestor microecosisteme și a genezei depozitelor minerale formate, necesită o inventariere microbiologică (tehnicile clasice și metode genetice), urmată de analize chimice ale soluțiilor și de stabilirea rapoartelor spațiale și temporale între minerale și organisme, necesitând observații macroscopice și microscopice prin utilizarea microscopiei electronice (MET, MEB-EDS, crio-MEB).

Crustele și "Stalactitele policrome", reprezintă rezultatul asocierii între *Acidithiobacillus ferrooxidans* (chemolitotrof) și șase specii de ciuperci din genul *Penicillium* (heterotrofe) într-un mediu acid (pH 1,2). Mari cantități de Fe^{2+} sunt oxidate de *A. ferrooxidans*, rezultând $Fe(OH)_3$ care se depune la exteriorul hifelor de *Penicillium*, cât și la exteriorul biofilmului, formând o lamină de $Fe(OH)_3$. Hifele mineralizate, formează scheletul intern al stalactitelor, acestea fiind învelite în laminele de hidroxid feric.

Consoțiile "Formațiunilor mucilaginoase", sunt constituite din șaptesprezece specii de microorganisme cuprinzând chemolitotrofe (4 specii de acidithiobacili), și heterotrofe (actinomicete și 12 specii de ciuperci), reunite într-o masă compactă de mucopolizaharide, într-un mediu acid (pH 2,8). Chemolitotrofele dominante cu metabolismul lor intens, determină oxidarea piritei. Aceasta are ca urmare: (1) eliberare de Fe^{2+} dând prin biooxidare $Fe(OH)_3$, care se depune în mucopolizaharidele extracelulare, conducând la formarea de stalactite sau de cruste, (2) eliberare de compuși ai sulfurii, care prin biooxidare dau cantități importante de SO_4^{2-} . $Fe(OH)_3$ nedepus și SO_4^{2-} , la care se adaugă ioni de K^+ , duc la formarea și precipitarea de jarosit, în zonele centrale ale stalactitelor, dar și pe pereții cavității. În anumite condiții, compuși ai Fe, Ni, Cr (mobilizați din rocă de către H_2SO_4 rezultat din activitatea bacteriană) precipită pe biofilmele bacteriene ale „formațiunilor mucilaginoase”, sub formă vermiculară. Producții rezultați din activitatea unor heterotrofe, în masa de mucopolizaharide, pot conduce la formarea de calcit protejat de mediul acid exterior de un înveliș mucopolizaharidic.

"Balta", dispusă în profunzimea minei, reprezintă un veritabil bazin de epurare, cu un pH aproape de neutralitate, în care se desfășoară metabolismul microorganismelor chemolitotrofe, cât și intense metabolisme chemolitotrofe. Două tipuri de depuneri (roșii și albe) se individualizează în baltă, în acestea fiind identificate 13 specii (10 în depunerea roșie și 3 în depunerea albă). Depunerea roșie se caracterizează printr-un metabolism chemolitotrof care cuprinde, alte oxidări ale compușilor cu sulf, oxidarea Fe^{2+} din care rezultă $Fe(OH)_3$, care se depune pe filamente spirale organice, probabil de *Gallionella ferruginea*. Numeroși heterotrofi metabolizează abundenta materie organică de origine alohtonă, provenind, odată cu apa, din toate sectoarele cavității. Depunerea albă este în special constituită din acumularea de micro și nanosferule aluminat în care Al rezultă din alterarea silicaților (feldspați) din roca mamă.

Cuvinte cheie: mină, România, sulfuri, pirită, jarosit, aluminat, hidroxid de fier, oxidare, speleoteme, stalactite, snotite, cruste, mucopolizaharide, mucilaginos, bacterii, *Acidithiobacillus*, fungi, *Penicillium*, actinomicete, alterare, chemolitotrofie, heterotrofie, consorțiu, microbiologie, MET, MEB.



UNIVERSITÉ BABEŞ-BOLYAI CLUJ-NAPOCA
ROUMANIE
L'INSTITUTE D'ETUDES DOCTORALES CLUJ - NAPOCA



UNIVERSITÉ FRANÇOIS RABELAIS – TOURS
FRANCE

ÉCOLE DOCTORALE : SANTÉ, SCIENCES,
TECHOLOGIES

ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2007 - 2008

Résumé de la thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Tours et de l'Université de Cluj-Napoca

présentée par **Vasile – Daniel Gherman**
soutenue publiquement le 17 mars 2008

Discipline : **Sciences de la Terre, Biologie**
Spécialité : **Géologie de la Surface, Microbiologie**

RECHERCHES SUR LES RELATIONS ENTRE POPULATIONS MICROBIENNES ET MINÉRALISATIONS DES SPÉLÉOTHÈMES DANS LES MINES D'ORAVITA (ROUMANIE). LE PROBLEME DES TRANSFORMATIONS DU SOUFRE ET DU FER

Directeurs de thèse : **Mihail Dragan – Bularda**
Jean – Gabriel Bréhéret

Membres du Jury

Jean – Gabriel Bréhéret	Professeur, directeur de thèse	Université François Rabelais de Tours
Constantin Cocirta	Maître de conférence	Université François Rabelais de Tours
Jean – Robert Disnar	Directeur de Recherches au CNRS,	Université d'Orleans, Rapporteur
Mihail Dragan – Bularda,	Professeur, directeur de thèse	Université Babeş – Bolyai, Cluj-Napoca
Simona – Isabela Dunca	Maître de conférence	Université Alexandru Ioan Cuza, Iasi, Rapporteur
Daniela Pasca	Maître de conférence	Université Technique Cluj - Napoca

Avant propos

Les recherches de cette thèse ont commencé en 2001, à l'Institut de Biologie de l'Académie Roumaine de Bucarest, sous l'attentive coordination de l'académicien Gheorghe Zarnea. Je tiens à remarquer la contribution particulière de deux membres de cette équipe de coordination, Dr Lucia Dumitru et Prof Lucian Ghinea.

De 2004 jusqu'à présent, les recherches ont continué auprès du Laboratoire de Géologie des Environnements Aquatiques Continentaux (GéEAC) de l'Université François Rabelais de Tours, France, sous la forme d'une cotutelle, bénéficiant du conseil attentif et de très haute qualité scientifique du Prof Jean-Gabriel Bréhéret. Dans le cadre de cette cotutelle, nous avons bénéficié d'une bourse du Gouvernement français.

En 2007, pour des raisons de santé, l'Académicien Gheorghe Zarnea s'est retiré des fonctions détenues à l'Institut de Biologie de Bucarest, et la coordination de cette thèse, pour la partie roumaine, a été reprise, avec beaucoup d'intérêt et de professionnalisme, par le Professeur Mihail Drăgan Bularda de l'Université Babeş-Bolyai de Cluj Napoca.

Je voudrais commencer par remercier à Jean – Gabriel Bréhéret (Université François Rabelais de Tours), Constantin Cocirta (Université François Rabelais de Tours), Jean – Robert Disnar (Université d'Orleans), Mihail Dragan – Bularda (Université Babeş – Bolyai, Cluj-Napoca), Simona – Isabela Dunca (Université Alexandru Ioan Cuza, Iasi) et Daniela Pasca (Université Technique Cluj – Napoca) qui ont eu l'amabilité d'accepter de juger ce travail.

Je tiens à adresser des remerciements particuliers à mon « chef », Prof. Jean-Gabriel Bréhéret, qui, dès le début, a montré une confiance totale et qui a participé avec une passion réelle aux actions sur le terrain, lors du prélèvement des échantillons, mais aussi à leur examen M.E.B. et à l'interprétation des résultats. J'adresse aussi mes plus sincères remerciements à mes « chefs » l'Académicien Gheorghe Zarnea, pour son aide et sa confiance, et au Professeur Mihail Dragan Bularda de l'Université Babeş-Bolyai de Cluj Napoca, qui m'a beaucoup aidé, par ses conseils et sa contribution, à peaufiner cette thèse.

Je voudrais aussi remercier M. Constantin Cocirta, maître de conférences, du Laboratoire GéEAC de l'Université François Rabelais de Tours, qui, faisant preuve d'une grande confiance en mes compétences, a recommandé cet sujet de recherches à mon directeur de thèse et à l'équipe du laboratoire dirigé par le Professeur Jean-Jacques Macaire, sans l'aide desquels je n'aurais pas pu achever le travail.

J'adresse aussi mes remerciements aux extraordinaires spécialistes du Laboratoire de Microscopie Électronique de Tours, dirigés par Brigitte Arbeille et Philippe Roingard: Pierre-Yves Sizaret, Pierre-Ivan Raynal, Christophe Hourieux, Emmanuelle Blanchard-Laumonier, Claude Lebos, Monique Lemesle, Sylvie Trassard, Fabienne Arcanger, Marie-Paule Regner et Iabelle Sausseureau qui, avec une patience remarquable, ont été mes professeurs avertis dans les techniques de microscopie électronique et dans les pièges de la langue française, mais qui, peu à peu, sont aussi devenus de vrais amis.

Pour leur soutien dans l'accomplissement des analyses de microbiologie, je remercie l'équipe du Département de Microbiologie de l'Institut de Biologie de Bucarest, dirigée par le Dr Lucia Dumitru, et l'équipe du Département de Bactériologie de l'hôpital Bretonneau de Tours, dirigée par M. Laurent Mereghetti. Je remercie aussi l'équipe du Laboratoire d'Analyse de l'Eau de la Régie des Eaux Roumaines Timisoara, coordonnée par Mme Dana Muntean, pour son aide lors des analyses chimiques des échantillons de la Mine Kiesberg.

Je remercie aussi pour leur précieuse aide:

- Mlle Ing. Angelica Crisan, pour ses informations sur la géologie de la zone étudiée;
- M. Dr. Ionel Bota, pour ses informations sur l'histoire des exploitations minières de la zone d'Oravița;
- mes collègues du Club de spéléologie Prusik de Timișoara, pour la mise au point de la carte de la mine Kiesberg ;
- Dr. Marcel Török de la Faculté de Géographie, pour la mise au point des cartes géologiques et topographiques de la zone étudiée;

- mes collègues Virgil Jumanca, Dan Bogdan, Florin Horak, qui n'ont jamais refusé notre invitation d'explorer la mine ensemble ou de prélever des échantillons, sans tenir compte du temps qu'il faisait.

J'adresse aussi des remerciements particuliers à ma famille, qui m'a toujours aidé et soutenu dans mes démarches, et je voudrais m'excuser pour les émotions que je l'ai fait vivre pendant les longues et nombreuses heures d'exploration de la mine.

Introduction

1. Milieux extrêmes de vie. Objet de l'étude et importance des recherches de la thèse

Les milieux de vie, dont une ou plusieurs caractéristiques physiques et/ou chimiques se situent aux limites imposées par la vie, nécessitant alors une adaptation drastique des organismes et en excluant la plupart profitant de conditions moyennes, sont qualifiés de „milieux extrêmes de vie”. Ils concernent ces environnements qui s'écartent notablement de la moyenne pour des paramètres variés, température (vers le chaud : thermophiles, vers le froid : psychrophiles), pression (barophiles ou piézophiles), excès ou absence de lumière, dessiccation, salinité (halophiles), pH (alcaliphiles ou acidophiles), concentrations en métaux, en éléments radioactifs, en matière organique etc. Le terme d' "extrémophiles" est appliqué aux organismes adaptés à ces milieux.

Les études consacrées à ces milieux de vie se sont multipliées depuis quelques décennies; des adaptations spécifiques des organismes extrémophiles ont ainsi été mises en évidence. A cet égard, les différents milieux à micro-organismes extrémophiles de la Terre retiennent l'attention des exobiologistes qui étudient la possible existence d'autres formes de vie en dehors de notre planète. La recherche de planètes „habitables” constitue l'un de leurs objectifs. Cela requiert de définir les conditions limites du développement de la vie, sachant que les caractéristiques des environnements planétaires susceptibles d'abriter la vie peuvent s'écarter très loin de la moyenne terrestre. Les communautés de micro-organismes extrémophiles de la Terre représentent donc des modèles d'adaptation aux valeurs extrêmes de certains facteurs ainsi que des modèles de fonctionnement de certains écosystèmes dans des conditions extrêmes, ce qui revient à la question de l'apparition de la vie sur Terre, si ce n'est sur d'autres planètes. Notamment, dans quelle mesure certains organismes ne seraient pas restés dans leur milieu d'origine depuis plus de 3,5 milliards d'années, ayant développé les mécanismes leur permettant de tirer parti de conditions considérées extrêmes dans la nature actuelle ?

Du point de vue écologique et évolutionniste, les milieux extrêmes de vie sont des milieux simples, avec un nombre réduit d'espèces, essentiellement unicellulaires et procaryotes, mais souvent avec un nombre relativement important de cellules par unité de volume. Comme peu d'espèces peuvent exister dans les milieux extrêmes, deux types de questions peuvent se poser : (a) Comment les organismes adaptés peuvent-ils supporter l'action des facteurs de milieu ? (Brock, 1978) ? (b) Pour quelles raisons la plupart des microorganismes ne supportent pas ces conditions extrêmes ?

Il existe trois modalités d'adaptation d'une espèce de micro-organisme aux conditions extrêmes de milieu :

- l'espèce développe un mécanisme d'exclusion de l'influence du facteur de contrainte sur sa structure ;
- elle développe un mécanisme d'annihilation de ce facteur de stress ;
- elle apprend à coexister avec le facteur de stress (Brock, 1978).

Les recherches consacrées aux milieux acides extrêmes ont acquis à cet égard une importance pratique de plus en plus grande, car l'étude de l'écologie des micro-organismes des milieux riches en métaux, par exemple, offre la base du développement des technologies biologiques de transformation des minerais (Johnson, 1999). Les producteurs primaires des milieux acides sont représentés par les bactéries chimiolithotrophes oxydant le fer et le soufre, et les micro-organismes acidophiles phototrophes, tels que les thermophiles modérées *Galdieria sulphuraria*, qui peuvent aider à l'assimilation du carbone dans les zones exposées aux rayons solaires.

Le carbone fixé, provenant des producteurs primaires vivants ou morts, est utilisé par les bactéries acidophiles hétérotrophes (ex. *Acidiphilium*), ce qui peut stimuler le développement des bactéries chimiolithotrophes, car certaines d'entre elles (*Leptospirillum ferrooxidans*) ont une grande affinité pour les composés organiques solubles. Ainsi, les populations mixtes acidophiles ont tendance à devenir plus résistantes et plus efficaces que celles des cultures pures correspondantes. De plus, dans les consortiums de micro-organismes acidophiles, les composés produits par d'autres populations microbiennes peuvent servir de donneurs ou d'accepteurs d'électrons (les bactéries ferro-oxydantes et ferro-réductrices), etc. (Rawlings, 1997).

L'oxydation microbienne des divers composés métalliques réduits, de beaucoup plus efficace que l'oxydation chimique, engendre des composés métalliques oxydés qui peuvent se déposer soit

activement soit passivement sur différentes structures extra-cellulaires électronégatives, généralement abondamment synthétisées par les micro-organismes extrémophiles. Ainsi, dans ces milieux particuliers apparaissent des formations minérales d'origine biogène. Ce type de formations minérales d'origine biogène constitue l'objet d'étude de notre thèse.

Nos recherches ont été menées dans une mine désaffectée, la mine Kiesberg, au S-O de la Roumanie, dans le département de Caraş-Severin, près de la ville d'Oraviţa; outre des aspects théoriques, elles conduisent à des conséquences pratiques. Du point de vue théorique le fait que chaque milieu extrême présente une série de caractéristiques spécifiques induisant le développement de communautés de micro-organismes différentes et un fonctionnement particulier de l'écosystème, rendait nécessaire de démontrer le mécanisme des microécosystèmes caractéristiques de la mine Kiesberg. Mais, d'autre part, nous souhaitons tester, à l'aide des communautés de micro-organismes étudiées, l'efficacité de l'élimination du fer et du manganèse des nappes phréatiques de profondeur, exploitées par forage et destinées à l'alimentation en eau de la ville de Timişoara.

2. Organisation de la thèse

La thèse a été organisée en six parties et douze chapitres.

La **Partie I Questions générales sur la microbiologie du fer et du soufre** est structurée en deux chapitres et représente une partie théorique. Considérant les données de la littérature, son but est d'établir le rôle des micro-organismes dans le cycle du soufre et du fer dans la nature, compte tenu du fait que l'objet d'étude de la présente thèse est représenté par les communautés microbiennes d'un milieu très riche en fer et en soufre.

La **Partie II Zone minière d'Oraviţa. Mine Kiesberg** est structurée en quatre chapitres et comprend une présentation de la zone où nous avons effectué nos recherches. Après un rappel des données géographiques et climatiques de la zone minière d'Oraviţa, l'évocation de l'historique des exploitations minières de la zone, les caractéristiques géologiques de la zone et de la mine étudiée seront précisées. Plus précisément, la mine Kiesberg sera décrite et les sites de prélèvement des échantillons seront présentés.

La **Partie III Recherches effectuées sur les sites de la mine Kiesberg. Techniques utilisées**, structurée en deux chapitres, comprend les analyses chimiques effectuées sur les eaux prélevées dans la Galerie Kiesberg Supérieure et les techniques utilisées pour les analyses, ainsi que les déterminations microbiologiques à l'aide de ces techniques.

La **Partie IV Etude des échantillons en microscopie électronique** comprend deux chapitres traitant, d'une part, des techniques utilisées pour les préparations destinées à la microscopie électronique et, d'autre part, les observations effectuées et les données obtenues.

La **Partie V Mécanismes métaboliques à la base de l'apparition des formations étudiées** concerne, en un chapitre, une proposition d'explication des mécanismes physiques, chimiques, biologiques et biochimiques à l'origine du développement des formations étudiées.

La **Partie VI Utilisation pratique des consortiums dans la déferrisation et la démanganisation des eaux de forage** (un chapitre) traite de notre expérience destinée à tester l'efficacité des consortiums de micro-organismes étudiés dans l'élimination du fer et du manganèse des nappes phréatiques de profondeur exploitées par forage dans la ville de Timişoara.

À ces 6 parties et 12 chapitres s'ajoutent **les conclusions, la bibliographie, la liste des figures, la liste des tableaux et les annexes.**

Partie I. Questions générales sur la microbiologie du fer et du soufre

Chapitre 1. Physiologie et activité biochimique des ferrobactéries

Certaines bactéries, oxydantes acidophiles du fer, oxydent le Fe^{2+} pour obtenir l'énergie nécessaire. De telles bactéries sont : *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*), *Sulfolobus sp.*, *Acidianus brierleyi*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*) a été la plus étudiée (paragraphe 1.4.) et en 2000 *Thiobacillus* a été renommé *Acidithiobacillus* (Kelly et al., 2000). Dans l'étude des acidophiles, la preuve la plus convaincante de l'oxydation microbienne du fer est le fait que le Fe^{2+} est le moins susceptible à l'auto-oxydation sous un pH 5. Certaines bactéries qui se développent près du pH neutre peuvent aussi oxyder le fer. La bactérie *Galionella ferruginea* métabolise le fer par chimiolithotrophie, tandis que la bactérie capsulée *Leptotrix sp.* le métabolise par mixotrophie. Ces micro-organismes ont besoin d'un milieu partiellement réduit pour cette activité. *Leptotrix sp.* peut aussi précipiter passivement le fer dans sa capsule.

Le Fe^{2+} peut aussi être oxydé sans activité enzymatique par des micro-organismes, lorsque leur métabolisme induit l'augmentation du potentiel rédox et/ou le pH du milieu, favorisant ainsi l'auto-oxydation. L'augmentation du potentiel rédox est due à la présence des oxydants issus de leur métabolisme. L'augmentation du pH est due à la production de l'ammoniac, à la photosynthèse, à la consommation de sels organiques dont certains peuvent chélater le Fe^{2+} .

La précipitation du Fe^{3+} n'implique pas toujours l'oxydation du Fe^{2+} . Le Fe^{3+} peut être stabilisé dans la solution par chélation. Les chélateurs, produits naturels pouvant solubiliser de grandes quantités de Fe^{3+} , comprennent les oxalates, les citrates, les acides humiques et les tanins, (produits naturels). La précipitation du Fe^{3+} peut se produire suite à la minéralisation microbienne de ces chélateurs. Il a ainsi été identifié un certain nombre de bactéries actives. Le Fe^{3+} peut être localement concentré par adsorption à la surface de la cellule, ainsi qu'il advient de différents micro-organismes incluant bactéries et protistes (voir chapitre 10).

Le développement microbien et l'accumulation subséquente du fer dans des milieux aquatiques peuvent conduire à l'accumulation concurrente d'autres ions de métaux lourds de co-précipitation et d'adsorption aux hydroxydes de fer. Les métaux adsorbés peuvent être remobilisés par acidification sans réduction du fer adsorbé.

Le Fe^{3+} peut être réduit en Fe^{2+} par activité enzymatique à l'aide d'un donneur d'électrons approprié (paragraphe 1.5.6.). La nitrate réductase est une enzyme pouvant être impliquée dans ce processus. Pourtant, au moins une autre enzyme peut être indépendamment active, surtout dans les organismes qui ne peuvent pas synthétiser la nitrate réductase. Dans ce processus sont impliqués les bactéries, ainsi que les champignons. Les réductions microbiennes du Fe^{3+} ne sont pas toutes enzymatiques. Certaines peuvent être le résultat de la réaction avec des produits métaboliques, tels que le H_2S ou le formiate.

Les réactions oxydantes et réductrices dues aux micro-organismes jouent un rôle important dans le cycle du fer dans la nature (paragraphe 1.9.). Elles influencent la mobilité du fer et les accumulations locales. La formation de dépôts sédimentaires de fer est attribuée aux micro-organismes agissant sur le fer (paragraphe 1.7.). La formation de l'ocre est associée à l'oxydation bactérienne du fer, et la gléisation à la réduction bactérienne du fer (paragraphe 1.8.). La réduction bactérienne du fer comme forme de respiration des bactéries hétérotrophes dans des milieux réducteurs peut apporter une contribution significative au cycle du carbone par la promotion de la minéralisation anaérobie (Ehrlich, 1995).

La corrosion des métaux est le résultat d'un processus complexe, déterminé par de multiples mécanismes indépendants: chimiques, mécaniques, électriques et biologiques (paragraphe 1.10.). La corrosion bactérienne est fréquente dans les conduites d'eau potable et résiduelle, de gaz et de pétrole, ainsi que dans celles des installations sanitaires.

Les micro-organismes sont impliqués dans plusieurs types de modifications des métaux, tels que: la corrosion anaérobie, par dépoliarisation cathodique, la production de métabolites corrosifs, la production du phénomène d'aération différentielle et la concentration des cellules à leur surface, la dégradation des pellicules protectrices naturelles ou artificielles de leur surface, etc. (Booth, 1971).

L'idée de la participation des bactéries à la corrosion a été lancée en 1891 par Garrett (cf. Zarnea, 1994).

Chapitre 2. Bases théoriques de l'action des micro-organismes dans le cycle du soufre

Le soufre, sous forme organique ou inorganique dans la nature, est un élément essentiel de la vie (Ehrlich, 1995). Une série d'organismes différents du point de vue systématique peuvent l'assimiler sous forme organique et inorganique (paragraphe 2.5.). Les plantes et de nombreux micro-organismes l'assimilent le plus souvent sous forme de sulfate. Les micro-organismes sont importants dans la minéralisation des composés organiques du soufre dans le sol et les milieux aquatiques. La biochimie de la minéralisation du soufre organique et la synthèse des composés organiques du soufre ont été bien étudiées depuis de nombreuses années (paragraphe 2.4.).

Le soufre inorganique peut exister sous différents états d'oxydation dans la nature, le plus souvent sous forme de sulfite (-2), S élémentaire (0) et sulfate (+6) (tableau 2.2.1.). Le thiosulfate et le tétrationate, avec du soufre en états d'oxydation mixtes, peuvent aussi apparaître en quantités importantes dans certains milieux. Certains micro-organismes du sol et de l'eau jouent un rôle important dans l'interconversion de ces états d'oxydation. Ils comprennent différentes eubactéries (même certaines cyanobactéries dans des conditions spéciales) et des archées.

Parmi les bactéries qui oxydent des formes réduites de soufre se trouvent les chimiolithotrophes anoxygéniques et oxygéniques (cyanobactéries), les photolithotrophes, les mixotrophes et les hétérotrophes (paragraphe 2.7.). La plupart des chimiolithotrophes et des mixotrophes utilisent l'oxygène comme oxydant, mais quelques chimiolithotrophes le substituent avec du nitrate ou avec du Fe^{3+} en absence d'oxygène. Certaines chimiolithotrophes comme *A. thioparus* peuvent oxyder le H_2S en S^0 dans des conditions partiellement réduites, mais elles forment du H_2SO_4 dans des conditions complètement oxydantes. Les bactéries anoxygéniques photolithotrophes (rouges et vertes) oxydent le H_2S en S^0 ou en H_2SO_4 pour générer la force réductrice nécessaire à la fixation du CO_2 et/ou de l'ATP. Certaines cyanobactéries oxydent le H_2S en S^0 en l'absence d'oxygène pour générer de l'énergie et la force réductrice nécessaire à la fixation du CO_2 . Différentes chimiolithotrophes et mixotrophes aérobies peuvent oxyder le S^0 en H_2SO_4 dans des milieux acides et neutres (paragraphe 2.7. B). L'oxydation du soufre a été observée dans des milieux mésothermes et dans des milieux avec des températures dépassant 100°C . Le thiosulfate est rapidement oxydé par certaines chimiolithotrophes, mixotrophes et hétérotrophes (paragraphe 2.7.D.). Il a été montré que certaines *Pseudomonas* marines l'ont utilisé comme source supplémentaire d'énergie en l'oxydant en tétrationate. D'autres bactéries peuvent conserver l'énergie par le disproportionnement du S^0 , du ditionite, du sulfite ou du thiosulfite dans des conditions anaérobies en sulfite et sulfate. Les formes oxydées de S^0 peuvent être réduites par différents micro-organismes. Le S^0 est réduit en H_2S avec ou sans conservation d'énergie par certaines archées et eubactéries anaérobies. Parmi les eubactéries conservant l'énergie se trouvent *Desulfuromonas acetoxidans*, *Desulfovibrio gigas* et autres bactéries sulfo-réductrices. On a découvert que deux champignons, *Rhodotorula* et *Trichosporum*, peuvent réduire le soufre en H_2S , mais, très probablement, sans conservation d'énergie (paragraphe 2.9.).

Le SO_4^{2-} peut être réduit pendant la respiration du sulfate (réduction dissimilatrice du sulfate) par un certain nombre de bactéries spécialisées (paragraphe 2.9.). Les espèces les mieux connues sont les eubactéries, mais deux archées au moins ont également été identifiées. Cette activité microbienne est d'une importance géologique majeure car, dans des conditions normales à la surface de la Terre, le SO_4^{2-} ne peut pas être réduit par des moyens purement chimiques à cause de l'important apport énergétique nécessaire à ce processus. La réduction aérobie du SO_4^{2-} par différents micro-organismes et plantes se réalise seulement en faibles quantités (réduction assimilatrice du sulfate). Les mécanismes de réduction assimilatrice et dissimilatrice du sulfate sont différents du point de vue biochimique. Certains réducteurs ou oxydants du S et de ses composés peuvent distinguer entre le ^{32}S et le ^{34}S et peuvent marquer le fractionnement des isotopes. Du point de vue géologique ce marquage sert à la détermination du caractère biotique ou abiotique de la formation des anciens dépôts de soufre (paragraphe 2.9.).

Des dépôts actuels de soufre d'origine biotique contenant des bactéries anaérobies et aérobies sulfito-oxydantes et sulfato-réductrices ont été identifiés dans plusieurs milieux lacustres. Il s'agit de

dépôts synergiques. L'oxydation bactérienne du soufre élémentaire en acide sulfurique dans certaines sources thermales a aussi été rapportée.

Des dépôts anciens épigéniques de soufre d'origine microbienne ont été identifiés dans des dômes de sel et dans d'autres formations géologiques associées aux roches mères pétrolières dans différentes parties du monde. Dans ces cas, le soufre S^0 s'est développé par réduction bactérienne du sulfate dérivé de l'anhydrite ou du gypse suivie par l'oxydation bactérienne dans des conditions partiellement réductrices. Lors d'une exposition totale à l'air, une partie du S est oxydé en acide sulfurique par des bactéries (paragraphe 2.11.).

Des transformations oxydatrices et réductrices moins spectaculaires du S apparaissent dans le sol, jouant un rôle important dans le maintien de la fertilité du sol.

Les sulfures métalliques peuvent localement apparaître en concentrations importantes et, dans ce cas, ils constituent des dépôts (paragraphe 2.13.). Même si la plupart des sulfures non-ferreux sont formés de manière abiotique par des processus magmatiques et hydrothermaux, quelques dépôts sédimentaires sont cependant d'origine biogène. Plus important est le fait que certaines accumulations sédimentaires de sulfures ferreux sont formées de manière abiotique. Le rôle microbien dans la biogénèse de n'importe lequel de ces dépôts sulfureux est joué par la genèse du H_2S , généralement par la réduction bactérienne du sulfate, mais aussi, dans quelques cas spéciaux, par la minéralisation des composés organiques du S. Comme ces sulfures métalliques sont fortement insolubles, la réaction spontanée des ions métalliques et des sulfures biogènes a lieu rapidement.

La biogénèse des minéraux spécifiques de sulfures métalliques a été démontrée en laboratoire (paragraphe 2.13.2.). Ces expériences nécessitent des composés métalliques relativement insolubles comme matériaux initiaux, pour limiter la toxicité des ions métalliques face aux bactéries sulforéductrices. Dans la nature l'adsorption des ions métalliques par les composantes du sédiment a une fonction similaire dans la réduction de la concentration des ions métalliques en-dessous du niveau toxique pour les sulfato-réducteurs.

Les sulfures métalliques sont aussi sujets à l'oxydation par des bactéries comme *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Sulfolobus* et *Acidianus brierleyi*. Cette action peut aussi impliquer l'attaque oxydative directe au niveau de la surface cristalline du sulfure métallique ou l'attaque oxydative indirecte, par génération de composés lixivants, qui oxydent chimiquement le sulfure métallique (paragraphe 2.13.4.). L'oxydation microbienne des sulfures métalliques est utilisée en industrie.

Partie II. Zone minière d'Oravița. Mine Kiesberg

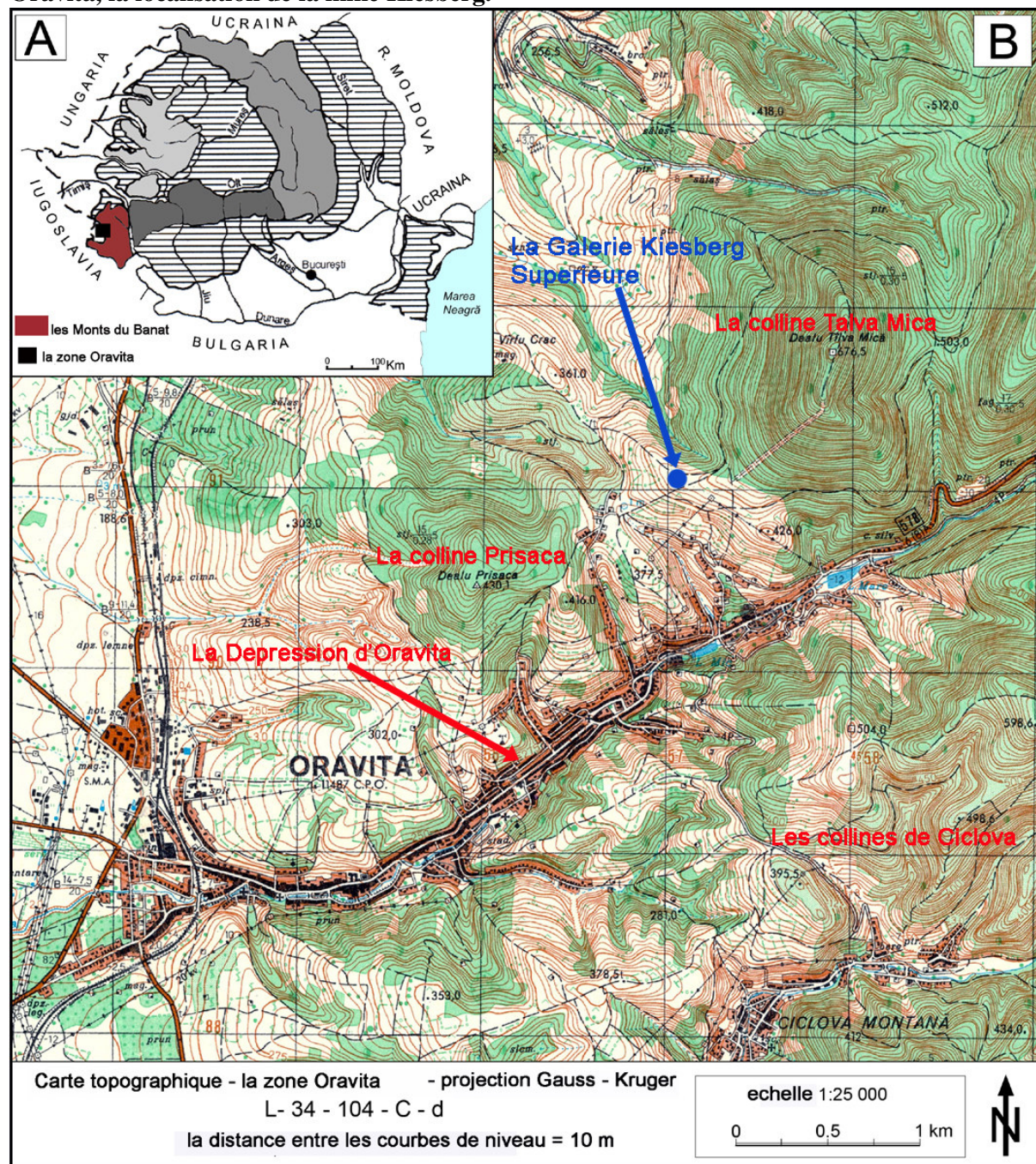
Chapitre 3. Caractéristiques géographiques et climatiques de la zone étudiée

La zone d'Oravița est située dans la partie S-O de la Roumanie, dans l'ancienne province du Banat, actuellement le département de Caraș-Severin, où se côtoient la Plaine du Caraș et les Collines d'Oravița (paragraphe 4.1.). La ville d'Oravița est située dans une dépression formée le long de la rivière d'Orăvicioara. Il s'agit de la dépression d'Oravița, avec une altitude moyenne de 250 mètres, encadrée au N par les Collines de Prisaca (420m) et de Tâlva Mică (675m) et au S par les Collines de Ciclova (370-500m) (*Fig. 3.1.1.*).

Les caractéristiques climatologiques de la zone d'Oravița peuvent être résumées ainsi (paragraphe 4.2.) :

- une température moyenne plurianuelle assez élevée, de 11,3°C,
- des températures minimales très élevées, les nuits de cette région étant parmi les plus chaudes de tout le pays,
- les gels précoces ou tardifs et les brumes sont rares,
- les hivers sont courts et doux,
- une humidité relativement réduite, la quantité moyenne plurianuelle dans la zone d'Oravița est de 828,5 L.m⁻²,
- lors des régimes cycloniques à forts vents, la température maximale ne dépasse pas trop la température minimale,
- les inversions thermiques sont peu fréquentes et elles apparaissent seulement en période d'accalmie ou en présence des vents de N-O,
- la couche de neige ne reste pas longtemps sur le sol (30 jours en moyenne), car le vent appelé Coșava évapore en quelques heures même une couche de 50 cm.

Fig. 3.1.1. A. La localisation de la zone d'Oravița sur la carte de Roumanie. B. La zone Oravița, la localisation de la mine Kiesberg.



Chapitre 4. Historique de l'exploitation minière dans la zone d'Oravița

L'évolution d'une économie basée sur l'exploitation minière et sur la métallurgie dans la zone d'Oravița (la ville d'Oravița et ses alentours) date de l'époque des Daces et des Romains. À cette époque, dans la zone d'Oravița existaient des mines romaines d'or, d'argent et de cuivre, leur exploitation se faisant généralement par des galeries latérales.

Ces exploitations ont fonctionné pratiquement, avec de brèves interruptions, pendant toute la période historique jusqu'à la fin du XIX^e et le début du XX^e siècle, changeant seulement de propriétaire ou de gérant.

Dans la ville d'Oravița la plupart des galeries latérales en exploitation, incluant les galeries Kiesberg, objet de la présente étude, se trouvaient dans la colline de Tâlva Mică. À l'époque de l'Empire Austro-Hongrois, de nombreuses mines d'Oravița ont été fermées et, ainsi, des données historiques sur toutes ces exploitations, comme la mine Kiesberg, ont été perdues en Roumanie, la majeure partie étant préservée dans des archives de Vienne.

Chapitre 5 : Caractéristiques géologiques de la zone étudiée

Les formations paléo-mésozoïques de la zone de Reșița-Oravița-Moldova Nouă se trouvent sur le substratum cristallin du domaine gétique, situé à l'intérieur de l'arc des Carpathes. Dans la partie ouest du synclinorium de Reșița-Oravița-Moldova Nouă, le contact entre le sédimentaire et le cristallin se réalise le long d'une importante ligne de dislocation connue sous le nom de la *ligne d'Oravița*.

Les schistes cristallins du domaine gétique de la zone d'Oravița sont considérés comme étant plus anciens que le Protérozoïque Supérieur. Dans le domaine gétique ont été initialement séparées deux unités cristallophyliennes majeures: la série de Sebeș-Lotru et la série de Miniș (des schistes amphiboliques, des amphibolites, des schistes quartzeux à biotite et chlorite) (Ghica-Budești, 1934; Pavelescu 1959; Savu, 1970; Gridan, 1981) (paragraphe 5.1.1.).

La ligne d'Oravița, ou ligne ouest (Schreter, 1912), sépare, dans le Banat de l'Ouest, le domaine gétique du domaine supragétique, ce dernier ayant une position interne par rapport au premier (paragraphe 5.1.2.). En ce qui concerne le domaine gétique, dans la zone de Dognecea-Oravița, Radu-Mercus (1962) et Constantinof (1972) ont distingué deux séries: la série Bocșița-Drimoxa (le complexe des gneiss micacés) et la série de Valea Carașului, avec trois complexes : A. le complexe des schistes à porphyroblastes blancs; B. le complexe des schistes volcanogéno-magmatogènes basiques, et C. le complexe des phyllades (Constantinof, 1957-1959) (*Fig. 5.1.1.*).

Les premiers dépôts sédimentaires, déposés en discordance sur les schistes cristallins, dans la zone d'Oravița, sont représentés par le Permien Inférieur sous la forme des grès arkosiens rouges et verts avec intercalations de conglomérats, de tuffites et des cornéennes à pinnite.

Après une période d'exondation, suivent les dépôts transgressifs du Mésozoïque, parmi lesquels on distingue les trois cycles de sédimentation suivants : le Cycle Triasique, le Cycle Jurassique-Crétacé inférieur et le Cycle Crétacé supérieur.

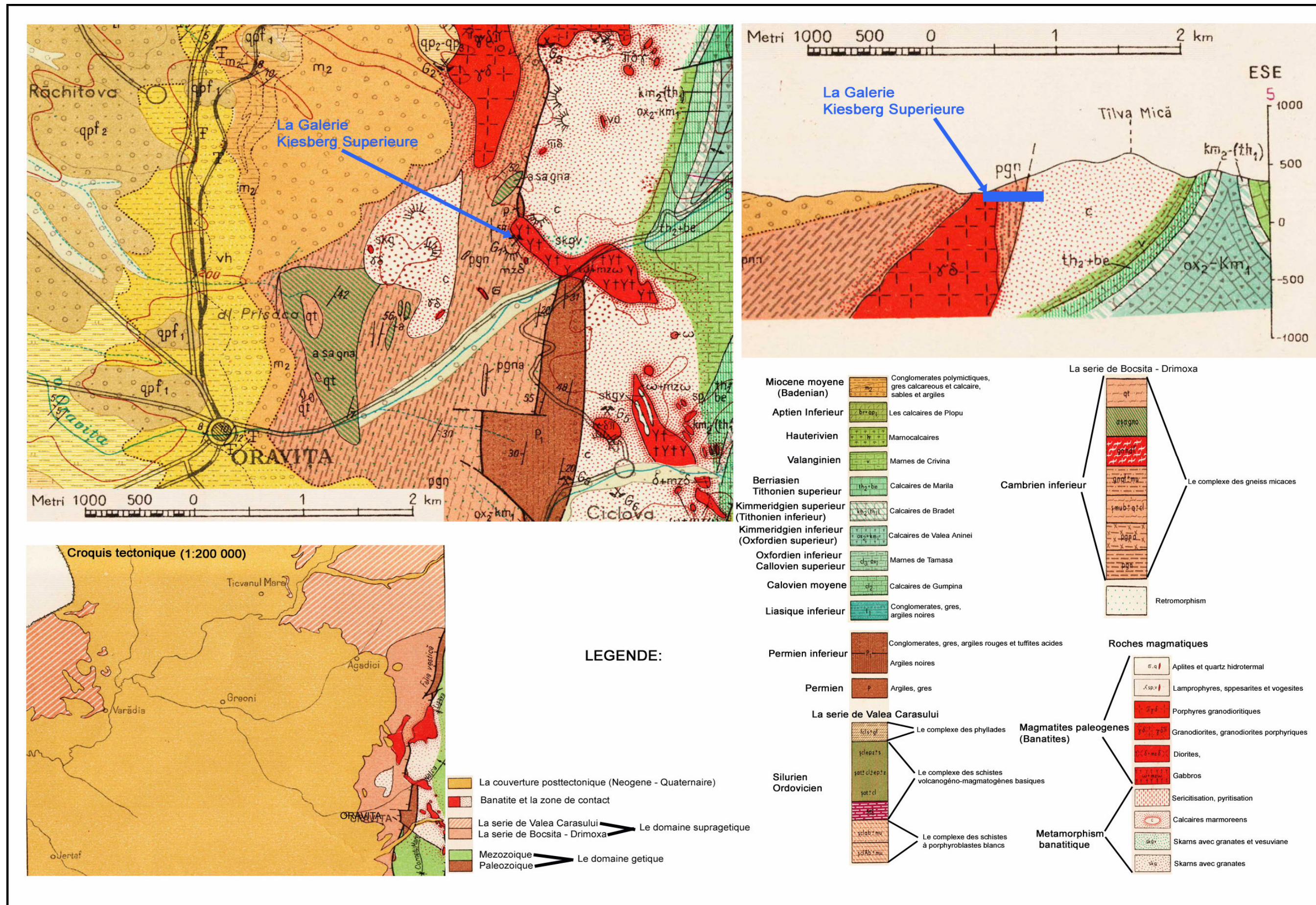
Le Trias est peu représenté ; il affleure seulement au sud de la zone ; après une autre période d'exondation, pendant laquelle la majorité de ces dépôts triasiques sont érodés, suit la transgression jurassique, celle du Lias, au cours de laquelle s'installe un milieu lagunaire continental.

Les formations du Crétacé Supérieur (K₂) sont transgressifs sur les dépôts plus anciens et l'on constate que l'aire de sédimentation du Crétacé Supérieur s'est déplacée progressivement vers l'Est : en conséquence les formations plus récentes sont mieux développées dans la partie orientale (paragraphe 5.1.3.).

Le diastrophisme laramique a eu comme effet, entre autres, la création d'un système de fractures profondes ou la réactivation de fractures plus anciennes, qui ont été utilisées comme voies d'accès au magmatisme banatitique subséquent, favorisant ainsi l'emplacement de corps plutoniques ou sub-volcaniques, auxquels s'associent de nombreux dykes, ainsi que la création d'une série de dépressions intramontagnardes où se sont accumulés des dépôts tertiaires du Néogène (paragraphe 5.1.4.) (*Fig. 5.1.1.*).

Le magmatisme est très répandu et présente une grande variété de types pétrographiques qui ont permis, dans cette région, la création du terme de *banatite* (von Cotta, 1865), notion précisée ultérieurement par Cadarcea (1931), dénomination maintenue jusqu'à présent. Les corps banatitiques de la zone d'Oravița sont formés de graniodiorites dans lesquels apparaissent toutes sortes de ségrégations granitiques et syénodioritiques et une large suite de filons de porphyres graniodioritiques, de porphyres dioritiques, des microdiorites, des microgranodiorites, des aplites, des microgabbros, des kéraatophyres quartziphères et des lamprophyres, des kersantites, des minettes et des odinites (*Fig. 5.1.1.*).

Fig. 5.1.1. La carte géologique de la zone Oravita.



Les corps banatitiques déjà mentionnés engendrent un métamorphisme de contact au niveau des schistes cristallins et des dépôts sédimentaires terrigènes et carbonatés mésozoïques, les transformant en cornéennes à biotite et à cordiérite ou en calcaires marmoréens et en skarns, auxquels sont liés d'importants gisements de contact métasomatiques, de fer, de sulfures complexes ou de molybdénite (*Fig. 5.1.*)

Les calcaires marmoréens, massifs, bien recristallisés, en couleurs allant du blanc, au rose jusqu'au « cendré », sont bien développés dans la zone de Trei Crai (Ciclova Montană) **et dans la zone de Tâlva Mică (Oravița) – zone Kiesberg**, où leur pureté augmente avec la profondeur (paragraphe 5.1.4.2.).

Suite à l'activité magmatique banatitique, dans la zone d'Oravița se sont formés quelques-uns des plus intéressants gisements de sulfures polymétalliques et oro-argentifères, tant au niveau de la variété des types génétiques, qu'au niveau de leur importance économique. Au contact entre le corps principal Est de porphyres dioritiques quartzifères et les calcaires se sont formés des skarns, contenant une riche minéralisation cuprifère, avec des taux de cuivre et oro-argentifères de plus de 5 %, minéralisation disposée sous forme de corps irréguliers et de lentilles.

Ces accumulations ont été exploitées à différents niveaux grâce à un grand nombre de travaux miniers, comme la galerie de Trei Crai, les galeries Labkowitz (Ciclova Montană), Aurelia, Simon Juda, Elias, Prințul Ioan, Prințul Albert, la galerie XII Apôtres inférieure, médiane et supérieure, la galerie Kiesberg supérieure et médiane, la galerie Loretta, (toutes situées à Oravița, sur la Colline de Tâlva Mică), ainsi que grâce à une série de galeries dont on ne connaît plus le nom, situées à Ogașul Cuptoare dans la zone de Brădișorul de Jos.

Notre étude concerne la zone du Gisement Policarpus.

Le Gisement Policarpus, situé dans la partie Nord de la ville d'Oravița et dans le S-O de la Colline de Tâlva Mică, a été ouvert par les galeries latérales Kiesberg supérieure, médiane et inférieure. Il se trouve en contact avec le corps Ouest de banatites d'Oravița avec des dépôts sédimentaires de calcaires et avec des schistes cristallins (paragraphe 5.2.).

La paragenèse des minéraux métalliques des skarns du Gisement Policarpus est la suivante :
pyrite + pyrrhotine + chalcopirite ± or ± molybdénite

La minéralisation est constituée principalement par de la pyrite et de la pyrrhotine, avec de la chalcopirite, de la cobaltine et de la marcassite, et se trouve dans des roches cornifiées-biotitisées et carbonatées. Cette minéralisation se présente sous forme disséminée, parfois compacte, comme celle se trouvant à l'entrée de la **Galerie Kiesberg I ou Supérieure** (où nous avons mené les recherches pour notre thèse).

Chapitre 6. Sites établis pour les analyses

Les Galeries Kiesberg Supérieure, Médiane et Inférieure correspondent à des galeries latérales creusées dans le Gisement Policarpus de la Colline de Tâlva Mică et ont connu un fort développement dendritique, suivant les dépôts de minéraux utiles (*Fig. 3.1.1.*).

Après la fermeture de l'exploitation, d'importants effondrements se sont manifestés, et, par ailleurs, aujourd'hui les Galeries Kiesberg Médiane et Inférieure sont complètement inondées et inaccessibles ; la seule galerie actuellement accessible reste la Kiesberg Supérieure, dans laquelle nous avons réalisé la présente étude.

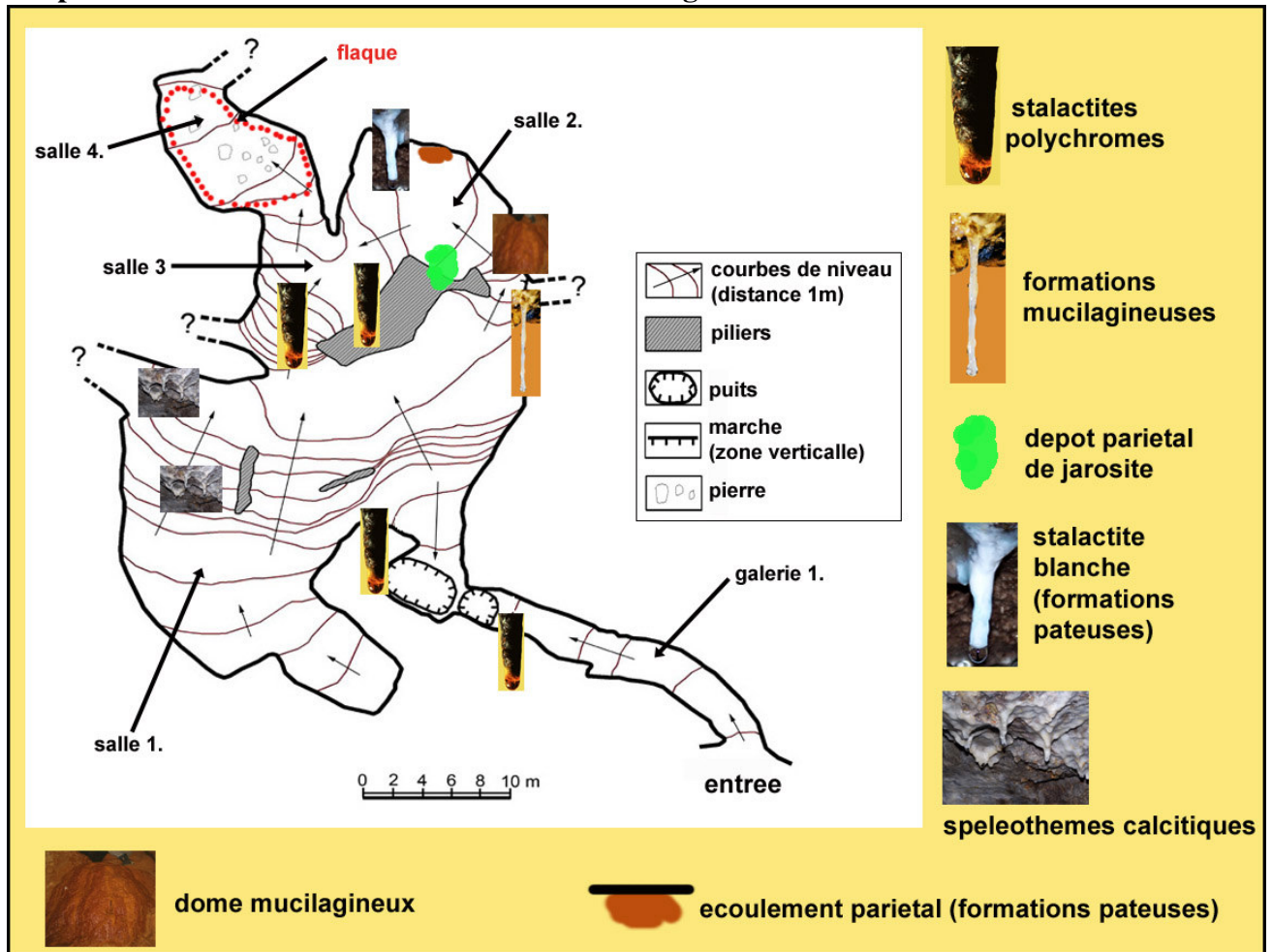
La galerie Kiesberg Supérieure est une cavité descendante, avec un développement de 45 m et une dénivelée de 24 m. L'accès s'opère par la Galerie 1, au bout de laquelle, par un puits, on pénètre dans la grande salle ou Salle 1, formée par l'effondrement d'anciennes galeries superposées. De la Salle 1 on traverse quatre salles, notées Salles 2, 3 et 4, et ensuite, par une galerie à forte pente descendante, on arrive au dernier secteur de la mine, qui est complètement inondé et inaccessible (paragraphe 6.1.1.) (*Fig. 6.2.1.*).

Du point de vue spéléoclimatique, dans la Galerie Kiesberg Supérieure la température moyenne annuelle est de 15,5⁰C, dépassant d'environ 5⁰C la moyenne pluriannuelle de température de la zone d'Oravița, la thermocline de la cavité se trouvant dans la galerie principale, à environ 4 m de l'entrée. À l'intérieur se déroulent d'intenses processus chimiques et biologiques, qui produisent d'importantes quantités de gaz, et comme il s'agit d'une cavité descendante avec une seule ouverture vers l'extérieur, les échanges sont très limités. En conséquence, la quantité d'oxygène est faible, et, pendant certaines périodes très humides, l'accès dans la cavité n'est possible qu'avec du matériel de respiration spécial (paragraphe 6.1.2.).

Présentation macroscopique des sites de nos recherches.

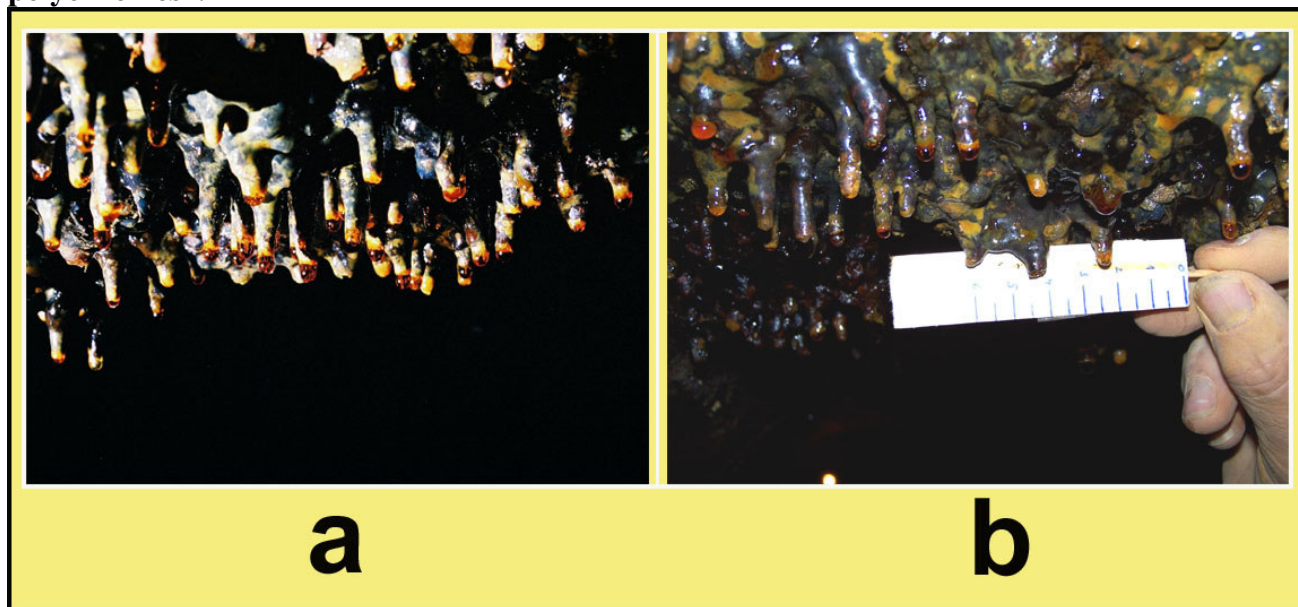
Plusieurs types de dépôts minéraux sont représentés dans la mine étudiée (*Fig. 6.2.1.*).

Fig. 6.2.1. Localisation des sites de prélèvement des échantillons et des différents types de spéléothèmes sur la carte de la cavité de Kiesberg.



1. Les „*Stalactites polychromes*” constituent des spéléothèmes, établis à partir des enduits qui recouvrent en partie la voûte et les parois de la mine, en forme de cône (conico-cylindrique), ayant les dimensions entre 0,5 – 5 cm de longueur et entre 0,3 – 0,8 cm de diamètre. L’enduit représente leur base commune, qui se présente sous la forme d’une croûte plus ou moins continue qui tapisse la voûte de la cavité (Fig. 6.2.1.1. et 6.2.1.2.).

Fig. 6.2.1.1. a., b. Vue d'ensemble des enduits et des groupes de „stalactites polychromes”.



Du point de vue de la localisation dans la cavité, nous observons des stalactites polychromes relativement isolées près de la petite cascade, dans la Galerie 1 et Salle 1, et quelques champs ou groupes au niveau de la salle la plus profonde, que nous avons notée Salle 3 (Fig. 6.2.1.).

2. Les „Stalactites et les écoulements mucilagineux”. Les stalactites mucilagineuses ou „snotites” ont une forme allongée, filiforme, de dimensions très variables, avec une longueur allant de 1 cm jusqu’à 10 cm et un diamètre de 0,5-1 cm à l’embase et de 0,2-0,3 cm à la pointe (Fig. 6.2.2.1. a.). Les écoulements mucilagineux qui couvrent les parois ont des épaisseurs de quelques centimètres (Fig. 6.2.2.1.b.). Ils représentent des consortiums de micro-organismes et sont localisés dans une „niche” (Fig. 6.2.2.2. a.) qui se trouve dans la paroi de la Salle 1, dans sa partie inférieure, près de la pente menant à la Salle 2 (Fig. 6.2.1.). À leur embase, ces snotites se sont minéralisées progressivement avec de l’hydroxyde de fer, conduisant à une consistance dure.

Fig. 6.2.2.1. a. Stalactites mucilagineuses; b. Écoulements mucilagineux.



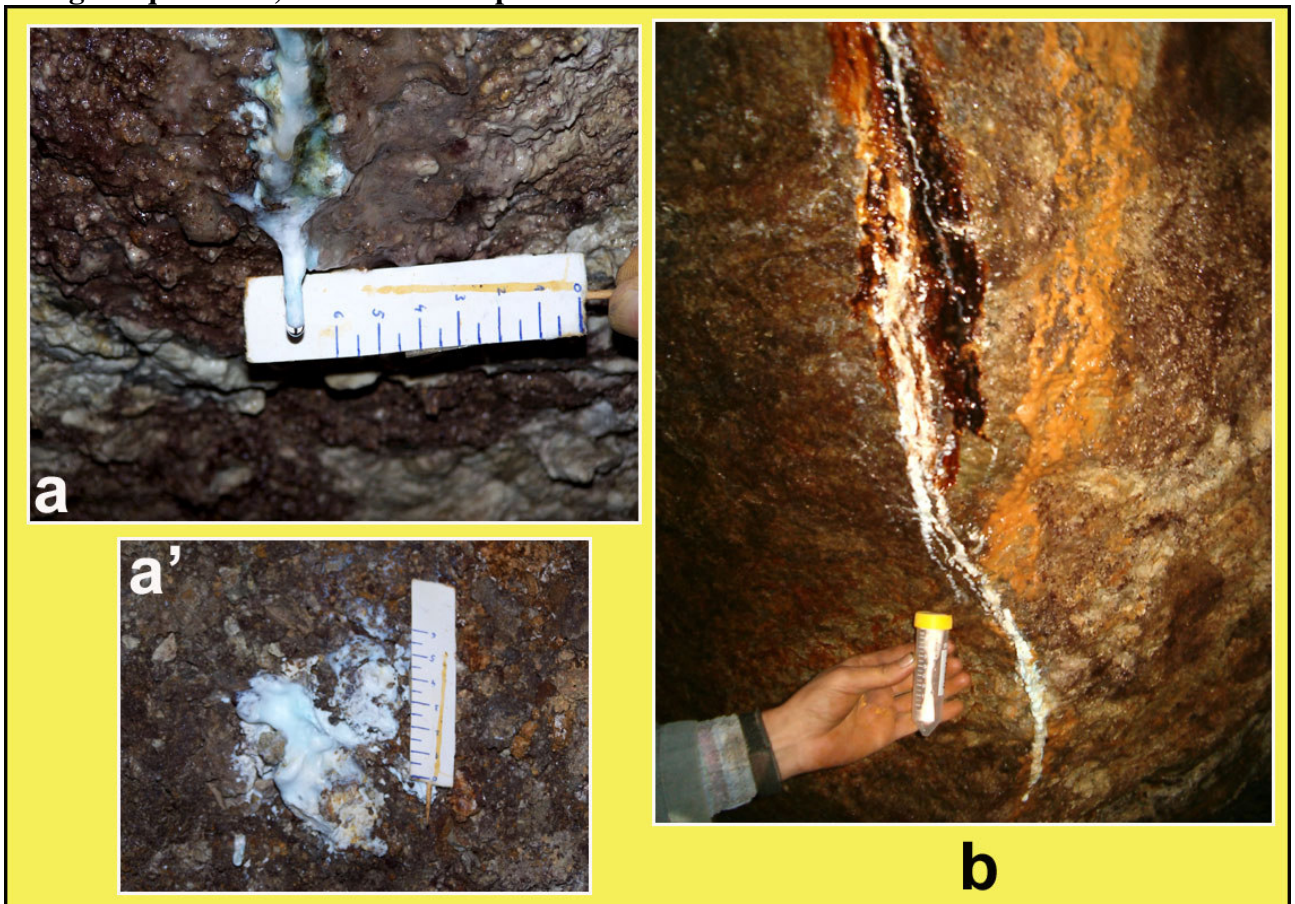
3. La „flaque”. Les eaux drainant les salles et galeries de la cavité coulent vers ses parties plus basses, créant une mare, de forme presque rectangulaire, avec une longueur de 4 m et une largeur de 2 m. Sa profondeur atteint 45 cm et elle se trouve dans la Salle 4 (Fig. 6.2.1.). Dans cette flaque sont présents deux types de sédiments : des sédiments rouges, ferrugineux, et des sédiments blancs, alumineux (Fig. 6.2.3.1.).

Fig. 6.2.3.1. a. Flaque, vue générale; b. Dépôt blanc.



4. Des „Formations pâteuses”. Ces formations sont représentées par un écoulement pariétal et des stalactites, qui présentent une couleur blanc-bleuâtre et la consistance de la pâte dentifrice (Fig. 6.2.4.1., Fig. 6.2.4.2.). Leur formation paraît avoir été causée par des processus d’altération chimique et biologique des aluminosilicates de la roche des parois de la cavité Kiesberg (chapitre 11.).

Fig. 6.2.4.1. + Fig. 6.2.4.2. Les „Formations pâteuses”: a. Stalactite blanche; a'. Dépôt stalagmitique blanc; b. Écoulement pariétal blanc.



Partie III. Recherches effectuées sur les sites de la mine Kiesberg. Techniques utilisées

Chapitre 7. Analyses chimiques effectuées

Les échantillons qui ont fait l'objet d'analyses chimiques ont été récoltés sur trois sites étudiés: les „stalactites polychromes”, les „formations mucilagineuses”, la „flaque” et sur le lac qui s'est formé suite à l'inondation des galeries les plus profondes de la cavité de Kiesberg. Les analyses ont été effectuées au Laboratoire de Chimie de l'Eau de la Régionale des Eaux Roumaines de Timișoara.

Les échantillons ont été récoltés dans des récipients spéciaux et ont été transportés au laboratoire pour les analyses en moins de 24 heures après leur prélèvement. Pendant les analyses les paramètres suivants ont été mesurés : *pH*, *O₂ dissous*, *phosphates*, *nitrate*, *sulfates*, *Fe total*, *Na*, *K*, *Cr*, *Cd*, *Ni*, *Pb*, *Zn*, *Mn*, *Cu*, *Ca*, *Mg* (tableau 7.2.1.).

Tableau 7.2.1. Résultats des analyses chimiques des échantillons récoltés dans la Galerie Kiesberg Supérieure.

<i>mg/L⁻¹</i>	<i>flaque</i>	<i>stalactites mucilagineuses</i>	<i>stalactites polychromes</i>	<i>la galerie inférieure</i>
<i>pH</i>	6,09	2,81	1,21	3,01
<i>O₂ dissolvat</i>	1,20	1,61	-	0,20
<i>Fosfați</i>	0,0183	0,0404	-	0,0498
<i>Azotați</i>	0,6434	3,2673	-	1,4073
<i>Sulfați</i>	1273	2810,5	-	2066
<i>Fe total</i>	1120	80,2	>15	>12
<i>Na</i>	15	5	30	12
<i>K</i>	12	3	22	6
<i>Cr</i>	0	0	0,227	0
<i>Cd</i>	0,001	0,004	0,08	0,003
<i>Ni</i>	0,052	0,082	1,18	0,10
<i>Pb</i>	0,05	0,04	0,04	0
<i>Zn</i>	0	0,37	2,9	0,38
<i>Mn</i>	0,1	1,04	>7,2	1,3
<i>Cu</i>	0	2,5	>10	1,4
<i>Ca</i>	10,52	376,4	-	394,6
<i>Mg</i>	15,18	97,2	-	91,1

La détermination de ces paramètres a nécessité du matériel de laboratoire et une série de techniques respectant les normes en vigueur dans l'Union Européenne et, donc, également en Roumanie : pour le pH - la norme *SR ISO 10523*, pour le O₂ dissous – la norme *SREN ISO 25813*, pour les phosphates - la norme *SREN 1189*, pour les nitrates – la norme *SR ISO 7890-1*, pour le Mn – la norme *8622 / 2 / 1997*, pour le Cr – la norme *SR 9174 / 1997* et pour les autres métaux – la norme *SR ISO 8288* (paragraphe 7.1.).

Dans le cas des stalactites polychromes, la quantité de solution de percolation qui peut être récoltée est très réduite, par la suite il n'a pas été possible d'analyser tous les paramètres, comme

dans le cas des autres échantillons. Les analyses chimiques de la solution de percolation de l'apex des stalactites polychromes montrent qu'elle présente le plus bas pH (1,21) de tous les échantillons analysés. Les éléments chimiques analysés s'y trouvent dans des concentrations nettement plus importantes que dans les autres échantillons ; de plus sa viscosité est également beaucoup plus élevée.

Les analyses chimiques de l'eau associée aux formations mucilagineuses présentent de même un pH acide (2,81), partiellement maintenu à cette valeur par la formation de l'acide sulfurique en conséquence de l'oxydation du soufre, comme dans le cas des stalactites polychromes. Par rapport aux autres échantillons, de grandes quantités de sulfate (2810,5 mg/l) caractérisent les stalactites mucilagineuses, ce qui indique l'existence d'une oxydation intense de toutes les formes de soufre réduit par les bactéries chimiosynthétisantes du consortium mucilagineux. On observe aussi des quantités assez importantes de calcium (376,4 mg/l) mais, inversement, des quantités de sodium et de potassium bien inférieures à celles des autres échantillons. Cela conduit à envisager la possibilité d'une fixation dans des minéraux précipités, ce que nous examinerons dans les chapitres 10 et 11.

Dans les eaux de la flaque, nous observons une concentration en sulfates relativement importante, mais représentant seulement 50 % de celle des autres échantillons. Le fer total déterminé a une concentration 10 fois plus importante que celle des autres échantillons, ce dont nous chercherons ultérieurement la signification.

Chapitre 8. Déterminations microbiologiques

8.1. Méthodes utilisées

Sur les sites étudiés, après les analyses chimiques de l'eau, des échantillons ont été récoltés en flacons stériles, échantillons sur lesquels ont été effectuées des analyses microbiologiques. Lors de ces analyses nous avons poursuivi l'isolement, sur des milieux de culture spécifiques, des différents groupes de micro-organismes et procédé à leur évaluation numérique, pour pouvoir ensuite comprendre les mécanismes métaboliques se trouvant à la base de la formation des structures étudiées.

Les analyses microbiologiques ont été effectuées dans la période 2004-2005, pendant deux périodes distinctes du point de vue de la quantité de précipitations et, donc, de la quantité d'eau ayant alimenté la cavité : une saison sèche et une saison pluvieuse. Les eaux de pluie, pour arriver dans la mine, doivent traverser toutes les couches des roches qui ont une épaisseur totale d'approximativement treize mètres. Le décalage temporel entre les pluies et l'arrivée de l'eau dans la mine est de l'ordre de douze – quinze jours. En 2004, les mesures ont été réalisées au mois de mars, le total des précipitations atteignant 29,9 mm (en saison sèche) et au mois de juillet, avec un total de précipitations de 141,8 mm (en saison des pluies). En 2005, les mesures ont été effectuées au mois de novembre, avec un total de précipitations de 37,4 mm (en saison sèche) et au mois d'avril, avec un total de précipitations de 226,4 mm (en saison des pluies). La quantité totale des précipitations a été de 875 mm en 2004 et, de 1202,2 mm en 2005.

L'analyse microbiologique a porté sur des stalactites polychromes, des formations mucilagineuses et des dépôts de la flaque.

Sur tous les sites établis existent des communautés de micro-organismes caractéristiques de deux domaines systématiques : Procaryotes (Eubacteries) et Eucaryotes. Dans ces communautés des liens écologiques importants se sont établis entre les différents types de micro-organismes et des interactions fortes entre ceux-ci et les facteurs de milieu, conférant des caractéristiques spécifiques à ces communautés. Excepté la flaque, où le pH de l'eau se situe aux alentours de 6, sur les deux autres sites les micro-organismes sont acidophiles.

Les méthodes classiques ont été utilisées pour les analyses microbiologiques : isolement, détermination et évaluation numérique, mais des méthodes génétiques, plus récentes, ont également été employées. Les données et l'analyse finale des résultats ont fait l'objet d'une analyse statistique.

L'isolement des bactéries chimiolithotrophes a été réalisé par inoculation dans les milieux nutritifs de solutions des échantillons prélevés : des gouttes rouges de la pointe des stalactites polychromes, de l'eau des stalactites mucilagineuses et de l'eau des flocons rouges et blancs, dans le cas de la flaque (paragraphe 8.1.1.1.). Les bactéries chimiolithotrophes acidophiles présentes dans nos échantillons sont représentées par des espèces du genre *Acidithiobacillus*, impliquées dans le métabolisme du soufre et du fer.

Les cultures enrichies ont été réalisées dans des vases Erlenmeyer ou dans des tubes en verre, utilisant: **le milieu de culture 9K** (Silverman, *et al.*, 1959), **pour *Acidithiobacillus ferrooxidans*** (Kelly, *et al.*, 2000) (*Thiobacillus ferrooxidans*), **pH 2,5**; **le milieu Winogradski (W₆)** (Winogradski, 1952), **pour d'autres ferrobactéries-pH 6**; **le milieu Starkey (S₆)** (Starkey, *et al.*, 1934), **pour le *A. thiooxidans*-pH 6**.

Pour obtenir des cultures pures de *A. ferrooxidans* la méthode des dilutions décimales ou sérielles a été utilisée sur un milieu 9K liquide. Les dilutions terminales contiennent alors des cellules isolées de chimiolithotrophes. A partir de ces dilutions on effectue des ensemencements sur le milieu solide 9K faiblement agarisé (0,7 %). Les colonies développées sur le milieu solide ont une couleur brun-rouille et apparaissent 28 jours environ après incubation (ANNEXE I: Fig. 8.1.1.1.2.).

Pour les déterminations quantitatives des *Acidithiobacillus* dans les échantillons analysés (paragraphe 8.1.2.1.) la méthode „*serial and-point dilution*” a été utilisée (Meinel et Meinel, 1967) (Rodina, 1972) et, pour les évaluations qualitatives, la méthode de la détermination du pH des cultures (Hutchinson *et al.*, 1969) (cf. paragraphe 8.1.3.1.).

En dehors des micro-organismes chimiosynthétisants, dans les échantillons que nous avons analysés existent aussi des micro-organismes hétérotrophes, qui utilisent les substances organiques provenant des chimiolithotrophes, ainsi que les substances dissoutes dans l'eau. Ces micro-organismes appartiennent aux bactéries et aux actinomycètes, mais aussi aux champignons et aux protistes.

Pour isoler les cultures pures de bactéries hétérotrophes acidophiles et neutrophiles aérobies et facultativement anaérobies, des cultures enrichies des trois échantillons sur des milieux liquides ont été réalisées (paragraphe 8.1.1.2.) : **le milieu March** (Wood, *et al.*, 1983), **pour les micro-organismes hétérotrophes acidophiles, pH 2,5** dilué 1/10 et 1/100 ; **le milieu G.Y.E.** (Johnson, *et al.*, 1983), **pour les micro-organismes hétérotrophes acidophiles, pH 3** ; **le bouillon simple pour les bactéries hétérotrophes neutrophiles aérobies de la flaque, pH 6,5.**

Les cultures enrichies du milieu March et G.Y.E. ont été utilisées pour l'isolement des actinomycètes et des champignons (paragraphe 8.1.1.3 et 8.1.1.4.).

L'isolement des cultures pures de bactéries hétérotrophes neutrophiles des dépôts de la flaque a été réalisé par l'utilisation du milieu solide de *gélose simple*, à l'aide de la méthode „*serial and-point dilution*” (paragraphe 8.1.2.1.). Des types distincts de colonies ont été obtenus sur ces milieux de gélose simple ; ils ont ensuite fait l'objet d'analyses génétiques (*ANNEXE II: Fig. 8.1.1.2.1.*)

L'isolement des actinomycètes a été effectué sur un milieu liquide G.Y.E. pH 3 et sur un milieu solide Manning pH 3, étant incubés à 30°C pendant 15 jours (paragraphe 8.1.1.3.). Jusqu'à présent nous n'avons pas réussi à réaliser des déterminations d'espèces. Dans ce cas des actinomycètes nous avons effectué seulement des déterminations et des évaluations numériques sur des cultures.

L'identification des champignons microscopiques a été menée à bien par isolement sur le milieu solide Czapeck (Ramirez, 1982), (Lorinczi *et al.*, 1966), (*ANNEXE III: Fig. 8.1.1.4.1.*), à partir de dilutions sérielles des cultures enrichies réalisées à partir des échantillons sur le milieu liquide March.

La plupart des espèces déterminées sur les sites étudiés sont relativement communes dans le sol ou sur des substances organiques en décomposition.

Pour les cultures de *A. ferrooxidans* isolées des stalactites polychromes (Tf₁; Tf₂; Tf₃) (*ANNEXE I: Fig. 8.1.1.1.1.*), ainsi que pour les quatre autres types de colonies hétérotrophes isolées à partir de la flaque (*ANNEXE II: Fig. 8.1.1.2.1.*) nous avons tenté de réaliser des déterminations génétiques. Ces déterminations ont été réalisées dans le Laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine de l'Université François Rabelais de Tours, suivant la méthode classique, fréquemment utilisée à présent dans les laboratoires de génétique bactérienne (Rådström *et al.* 1994).

Toutes les données obtenues par ces méthodes, c'est-à-dire les espèces déterminées et les évaluations numériques en périodes de pluies et de sécheresse des années 2004 et 2005, figurent dans les tableaux et sont traitées selon les méthodes statistiques. Sont ainsi évalués les niveaux maximaux et minimaux de ces valeurs, les moyennes arithmétiques, les écarts-types, les erreurs standard des moyennes, les coefficients de variation, et des corrélations ont été établies entre les valeurs numériques déterminées pour chaque espèce et certains paramètres du milieu.

8.2. Données obtenues

8.2.1. Les stalactites polychromes

Dans le cas des stalactites polychromes, les gouttes pointant à l'apex de ces spéléothèmes ont été prélevées et isolées dans des flacons stériles. Les données microbiologiques sont les suivantes.

En 2004, mais aussi en 2005, dans la solution de percolation acide (pH 1,21) de la pointe des stalactites polychromes, sept espèces de micro-organismes formant une association ou un consortium par des interconnexions fonctionnelles (*tableau 8.2.1.1. et 8.2.1.3.*) ont été déterminées (voir les chapitres 10 et 11).

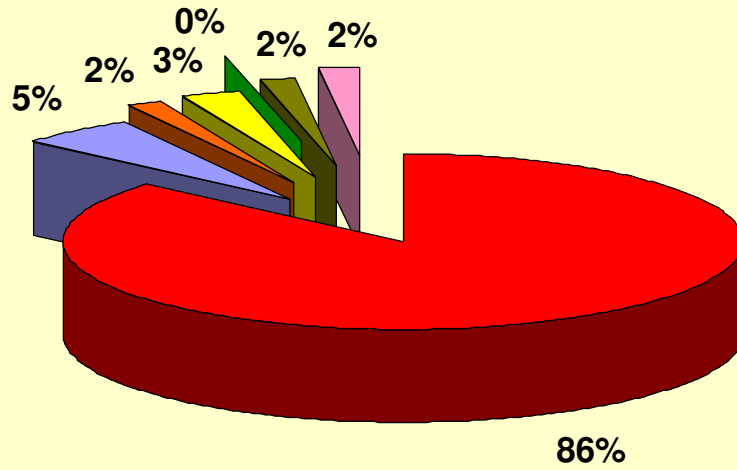
Tableaux 8.2.1.1. + 8.2.1.3. Nombre le plus probable de micro-organismes (no. cellules/ml) dans les stalactites polychromes en 2004 et 2005.

Espece	2004		2005		2004	2005
	Humide	Sec	Humide	Sec	amplitude des variations	amplitude des variations
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	9500	4500	9500	8000	5000	1500
<i>Penicillium expansum</i>	600	500	600	600	100	0
<i>Penicillium cyclopium</i>	200	150	250	150	50	100
<i>Penicillium frequentans</i>	300	200	500	300	100	200
<i>Penicillium griseo-azureum</i>	0	200	0	200	200	200
<i>Penicillium citreo-viride</i>	200	0	300	200	200	100
<i>Penicillium lividum</i>	200	200	300	300	0	0

Parmi celles-ci, *Acidithiobacillus ferrooxidans* est la seule espèce bactérienne chimiolithotrophe, représentant la production primaire de substance organique dans le cadre de cette association. Les autres taxons sont représentés par six espèces de champignons du genre *Penicillium*, qui sont des organismes hétérotrophes utilisant la substance organique en provenance du producteur primaire *A. ferrooxidans*.

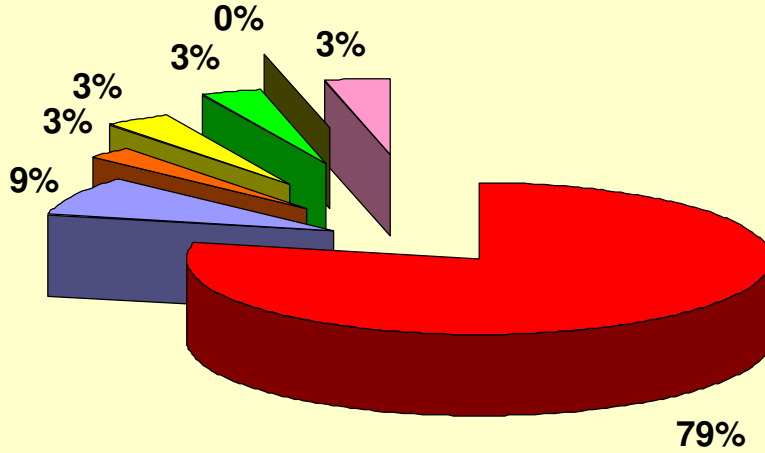
A partir de la représentation graphique des pourcentages d'espèces déterminées pendant les deux saisons de pluies et de sécheresse des années 2004 et 2005 (*Fig. 8.2.1.1., 8.2.1.2. et 8.2.1.5., 8.2.1.6.*), nous observons une nette dominance, par le nombre de cellules/ml d'eau, de *A. ferrooxidans* en tant que producteur primaire du consortium; il représente environ 80 % de la population totale. Le reste correspond aux hétérotrophes représentées par six espèces de *Penicillium* (*Tableau 8.2.1.7., Fig. 8.2.1.13.*).

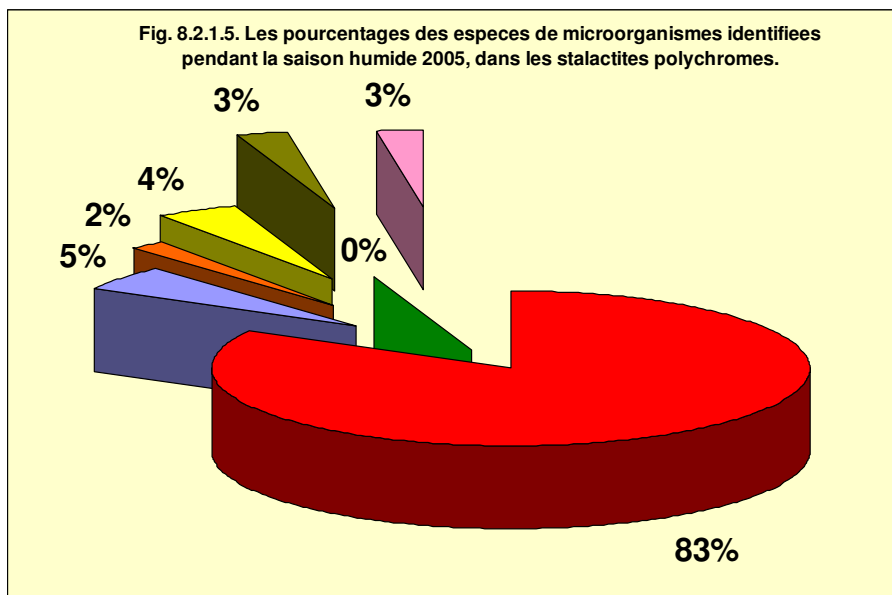
Fig. 8.2.1.1. Les pourcentages des especes de microorganismes identifiees pendant la saison humide 2004, dans les stalactites polychromes.



1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*; 2. *Penicillium expansum*; 3. *P. cyclopium*; 4. *P. frequentans*; 5. *P. griseo-azureum*; 6. *P. citreo-viride*; 7. *P. lividum*.

Fig. 8.2.1.2. Les pourcentages des especes de microorganismes identifiees pendant la saison seche 2004, dans les stalactites polychromes.





1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*; 2. *Penicillium expansum*; 3. *P. cyclopium*; 4. *P. frequentans*; 5. *P. griseo-azureum*; 6. *P. citreo-viride*; 7. *P. lividum*.

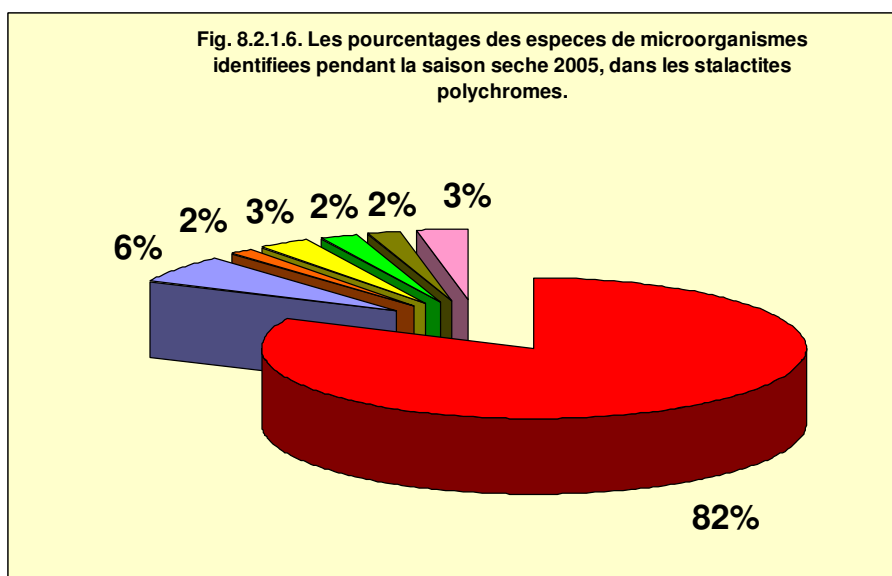
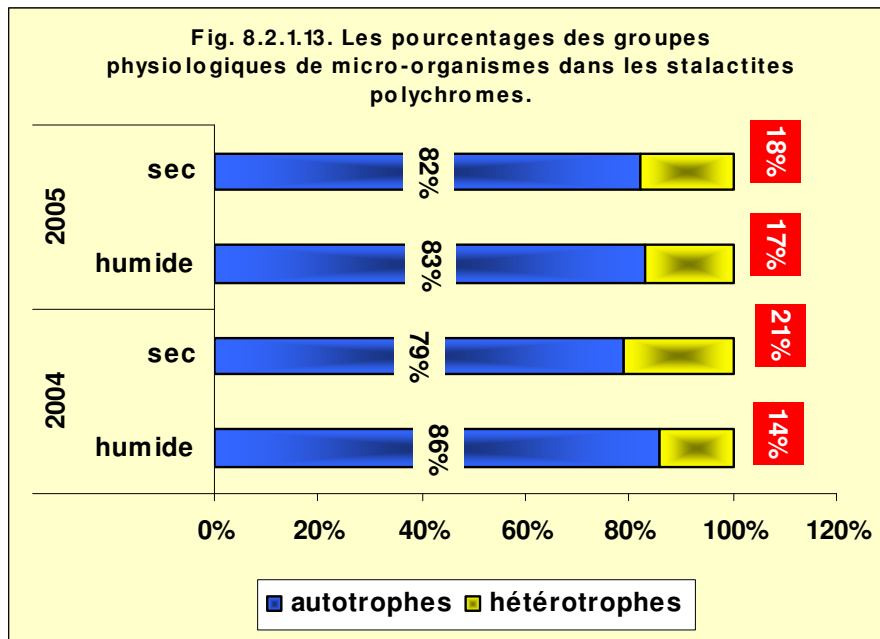


Tableau 8.2.1.7. Les pourcentages des groupes physiologiques de micro-organismes dans les stalactites polychromes, pendant les saisons pluvieuses et sèches des années 2004 et 2005.

années	saisons	autotrophes	hétérotrophes
2004	humide	86%	14%
	sec	79%	21%
2005	humide	83%	17%
	sec	82%	18%



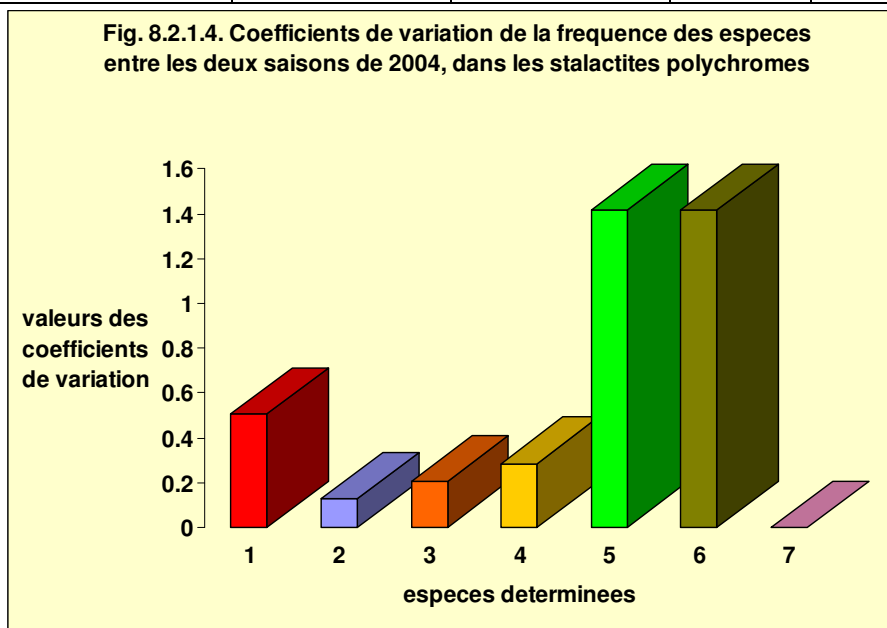
A. ferrooxidans présente la plus grande variation du nombre de cellules/ml d'eau entre la saison des pluies et la saison sèche, en 2004 comme en 2005 (tableau 8.2.1.1. et 8.2.1.3.) et (Fig. 8.2.1.3. et 8.2.1.7.). D'autres espèces caractérisées par des variations importantes sont *Penicillium griseo-azureum* et *Penicillium citreo-viride* ; les autres espèces enregistrent seulement d'assez faibles variations. *P. lividum*, en 2004 comme en 2005, n'enregistre pas de variations numériques entre la saison de pluie et la saison sèche.

A partir du calcul et de la représentation des coefficients de variation (Tableaux 8.2.1.2. et 8.2.1.4.) (Fig. 8.2.1.4. et 8.2.1.8.) il apparaît qu'entre la saison des pluies et la saison sèche, les plus fortes variations des distributions de fréquences ont été enregistrées, pendant les deux années pour *P. griseo-azureum*, et en 2004, pour *P. citreo-viride*. La première de ces deux espèces n'a pratiquement pas été identifiée pendant la saison des pluies, et la deuxième n'a pas été identifiée pendant la saison sèche 2004. *Penicillium lividum* est la seule espèce sans variations de fréquence pendant les deux saisons au cours de ces deux années.

Tableau 8.2.1.2. Moyenne arithmétique, écart standard (DS), erreur standard (ES) et coefficients de variation des espèces dans les stalactites polychromes en 2004.

Espece	2004		moyenne	± ES	DS	coefficient de variation
	Humide (no.cellules/ml)	Sec (no.cellules/ml)				
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	9500	4500	7000	2500	3535,53	0,50
<i>Penicillium expansum</i>	600	500	550	50	70,71	0,12
<i>Penicillium cyclopium</i>	200	150	175	25	35,35	0,20
<i>Penicillium frequentans</i>	300	200	250	50	70,71	0,28
<i>Penicillium griseo-azureum</i>	0	200	100	100	141,42	1,41
<i>Penicillium citreo-viride</i>	200	0	100	100	141,42	1,41
<i>Penicillium lividum</i>	200	200	200	0	0	0

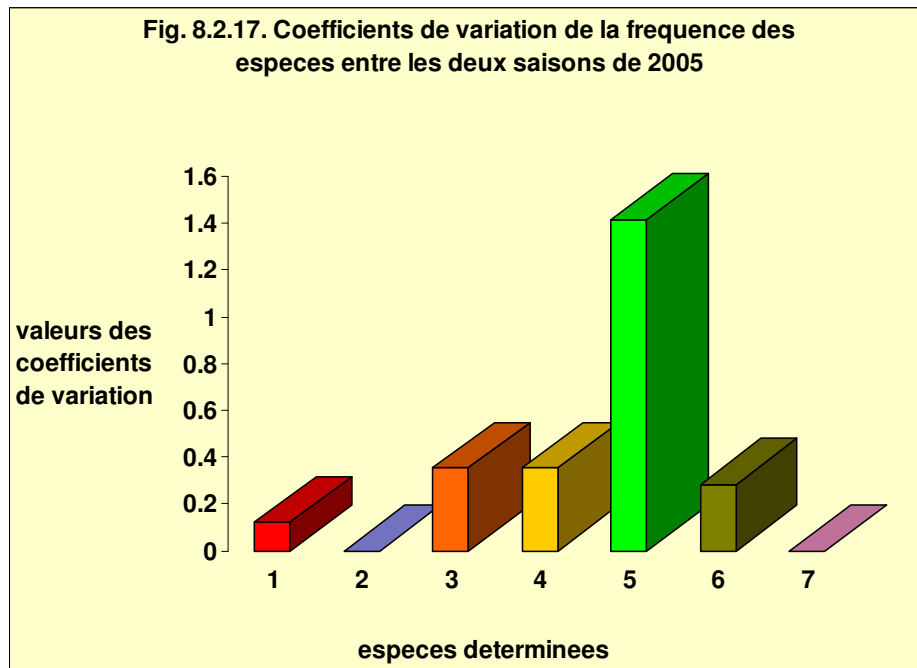
Fig. 8.2.1.4. Coefficients de variation de la fréquence des espèces entre les deux saisons de 2004, dans les stalactites polychromes



1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*; 2. *Penicillium expansum*; 3. *P. cyclopium*; 4. *P. frequentans*; 5. *P. griseo-azureum*; 6. *P. citreo-viride*; 7. *P. lividum*.

Tableau 8.2.1.4. Moyenne arithmétique, écart standard (DS), erreur standard (ES) et coefficients de variation des espèces dans les stalactites polychromes en 2005.

Espece	2005		moyenne	± ES	DS	coefficient de variation
	Humide (no.cellules/ml)	Sec (no.cellules/ml)				
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	9500	8000	8750	750	1060,66	0,12
<i>Penicillium expansum</i>	600	600	600	0	0	0
<i>Penicillium cyclopium</i>	250	150	200	50	70,71	0,35
<i>Penicillium frequentans</i>	500	300	400	100	141,42	0,35
<i>Penicillium griseo-azureum</i>	0	200	100	100	141,42	1,41
<i>Penicillium citreo-viride</i>	300	200	250	50	70,71	0,28
<i>Penicillium lividum</i>	300	300	300	0	0	0



1. Acidithiobacillus ferrooxidans; *2. Penicillium expansum*; *3. P. cyclopium*; *4. P. frequentans*; *5. P. griseo-azureum*; *6. P. citreo-viride*; *7. P. lividum*.

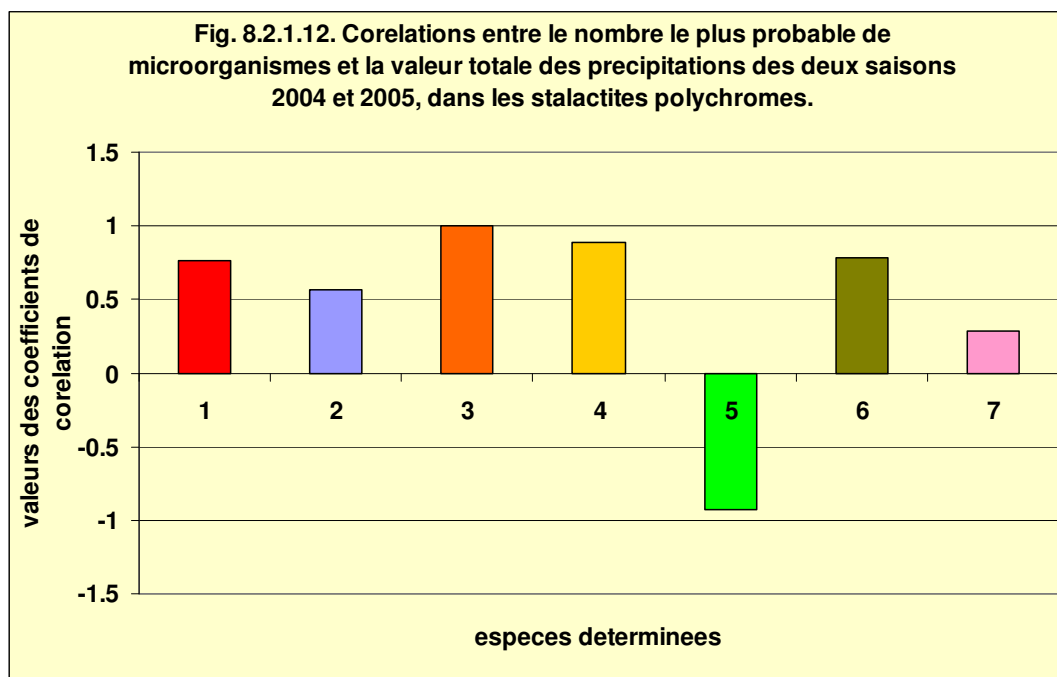
Les corrélations entre le nombre le plus probable de micro-organismes et la valeur totale des précipitations des mois où ont été réalisées les mesures ont été déterminées par le calcul des coefficients de corrélation (*Tableau 8.2.1.6.*) (*Fig. 8.2.1.12.*). Pendant les deux saisons des années 2004 et 2005, le nombre des micro-organismes a tendance à augmenter avec la quantité de précipitations dans le cas des espèces *A. ferrooxidans*, *P. expansum*, *P. cyclopium*, *P. frequentans*, *P. citreo-viride* et *P. lividum*, mais c'est inverse pour *P. griseo-azureum*.

Pour une valeur de $p \leq 5\%$ (voir le paragraphe 8.1.4. et l'*Annexe VI: Tableau 8.1.4.1.*) du *Tableau 8.2.1.6.* (**), on observe que la seule espèce présentant des corrélations significatives avec les précipitations est *P. cyclopium*, les autres espèces présentent des corrélations non significatives.

Tableau 8.2.1.6. Corélations entre le nombre des micro-organismes (no.cellules/ml) et le volume total des précipitations (en mm), en 2004 et 2005, dans les stalactites polychromes.

Espece		le no. des micro-organismes		les précipitations		coefficient de corrélation
		sec	humide	sec	humide	
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	2004	4500	9500	29,9	141,8	0,758
	2005	8000	9500	37,4	226,4	
<i>Penicillium expansum</i>	2004	500	600	29,9	141,8	0,562
	2005	600	600	37,4	226,4	
<i>Penicillium cyclopium</i>	2004	150	200	29,9	141,8	0,997**
	2005	150	250	37,4	226,4	
<i>Penicillium frequentans</i>	2004	200	300	29,9	141,8	0,889
	2005	300	500	37,4	226,4	
<i>Penicillium griseo-azureum</i>	2004	200	0	29,9	141,8	-0,928
	2005	200	0	37,4	226,4	
<i>Penicillium citreo-viride</i>	2004	0	200	29,9	141,8	0,780
	2005	200	300	37,4	226,4	
<i>Penicillium lividum</i>	2004	200	200	29,9	141,8	0,284
	2005	300	300	37,4	226,4	

$p \leq 5\%$



1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*; 2. *Penicillium expansum*; 3. *P. cyclopium*; 4. *P. frequentans*; 5. *P. griseo-azureum*; 6. *P. citreo-viride*; 7. *P. lividum*.

En ce qui concerne l'analyse de l'ampleur de la variation du nombre de micro-organismes de 2004 à 2005 (Tableau 8.2.1.5. et Fig. 8.2.1.9., 8.2.1.10.), nous avons observé que, pendant les deux saisons riches en précipitations, des variations numériques importantes apparaissent dans le cas de l'espèce *P. frequentans*. Une variation plus importante est observée aussi dans le cas des espèces *P. citreo-viride* et *P. lividum* et dans une moindre mesure dans le cas de *P. cyclopium*. Les *A. ferrooxidans*, *P. expansum* et *P. griseo-azureum* n'enregistrent aucune variation pendant les

saisons riches en précipitations des deux années. Pendant les deux saisons pauvres en précipitations, on observe une variation importante du nombre dans le cas de *A. ferrooxidans*. *P. citreo-viride* présente aussi une variation significative, et *P. expansum*, *P. frequentans* și *P. Lividum*, une variation moins importante. *P. cyclopium* et *P. griseo-azureum* n'enregistrent aucune variation pendant les saisons sèches des deux années.

L'analyse générale des variations numériques des espèces, pendant les deux saisons de pluies et de sécheresse des années 2004 et 2005 (Fig. 8.2.1.11.), montre une plus grande quantité en 2005 qu'en 2004, ainsi qu'une variation numérique moins importante entre la saison des pluies et la saison sèche 2005 par rapport à 2004.

Compte tenu du fait que la valeur totale des précipitations en 2005 (1202,2 mm) a été significativement supérieure à celle de 2004 (875 mm), la quantité d'eau étant plus importante pendant tous les mois par rapport à 2004, la population des micro-organismes est demeurée relativement élevée d'une saison à l'autre.

D'autre part, les stalactites polychromes sont alimentées par une solution de percolation grâce à un système de fines fissures qui affectent la voûte de la cavité ; en conséquence la solution de percolation ne disparaît jamais des stalactites, mais elle s'écoule plus lentement lors des périodes sèches (ce qui a été démontré à l'aide des rondelles en papier posées sous les stalactites – voir chapitre 6), ce qui augmente sa concentration en ions divers. Par la suite, nous pouvons supposer que, dans le cas des stalactites polychromes, les variations numériques des micro-organismes déterminés, entre la saison des pluies et la saison sèche, sont dues plutôt à l'effet inhibiteur des différents ions dans la solution hyperconcentrée des périodes sèches.

En conclusion, dans la solution acide (pH 1,21) des stalactites polychromes il existe une communauté de micro-organismes formée par une abondante population de *A. ferrooxidans* (80%), représentant le producteur primaire de substance organique de la communauté, et des populations d'organismes hétérotrophes comptant six espèces de *Penicillium* (20%) qui utilisent la substance organique du producteur primaire.

8.2.2. Les formations mucilagineuses

Dans le cas des formations mucilagineuses, les échantillons ont été récoltés (dans des flacons stériles) sur des stalactites mucilagineuses, des écoulements pariétaux et des écoulements de plancher (chapitre 6.). Les résultats des analyses microbiologiques réalisées sur ces formations peuvent se résumer ainsi.

En 2004 (Tableaux 8.2.2.1. et 8.2.2.3.), 16 espèces de micro-organismes ont été déterminées, et en 2005, en plus de ces 16 espèces, le genre *Scytalidium* (Fam. *Dematiaceae*) a aussi été identifié (pour faciliter les comparaisons des résultats des deux saisons des années 2004 et 2005, nous avons opté pour l'indication de ce genre aussi dans les tableaux et les graphiques concernant l'année 2004).

Tableaux 8.2.2.1. + 8.2.2.3. Nombre le plus probable de micro-organismes (no. cellules/ml) dans les formations mucilagineuses en 2004 et 2005.

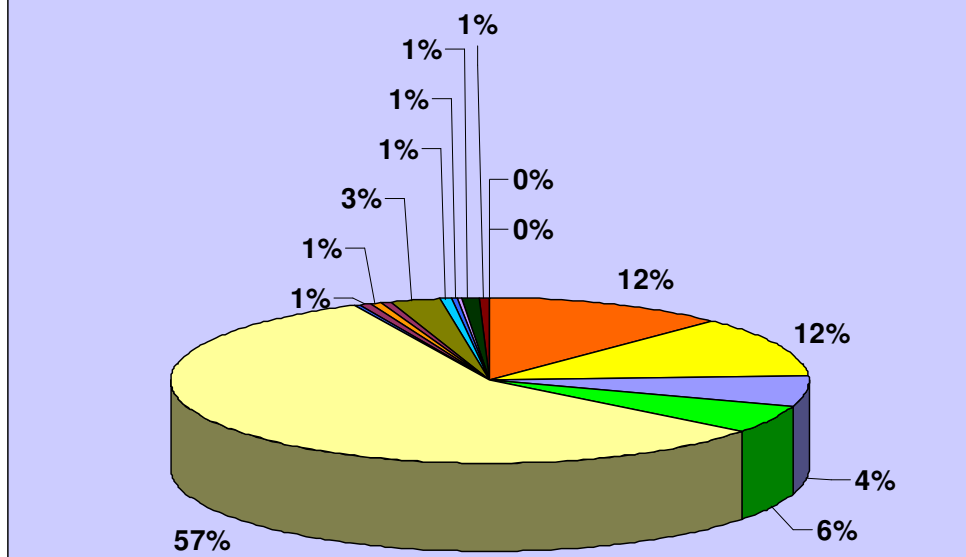
Especce	2004		2005		2004	2005
	humide	sec	humide	sec	amplitude des variations	amplitude des variations
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	9500	0	9500	1400	9500	8100
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	9500	3000	9500	4500	6500	5000
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	4500	0	7500	2000	4500	5500
<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	4500	3000	4500	4500	1500	0
<i>Actinomicete</i>	45000	4500	9500	4500	40500	5000
<i>Penicillium citreo-viride</i>	200	0	300	200	200	100
<i>Penicillium implicatum</i>	600	300	700	0	300	700
<i>Penicillium expansum</i>	400	200	600	200	200	400
<i>Penicillium verucosum</i>	300	0	200	0	300	200
<i>Penicillium verucosum var. corimbiferum</i>	2000	200	300	0	1800	300
<i>Penicillium griseo-fulvus</i>	400	0	700	300	400	400
<i>Penicillium steckii</i>	200	0	200	0	200	200
<i>Aspergillus nidulans</i>	400	0	600	200	400	400
<i>Aspergillus thomii</i>	600	300	700	300	300	400
<i>Rhodotorula</i>	400	300	600	400	100	200
<i>Cladosporium herbarum</i>	0	300	0	200	300	200
<i>Scytalidium</i>	0	0	200	0	0	200

Les espèces identifiées sont intimement associées par les mucopolysaccharides extracellulaires (chapitre 10), formant ainsi un "consortium mucilagineux". Pour les seize espèces identifiées, les quatre espèces de acidithiobacilles et les actinomycètes représentent des bactéries, les autres sont des champignons. *Acidithiobacillus neapolitanus*, *A. thiooxidans* et *A. thioparus* correspondent à des bactéries chimiolithotrophes acidophiles qui assurent l'oxydation des composés du soufre réduits provenant de l'oxydation biologique et chimique de la pyrite des parois de la Galerie Kiesberg (voir chapitre 11.) et, dans le cadre du consortium, elles sont les producteurs primaires de substance organique. *Acidithiobacillus intermedius* est une espèce à métabolisme mixotrophe, facultativement hétérotrophe.

La substance organique autochtone des producteurs primaires (acidithiobacilles) et la substance organique allochtone de l'eau provenant des autres secteurs de la cavité (chapitre 11) sont décomposées par des micro-organismes hétérotrophes de ce microécosystème. Les hétérotrophes sont représentées par les actinomycètes, dont il n'a pas été possible d'identifier les espèces à présent, et par les espèces de champignons suivantes : *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus thomii*, *Penicillium steckii*, *P. expansum*, *P. verucosum*, *P. griseo-fulvus*, *P. implicatum*, *P. verucosum var. corybiferum* (Fam. Moniliaceae) ; *Rhodotorula sp.* (Fam. Cryptococaceae) ; *Cladosporium herbarum* (Fam. Dematiaceae).

Du point de vue des populations (Fig. 8.2.2.1., 8.2.2.2. et 8.2.2.5., 8.2.2.6.), les espèces bactériennes sont dominantes, avec environ 90 % de la population totale, par rapport aux champignons (10 %).

Fig. 8.2.2.1. Les pourcentages des especes de microorganismes identifiees pendant la saison humide 2004, dans les formations mucilagineuses.



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Actinomicete*; 6. *Penicillium citreo-viride*; 7. *P. implicatum*; 8. *P. expansum*; 9. *P. verucosum*; 10. *P. verucosum var. corimbiferum*; 11. *P. griseo-fulvus*; 12. *P. steckii*; 13. *Aspergillus nidulans*; 14. *A. thomii*; 15. *Rhodotorula sp.*; 16. *Cladosporium herbarum*; 17. *Scytalidium sp.*

Fig. 8.2.2.2. Les pourcentages des especes de microorganismes identifiees pendant la saison seche 2004, dans les formations mucilagineuses.

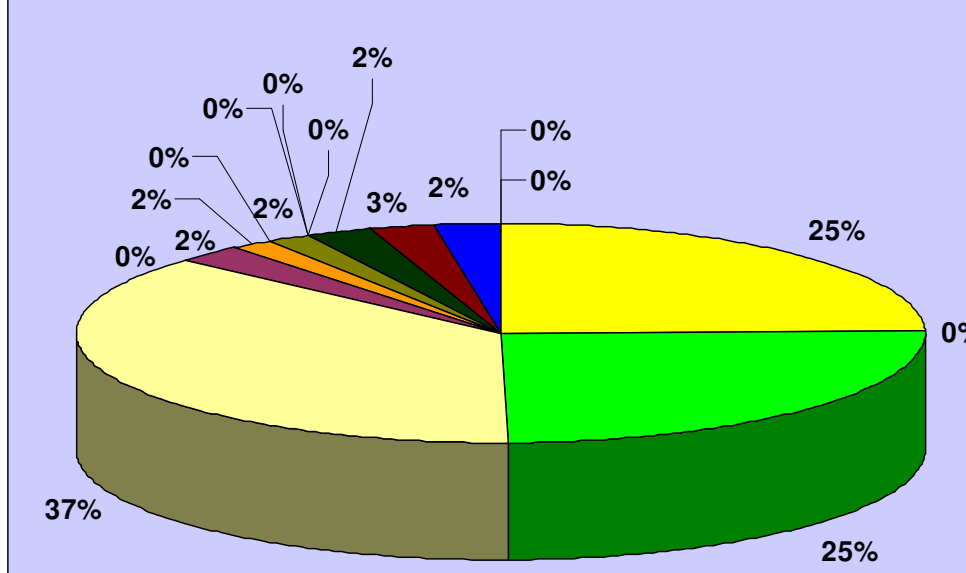
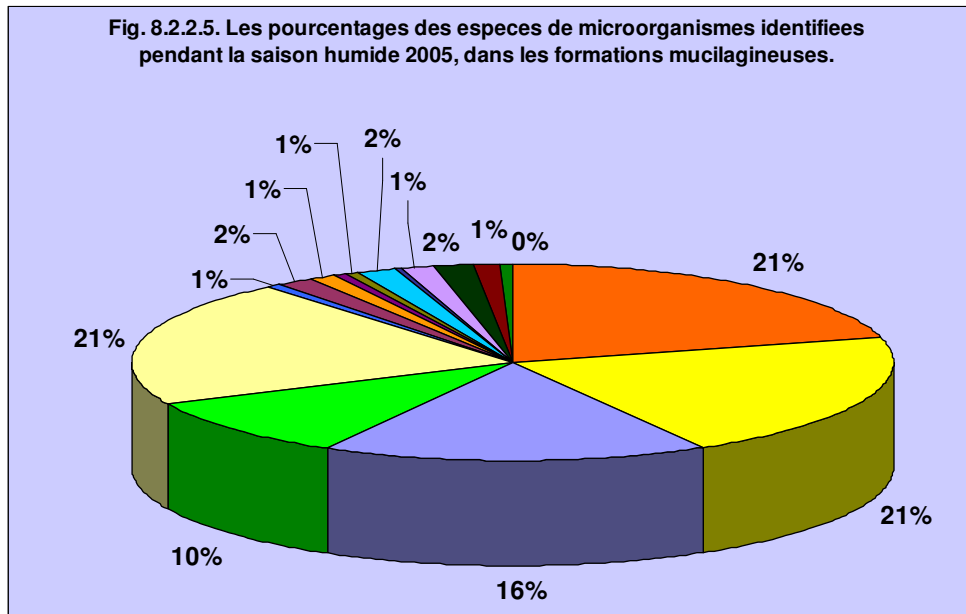
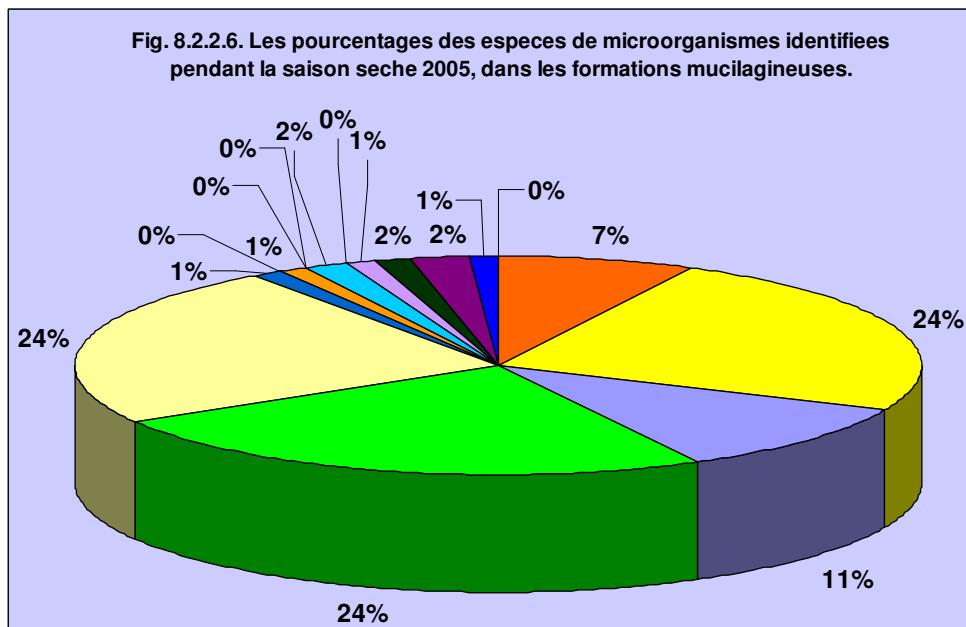


Fig. 8.2.2.5. Les pourcentages des especes de microorganismes identifiees pendant la saison humide 2005, dans les formations mucilagineuses.



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Actinomicete*; 6. *Penicillium citreo-viride*; 7. *P. implicatum*; 8. *P. expansum*; 9. *P. veruncosum*; 10. *P. veruncosum* var. *corimbiferum*; 11. *P. griseo-fulvus*; 12. *P. steckii*; 13. *Aspergillus nidulans*; 14. *A. thomii*; 15. *Rhodotorula* sp.; 16. *Cladosporium herbarum*; 17. *Scytalidium* sp.

Fig. 8.2.2.6. Les pourcentages des especes de microorganismes identifiees pendant la saison seche 2005, dans les formations mucilagineuses.



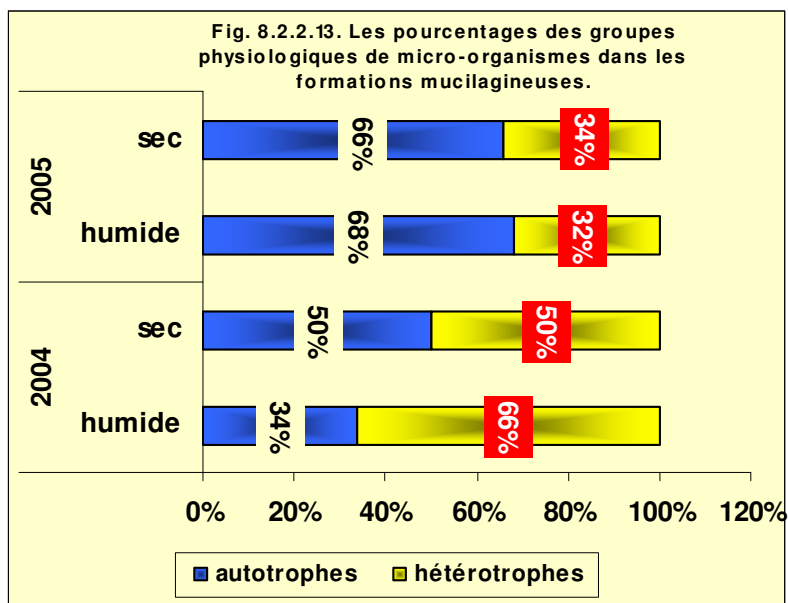
Pendant la saison des pluies 2004, les populations hétérotrophes dominent, les actinomycètes et les champignons représentant 66%, alors que les chimiolithotrophes représentent 34 %. Pendant la saison sèche 2004, la population chimiolithotrophe (50%) équivaut à la population hétérotrophe (50 %) ; remarquons cependant que *A. intermedius* représentant la moitié de la quantité de chimiolithotrophes (25 %), est hétérotrophe facultative.

Pendant la saison des pluies 2005, les espèces dominantes sont les acidithiobacilles chimiolithotrophes avec 68 % dont 10 % sont représentés par *A. intermedius* (facultativement hétérotrophe). Les hétérotrophes représentent 32 %, dont 21% d'actinomycètes, et les espèces de champignons, 11 % de la population totale. Pendant la saison sèche 2005, comme pendant la saison

des pluies, les *Acidithiobacillus* chimiolithotrophes sont les espèces dominantes, avec 66 %, dont 24 % sont représentés par *A. intermedius*. Les hétérotrophes représentent 34 %, avec 24 % d'actinomycètes, alors que les espèces de champignons représentent 10 % de la population totale (Tableau 8.2.2.7., Fig. 8.2.2.13).

Tableau 8.2.2.7. Les pourcentages des groupes physiologiques de micro-organismes dans les formations mucilagineuses, pendant les saisons pluvieuses et sèches des années 2004 et 2005.

années	saisons	autotrophes	hétérotrophes
2004	humide	34%	66%
	sec	50%	50%
2005	humide	68%	32%
	sec	66%	34%

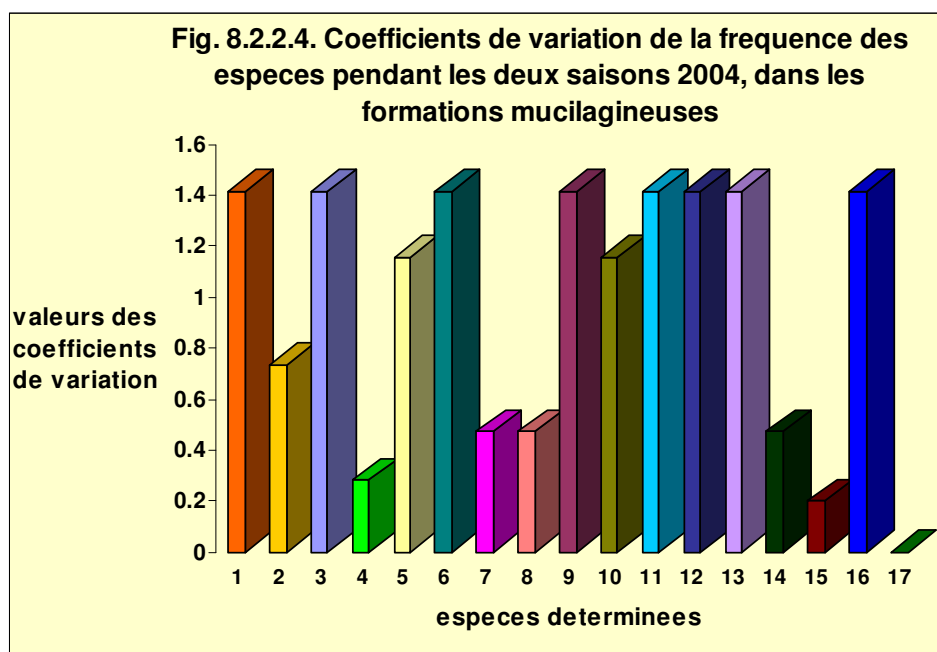


L'écart le plus important concernant le nombre de cellules/ml d'eau entre la saison des pluies et la saison sèche en 2004 apparaît chez les actinomycètes (Fig. 8.2.2.3., 8.2.2.7.). Des variations numériques sont significatives aussi pour les espèces de acidithiobacilles, ainsi que *P. veruncosum* var. *corimbiferum* ; les autres espèces enregistrent des variations numériques moins importantes. En 2005, *Acidithiobacillus neapolitanus* connaît la plus grande variation numérique. Les autres espèces présentant des variations numériques significatives sont : *A. thiooxidans*; *A. thioparus*, les *Actinomicetele*, mais aussi *P. expansum*, *P. griseo-fulvus*, *Aspergillus nidulans*, *A. thomii*. L'espèce *A. intermedius* est stable d'une saison à l'autre, en 2005.

Les variations de fréquence des espèces pendant les deux saisons ont été observées par le calcul des coefficients de variation à l'aide de la moyenne arithmétique et de l'écart-type(DS) (Tableaux 8.2.2.2. et 8.2.2.4.) (Fig. 8.2.2.4. et 8.2.2.8.). Ainsi, de la saison des pluies à la saison sèche, les plus grandes variations de fréquence sont enregistrées par *Acidithiobacillus neapolitanus*, *A. thioparus*, *Penicillium citreo-viride*, *P. veruncosum* var. *corimbiferum*, *P. griseo-fulvus*, *P. Steckii* qui, en saison sèche, n'ont pas été identifiées. *Cladosporium herbarum* n'a pas été identifiée pendant les saisons des pluies 2004 et 2005.

Tableau 8.2.2.2. Moyenne arithmétique, écart standard (DS), erreur standard (ES) et coefficients de variation des espèces dans les formations mucilagineuses en 2004.

Espece	2004		moyenne	± ES	DS	coefficient de variation
	Humide (no.cellules/ml)	Sec (no.cellules/ml)				
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	9500	0	4750	4750	6717,5	1,41
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	9500	3000	6250	3250	4596,2	0,73
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	4500	0	2250	2250	3182	1,41
<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	4500	3000	3750	750	1060,7	0,28
<i>Actinomicete</i>	45000	4500	24750	20250	28638	1,15
<i>Penicillium citreo-viride</i>	200	0	100	100	141,42	1,41
<i>Penicillium implicatum</i>	600	300	450	150	212,13	0,47
<i>Penicillium expansum</i>	400	200	300	100	141,42	0,47
<i>Penicillium veruncosum</i>	300	0	150	150	212,13	1,41
<i>Penicillium veruncosum var. corimbiferum</i>	2000	200	1100	900	1272,8	1,15
<i>Penicillium griseo-fulvus</i>	400	0	200	200	282,84	1,41
<i>Penicillium steckii</i>	200	0	100	100	141,42	1,41
<i>Aspergillus nidulans</i>	400	0	200	200	282,84	1,41
<i>Aspergillus thomii</i>	600	300	450	150	212,13	0,47
<i>Rhodotorula</i>	400	300	350	50	70,711	0,20
<i>Cladosporium herbarum</i>	0	300	150	150	212,13	1,41
<i>Scytalidium</i>	0	0	0	0	0	0

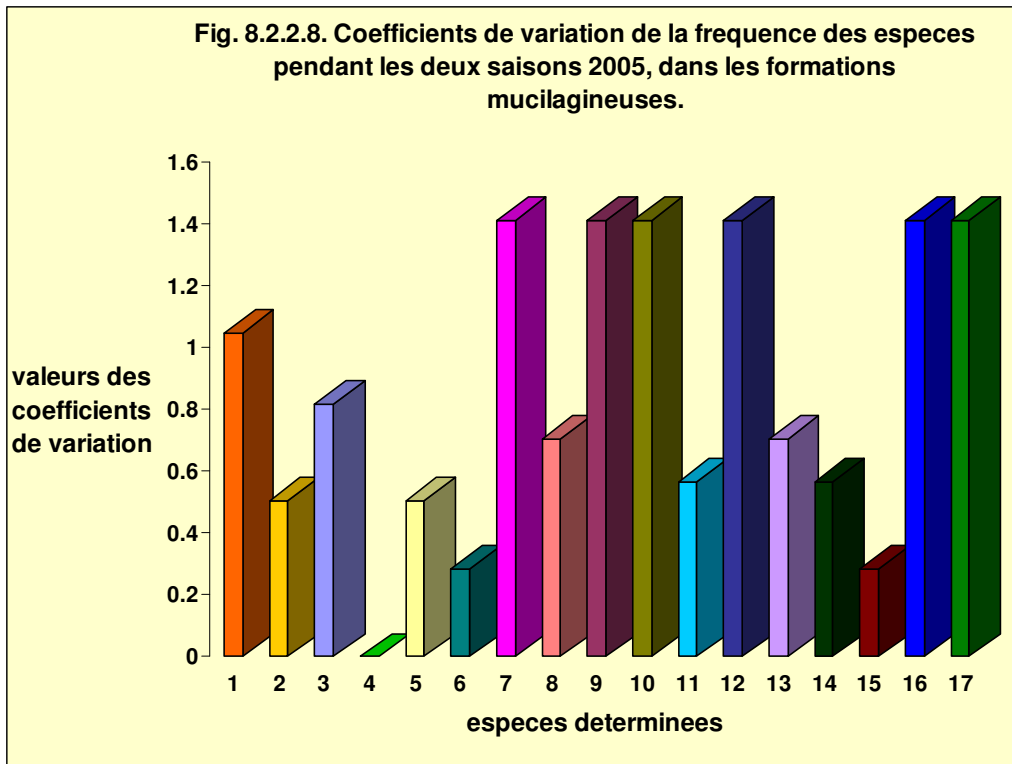


1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Actinomicete*; 6. *Penicillium citreo-viride*; 7. *P. implicatum*; 8. *P. expansum*; 9. *P. veruncosum*; 10. *P. veruncosum var. corimbiferum*; 11. *P. griseo-fulvus*; 12. *P. steckii*; 13. *Aspergillus nidulans*; 14. *A. thomii*; 15. *Rhodotorula sp.*; 16. *Cladosporium herbarum*; 17. *Scytalidium sp.*

En 2005, les plus grandes variations de fréquence concernent *P. implicatum*, *P. verucosum*, *P. verucosum* var. *corimbiferum*, *P. steckii*, *Scytalidium* sp., variations qui n'ont pas été identifiées pendant la saison sèche. Des variations de fréquence assez importantes ont été enregistrées aussi pour les autres espèces, excepté *A. intermedius* qui n'enregistre aucune variation. On observe une variation plus importante des populations de micro-organismes, pendant les deux saisons 2004-2005, dans le cas des formations mucilagineuses, ainsi que dans le cas des stalactites polychromes.

Tableau 8.2.2.4. Moyenne arithmétique, écart standard (DS), erreur standard (ES) et coefficients de variation des espèces dans les formations mucilagineuses en 2005.

Espece	2005		moyenne	±ES	DS	coefficient de variation
	Humide (no.cellules/ml)	Sec (no.cellules/ml)				
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	9500	1400	5450	4050	5727,56	1,05
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	9500	4500	7000	2500	3535,53	0,50
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	7500	2000	4750	2750	3889,09	0,81
<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	4500	4500	4500	0.00	0	0
<i>Actinomicete</i>	9500	4500	7000	2500	3535,53	0,50
<i>Penicillium citreo-viride</i>	300	200	250	50	70,71	0,28
<i>Penicillium implicatum</i>	700	0	350	350	494,97	1,41
<i>Penicillium expansum</i>	600	200	400	200	282,84	0,70
<i>Penicillium verucosum</i>	200	0	100	100	141,42	1,41
<i>Penicillium verucosum</i> var. <i>corimbiferum</i>	300	0	150	150	212,13	1,412
<i>Penicillium griseo-fulvus</i>	700	300	500	200	282,84	0,56
<i>Penicillium steckii</i>	200	0	100	100	141,42	1,41
<i>Aspergillus nidulans</i>	600	200	400	200	282,84	0,70
<i>Aspergillus thomii</i>	700	300	500	200	282,84	0,56
<i>Rhodotorula</i> sp.	600	400	500	100	141,42	0,28
<i>Cladosporium herbarum</i>	0	200	100	100	141,42	1,41
<i>Scytalidium</i> sp.	200	0	100	100	141,42	1,41



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Actinomicete*; 6. *Penicillium citreo-viride*; 7. *P. implicatum*; 8. *P. expansum*; 9. *P. verucosum*; 10. *P. verucosum var. corimbiferum*; 11. *P. griseo-fulvus*; 12. *P. steckii*; 13. *Aspergillus nidulans*; 14. *A. thomii*; 15. *Rhodotorula sp.*; 16. *Cladosporium herbarum*; 17. *Scytalidium sp.*

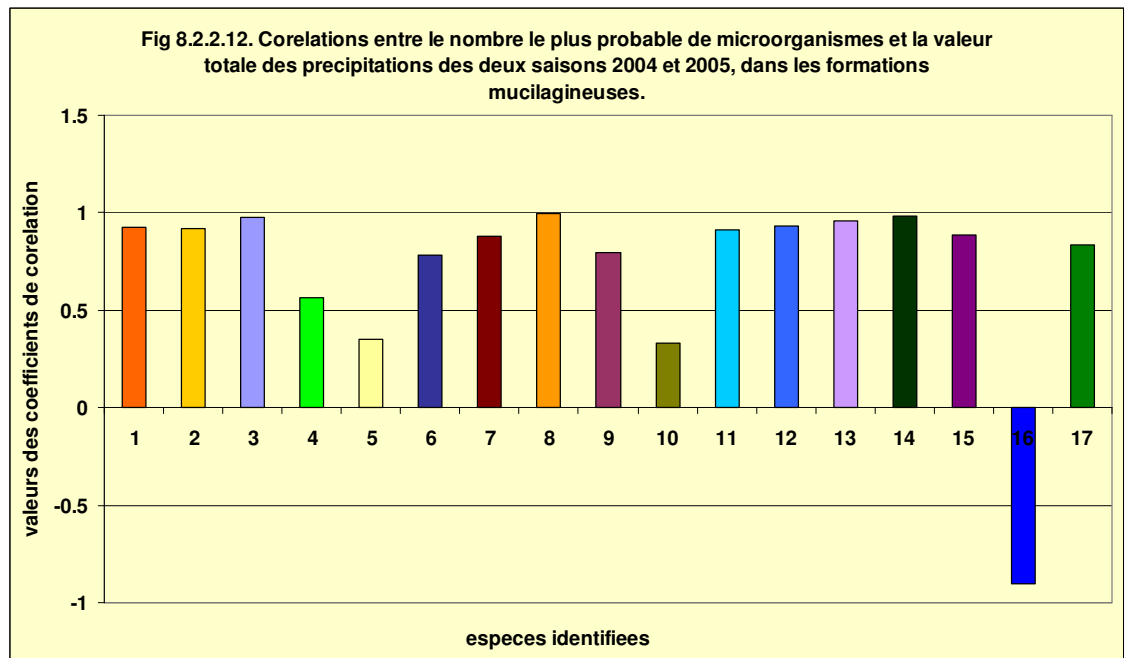
Les corrélations établies entre le nombre le plus probable de micro-organismes et la valeur totale des précipitations des mois où l'on a effectué des mesures (Tableau 8.2.2.6.) (Fig. 8.2.2.12.), dans les années 2004 et 2005, ont montré, par la représentation graphique des coefficients de corrélation, que toutes les espèces identifiées dans les formations mucilagineuses présentent une tendance des corrélations positives avec les précipitations, excepté *Cladosporium herbarum*, seule espèce qui a tendance à des corrélations négatives.

Pour une valeur $p \leq 5\%$ (voir paragraphe 8.1.4. et Annexe VI : Tableau 8.1.4.1.), nous observons sur le Tableau 8.2.2.6. (*, **) que *P. expansum* présente la corrélation la plus significative avec les précipitations. D'autres espèces à corrélations significatives sont *A. thioparus*, *Aspergillus nidulans* et *A. thomii*, toutes ces espèces présentant des corrélations positives. Dans le cas des autres espèces, ces corrélations sont non significatives.

Tableau 8.2.2.6. Corélations entre le nombre des micro-organismes (no.cellules/ml) et le volume total des précipitations (en mm), en 2004 et 2005, dans les formations mucilagineuses.

Espece		le no. des micro-organismes		les précipitations		coefficient de corelation
		sec	humide	sec	humide	
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	2004	0	9500	29,9	141,8	0,926
	2005	1400	9500	37,4	226,4	
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	2004	3000	9500	29,9	141,8	0,919
	2005	4500	9500	37,4	226,4	
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	2004	0	4500	29,9	141,8	0,975*
	2005	2000	7500	37,4	226,4	
<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	2004	3000	4500	29,9	141,8	0,562
	2005	4500	4500	37,4	226,4	
<i>Actinomicete</i>	2004	4500	45000	29,9	141,8	0,350
	2005	4500	9500	37,4	226,4	
<i>Penicillium citreo-viride</i>	2004	0	200	29,9	141,8	0,780
	2005	200	300	37,4	226,4	
<i>Penicillium implicatum</i>	2004	300	600	29,9	141,8	0,882
	2005	0	700	37,4	226,4	
<i>Penicillium expansum</i>	2004	200	400	29,9	141,8	0,997**
	2005	200	600	37,4	226,4	
<i>Penicillium veruncosum</i>	2004	0	300	29,9	141,8	0,793
	2005	0	200	37,4	226,4	
<i>Penicillium veruncosum var. corimbiferum</i>	2004	200	2000	29,9	141,8	0,328
	2005	0	300	37,4	226,4	
<i>Penicillium griseo-fulvus</i>	2004	0	400	29,9	141,8	0,913
	2005	300	700	37,4	226,4	
<i>Penicillium steckii</i>	2004	0	200	29,9	141,8	0,928
	2005	0	200	37,4	226,4	
<i>Aspergillus nidulans</i>	2004	0	400	29,9	141,8	0,957*
	2005	200	600	37,4	226,4	
<i>Aspergillus thomii</i>	2004	300	600	29,9	141,8	0,983*
	2005	300	700	37,4	226,4	
<i>Rhodotorula</i>	2004	300	400	29,9	141,8	0,889
	2005	400	600	37,4	226,4	
<i>Cladosporium herbarum</i>	2004	300	0	29,9	141,8	-0,902
	2005	200	0	37,4	226,4	
<i>Scytalidium</i>	2004	0	0	29,9	141,8	0,837
	2005	0	200	37,4	226,4	

p ≤ 5%



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Actinomycete*; 6. *Penicillium citreo-viride*; 7. *P. implicatum*; 8. *P. expansum*; 9. *P. veruncosum*; 10. *P. veruncosum var. corimbiferum*; 11. *P. griseo-fulvus*; 12. *P. steckii*; 13. *Aspergillus nidulans*; 14. *A. thomii*; 15. *Rhodotorula sp.*; 16. *Cladosporium herbarum*; 17. *Scytalidium sp.*

A partir de l'analyse de l'ampleur de la variation du nombre des micro-organismes de 2004 à 2005 (Tableau 8.2.1.5. et Fig. 8.2.1.9., 8.2.1.10.), nous avons observé le fait que, pendant les deux saisons riches en précipitations, une grande variation du nombre des *Actinomycètes* a été enregistrée. D'autres espèces, à savoir *A. thioparus* et *P. veruncosum var. corimbiferum* présentent des variations numériques significatives ; les autres présentant des variations réduites. *A. neapolitanus*, *A. thiooxidans*, *A. intermedius*, *P. steckii* et *Cladosporium herbarum* ne présentent pas de variations numériques pendant les saisons riches en précipitations des années 2004 et 2005.

Pendant les deux saisons pauvres en précipitations, une importante variation du nombre de *A. thiooxidans* et *A. intermedius* a été observée. Ces variations numériques sont plus réduites en 2004 et en 2005 chez *Penicillium citreo-viride* et *Rhodotorula sp* ; les autres espèces n'enregistrent aucune variation pendant les saisons sèches des deux années.

L'analyse générale des variations numériques des espèces, pendant les deux saisons des pluvieuses et sèches de 2004 et 2005 (Fig. 8.2.2.11.), a permis d'identifier une variation numérique moins importante des micro-organismes, entre la saison des pluies et la saison sèche 2005 par rapport à 2004. En 2004 on observe aussi, dans le cas des *Actinomycètes*, une variation numérique plus importante, ceci étant en fait une situation aléatoire et de courte durée.

Comme nous avons indiqué dans le chapitre 6, le débit de l'eau de la niche où se trouvent les formations mucilagineuses varie significativement des périodes riches en précipitations aux périodes pauvres en précipitations. Ainsi, à la différence des stalactites polychromes, dans les formations mucilagineuses nous avons observé une variation plus importante des populations de micro-organismes, pendant les deux années, entre la saison des pluies et la saison sèche.

Les producteurs primaires, représentés par des espèces de *Acidithiobacillus*, réalisent l'oxydation de la pyrite et d'autres sulfures métalliques (voir chapitre 11) des parois de la Galerie Kiesberg, mais aussi du Fe^{2+} et des composés du soufre réduits, provenant de l'oxydation biologique et chimique de la pyrite. L'oxydation biologique de la pyrite intervient au contact entre les formations mucilagineuses et la paroi de la galerie et est intense pendant les périodes de grande

humidité, lorsque l'eau se charge des produits d'oxydation et les évacue, car leurs accumulations locales inhibent les *Acidithiobacillus* actifs pendant l'oxydation (chapitres 1 et 2). Les produits provenant de l'oxydation de la pyrite (Fe^{2+} , S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, etc) sont rapidement oxydés par les chimiolithotrophes du consortium mucilagineux qui se trouvent un peu à l'écart de la roche. Ainsi, nous avons observé qu'en 2005, lorsque la quantité d'eau était élevée (total des précipitations : 1202,2 mm) les populations autotrophes (chimiolithotrophes) dominaient le microécosystème, alors que durant l'année 2004, plus sèche (875 mm), les populations hétérotrophes prédominaient.

En conclusion, les formations mucilagineuses représentent un microécosystème formé de populations de micro-organismes acidophiles (pH de l'eau 2,81), autotrophes (chimiolithotrophes) et hétérotrophes, entre lesquels existent des liens étroits, le rapport entre ces micro-organismes variant en fonction de l'apport d'eau et des autres facteurs de milieu comme la variation de pH, des éléments chimiques, de substance organique, etc.

8.2.3. La flaque

Dans le cas de la flaque, des échantillons du dépôt rouge et du dépôt blanc ont été récoltés dans des flacons stériles pour les analyses.

Les résultats des analyses peuvent être résumés ainsi.

En 2004 (*Tableau 8.2.3.1. et 8.2.3.3.*), 12 espèces de micro-organismes ont été identifiées, auxquelles s'est ajoutée, en 2005, une espèce supplémentaire, *Aspergillus thomii* (dépôt blanc) (Fam. *Moniliaceae*). Des treize espèces identifiées, dix sont présentes dans le dépôt rouge, et trois (champignons) dans le dépôt blanc (comme dans le cas des formations mucilagineuses, pour faciliter les comparaisons entre les résultats des deux saisons des années 2004 et 2005, nous avons choisi d'introduire *Aspergillus thomii* (dépôt blanc) dans les tableaux et les graphiques pour l'année 2004).

Tableaux 8.2.3.1. + 8.2.3.3. Nombre le plus probable de micro-organismes (no. cellules/ml) dans la flaque en 2004 et 2005.

Espece	2004		2005		2004	2005
	humide	sec	humide	sec	amplitude des variations	amplitude des variations
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	9500	4500	9500	7500	5000	2000
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	7500	3000	9500	4500	4500	5000
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	4500	2000	7500	4500	2500	3000
<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	9500	7500	9500	7500	2000	2000
<i>Flexibacter sancti</i>	12000	10000	12500	9500	2000	3000
<i>Acidovorax delafieldii</i>	500	1500	300	1500	1000	1200
<i>Chryseobacterium gleum</i>	10500	7500	11500	7500	3000	4000
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	11000	7500	12000	9500	3500	2500
<i>Penicillium notatum (dep. Rouge)</i>	600	200	700	200	400	500
<i>Aspergillus thomii (dep. Rouge)</i>	700	0	600	200	700	400
<i>Penicillium notatum (dep. Blanc)</i>	700	400	700	600	300	100
<i>Aspergillus niger (dep. Blanc)</i>	300	200	300	0	100	300
<i>Aspergillus thomii (dep. Blanc)</i>	0	0	400	200	0	200

En plus de ces espèces, nous supposons aussi une présence massive dans ce bassin de la bactérie *Gallionella ferruginea*, qui oxyde enzymatiquement le Fe^{2+} à un pH voisin de la neutralité. Ainsi que nous le verrons au chapitre 11, la microscopie électronique révèle que le

dépôt rouge est entièrement formé par des filaments organiques spiralés sur lesquels se dépose l'hydroxyde ferrique, lesquels filaments sont analogues à ceux de *G. ferruginea*. La présence de ce micro-organisme est également suspectée du fait des caractéristiques physiologiques de la bactérie *G. ferruginea*, démontrées par différents auteurs (voir chapitre 1), et qui sont les suivantes. (1) *G. ferruginea*, selon Zarnea (1994), oxyde enzymatiquement le Fe^{2+} à pH neutre (la flaque présente un pH supérieur à 6). (2) Dans des cultures de laboratoires, en conditions aérobies, elle se développe exponentiellement, les cellules libres étant mobiles avec un seul flagelle et sans formation de filaments. Les filaments commencent à se former seulement en phase stationnaire, à un pH supérieur à 6. Aucun filament ne se forme lorsque le Fe^{2+} ne s'est pas auto-oxydé, conditions qui incluent la micro-aérobiose. Hallbeck et Pedersen (1990) suggèrent que la formation des filaments protège en quelque sorte contre la "hausse de la capacité réductrice du Fe^{2+} lorsqu'il devient instable dans un milieu devenu oxydant". (3) *G. ferruginea* préfère un pH entre 6 et 7,6, et son besoin modéré en O_2 explique pourquoi ce micro-organisme peut catalyser l'oxydation du Fe^{2+} à pH neutre. Dans ces conditions partiellement réduites, le fer s'auto-oxyde seulement lentement (Wolfe, 1964). (4) *G. ferruginea* peut se développer de manière autotrophe et mixotrophe (Hallbeck et Pedersen, 1991).

Jusqu'à présent, pour des raisons techniques, sa mise en évidence dans les dépôts de cette flaque n'a donc pas abouti ; cela constituera l'une de nos futures tâches.

Les quatre espèces de *Acidithiobacillus* ainsi que *Flexibacter sancti*, *Acidovorax delafieldii*, *Chryseobacterium gleum*, *Staphylococcus aureus subsp. aureus* sont des représentants des bactéries, les autres espèces identifiées représentant des champignons.

Acidithiobacillus neapolitanus, *A. thiooxidans* et *A. thioparus* sont des bactéries chimiolithotrophes, qui oxydent les composés du soufre réduit, provenant de l'oxydation biologique et chimique de la pyrite et sont des producteurs primaires de substance organique. *A. intermedius* est une espèce à métabolisme mixotrophe, mais aussi hétérotrophe facultative.

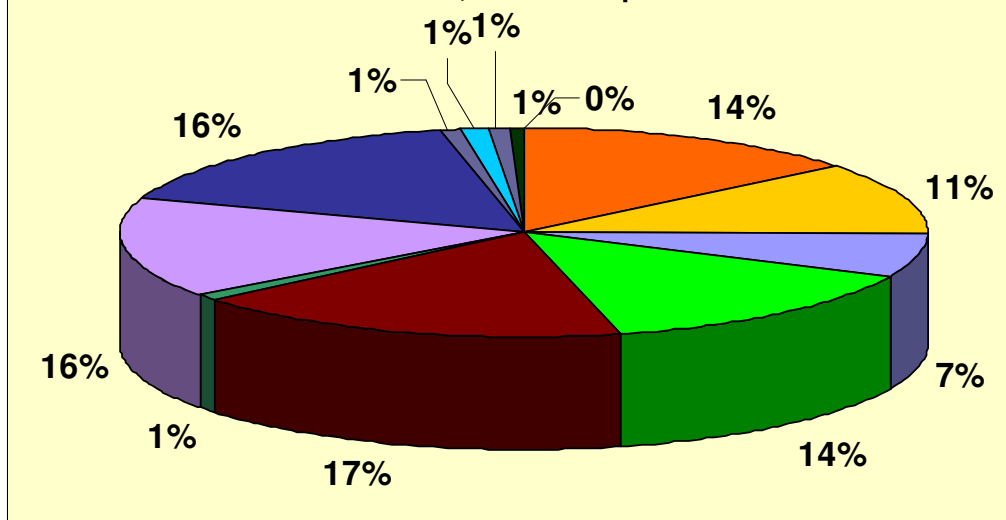
La substance organique allochtone arrivée dans la flaque avec l'eau drainée des autres secteurs et celle due à l'activité des producteurs primaires (des *Acidithiobacillus*) (chapitre 11) sont décomposées par les micro-organismes hétérotrophes, représentés par les autres espèces bactériennes identifiées, ainsi que par les espèces de champignons suivantes (de la famille des Moniliaceae).

1. dépôt rouge: *Penicillium notatum*; *Aspergillus thomii*;

2. dépôt blanc: *P. notatum*, *A. niger*.

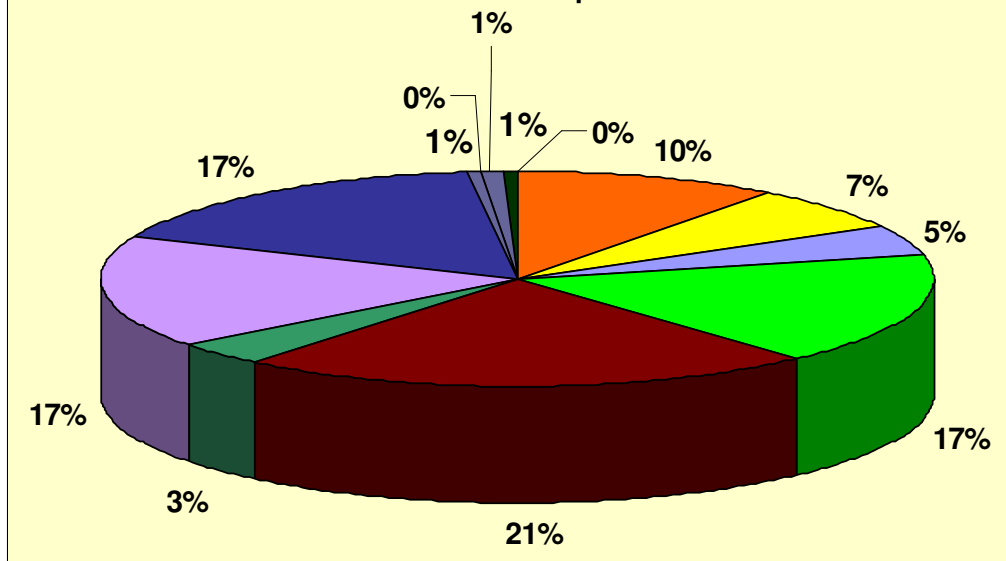
Du point de vue des proportions (Fig. 8.2.3.1., 8.2.3.2. et 8.2.3.5., 8.2.3.6.), les espèces bactériennes dominent avec plus de 90 % de la population totale, les champignons formant seulement quelques pour-cents.

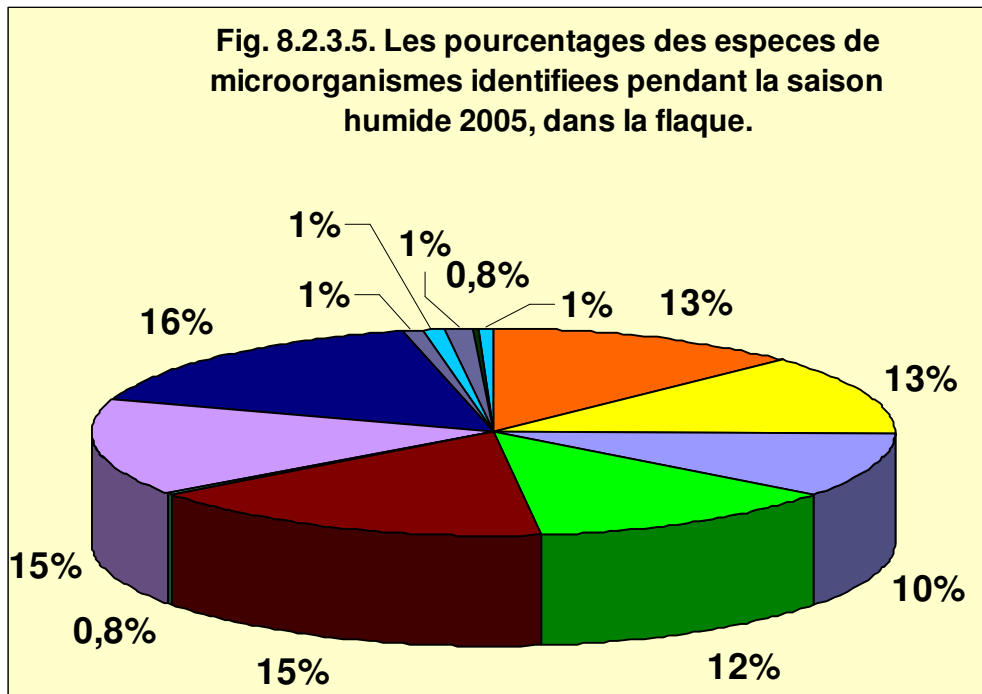
Fig. 8.2.3.1. Les pourcentages des especes de microorganismes identifiees pendant la saison humide 2004, dans la flaue.



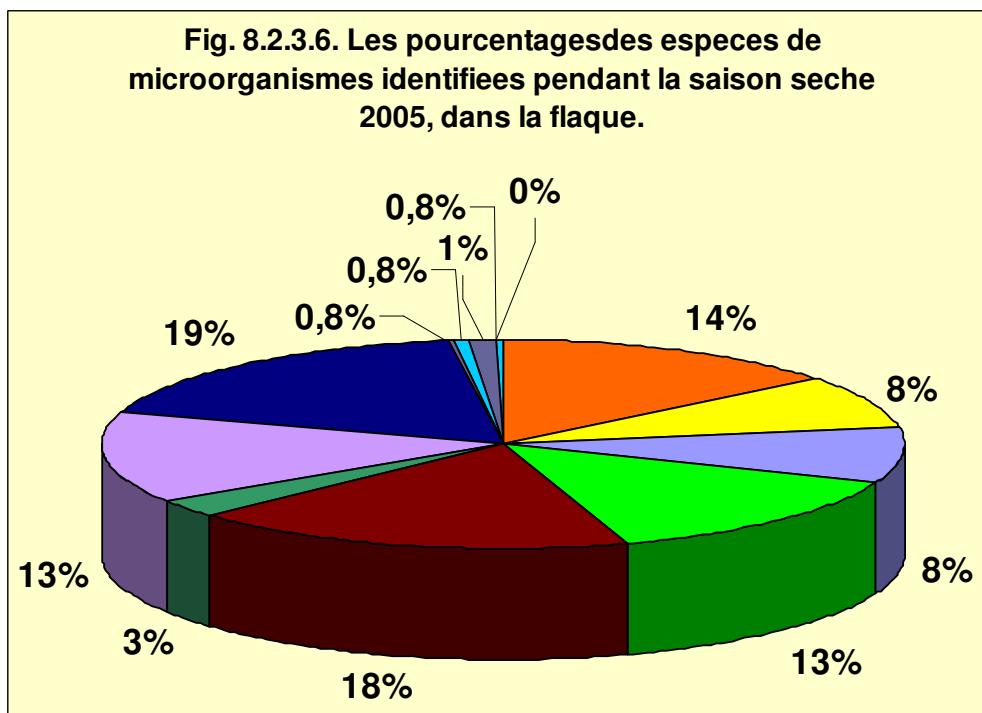
1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Flexibacter sancti*; 6. *Acidovorax delafieldii*; 7. *Chryseobacterium gleum*; 8. *Staphylococcus aureus subsp. aureus*; 9. *Penicillium notatum (dep. Roşie)*; 10. *Aspergillus thomii (dep. Roşie)*; 11. *Penicillium notatum (dep. Albă)*; 12. *Aspergillus niger (dep. Albă)*; 13. *Aspergillus thomii (dep. Albă)*.

Fig. 8.2.3.2. Les pourcentages des especes de microorganismes identifiees pendant la saison seche 2004, dans la flaue.





1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Flexibacter sancti*; 6. *Acidovorax delafieldii*; 7. *Chryseobacterium gleum*; 8. *Staphylococcus aureus subsp. aureus*; 9. *Penicillium notatum (dep. Roşie)*; 10. *Aspergillus thomii (dep. Roşie)*; 11. *Penicillium notatum (dep. Albă)*; 12. *Aspergillus niger (dep. Albă)*; 13. *Aspergillus thomii (dep. Albă)*.

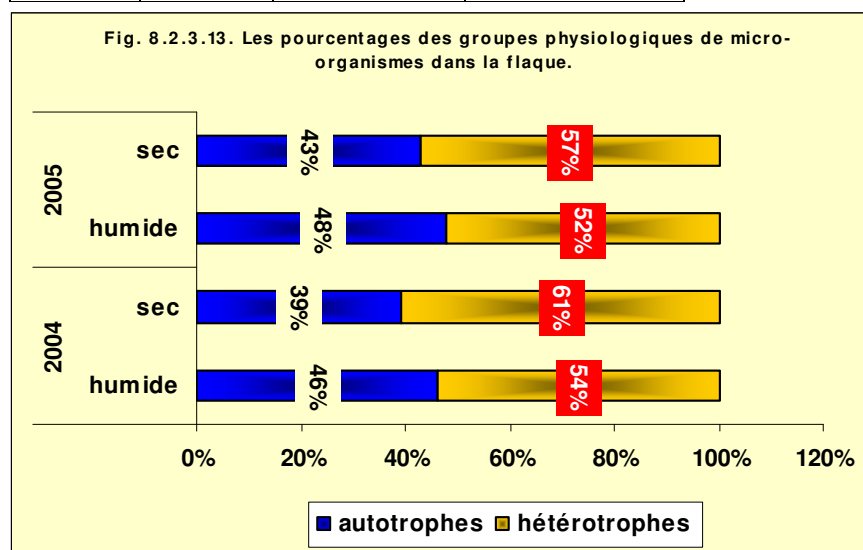


Les hétérotrophes sont dominantes pendant les deux saisons des années 2004 et 2005, mais leur augmentation est marquée pendant les saisons sèches (de plus de 50 % pendant les saisons des pluies, à plus de 60 % de la population totale, pendant les saisons sèches). Inversement, la population des acidithiobacilles chimiolithotrophes (autotrophes) représente environ 40% de la

population totale, subit une légère baisse, de quelques pour-cents, entre la saison pluvieuse et la saison sèche. *A. Intermedius*, hétérotrophe facultative, représentait environ 15% de la population totale de acidithiobacilles (Tableau 8.2.3.7., Fig. 8.2.3.13).

Tableau 8.2.3.7. Les pourcentages des groupes physiologiques de micro-organismes dans la flaque, pendant les saisons pluvieuses et sèches des années 2004 et 2005.

années	saisons	autotrophes	hétérotrophes
2004	humide	46%	54%
	sec	39%	61%
2005	humide	48%	52%
	sec	43%	57%

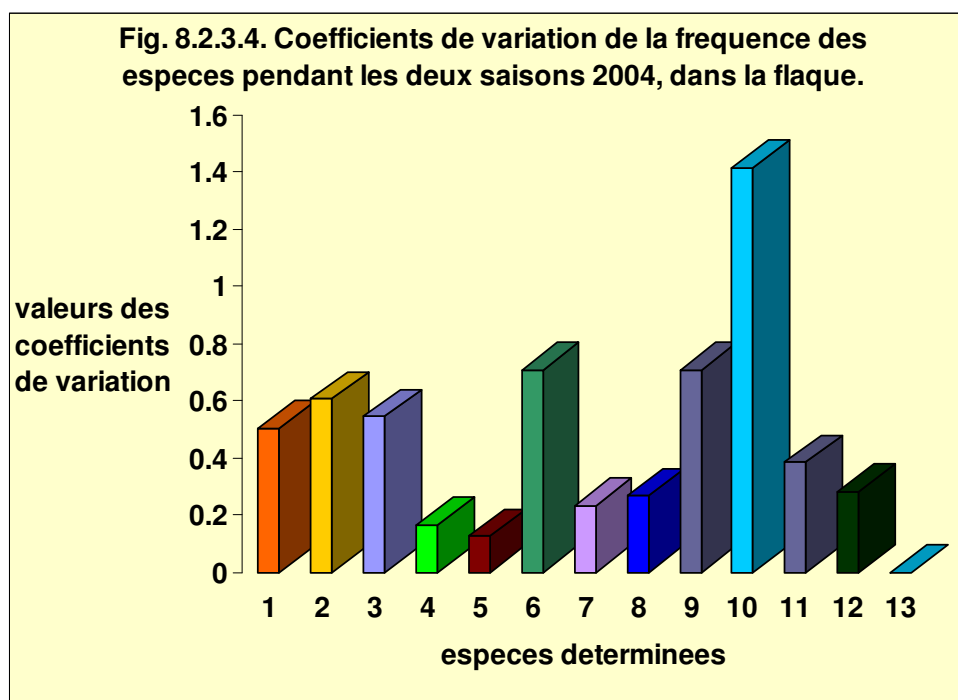


La plus grande variation du nombre de cellules/ml d'eau, entre la saison des pluies et la saison sèche, en 2004 comme en 2005 (Fig. 8.2.3.3., 8.2.3.7.), est présentée par les quatre espèces de acidithiobacilles, mais aussi par les autres espèces bactériennes.

De la saison humide à la saison sèche (Tableaux 8.2.3.2. et 8.2.3.4.) (Fig. 8.2.3.4. et 8.2.3.8.), les plus importantes variations de distribution des fréquences sont enregistrées par *Aspergillus thomii* (dépôt Rouge), en 2004, et par *Aspergillus niger* (dépôt Blanc), en 2005, mais elles n'ont pas été identifiées pendant la saison sèche. D'autres espèces présentent des variations significatives de fréquence, en 2004 : *Acidithiobacillus neapolitanus*, *A. thiooxidans*, *A. thioparus*, *Acidovorax delafieldii* et *Penicillium notatum* (dépôt Rouge), et en 2005 : *A. thiooxidans*, *A. thioparus*, *Acidovorax delafieldii*, *Penicillium notatum* (dépôt Rouge), *Aspergillus thomii* (dépôt Rouge), *Aspergillus niger* (dépôt Blanc) et *Aspergillus thomii* (dépôt Blanc), les autres présentent des variations assez réduites.

Tableau 8.2.3.2. Moyenne arithmétique, écart standard (DS), erreur standard (ES) et coefficients de variation des espèces dans la flaque en 2004.

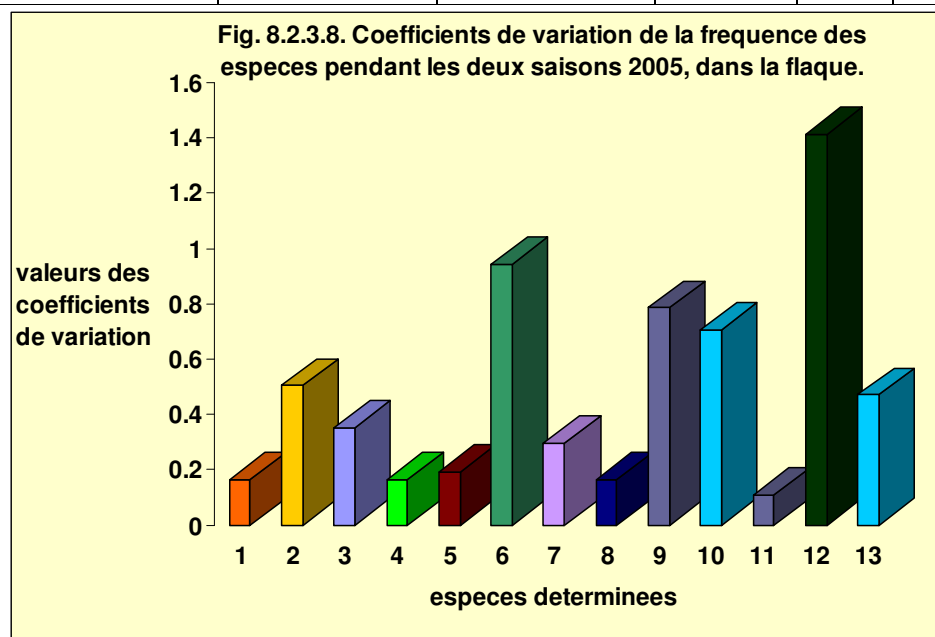
Espece	2004		moyenne	± ES	DS	coefficient de variation
	Humide (no.cellules/ml)	Sec (no.cellules/ml)				
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	9500	4500	7000	2500	3535,53	0,50
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	7500	3000	5250	2250	3181,98	0,60
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	4500	2000	3250	1250	1767,76	0,54
<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	9500	7500	8500	1000	1414,21	0,16
<i>Flexibacter sancti</i>	12000	10000	11000	1000	1414,21	0,12
<i>Acidovorax delafieldii</i>	500	1500	1000	500	707,10	0,70
<i>Chryseobacterium gleum</i>	10500	7500	9000	1500	2121,32	0,23
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	11000	7500	9250	1750	2474,87	0,26
<i>Penicillium notatum (dep. Rouge)</i>	600	200	400	200	282,84	0,70
<i>Aspergillus thomii (dep. Rouge)</i>	700	0	350	350	494,97	1,41
<i>Penicillium notatum (dep. Blanc)</i>	700	400	550	150	212,13	0,38
<i>Aspergillus niger (dep. Blanc)</i>	300	200	250	50	70,71	0,28
<i>(Aspergillus thomii) (dep. Blanc)</i>	0	0	0	0	0	0



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Flexibacter sancti*; 6. *Acidovorax delafieldii*; 7. *Chryseobacterium gleum*; 8. *Staphylococcus aureus subsp. aureus*; 9. *Penicillium notatum (dep. Roşie)*; 10. *Aspergillus thomii (dep. Roşie)*; 11. *Penicillium notatum (dep. Albă)*; 12. *Aspergillus niger (dep. Albă)*; 13. *Aspergillus thomii (dep. Albă)*.

Tableau 8.2.3.4. Moyenne arithmétique, écart standard (DS), erreur standard (ES) et coefficients de variation des espèces dans la flaque en 2005.

Especce	2005		moyenne	± ES	DS	coefficient de variation
	Humide (no.cellules/ml)	Sec (no.cellules/ml)				
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	9500	7500	8500	1000	1414,21	0,16
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	9500	4500	7000	2500	3535,53	0,50
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	7500	4500	6000	1500	2121,32	0,35
<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	9500	7500	8500	1000	1414,21	0,16
<i>Flexibacter sancti</i>	12500	9500	11000	1500	2121,32	0,19
<i>Acidovorax delafieldii</i>	300	1500	900	600	848,52	0,94
<i>Chryseobacterium gleum</i>	11500	7500	9500	2000	2828,42	0,29
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	12000	9500	10750	1250	1767,76	0,16
<i>Penicillium notatum (dep. Rouge)</i>	700	200	450	250	353,55	0,78
<i>Aspergillus thomii (dep. Rouge)</i>	600	200	400	200	282,84	0,70
<i>Penicillium notatum (dep. Blanc)</i>	700	600	650	50	70,71	0,10
<i>Aspergillus niger (dep. Blanc)</i>	300	0	150	150	212,13	1,41
<i>Aspergillus thomii (dep. Blanc)</i>	400	200	300	100	141,42	0,47



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Flexibacter sancti*; 6. *Acidovorax delafieldii*; 7. *Chryseobacterium gleum*; 8. *Staphylococcus aureus subsp. aureus*; 9. *Penicillium notatum (dep. Roşie)*; 10. *Aspergillus thomii (dep. Roşie)*; 11. *Penicillium notatum (dep. Albă)*; 12. *Aspergillus niger (dep. Albă)*; 13. *Aspergillus thomii (dep. Albă)*.

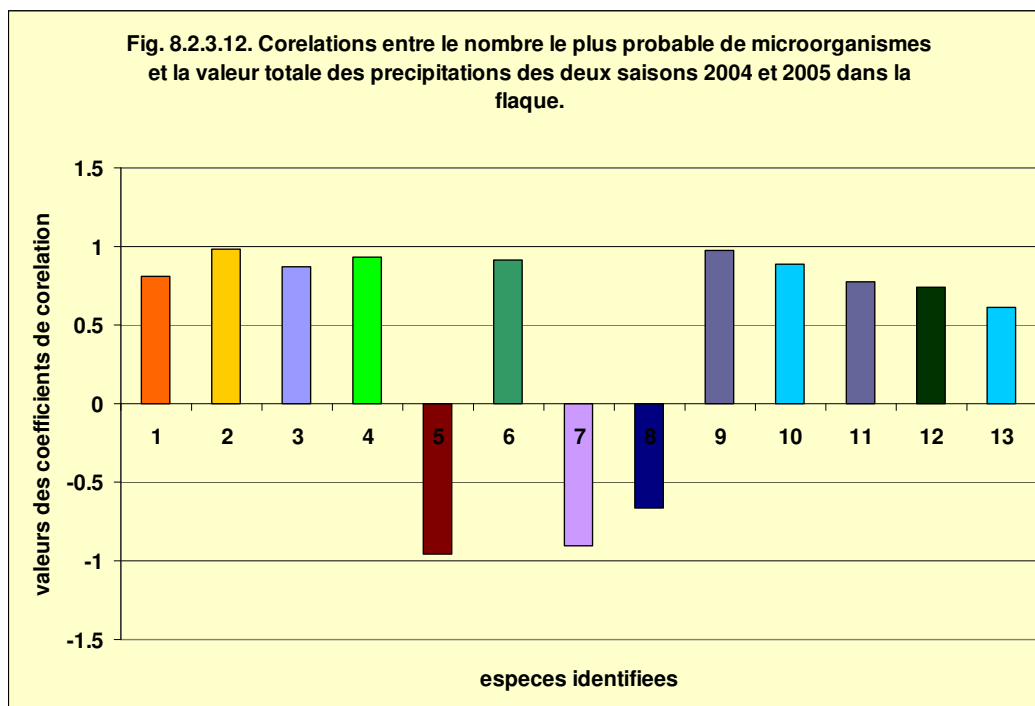
A partir de la représentation graphique des coefficients de corrélation (entre le nombre le plus probable de micro-organismes et les quantités totales de précipitations des mois où l'on a procédé à des mesures en 2004 et en 2005) (Fig. 8.2.3.12.), nous avons observé que *Flexibacter sancti*, *Chryseobacterium gleum* et *Staphylococcus aureus subsp. aureus* présentent une tendance des corrélations négatives avec les précipitations, l'accroissement de leur population est donc inversement proportionnelle avec l'augmentation de la quantité d'eau qui alimente la flaque. Les autres espèces identifiées présentent une tendance de corrélations positives avec les précipitations : leur nombre est ainsi directement proportionnel avec le débit de l'eau arrivant à la flaque.

Du point de vue statistique, pour une valeur $p \leq 5\%$ (voir paragraphe 8.1.4. et *Annexe VI: Tableau 8.1.4.1.*), du *Tableau 8.2.3.6. (*)*, on observe que les corrélations les plus significatives avec les précipitations concernent *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Flexibacter sancti* et *Penicillium notatum (dépôt Rouge)*. Parmi ces trois espèces, les corrélations sont positives, pour *Acidithiobacillus thiooxidans* et *Penicillium notatum (dépôt Rouge)* mais négatives pour *Flexibacter sancti*. Pour les autres espèces ces corrélations sont non significatives.

Tableau 8.2.3.6. Corélations entre le nombre des micro-organismes (no.cellules/ml) et le volume total des précipitations (en mm), en 2004 et 2005, dans la flaque.

Espece		le no. des micro-organismes		les précipitations		coefficient de corélation
		sec	humide	sec	humide	
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	2004	4500	9500	29,9	141,8	0,811
	2005	7500	9500	37,4	226,4	
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	2004	3000	7500	29,9	141,8	0,980*
	2005	4500	9500	37,4	226,4	
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	2004	2000	4500	29,9	141,8	0,871
	2005	4500	7500	37,4	226,4	
<i>Acidithiobacillus intermedius</i>	2004	7500	9500	29,9	141,8	0,928
	2005	7500	9500	37,4	226,4	
<i>Flexibacter sancti</i>	2004	12000	10000	29,9	141,8	-0,957*
	2005	12500	9500	37,4	226,4	
<i>Acidovorax delafieldii</i>	2004	500	1500	29,9	141,8	0,916
	2005	300	1500	37,4	226,4	
<i>Chryseobacterium gleum</i>	2004	10500	7500	29,9	141,8	-0,903
	2005	11500	7500	37,4	226,4	
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	2004	11000	7500	29,9	141,8	-0,660
	2005	12000	9500	37,4	226,4	
<i>Penicillium notatum (dép. rouge)</i>	2004	200	600	29,9	141,8	0,974*
	2005	200	700	37,4	226,4	
<i>Aspergillus thomii (dép. rouge)</i>	2004	0	700	29,9	141,8	0,855
	2005	200	600	37,4	226,4	
<i>Penicillium notatum (dép. blanc)</i>	2004	400	700	29,9	141,8	0,777
	2005	600	700	37,4	226,4	
<i>Aspergillus niger (dép. blanc)</i>	2004	200	300	29,9	141,8	0,739
	2005	0	300	37,4	226,4	
<i>Aspergillus thomii (dép. blanc)</i>	2004	0	0	29,9	141,8	0,608
	2005	200	400	37,4	226,4	

$p \leq 5\%$



1. *Acidithiobacillus neapolitanus*; 2. *A. thiooxidans*; 3. *A. thioparus*; 4. *A. intermedius*; 5. *Flexibacter sancti*; 6. *Acidovorax delafieldii*; 7. *Chryseobacterium gleum*; 8. *Staphylococcus aureus subsp. aureus*; 9. *Penicillium notatum* (dep. Roşie); 10. *Aspergillus thomii* (dep. Roşie); 11. *Penicillium notatum* (dep. Albă); 12. *Aspergillus niger* (dep. Albă); 13. *Aspergillus thomii* (dep. Albă).

Pour les deux saisons riches en pluies de 2004 et de 2005, les variations numériques les plus importantes (Tableau 8.2.3.5. et Fig. 8.2.1.9., 8.2.3.10.) concernent *A. thiooxidans* et *Flexibacter sancti*, *Chryseobacterium gleum* et *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, les autres présentant des variations non significatives. *Acidithiobacillus neapolitanus*, *A. thioparus*, *A. intermedius*, *Penicillium notatum* (dépôt Blanc), *Aspergillus niger* (dépôt Blanc) et *Aspergillus thomii* (dépôt Blanc) ne présentent pas de variations numériques entre 2004 et 2005, pendant les saisons riches en précipitations.

Pendant les saisons pauvres en précipitations (Fig. 8.2.3.10.), on observe, d'une année à l'autre, une variation importante de populations dans le cas de *Acidithiobacillus neapolitanus*, *A. thiooxidans*, *A. thioparus* et *P. expansum*. Les variations numériques sont moindres pour *Flexibacter sancti* et *Penicillium notatum* (dépôt Blanc), entre 2004 et 2005 ; les autres espèces n'enregistrent aucune variation pendant les saisons sèches des deux années.

De manière générale, (Fig. 8.2.3.11.), nous avons observé, comme pour les autres échantillons, que la variation numérique des micro-organismes est moins importante entre les deux saisons des pluies et les deux saisons sèches de 2004 et 2005 qu'entre saisons sèches et humides. Des variations numériques importantes sont observées dans le cas de *Acidithiobacillus neapolitanus*, *A. thiooxidans*, *A. thioparus*, *A. intermedius*, *Flexibacter sancti*, *Chryseobacterium gleum* et *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, les autres espèces n'enregistrent que de petites variations.

Rappelons que la flaue se situe dans l'un des plus bas secteurs de la cavité Kiesberg (voir chapitre 6), qu'elle présente un pH entre 6 et 7 et draine une grande partie des eaux des autres galeries de la cavité. Dans la zone des dépôts rouges, occupant 90 % de sa surface, existe une communauté mixte, formée de populations de micro-organismes chimiolithotrophes (autotrophes)

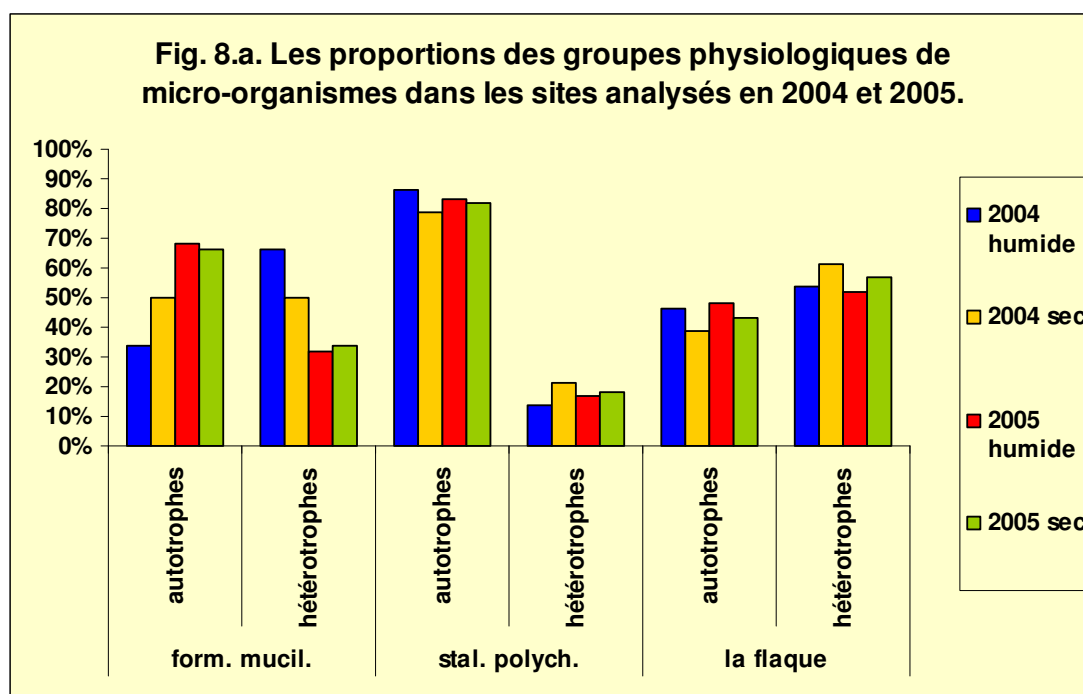
(environ 40 % de toutes les populations), et des populations de micro-organismes hétérotrophes (environ 60 %).

Dans les communautés chimiolithotrophes, l'oxydation du Fe^{2+} de l'eau de la flaque se fait, nous le supposons, par *Gallionella ferruginea*, qui forme une très grande quantité de filaments spiralés (voir chapitre 10) constituant en fait tout le dépôt rouge. Les populations de acidithiobacilles que nous y avons identifiées oxydent les composés du soufre réduit, provenant de l'oxydation de la pyrite des parois de la cavité.

L'activité des populations chimiosynthétisantes conduit à la formation de substances organiques qui, avec les matières organiques allochtones, sont décomposées par les populations de micro-organismes hétérotrophes. Pendant les périodes sèches, où l'apport d'eau de l'extérieur est moins important, l'activité des micro-organismes hétérotrophes s'intensifie.

Le dépôt blanc, où coexistent seulement trois espèces de champignons, représente une zone où se poursuit l'altération des feldspaths commencée sur les parois de la mine (voir chapitre 11).

D'un point de vue général concernant les activités métaboliques qui se déroulent sur les trois sites analysés (Tableau 8.a., Tableau 8.b., Fig. 8.a.), stalactites polychromes, formations mucilagineuse et flaque, il est possible de préciser les aspects suivants.



(1) *Acidithiobacillus ferrooxidans*, qui peut utiliser le Fe^{2+} comme unique source d'énergie, mais aussi le soufre ou le thiosulfate (Hutchinson *et al.*, 1969), se trouve seulement dans les stalactites polychromes, où il forme une population chimiolithotrophe assez nombreuse ; cette bactérie se trouve probablement aussi dans les formations mucilagineuses, où elle peut être confondue avec *A. thiooxidans*. Dans la solution de percolation des microfissures de la roche elle réalise l'oxydation du Fe^{2+} et des composés du soufre, qu'elle oxyde au fur et à mesure à l'intérieur des stalactites polychromes (voir chapitre 11).

(2) *Acidithiobacillus neapolitanus*, qui oxyde les S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, *A. thiooxidans*, qui oxyde les S^0 , SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$, *A. thioparus* (S^0 , SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) et *A. intermedius* (S^0 , SO_3^{2-}) (Hutchinson *et al.*, 1969) forment des communautés importantes dans les formations mucilagineuses, où elles sont dominantes, mais aussi dans la flaque.

(3) Les *Actinomycètes* se trouvent seulement dans les formations mucilagineuses, où ils représentent le plus important groupe de micro-organismes hétérotrophes.

(4) *Flexibacter sancti*, *Acidovorax delafieldii*, *Chryseobacterium gleum* et *Staphylococcus aureus subsp. Aureus* (par ailleurs communes dans les sols et les eaux riches en substances organiques) ont été identifiées seulement dans la flaque, où elles représentent les principaux micro-organismes hétérotrophes.

(5) Les espèces de champignons identifiées sont des espèces communes des sols et des eaux riches en substances organiques et représentent des composantes permanentes parmi les hétérotrophes des trois sites analysés. Dans les stalactites polychromes, les espèces de *Penicillium*, représentent environ 20 % du nombre total de micro-organismes.

(6) Les populations de micro-organismes autotrophes (*Fig. 8.a.*) sont dominantes dans les stalactites polychromes et les formations mucilagineuses, tandis que ce sont les populations de micro-organismes hétérotrophes qui dominent dans la flaque.

En conclusion, les résultats acquis à l'issue des analyses microbiologiques effectuées sur les trois sites ont permis de mettre en évidence des communautés de micro-organismes, composées par des populations bactériennes et fongiques, entre lesquelles existent des liens étroits, de nature trophique (dont nous aborderons les modalités au chapitre 11). Le rapport entre les différentes populations de micro-organismes change en fonction des facteurs du milieu, au moins en fonction de la quantité d'eau (comme nous l'avons illustré), l'eau étant essentielle pour l'activité oxydative des chimiolithotrophes, mais aussi comme transporteur des différents composés inorganiques et organiques.

Partie IV. Étude des échantillons en microscopie électronique

Chapitre 9. Méthodes de préparation des échantillons

9.1. Microscopie électronique à transmission (technique conventionnelle)

Les échantillons sont fixés par immersion dans un mélange de glutaraldéhyde 1 % et de paraformaldéhyde 4 % en tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 durant un minimum de 2 heures, selon Mc Dowel et Trump (1976). Après un lavage en tampon phosphate 0,1 M additionné de NaCl 0,2 %, les échantillons sont post-fixés dans un mélange d'acide osmique 2 % en tampon phosphate 0,1 M. Après déshydratation dans l'alcool (bains successifs alcool 50 %, 70 %, 90 % et 100 % et oxyde de propylène) et imprégnation pendant 15-17 heures en Epon pur à + 4° C, les échantillons sont inclus en Epon, polymérisés pendant 48 heures à 60° C et coupés sur ultramicrotome Ultracut E Reichert.

Les coupes ultrafines déposées sur grille, contrastées par une double imprégnation acétate d'uranyle, citrate de plomb sont observées en microscopie électronique à transmission sur un appareil JEOL 1010 ou JEOL 1230 sous une tension d'accélération de 80 kV.

Des problèmes particuliers se sont posés lors du traitement des consortiums mucilagineux, particulièrement dans la confection des coupes ultraminces, du fait que certaines parties des mucopolysaccharides extracellulaires sont minéralisées, et que des cristaux sont parfois présents parmi les cellules, à l'intérieur des consortiums (voir chapitre 10).

9.2. Microscopie électronique à balayage.

En microscopie à balayage, les images sont obtenues grâce à l'émission d'électrons secondaires induite à la surface de l'échantillon par un faisceau d'électrons accélérés sous une tension de quelques kilovolts (1 à 15 kV). Comme l'échantillon, exposé au bombardement électronique, est également soumis à un vide poussé de l'ordre de 10^{-7} hPa, cela implique une préparation préalable des échantillons qui consiste en une fixation afin de préserver les structures, une déshydratation suivie d'un séchage complet.

La fixation est réalisée par immersion de l'échantillon pendant une heure dans une solution de paraformaldéhyde à 4 % associé au glutaraldéhyde à 1% en tampon phosphate de sodium 0.3 M pH 7.4. L'échantillon est rincé avec un tampon phosphate 0.15M pH 7.4 contenant du NaCl 34 mM, puis post-fixé avec une solution de tétraoxyde d'osmium (OsO_4) à 2% dans le tampon phosphate de sodium 0.15M pH 7.4, pendant une heure à l'obscurité sous la hotte. Au terme de cette post-fixation, l'échantillon est lavé 3 fois en eau PPI (pour préparation injectable), puis déshydraté en bains d'éthanol de force croissante, 50°, 70°, 90° et 3 bains d'éthanol absolu. Enfin, le dernier alcool absolu est substitué par de l'héxaméthylidisilazane (HMDS) pur, laissé évaporer à la température du laboratoire sous la hotte.

Pour certains échantillons, la dessiccation a été opérée par la méthode du point critique utilisant le CO_2 . Pour cela, la fixation est réalisée par immersion de l'échantillon durant deux heures au minimum dans une solution de paraformaldéhyde associée au glutaraldéhyde identique à celle précisée pour la préparation précédente, lequel échantillon subit ensuite le même protocole à l'exception de la dernière étape où la dessiccation s'opère par la méthode du point critique utilisant le CO_2 au lieu d'une application de l'HMDS.

L'échantillon est rendu conducteur par métallisation avec du platine par pulvérisation cathodique (la couche déposée présente une épaisseur de l'ordre de 5 à 8 nm). Cette couche favorise l'émission d'électrons secondaires et évite les phénomènes de charges susceptibles d'altérer l'image.

L'échantillon ainsi métallisé est observé avec un microscope à balayage doté d'un canon à émission de champ (Zeiss Gemini 982). Les images sont numérisées en ligne avec une résolution de

1024 X 1024 pixels. La tension d'accélération appliquée pour nos observations est de 15kV et la distance de travail de 16 mm.

9.3. Préparation des échantillons pour le cryo-M.E.B.

Les méthodes chimiques classiques de préparation des échantillons utilisent des substances pouvant induire l'apparition d'artefacts. Pour éliminer cette difficulté, des cryo-méthodes ont été mises au point ; elles sont de plus en plus utilisées dans la cytochimie, les immunomarquages et les microanalyses. Les cryo-méthodes consistent en la solidification de l'eau des cellules, donc en l'arrêt de toutes les réactions biochimiques et en l'immobilisation des composantes cellulaires. Il s'agit donc d'une sorte d'équivalent de la fixation chimique. Les agents de refroidissement utilisés sont soit des gaz liquéfiés, soit des métaux refroidis, qu'on choisit en fonction de leur température et de leur conductivité thermique.

Nous avons utilisé la méthode de l'observation directe au cryo-MEB pour des stalactites et des écoulements mucilagineux. Dans ce cas de l'observation directe, l'échantillon doit subir plusieurs étapes telles que le nettoyage de sa surface, son découpage à des dimensions un peu plus petites que celles du support, l'immersion du porte-objet dans de l'azote à consistance pâteuse (-210°C), la sublimation par un nouveau réchauffement de la platine du microscope jusqu'à -80°C pendant environ 20 min pour sublimer le givre de la surface de l'échantillon et un nouveau refroidissement de la platine jusqu'à -120°C . Enfin, l'échantillon est métallisé pendant 3 min à 25 mA, et l'observation se fait ensuite à 10 kV.

Chapitre 10. Caractéristiques des échantillons en microscopie électronique (MET et MEB-E.D.S.)

10.1. Les stalactites polychromes

Dans les zones de croissance des stalactites polychromes, l'eau de percolation, traversant la voûte de la cavité par de fines fissures, présente une forte concentration en sels dissous (voir chapitre 7). Cette solution, ayant des couleurs qui varient de l'orange au rouge foncé, possède un pH entre 0,5 et 1,5 et une tension superficielle importante. Elle forme ainsi, sur la surface de la voûte de la cavité, un film continu d'environ 0,5 mm d'épaisseur dans lequel se trouvent les bactéries chimiolithotrophes et les champignons microscopiques et qui constitue ainsi un biofilm.

À l'interface air-solution, comme le biofilm est assez stable, car il est alimenté extrêmement lentement avec de l'eau de percolation et la concentration des substances dissoutes est importante, celles-ci précipitent formant une couche continue d'hydroxyde de fer (*Fig.10.1.2. b.*). Cette couche, ou lamine, dont l'épaisseur varie de quelques dizaines à quelques centaines de micromètres, se forme très lentement et présente une structure microstratifiée (*Fig. 10.1.3. a, b*).

Fig. 10.1.2. a. Vue d'ensemble à la loupe binoculaire d'une stalactite polychrome et d'une de ses sections; **b.** Section d'une stalactite polychrome.

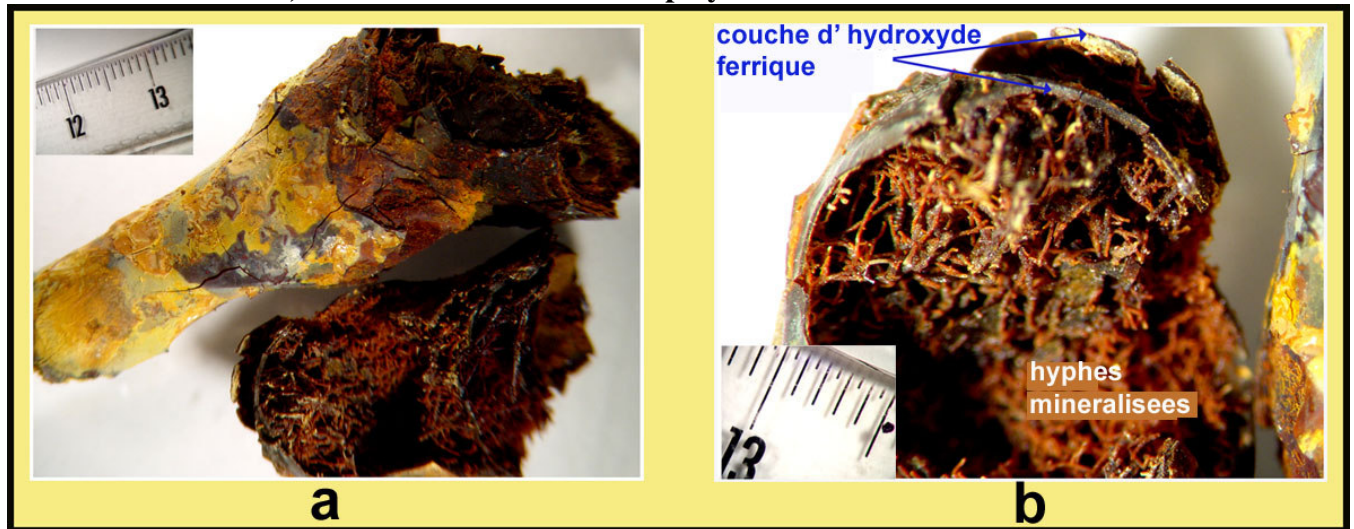
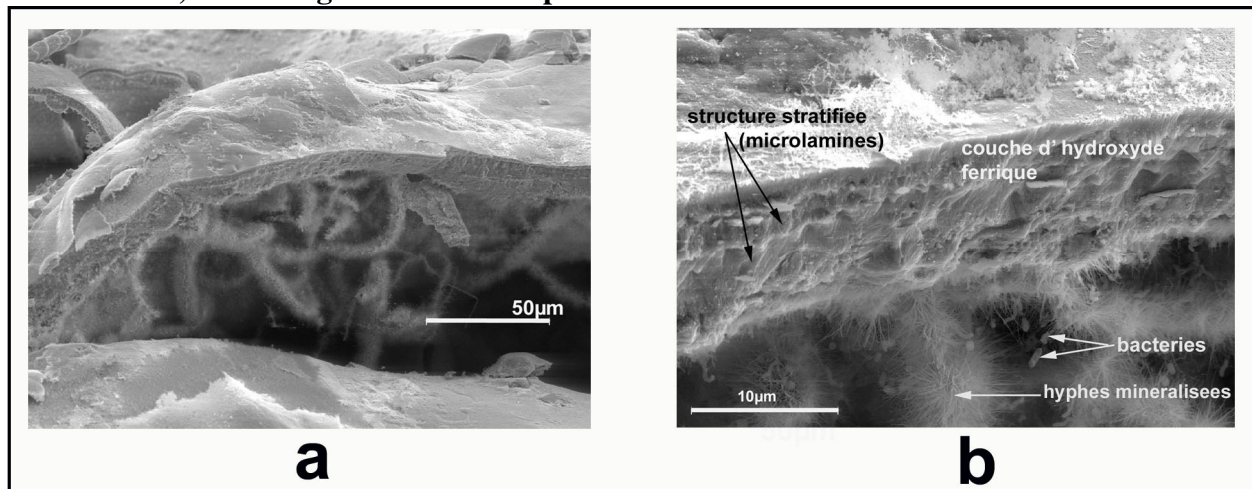


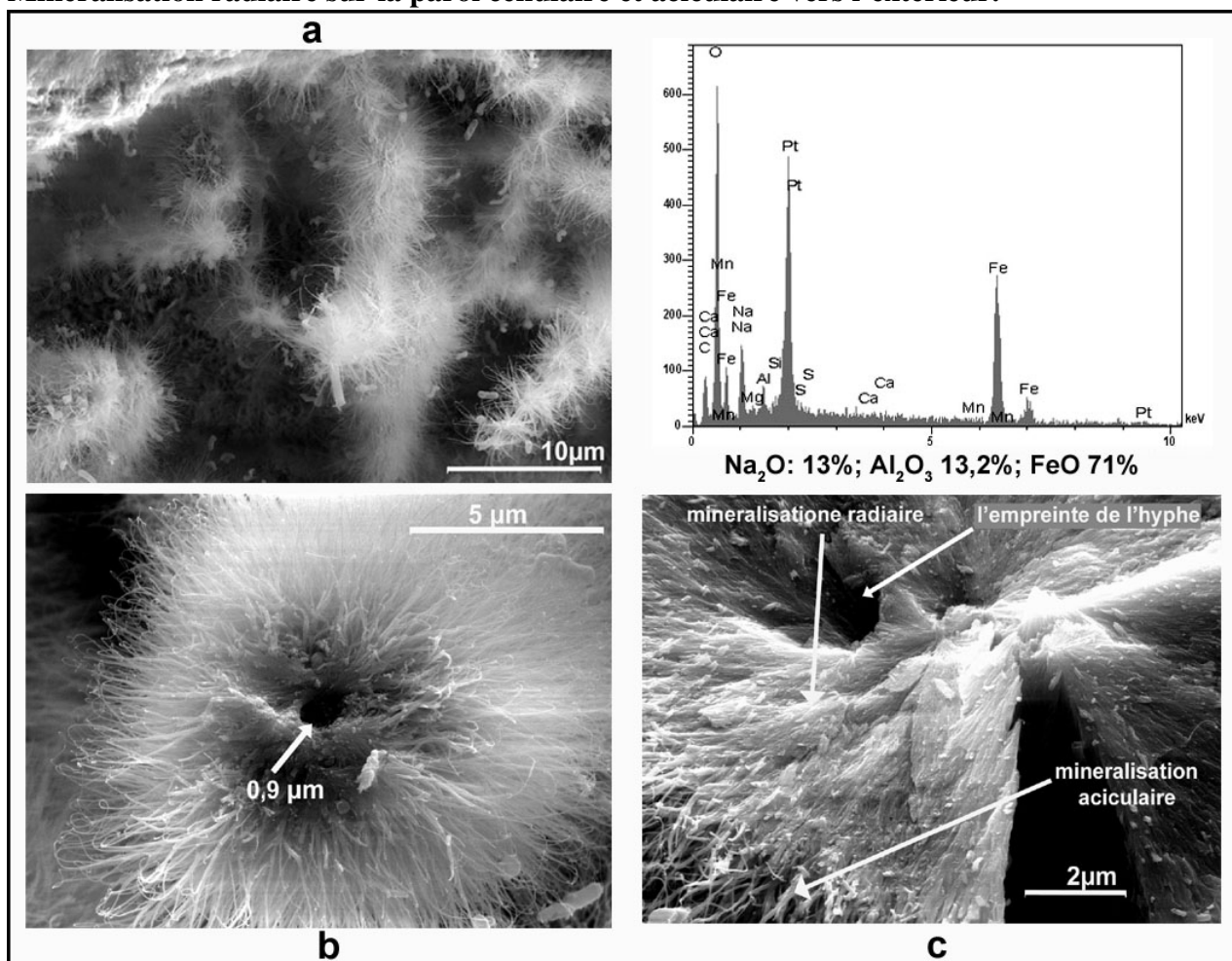
Fig. 10.1.3. a. Vue d'ensemble de la couche d'hydroxyde ferrique et des hyphes minéralisés; **b.** Vue à grossissement supérieur.



Dans la solution de percolation, le Fe^{2+} , provenant de l'oxydation de la pyrite de la roche de la voûte de la cavité (chapitre 11), est oxydé par les nombreuses cellules bactériennes de *A. ferrooxidans*, formant du Fe^{3+} , qui se dépose à l'intérieur du biofilm sous forme d'oxyde de fer. Ainsi, les hyphes de champignons se minéralisent, conférant un aspect fibreux à l'intérieur de la croûte et des stalactites (Fig. 10.1.4.). Pour *A. ferrooxidans* libre dans la solution, les hyphes minéralisés représentent un vrai support (Fig. 10.1.5. a., b.; Fig. 10.1.6.).

La minéralisation des hyphes de Deutéromycètes se réalise à leur extérieur. Sur la paroi cellulaire, la minéralisation est radiaire et, vers l'extérieur, elle prend une forme aciculaire. En M.E.B. les hyphes présentent un aspect duveteux (Fig. 10.1.5. a., b., c.).

Fig. 10.1.5. a., b., Hyphes minéralisées à aspect plumeux (duveteux) et bactéries; c. Minéralisation radiaire sur la paroi cellulaire et aciculaire vers l'extérieur.



La minéralisation aciculaire est très fine, et les aiguilles d'oxyde de fer peuvent être ramifiées, possédant un canal central (80-90 nm) (Fig. 10.1.7. a., b., c., d.). Après la formation de la couche d'hydroxyde de fer, dans la partie superficielle du biofilm, un nouveau biofilm se développe en surface et le processus recommence.

Dans les zones où le biofilm continu de la voûte de la cavité rencontre des irrégularités formant saillie, se forment des gouttes qui subissent la même évolution que celle décrite plus haut, commençant ainsi la formation des stalactites polychromes (chapitre 11) (Fig. 10.1.8. a., b.). À l'intérieur des gouttes des pointes de ces stalactites existe un consortium vivant, formé de cellules de *A. ferrooxidans* et des hyphes de Deutéromycètes (Fig. 10.1.11.; Fig. 10.1.12.) entre lesquelles

existent des liens métaboliques étroits (*Fig. 10.1.10.*). La minéralisation de ces hyphes s'opère à la base de la goutte (vers la stalactite) au contact avec les hyphes minéralisées plus anciennes, processus permettant l'accroissement des stalactites.

Fig. 10.1.7. a. Vue d'ensemble d'une hyphe à minéralisations aciculaires d'hydroxyde ferrique; b., d. Mineralisation aciculaire ramifiée; c. Aiguilles d'hydroxyde ferrique en section transversale (canal central visible).

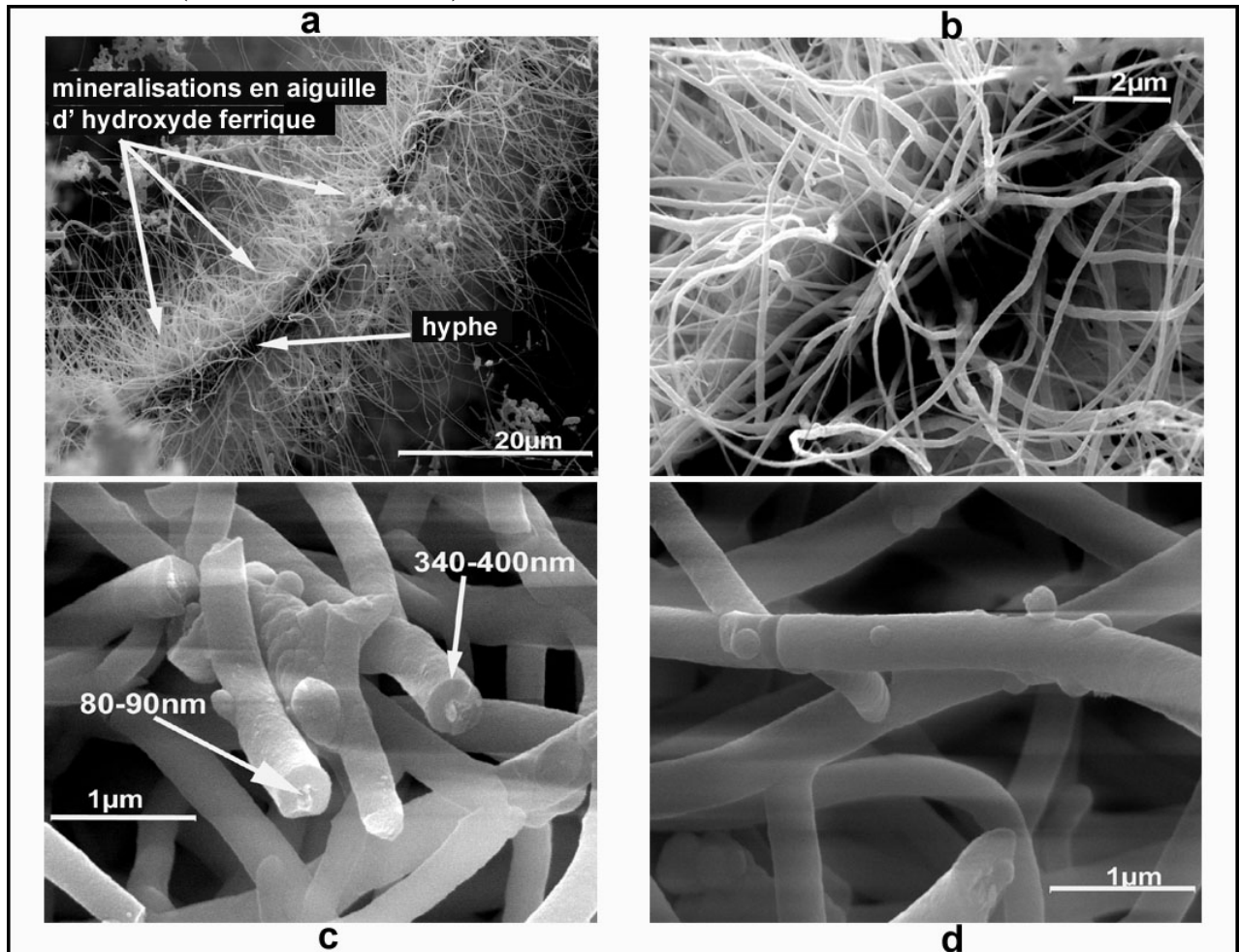


Fig.10.1.10. a. Vue d'ensemble d'hyphes qui ne sont pas minéralisées, ramifiées; b., c., d. Hyphes à prolongements hyphaux irréguliers en contact avec des bactéries (différents grossissements); e., f. Hyphes à prolongements courts et bactéries.

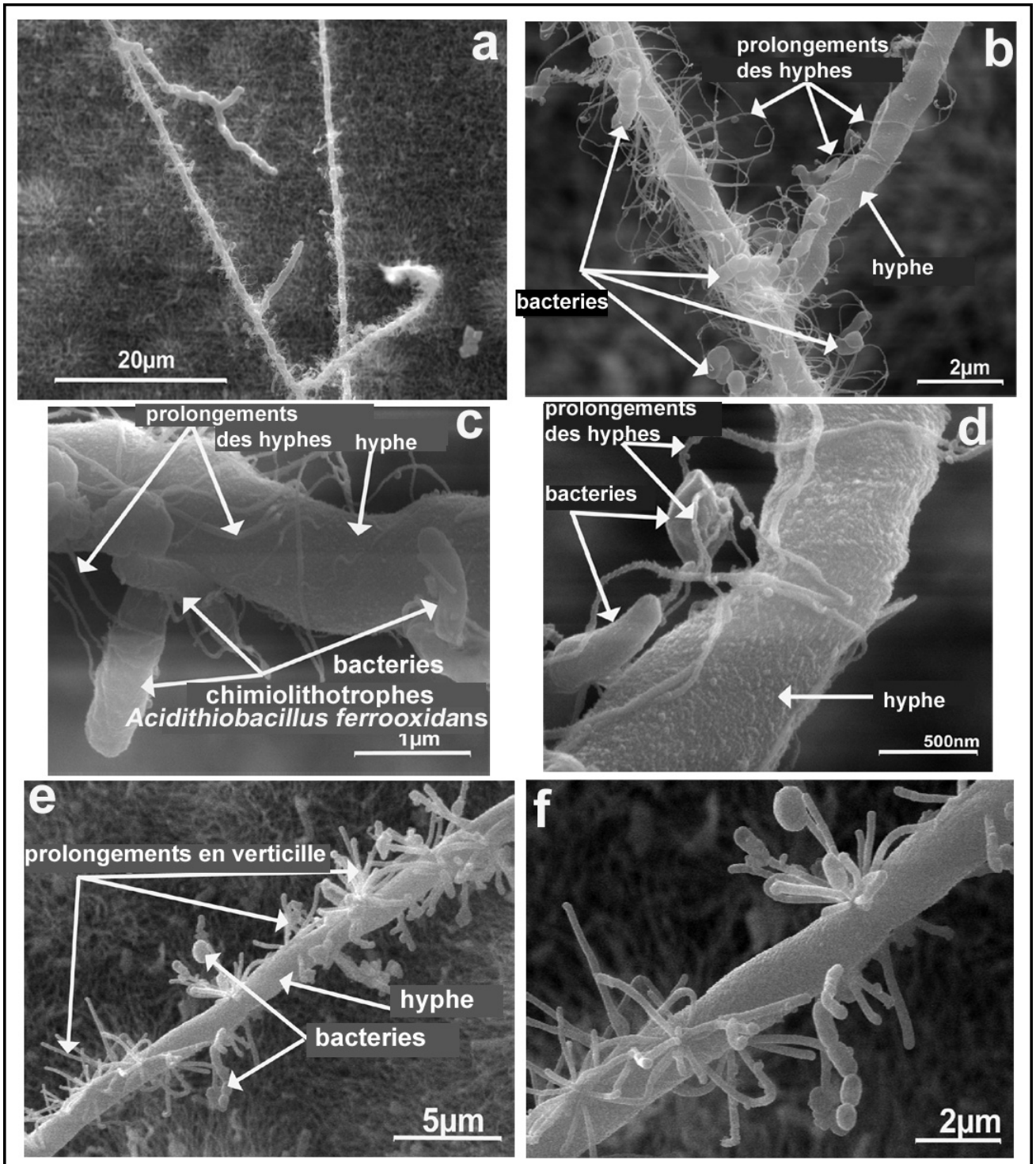
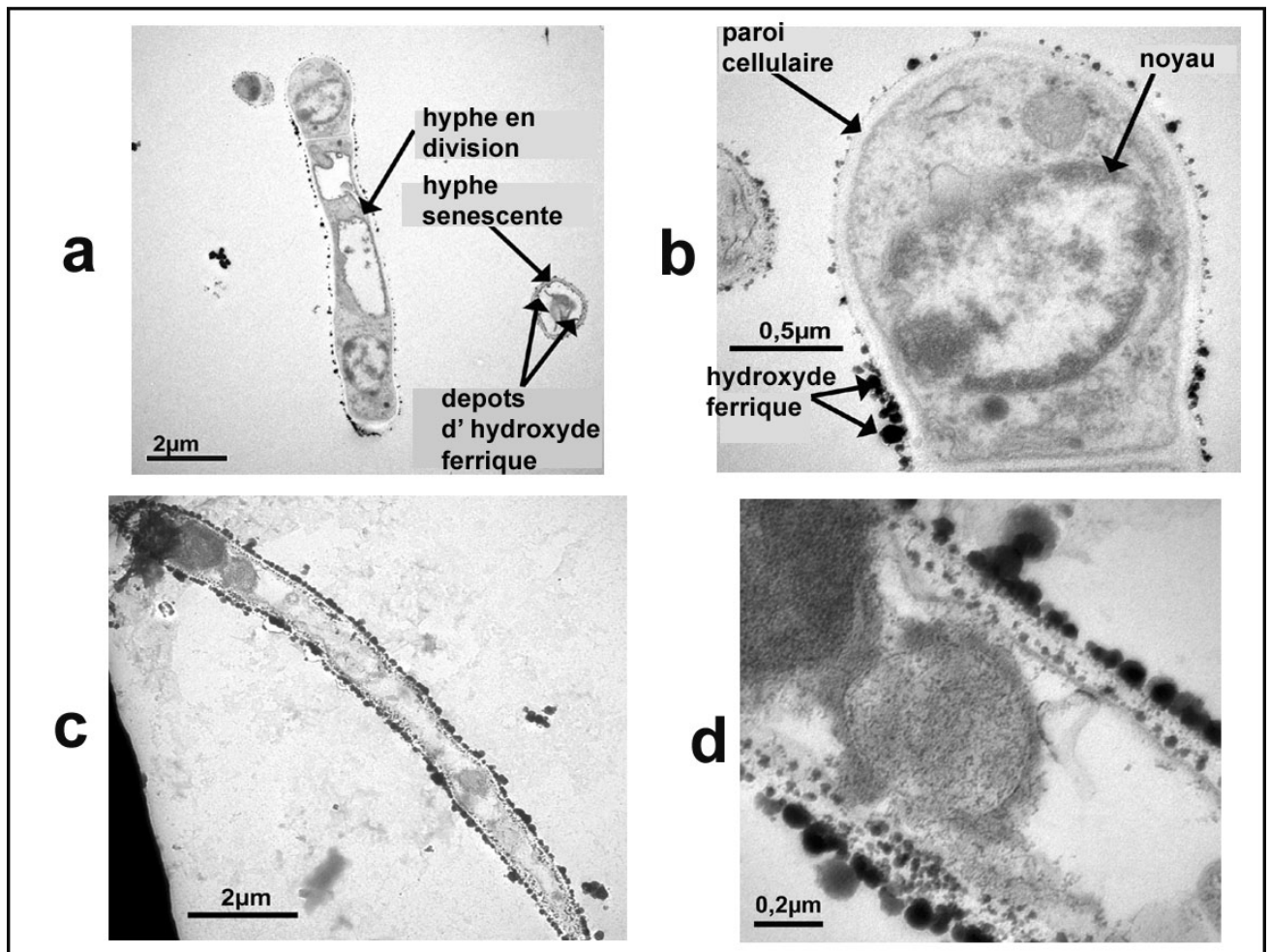


Fig. 10.1.12. a. Hyphe en division. Section transversale d'une hyphe sénescente à minéralisations aciculaires d'oxyde de fer vers l'intérieur; b. Hyphe en division à minéralisations d'hydroxyde ferrique sur la paroi cellulaire (différents grossissements).



10.2. Stalactites, écoulements pariétaux et planchers mucilagineux

Les formations mucilagineuses représentent des consortiums de micro-organismes chimiolithotrophes et hétérotrophes très bien soudés dans une masse compacte de mucopolysaccharides extracellulaires. Dans cette matrice de mucopolysaccharides se dépose l'oxyde de fer provenant de l'oxydation du Fe^{2+} par les bactéries chimiolithotrophes (voir chapitre 11).

Le substrat fournisseur d'énergie de ces consortiums de micro-organismes est la pyrite (voir chapitre 11), qui se trouve en grande quantité dans le gisement et, par conséquent, est présente sur les parois et la voûte de la cavité (Fig. 10.2.2.; Fig. 10.2.3. b.). Les cristaux de pyrite sont colonisés par des acidithiobacilles dont les biofilms tapissent leur surface. Ces biofilms, constitués des cellules bactériennes entourées de mucopolysaccharides très compacts, couvrent entièrement les cristaux, formant ainsi un milieu favorable aux réactions d'oxydation à leur surface. Sur la surface des cristaux de pyrite, les bactéries chimiolithotrophes agissent surtout au niveau des irrégularités présentées par les cristaux (Fig. 10.2.4. a., b.).

Fig. 10.2.2. Vue d'ensemble d'un cristal de pyrite couvert d'un biofilm compact. Spectre E.D.S. sur le cristal de pyrite.

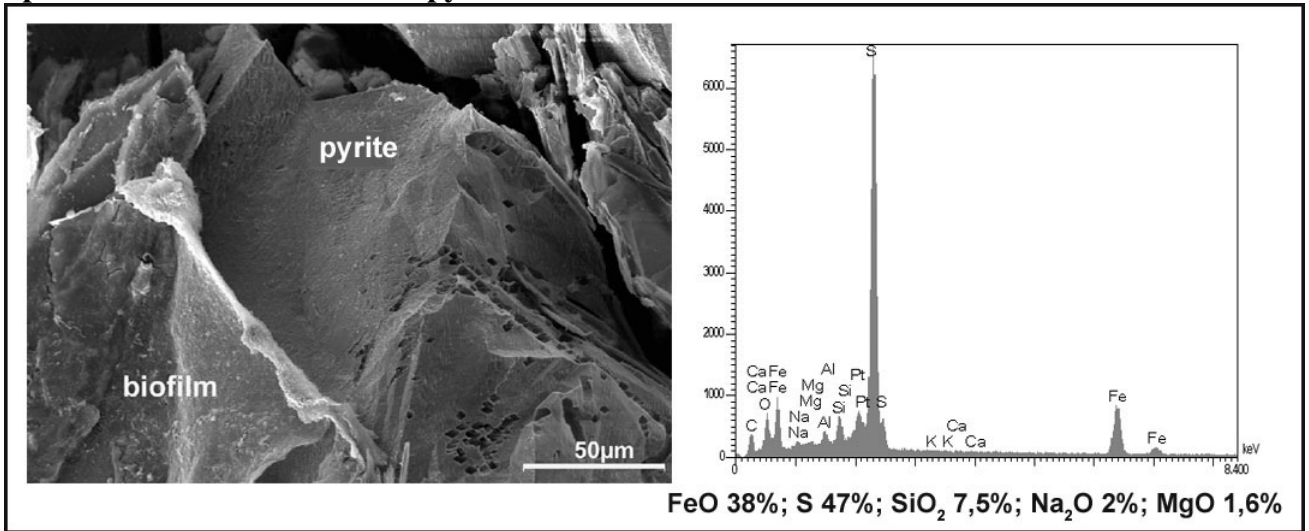
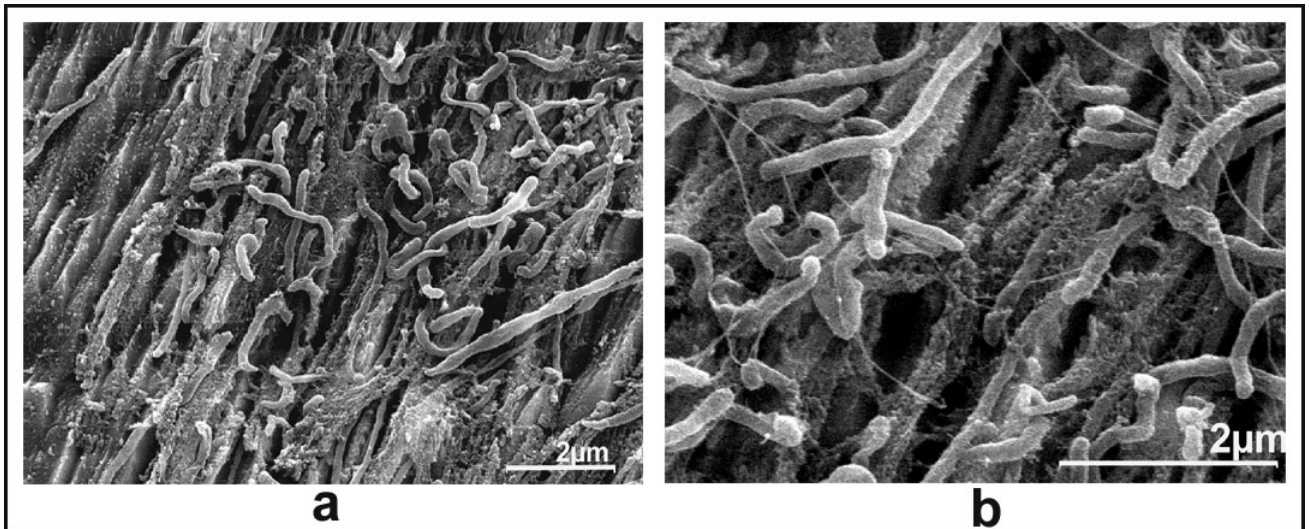


Fig. 10.2.4. a. Biofilm distendu à la surface des cristaux de pyrite; b. Détail à bactéries chimiolithotrophes adhérant intimement aux irrégularités du cristal de pyrite.



L'oxydation du Fe^{2+} de la surface des cristaux de pyrite (source d'énergie des chimiolithotrophes), libère le fer ferrique qui se dépose passivement et activement dans les biofilms de micro-organismes sous forme d'oxyde de fer (*Fig. 10.2.5.*). Dans le cas des stalactites, ce dépôt se réalise de la base vers la pointe et du centre vers les bords et, dans le cas des écoulements depuis bords vers la zone centrale (*Fig. 10.2.1. a., b.*). À l'extérieur de la zone minéralisée ou en cours de minéralisation, il existe en permanence un biofilm bactérien très compact, formant une véritable couverture, et à l'intérieur de cette zone les mucopolysaccharides ont un aspect effiloché (*Fig. 10.2.6. a., b., c., d.; Fig. 10.2.7. a., b.*).

Fig. 10.2.5. Minéralisations d'hydroxyde ferrique à biofilm extérieur à la base de la stalactite mucilagineuse (différents grossissements). Spectre E.D.S.

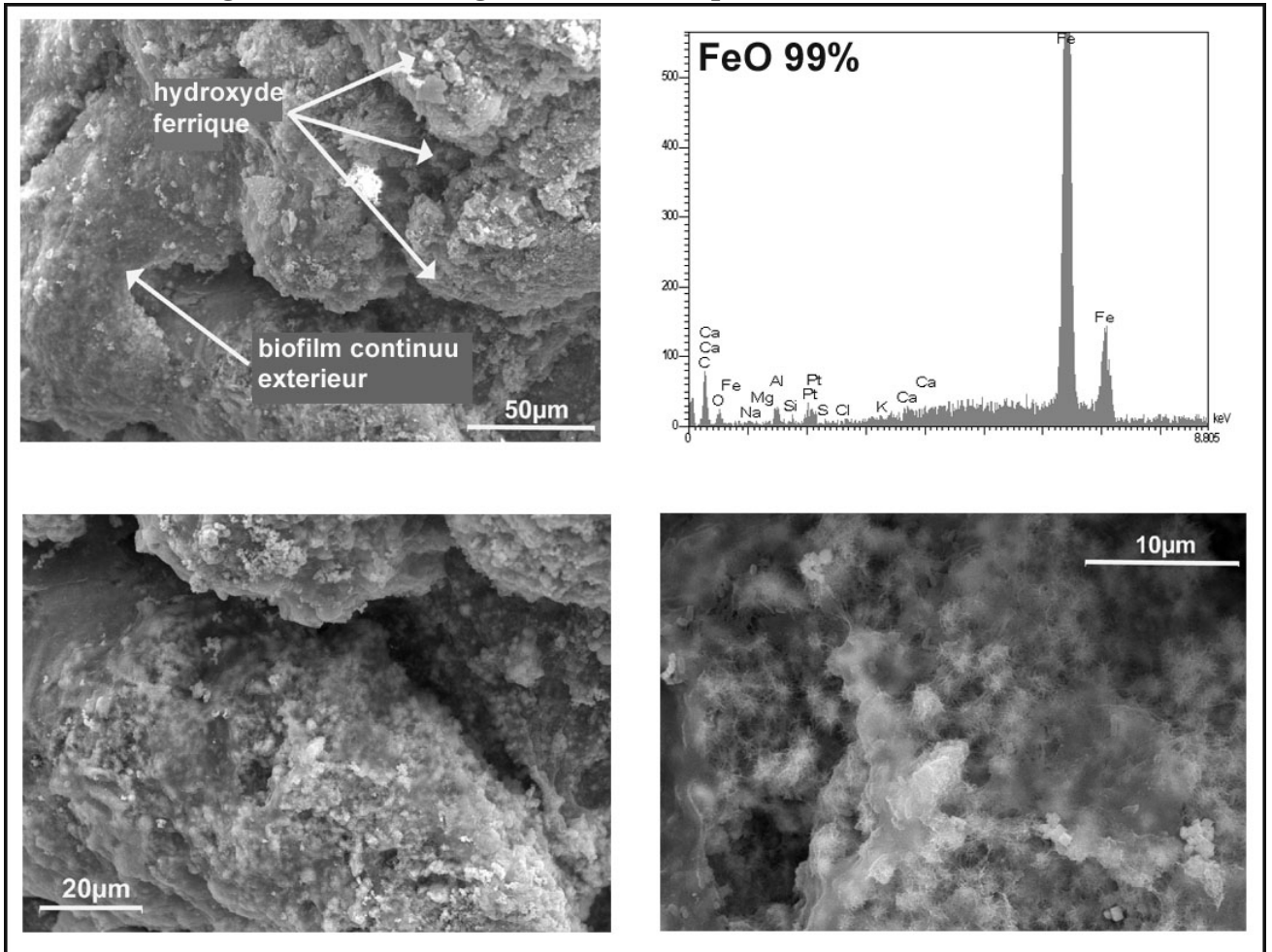
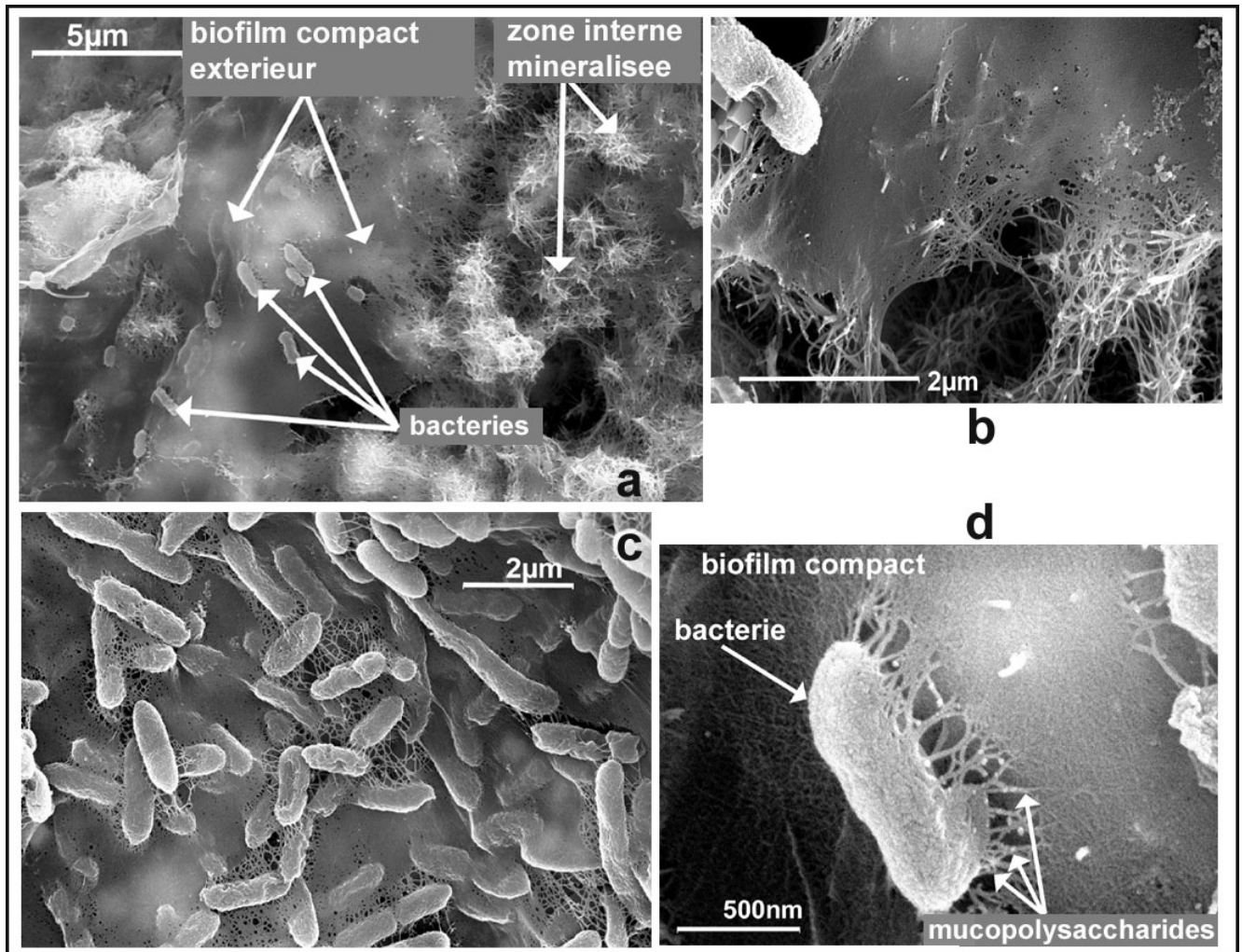


Fig. 10.2.6. a., b. Mucopolysaccharides minéralisées intérieures; c. Biofilm bactérien compact; d. Bactérie du biofilm.



Dans les coupes ultrafines pratiquées à la base des stalactites mucilagineuses on observe un grand nombre de micro-organismes vivants, entourés de fins cristaux aciculaires d'oxyde de fer disposés à l'extérieur de la cellule (Fig. 10.2.8. a., b., c., d., et Fig. 10.2.9. a., b., c., d.). Dans le cas des cellules sénescents, on observe une importante minéralisation à l'intérieur de la cellule, laquelle subit alors une importante déformation (Fig. 10.2.10. a., b., c., d.).

Fig. 10.2.9. a., c. Micro-organisme à cristaux aciculaires d'hydroxyde ferrique extérieur; b., d. Détail de la périphérie extérieure cellulaire à cristaux d'hydroxyde ferrique.

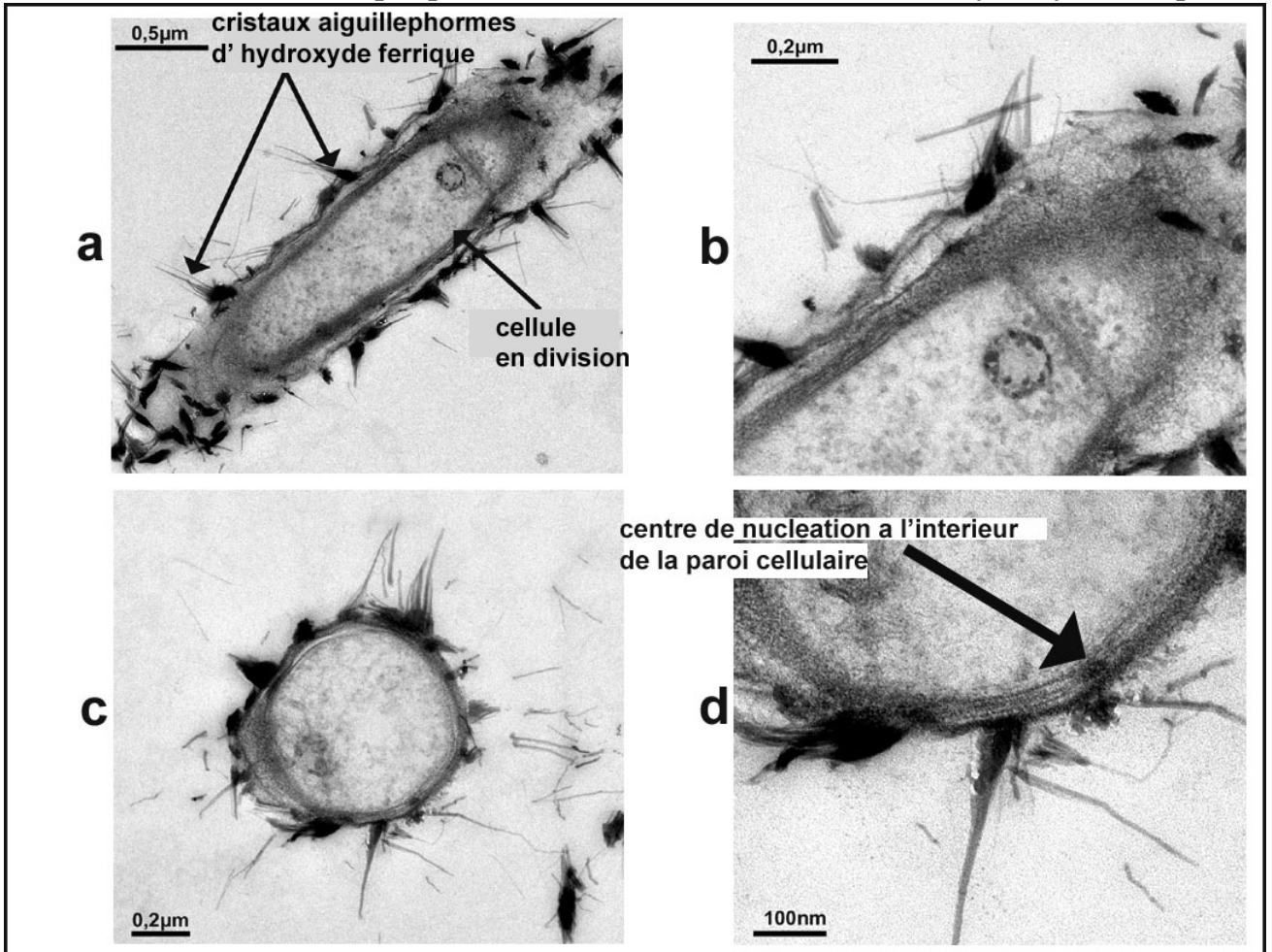
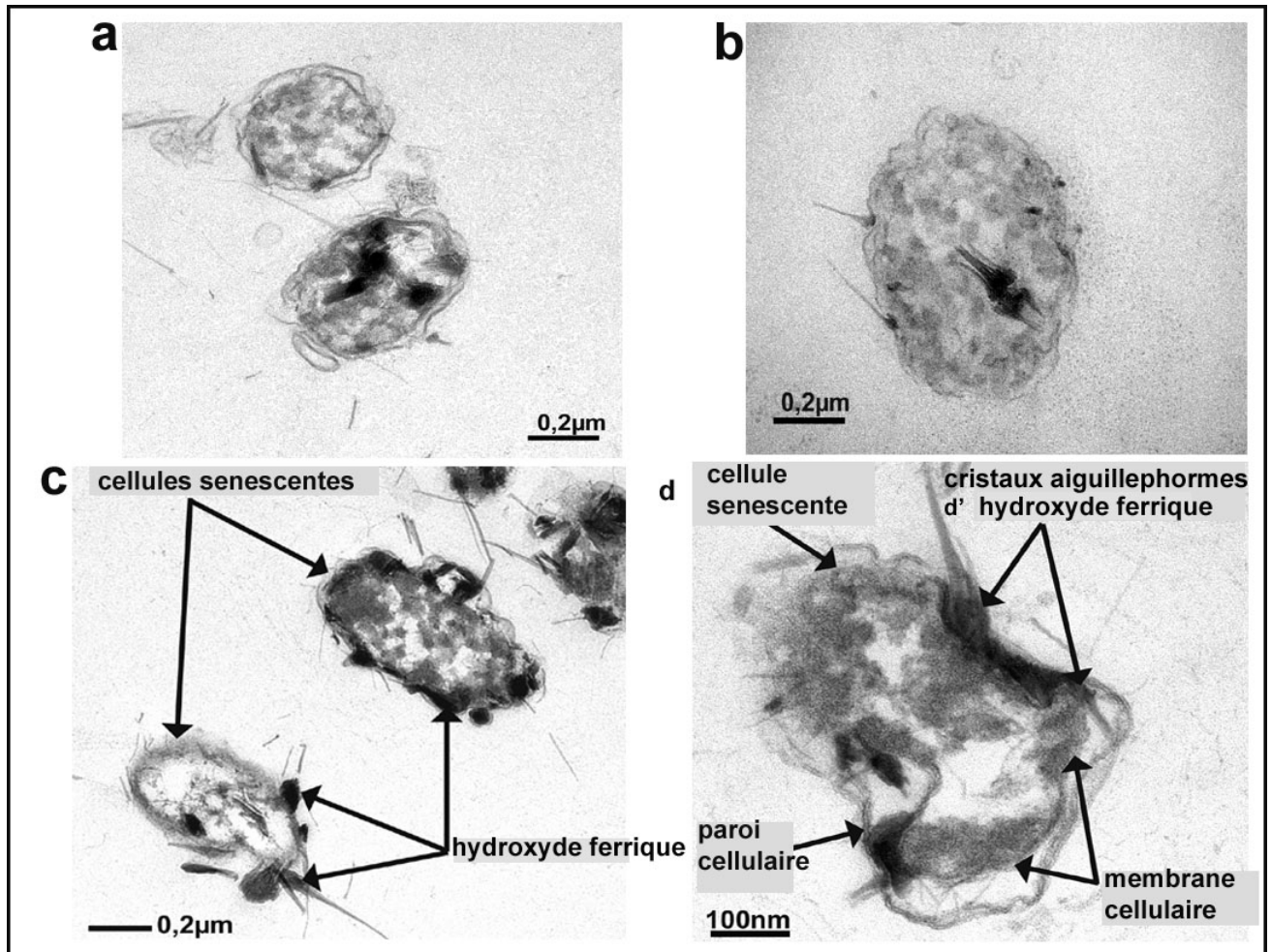


Fig. 10.2.10. a., b., c. Cellules sénescents à cristaux d'hydroxyde ferrique intérieur; d. Détail d'une cellule sénescence.



Les zones centrales des formations mucilagineuses, présentent de fréquentes micro-colonies globulaires (souvent observées en M.E.B. ainsi qu'en M.E.T. Elles sont formées par des dizaines de cellules bactériennes entourées d'une masse compacte de mucopolysaccharides, qui se minéralisent progressivement (*Fig. 10.2.11. a., b., c., d.*). Ici se forment de fins cristaux aciculaires d'oxyde de fer, ayant ce même aspect effiloché précédemment évoqué (*Fig. 10.2.12. a., b., c., d., e., f.*). Dans les zones complètement minéralisées on observe des orifices correspondant aux anciennes cellules ou aux anciennes micro-colonies globulaires bactériennes, qui se sont désorganisées (*Fig. 10.2.12. f.; Fig. 10.2.13. a., b., c., d.*).

Fig 10.2.11. a., b. Microcolonies bactériennes globulaires; c., d. Microcolonies bactériennes globulaires – détail.

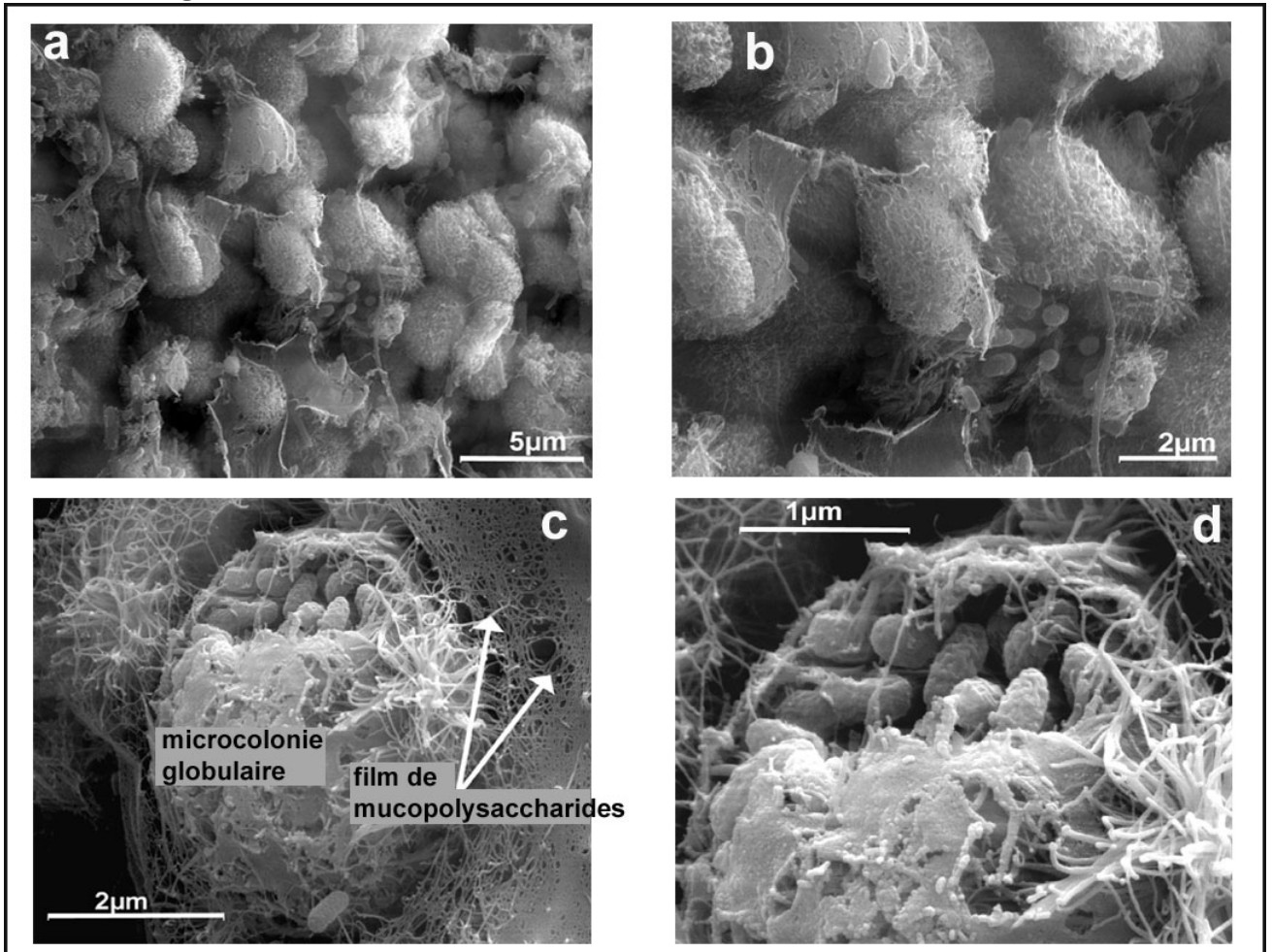
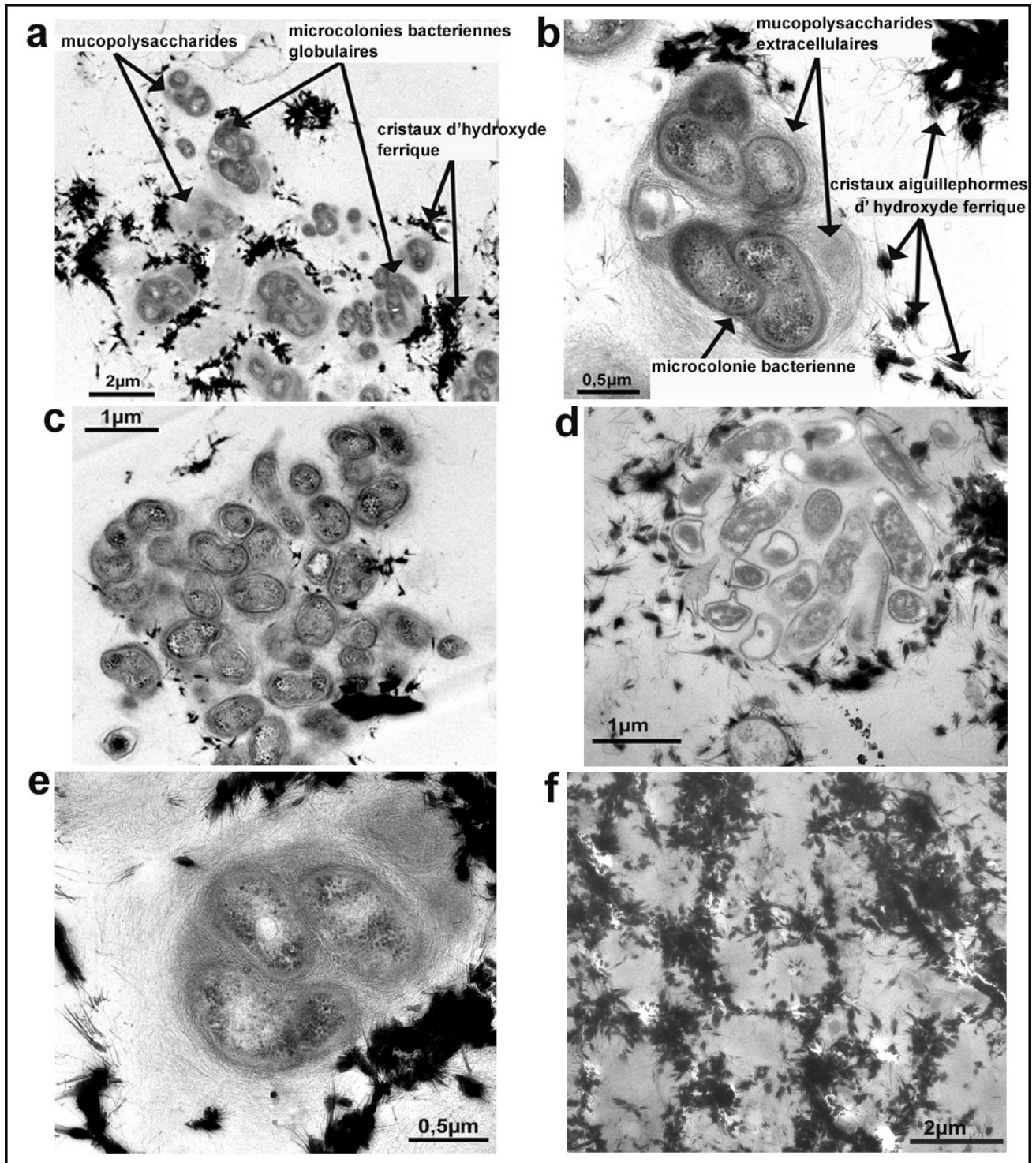


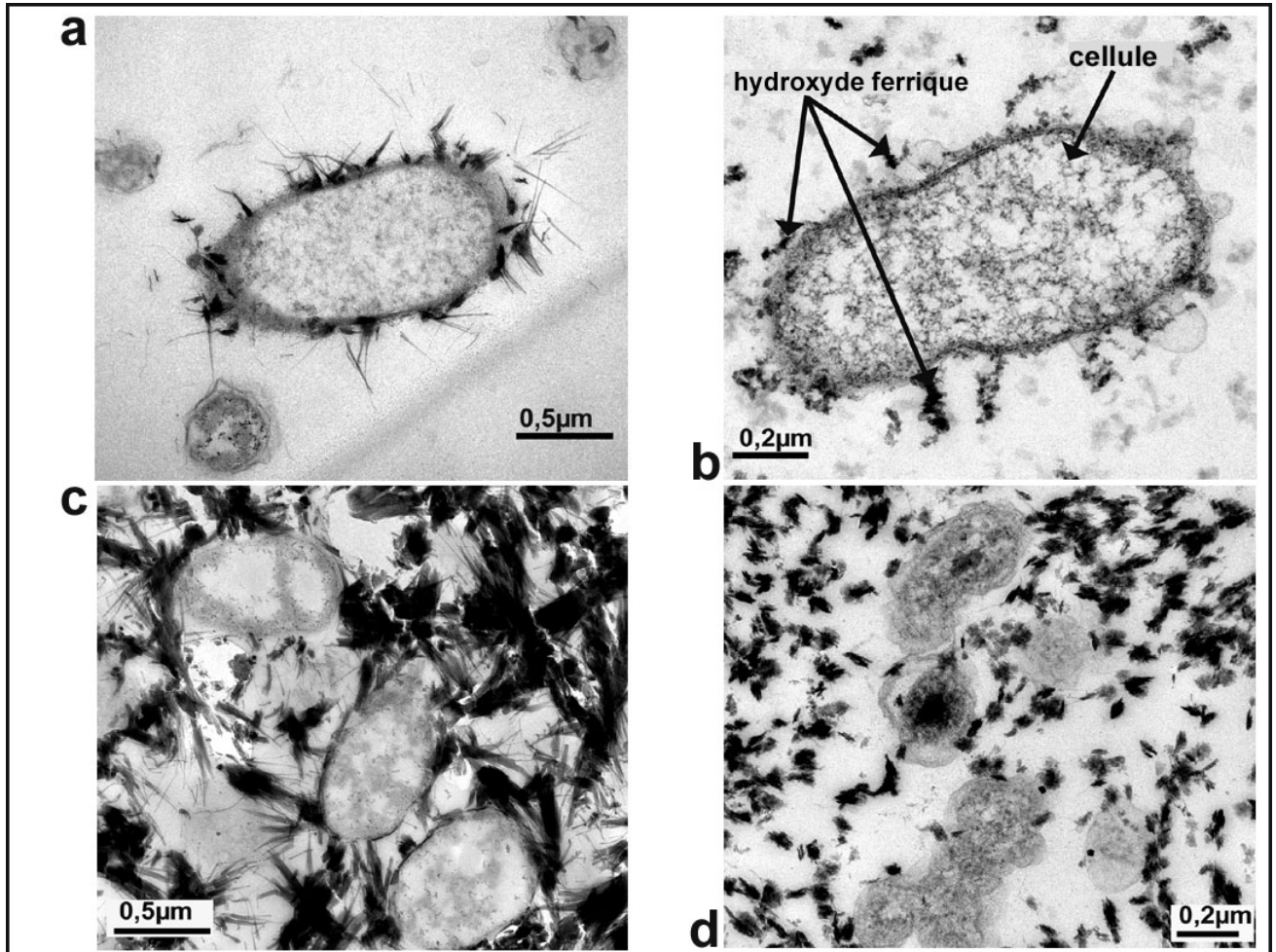
Fig 10.2.12. a., b., c., d., e. Microcolonies bactériennes globulaires entourées d'hydroxyde ferrique; f. Zone à microcolonies bactériennes globulaires complètement minéralisée.



En M.E.T. on observe une nette différence dans l'habitus des cristaux d'oxyde de fer dans les biofilms microbiens : ils sont aciculaires au niveau des stalactites mucilagineuses, (Fig. 10.2.8.; Fig. 10.2.9.; Fig.10.2.10.; Fig. 10.2.12.; Fig. 10.2.14. a., c.), et sont fusiformes ou irréguliers dans

les écoulements mucilagineux pariétaux et de plancher (*Fig. 10.2.14. b., d.; Fig. 10.2.15. a., b., c., d.*).

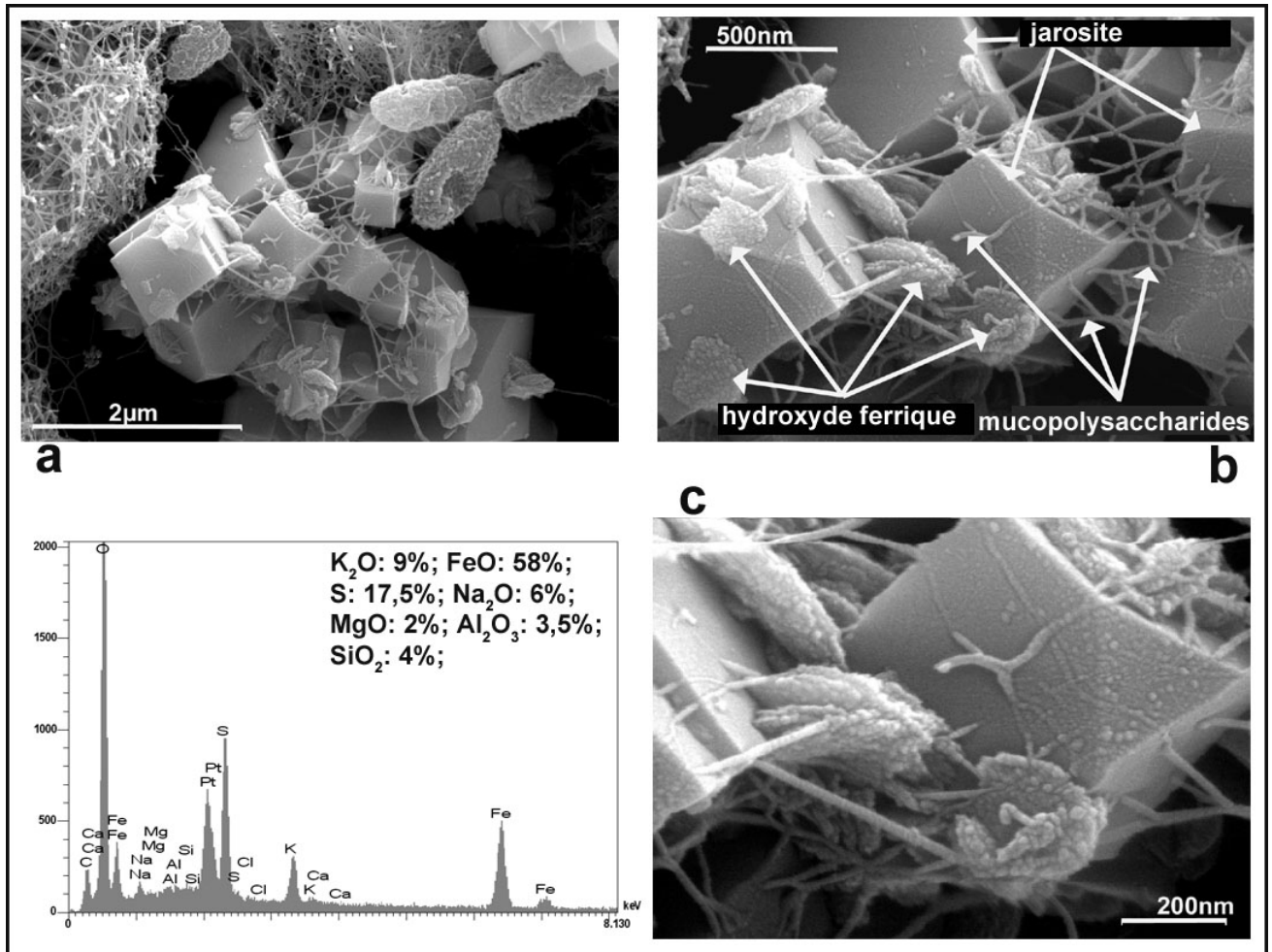
Fig. 10.2.14. a., c. Stalactites mucilagineuses : micro-organismes entourés de cristaux aciculaires d'hydroxyde ferrique; b., d. Écoulements mucilagineux de plancher : micro-organismes entourés de petits cristaux de forme irrégulière.



Le Fe^{3+} qui provient de l'oxydation bactérienne du Fe^{2+} de la pyrite, en dehors du fait qu'il peut se déposer sous forme d'oxy-hydroxyde, peut provoquer l'oxydation de la pyrite résiduelle. De cette réaction il résulte du Fe^{2+} et du SO_4^{2-} . En présence du sulfate et d'autres ions (K^+), l'hydroxyde ferrique se transforme en jarosite plus insoluble (chapitre 11), que nous avons identifiée (EDS et DRX) surtout dans les zones en cours de minéralisation.

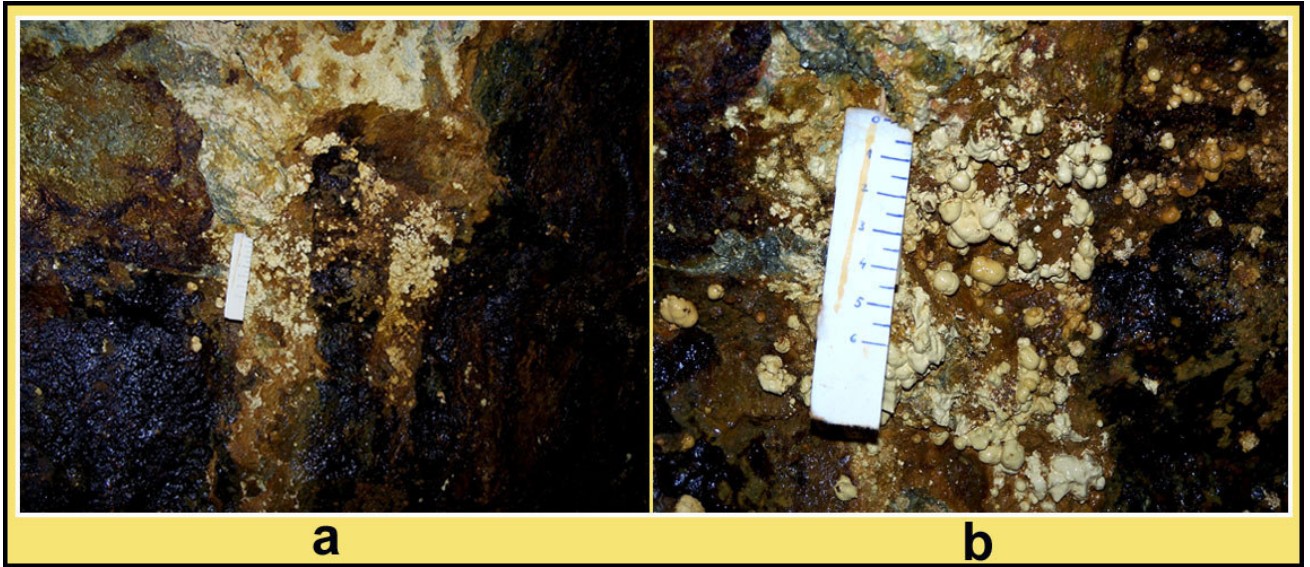
La jarosite (potassique) cristallise dans le système trigonal-pyramidal (*Fig. 10.2.17. a., b., c.; Fig. 10.2.18. a., b., c., d.*). Elle est présente à la fois dans les stalactites et dans les écoulements de plancher et pariétaux.

Fig. 10.2.17. a. Groupe de cristaux de jarosite et bactéries; b., c. Cristaux de jarosite associés aux polysaccharides et à des hydroxydes ferriques. Spectre E.D.S. sur le cristal de jarosite.



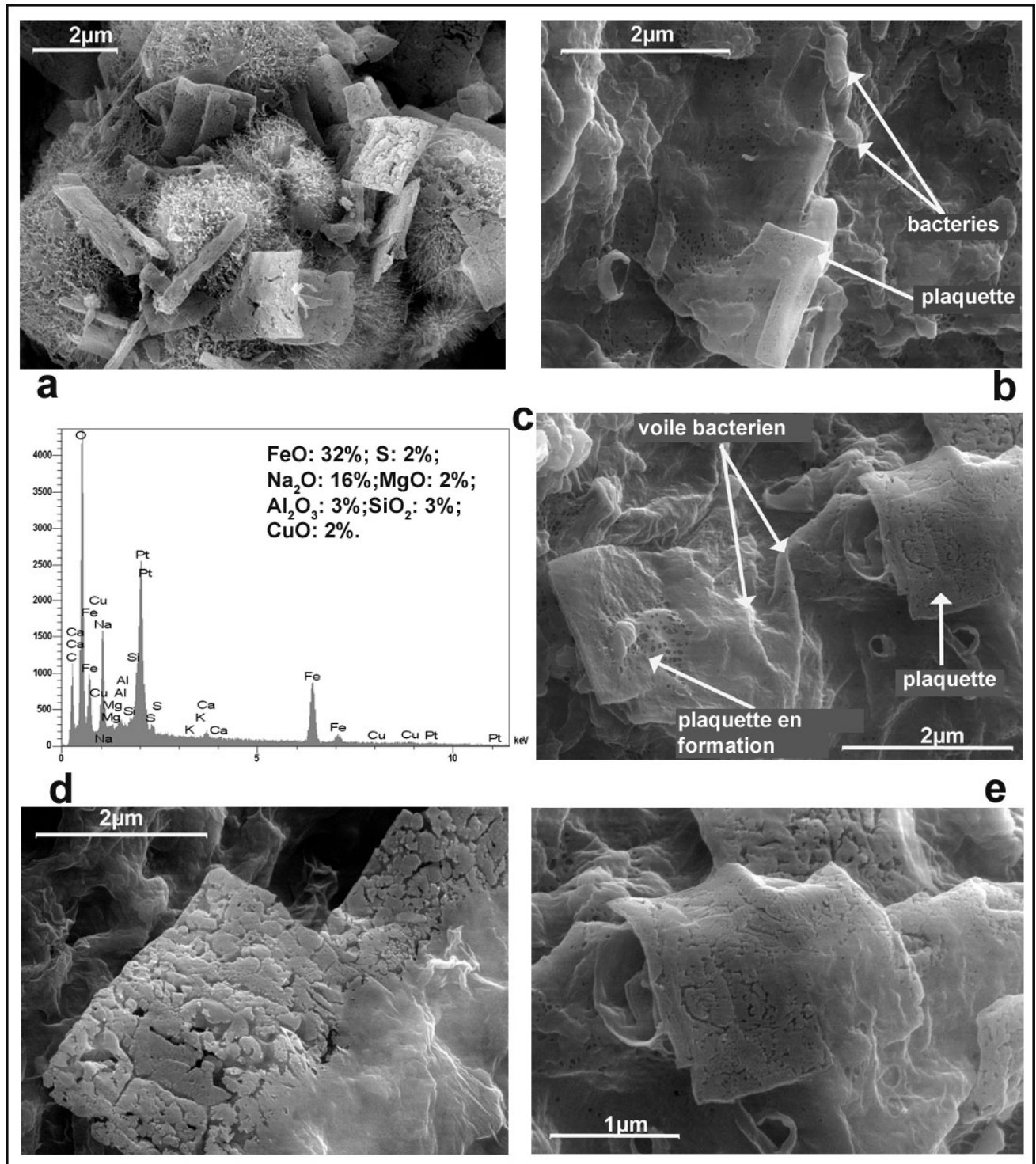
La jarosite a été identifiée en grandes quantités aussi dans la Salle 2, près de la niche aux formations mucilagineuses. Ici, elle constitue un dépôt blanc-jaunâtre, sous forme de demi-sphères de 0,2-0,8 cm de diamètre, avec un développement pulvérulent sur la paroi, ceci sur une surface d'environ 1 m² (Fig. 10.2.19 a., b.). Dans la masse de cristaux on observe des mucopolysaccharides et des cellules bactériennes (Fig. 10.2.20. a., b.).

Fig. 10.2.19. Dépôt de jarosite sur la paroi de la Salle 2.. a. Ensemble du dépôt de jarosite; b. Détail.



Une autre formation minérale sous forme de plaquettes carrées est rencontrée dans le cas des écoulements mucilagineux de plancher et elle se forme à partir du film compact de mucopolysaccharides bactériens (*Fig. 10.2.21. a., b., c., d., e.*). Les spectres E.D.S. réalisés sur ces plaquettes montrent en quantité Fe, Na, C et O ; les autres éléments s'y trouvent de manière accessoire. En conclusion, cette composition se rapprocherait de celle d'un carbonate.

Fig. 10.2.21. a. Ensemble de plaquettes et de mucopolysaccharides; b., c., d. Détail de palquette en formation (différents grossissements).



Par ailleurs, dans l'une des stalactites mucilagineuses, des formes singulières ont pu être observées. Il s'agit de sortes de vermicules identifiés d'abord sous la loupe par leur éclat métallique. Du point de vue structurel ce type de formation semble constitué de sous-unités sous forme de plis, qui représentent en fait un biofilm compact momifié (Fig. 10.2.22. a., b.; Fig. 10.2.25. a., b.), par la précipitation de matière minérale. Le biofilm présente des plis transversaux, ainsi que des plis

longitudinaux (Fig. 10.2.24. a., b.). Ce vermicule minéralisé est recouvert par un biofilm compact (Fig. 10.2.23. a., b.), (Fig. 10.2.26.).

Fig 10.2.22. a., b. Ensemble du vermicule (différents grossissements).

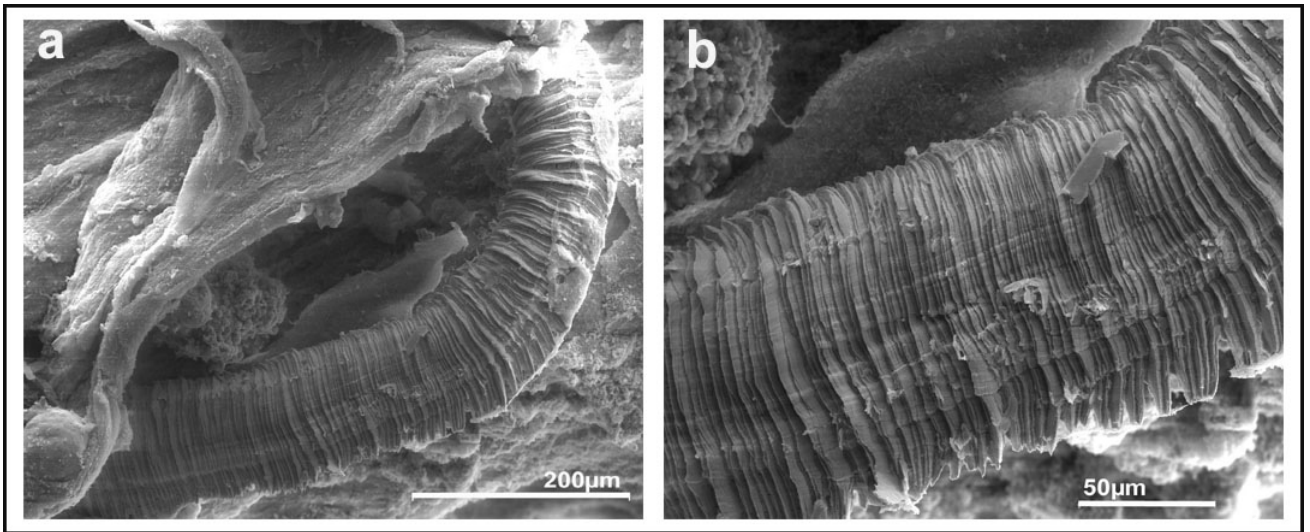


Fig. 10.2.24. a. Grands plis dans la structure du vermicule; b. Grands plis et microplis. Composition chimique (spectre E.D.S.).

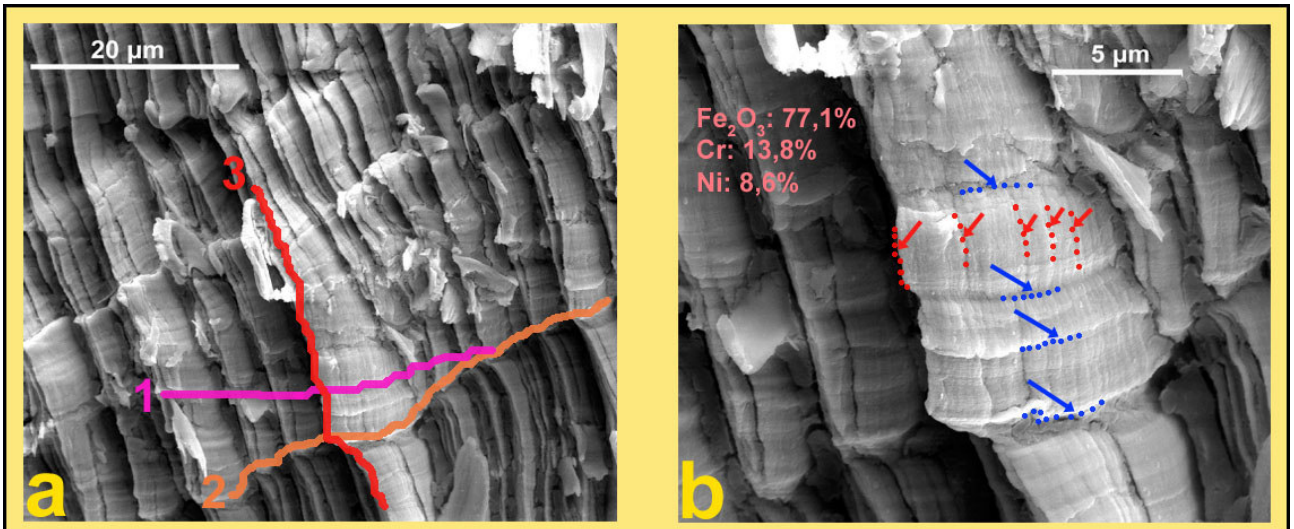
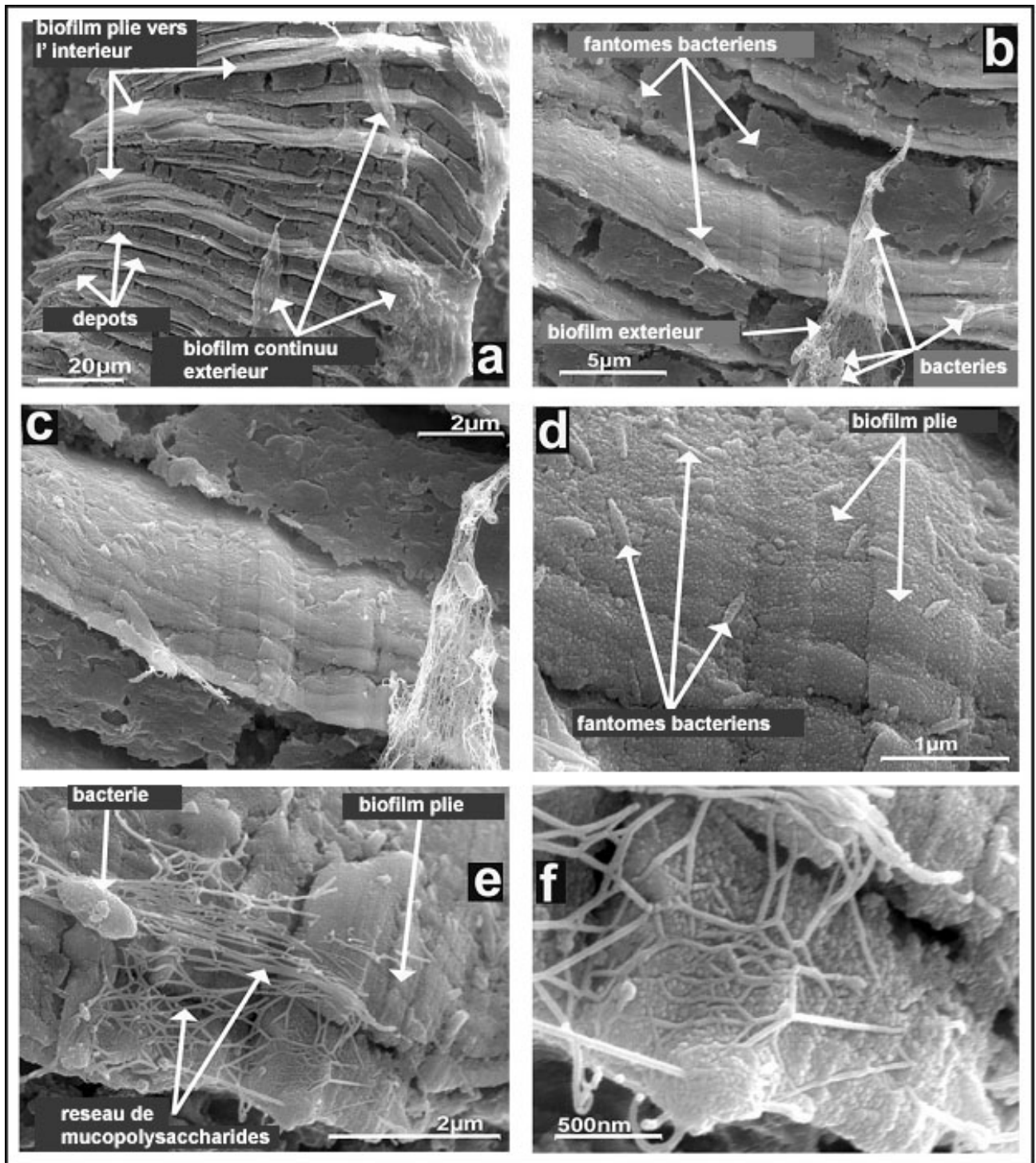
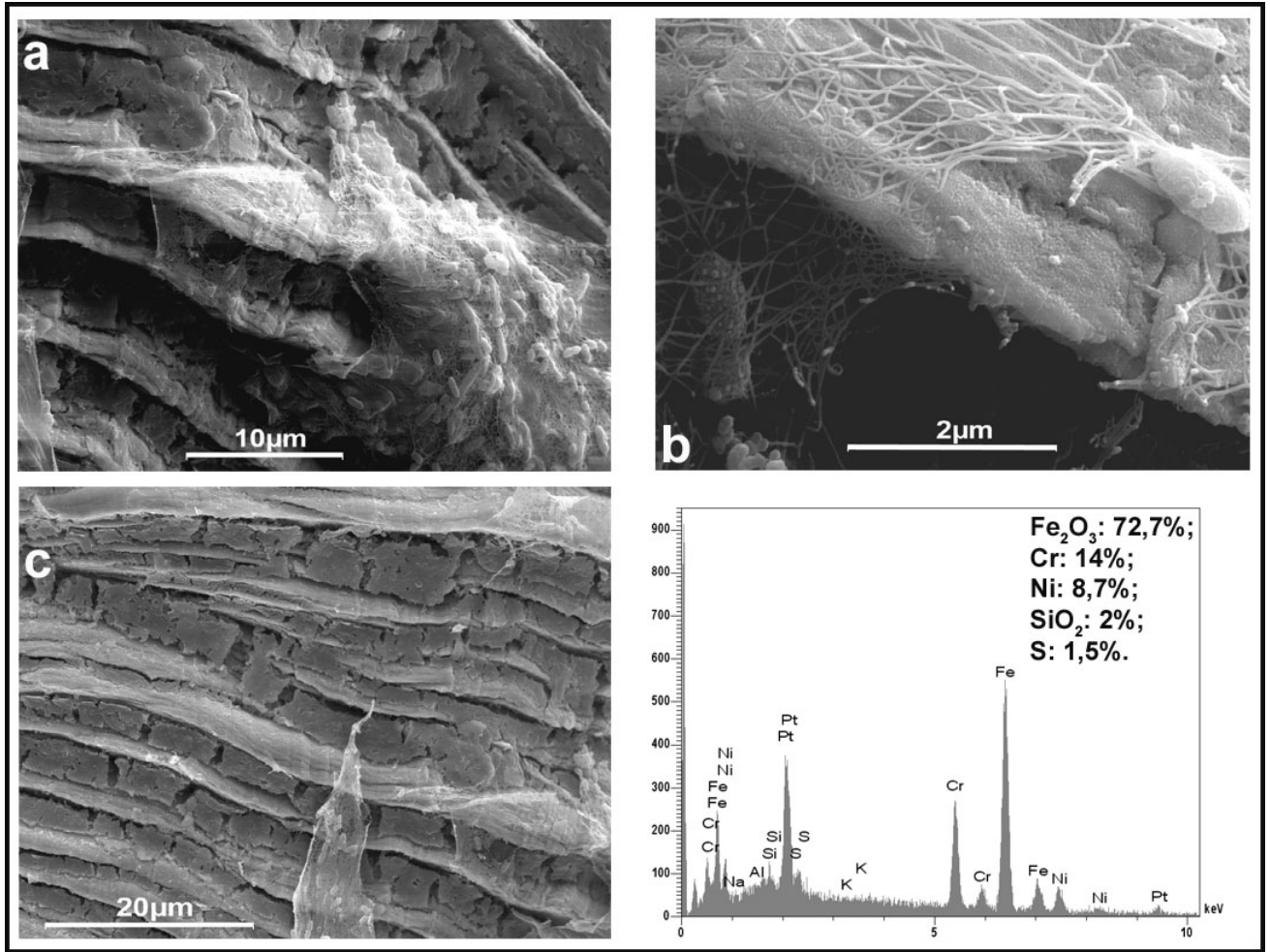


Fig. 10.2.26. a. Ensemble de structure – vermicule; b. Détail de structure; c. Pli de biofilm momifié et dépôts minéraux; d. Détail du pli de biofilm et cellules bactériennes momifiées; e., f. Mucopolysaccharides bactériennes dans le biofilm extérieur.



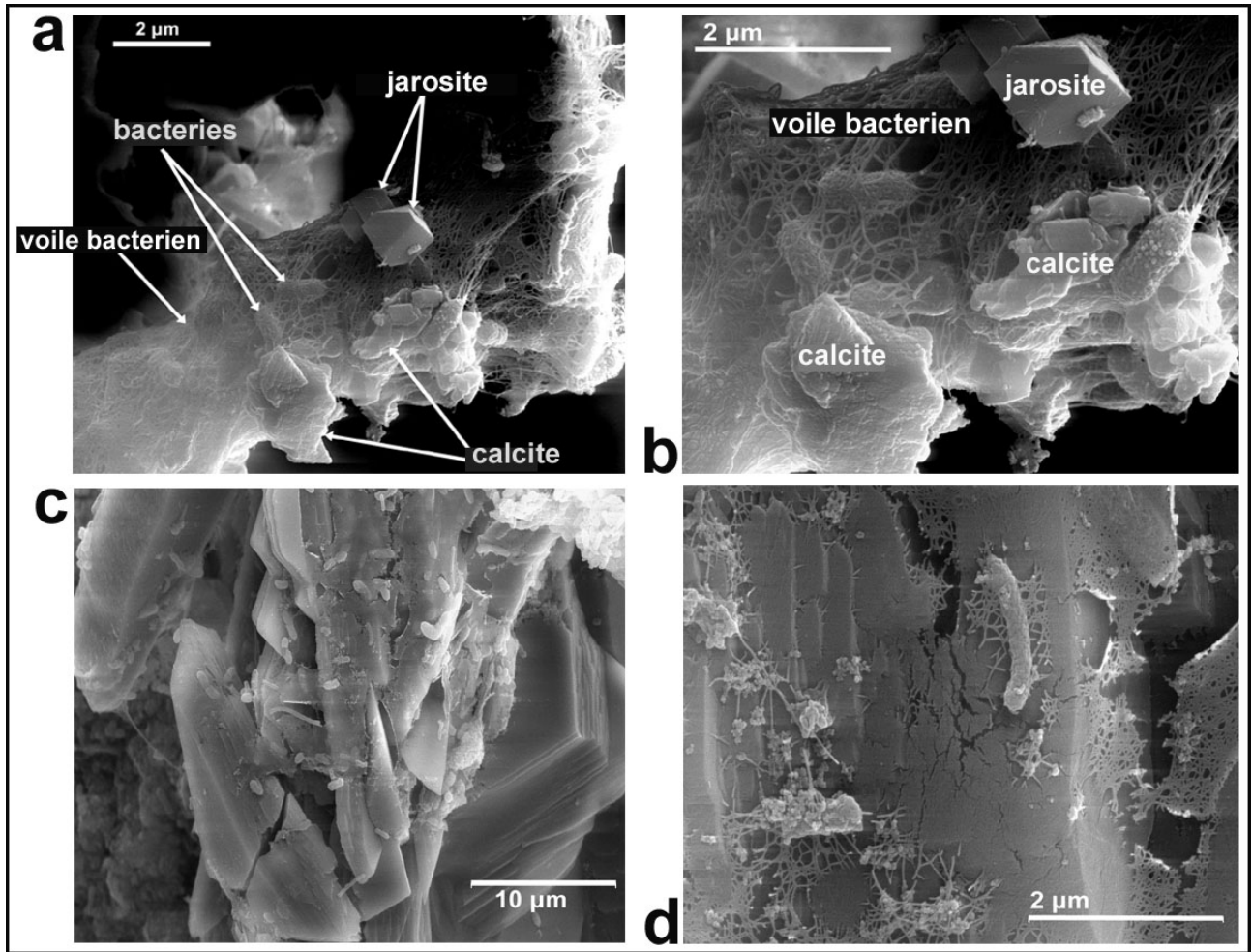
Les analyses E.D.S. ont indiqué une composition chimique très particulière, ce type de vermicule qui correspond à un consortium microbien fossilisé, est en effet caractérisé par environ 70 % de Fe, 9 % de Ni et 15 % de Cr (Fig. 10.2.27. c.). Le minéral constitutif n'a pas été identifié.

Fig. 10.2.27. a. Biofilm extérieur et le pli interne; b. Bactérie et mucopolysaccharides extracellulaires; c. Ensemble de la structure de la formation vermiculaire; Spectre E.D.S. de cette structure.



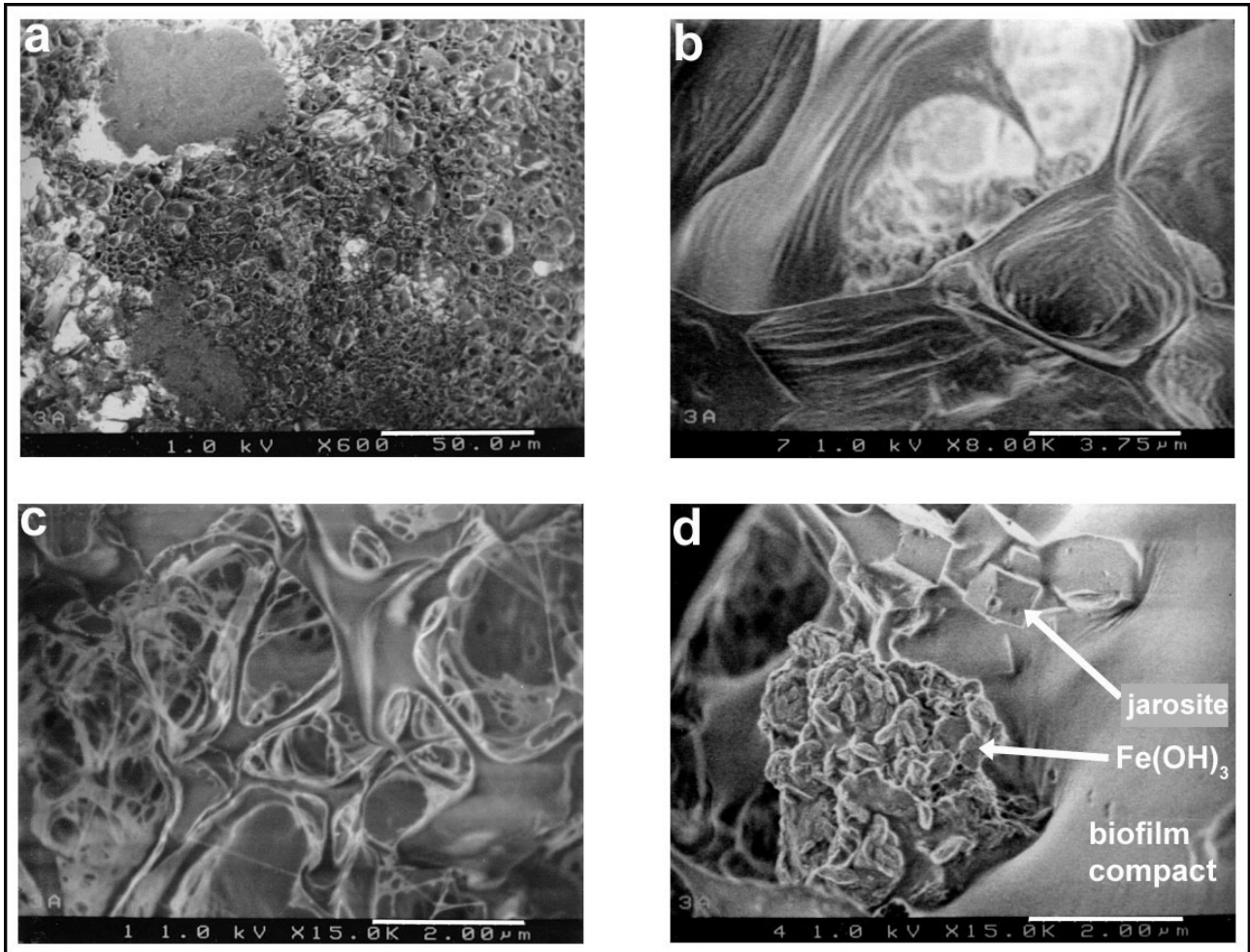
Dans le voile bactérien qui recouvre le vermicule la présence de jarosite a été observée, ainsi que celle de calcite en petite quantité (*Fig. 10.2.28. a., b.*). Cette dernière se trouve sous forme de petits cristaux disséminés dans la masse de mucopolysaccharides au contact du vermicule (*Fig. 10.2.28. c., d.*).

Fig. 10.2.28. a., b. Cristaux de jarosite et de calcite dans le voile bactérien couvrant l'extérieur du vermicule; c., d. Cristaux de calcite aux bactéries et mucopolysaccharides du corps de la stalactite mucilagineuse à proximité du vermicule.



Les formations mucilagineuses ont été aussi examinées par la cryo-M.E.B. Son avantage consiste dans le fait que l'échantillon n'est pas déshydraté et les mucopolysaccharides ne sont pas dilacérés, les biofilms ayant un aspect compact (*Fig. 10.2.29.*). En cryo-M.E.B., les mucopolysaccharides bactériens ont un aspect vésiculaire.

Fig. 10.2.29. Le biofilm au cryo-MEB. a. Vue générale du biofilm; b., c. Mucopolysaccharides vésiculaires; d. Biofilm compact à dépôts d'hydroxyde ferrique et de jarosite.

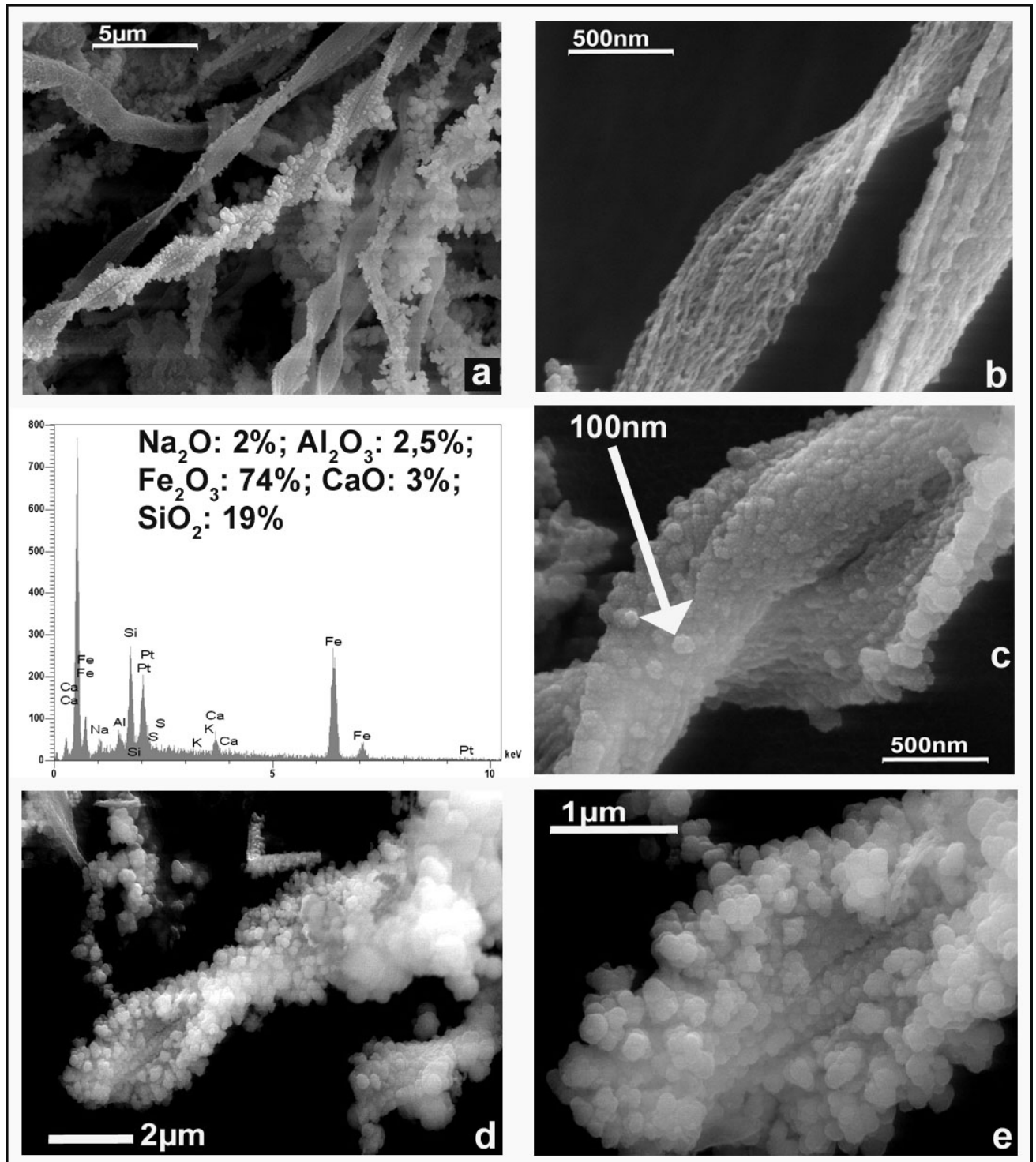


10.3. La flaque

Dans la flaque où une grande partie des eaux de la cavité est drainée, les sédiments sont de deux types: des dépôts rouges, ferrugineux, et des dépôts blancs, alumineux (chapitre 6) (*Fig. 6.2.3.1. a., b.; Fig. 10.3.1. a., b., c.*).

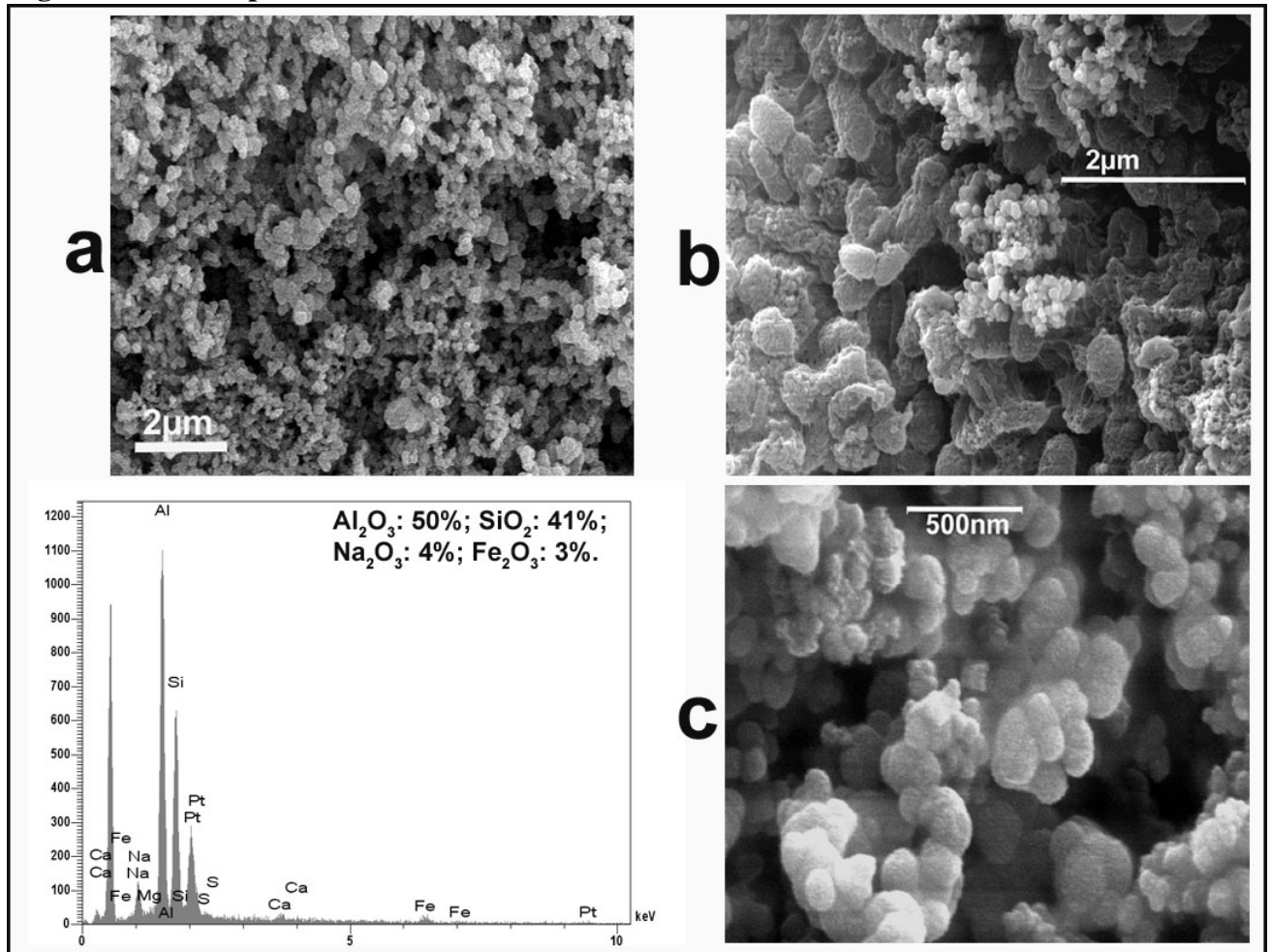
Le dépôt rouge est formé d'un ensemble de filaments spiralés, présentant en leur surface de petits globules d'un diamètre d'environ 100 nm, et riches en fer (*Fig. 10.3.2. a., b., c., d., e.*). En M.E.T. il a été observé une fine minéralisation de ces filaments spiralés (*Fig. 10.3.3. a., b., c.*) et également une grande densité d'autres micro-organismes, représentés par des bactéries et des hyphes de Deutéromycètes (*Fig. 10.3.3. d., e., f.*).

Fig. 10.3.2. a. Filaments spiralés, vue d'ensemble; b., c., d., e. Spirales – détail. Spectre E.D.S.



Le dépôt blanc, qui présente une surface nettement plus réduite que le dépôt rouge, est riche en aluminium. A l'échelle microscopique, il apparaît constitué de nanosphères souvent regroupées en petits amas (*Fig. 10.3.4. a., c.*) pour lesquelles l'absence de réflexions sur les spectres de diffraction des rayons X montre le caractère amorphe. Dans certaines zones, un grand nombre de micro-organismes ont pu être observés (*Fig. 10.3.4. b.*).

Fig. 10.3.4. a., c. Sphérules aluminées, spectre E.D.S.; b. Ensemble de micro-organismes et de sphérules alumineuses.

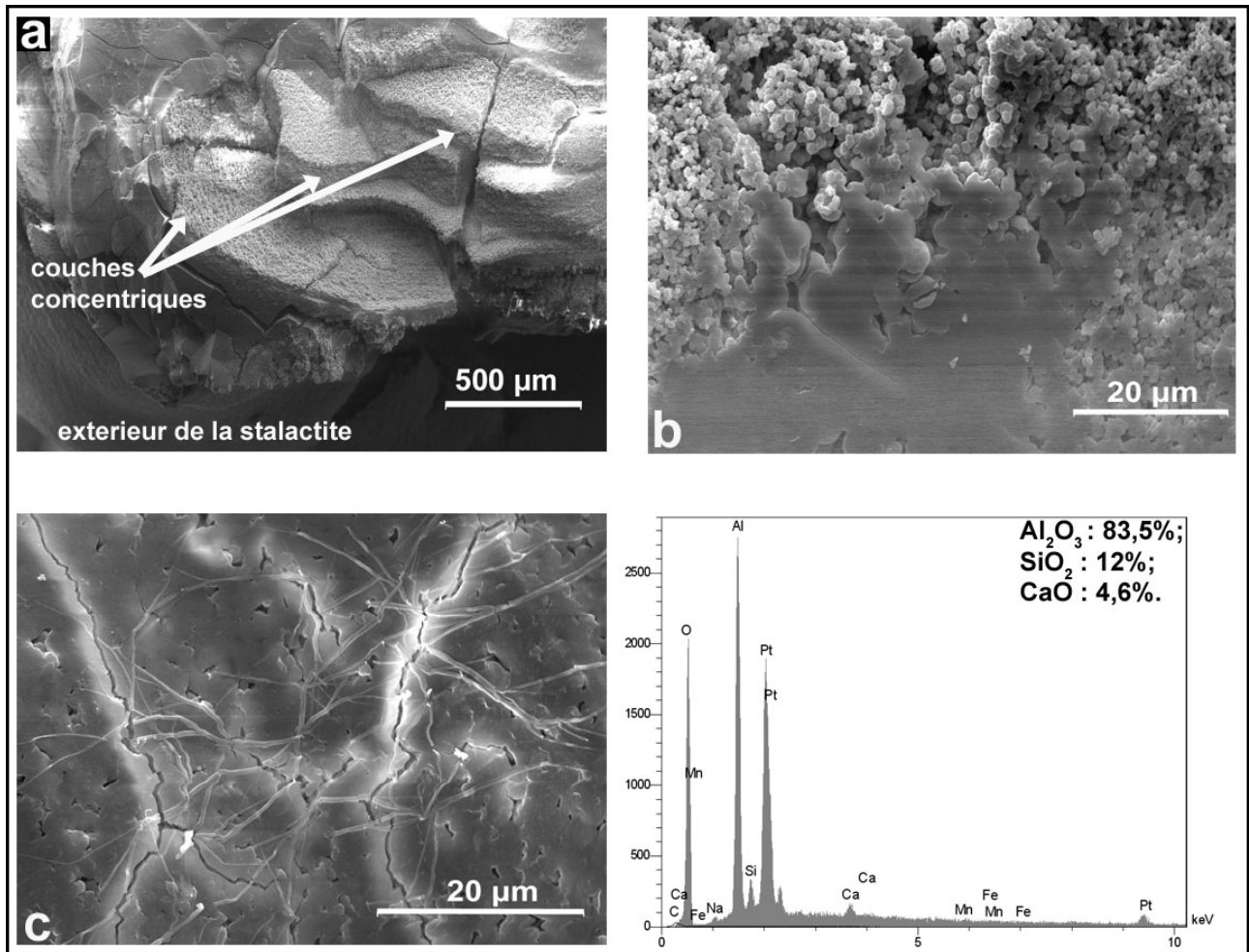


10.4. Formations pâteuses

Comme on l'a déjà vu dans le chapitre 6, il s'agit de deux types de formations se trouvant sur l'une des parois de la Salle 2 : un écoulement pariétal blanc et une stalactite blanche à dépôt stalagmitique (*Fig. 6.2.1., Fig. 6.2.4.1., Fig. 6.2.4.2.*). A l'échelle microscopique et du point de vue de la composition chimique, ces deux formations se ressemblent beaucoup.

Les observations en M.E.B., réalisées sur le corps de la stalactite blanche, montrent qu'elle est formée d'une masse de petites sphérules déposées en couches concentriques. Aux joints des couches, les sphérules deviennent coalescentes, formant une croûte sur laquelle, dans certaines zones, se trouvent des formations filamenteuses ramifiées, semblables aux hyphes de champignons (*Fig. 10.4.1. a., b., c.*). Du point de vue chimique, les sphérules sont très riches en Al (jusqu'à plus de 80 % Al₂O₃) avec du silicium et un peu de Ca; leur caractère amorphe est montré par les diffractogrammes.

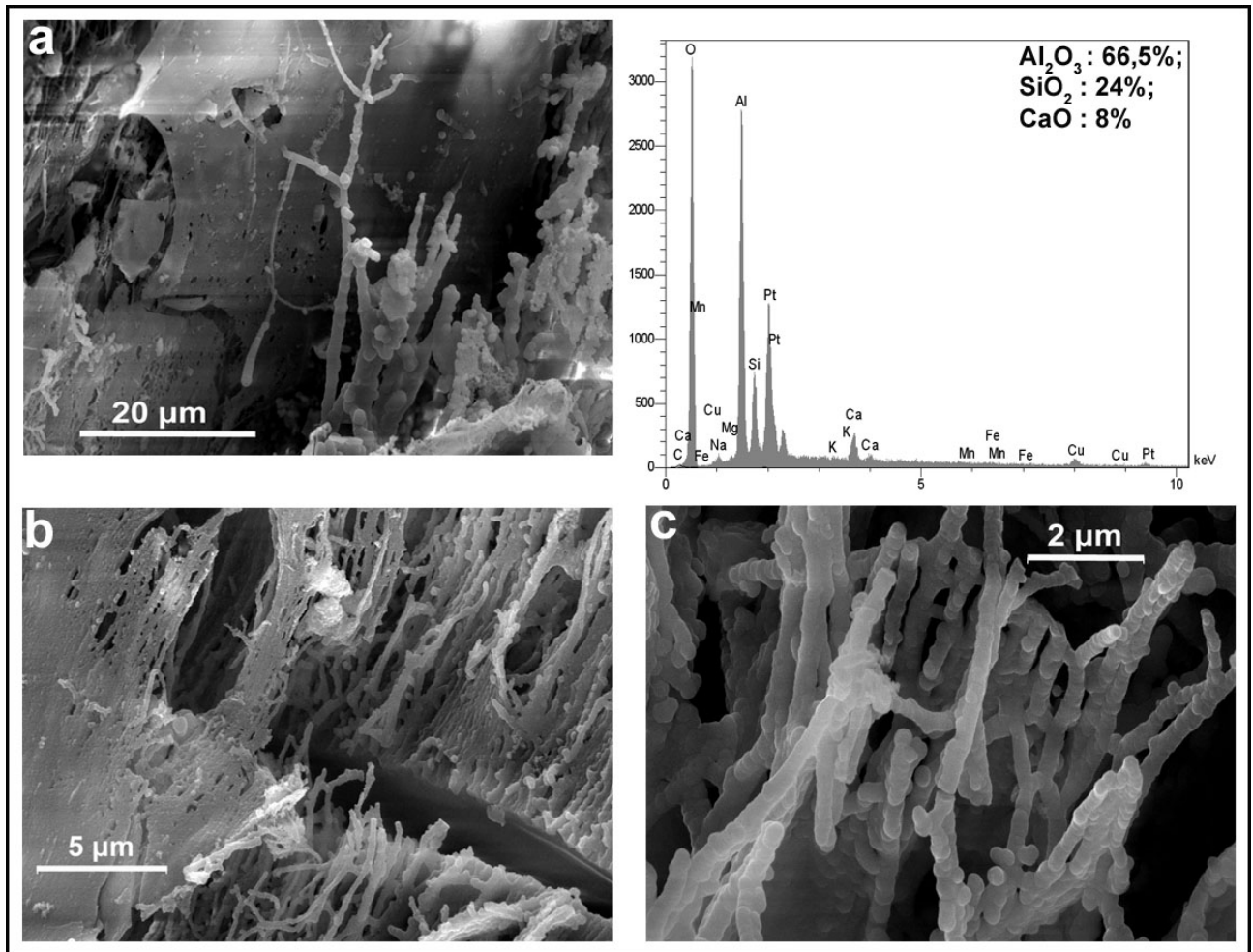
Fig. 10.4.1. a. Vue d'ensemble de la structure interne en couches concentriques de la stalactite blanche; **b.** Sphérules formant le corps de la stalactite, leur passage en masses compactes (croûtes) au joint des couches concentriques; **c.** Filaments ramifiés, ressemblant aux hyphes de champignons, sur ces croûtes; Spectre E.D.S.



À la base de la stalactite, mais aussi dans le cas de l'écoulement pariétal blanc, la structure et la composition chimique sont un peu plus compliquées, car deux types de structures apparaissent.

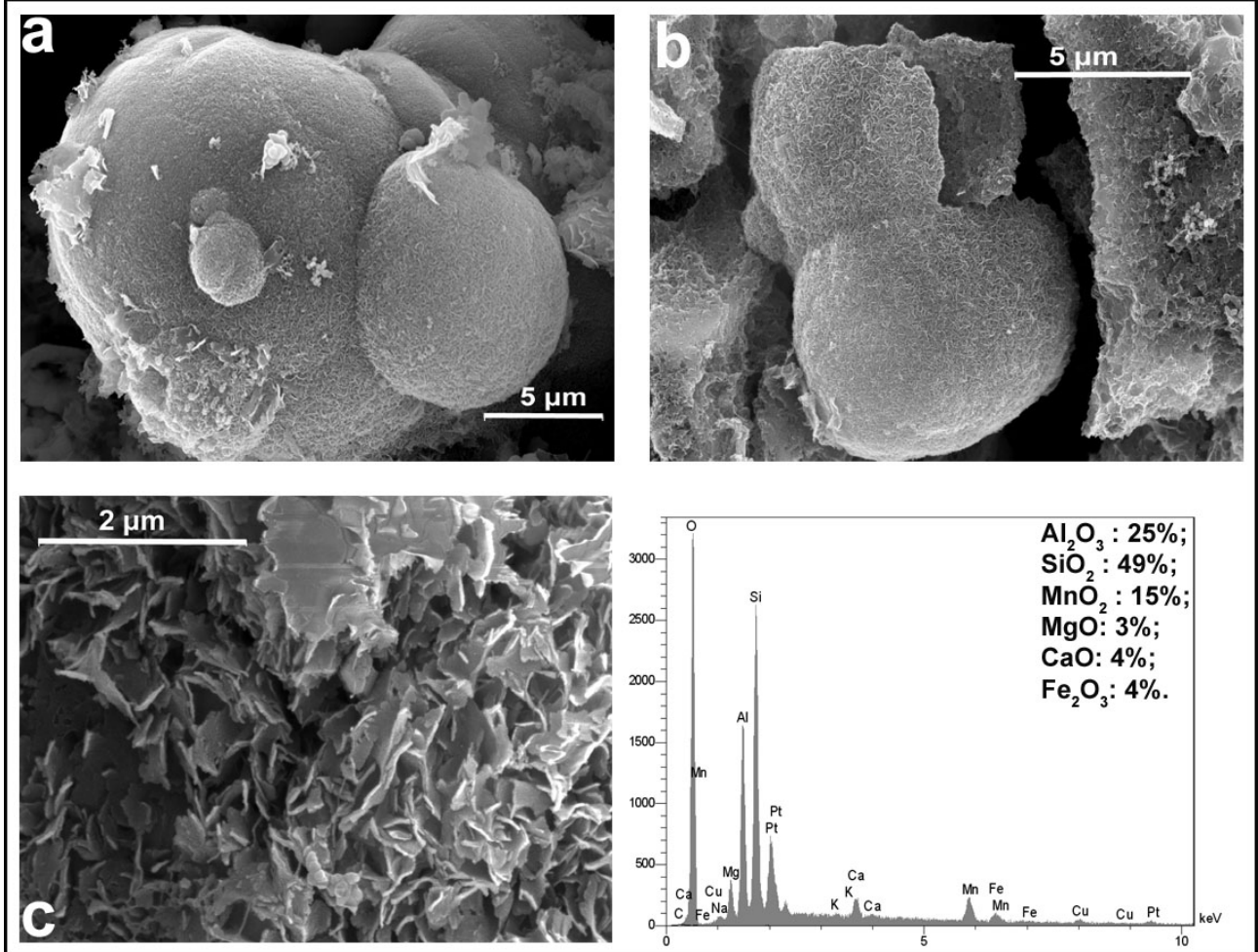
a. des structures filamenteuses, les filaments sont ramifiés, ressemblant aux hyphes de champignons, ils sont constitués de sphérules unies entre elles (Fig. 10.4.2. a., c.). Cette structure filamenteuse alterne avec des structures en plaquettes, feuilletées, formées par l'union des filaments (Fig. 10.4.2. b.). Leurs caractères chimiques sont voisins des précédents.

Fig. 10.4.2. a., c. Filaments ramifiés formés de sphérules coalescentes; b. Vue de filaments ramifiés alternant avec des structures plaquettaires, feuilletées, formées par union des filaments. Spectre E.D.S.



b. des structures sphéroïdales de plus grande taille, creuses (Fig. 10.4.3. a., b.), entièrement formées de fins feuillets de petites dimensions (Fig. 10.4.3. c.). À la différence des structures filamenteuses et des sphérules déjà présentées, la composition chimique de ces petites structures feuilletées est plus complexe (Fig. 10.4.3.) : elle se révèle nettement plus riche en silice, Mg, Mn ; Ca et Fe y sont également détectés. Habitus et composition chimique laissent penser à des minéraux argileux.

Fig. 10.4.3. a., b. Structures sphéroïdales vides à l'intérieur; c. Surface de structure sphéroïdale formée de palquettes minces, de petites dimensions. Spectre E.D.S.



Partie V. Mécanismes métaboliques à la base de l'apparition des formations étudiées

Chapitre 11. Processus et mécanismes métaboliques

En terme de bilan général des processus qui interviennent dans les formations étudiées, nous pouvons préciser l'ensemble des faits suivants (*Fig. 11.1.*).

Dans la roche qui forme la voûte de la cavité, plus précisément dans ses microfissures, la pyrite est oxydée par des *Acidithiobacillus* attachés aux cristaux, libérant le Fe^{2+} , mais aussi le soufre du sulfure. Dans les formations mucilagineuses on a observé le fait que les cellules bactériennes forment un biofilm distendu sur la surface des cristaux, utilisant leur irrégularités. Une partie du Fe^{2+} qui en résulte est oxydé sur place par les bactéries libres de la solution de percolation des microfissures de la voûte dans le cas des stalactites polychromes (*Fig. 11.1.4.*), ou du biofilm compact entourant comme une enveloppe les cristaux de pyrite dans le cas des formations mucilagineuses (*Fig. 11.2.1.*, *Fig. 11.2.2.*). A partir de l'oxydation du Fe^{2+} se forme du Fe^{3+} qui induit ensuite une oxydation chimique de la pyrite résiduelle, donnant naissance à une autre quantité de Fe^{2+} , qui se trouve ensuite disponible pour les micro-organismes chimiosynthétisants des consortiums.

Dans la zone des stalactites polychromes, le Fe^{2+} provenant de l'oxydation biologique et chimique de la pyrite est oxydé en Fe^{3+} par *A. ferrooxidans*, formant, en consortium avec les six espèces de *Penicillium*, un biofilm continu sur la voûte de la cavité. L'association mutualiste des bactéries et des champignons se réalise par les prolongements des hyphes (chapitre 10). Par leur biais, les hyphes prélèvent directement les produits organiques métaboliques bactériens, mais les bactéries bénéficient elles-aussi de certains ions et précurseurs organiques simples provenant des Deutéromycètes.

Dans les zones où la voûte présente des irrégularités en saillie, le biofilm forme des gouttes, initiant ainsi la formation des stalactites polychromes. Le Fe^{3+} , provenant de l'oxydation, se dépose sous forme de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ à l'extérieur des hyphes de champignons, sous forme de minéralisations aciculaires, ce qui augmente de beaucoup le diamètre de ces hiffes; cela leur confère une structure fibreuse visible sous la loupe binoculaire.

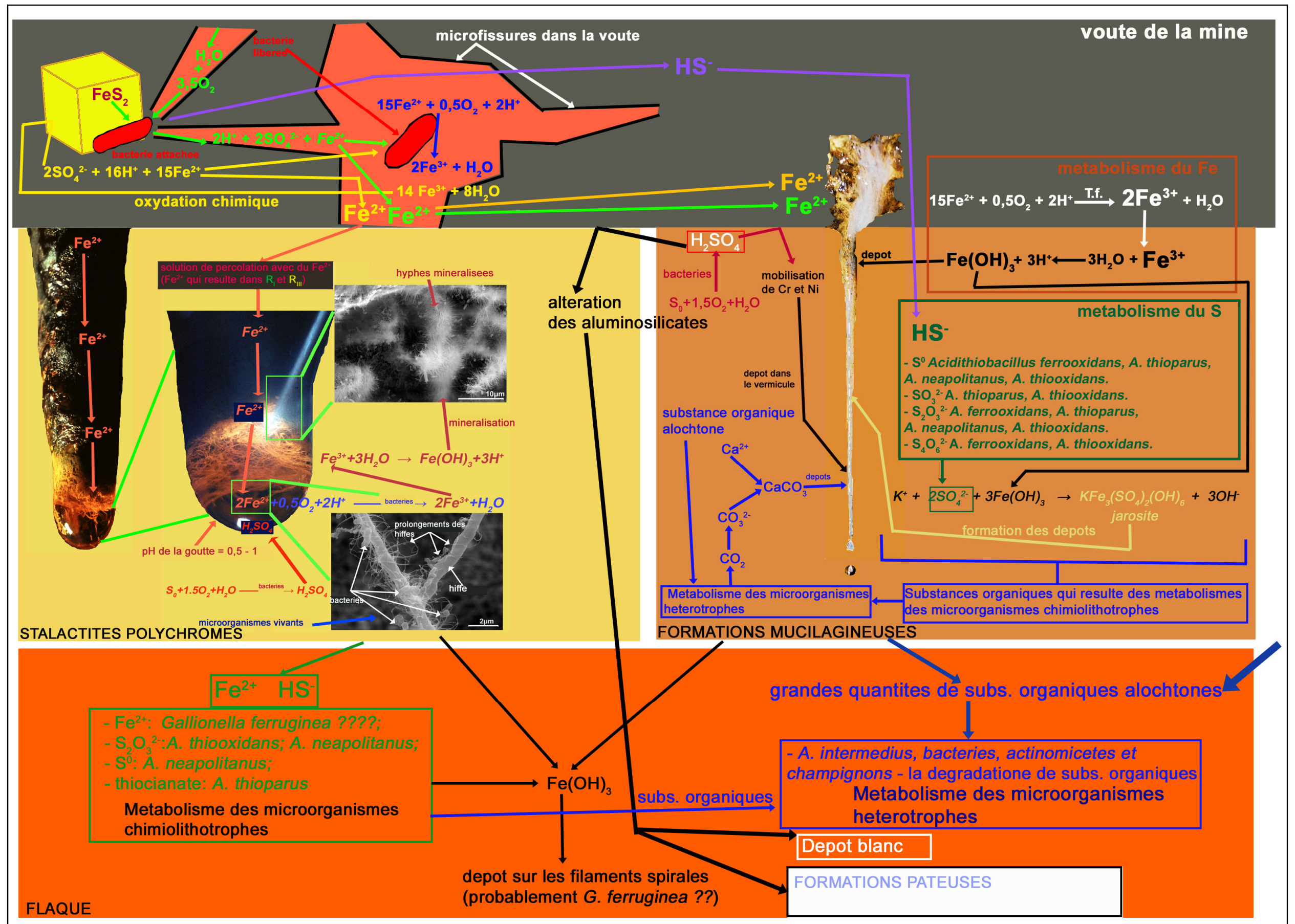
Le biofilm est alimenté extrêmement lentement, depuis la voûte de la cavité, avec une solution de percolation dont la concentration et la viscosité sont importantes. Par la suite, à l'extérieur du biofilm le $\text{Fe}(\text{OH})_3$ se dépose encore sous forme d'une lamine microstratifiée (en fonction du temps de dépôt).

Le résultat final est représenté par la minéralisation complète du biofilm, qui est limité à l'extérieur par la lamine de $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Sur sa surface se forme alors un autre biofilm qui pérennise le processus.

On connaît le fait que *A. ferrooxidans* oxyde le soufre de la chalcopyrite par attaque directe avant d'oxyder le Fe^{2+} en solution en Fe^{3+} . Ainsi, le S^0 produit pendant ces réactions est converti par *A. ferrooxidans* (connu comme étant capable d'oxyder le S^0 , le $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, le formiate) en acide sulfurique, acidifiant la solution de percolation (pH 0,5-2) (*Fig. 11.1.5.*).

Dans le cadre de nos recherches, nous avons effectué une expérience *in situ* pour mesurer la respiration du biofilm dans un intervalle de temps de deux semaines. Dans ce but nous avons utilisé un manomètre en verre en U à volume connu, fixé sur un support, et dans la zone de la courbure nous avons introduit de l'eau distillée stérile colorée à la fuxine Ziehl. Les mesures ont été réalisées sur une stalactite polychrome en plein métabolisme, introduite dans le manomètre qui a été collé de manière étanche à la voûte de la cavité (la base de la stalactite). Deux semaines plus tard, nous avons mesuré la différence de niveau de la colonne d'eau colorée et nous avons calculé le volume de gaz produit (*Fig. 11.1.6.*, *Fig. 11.1.7.*), qui a été d'environ $0,032 \text{ cm}^3$.

Fig. 11.1. Vue générale des processus se déroulant sur les sites étudiés.



Si nous prenons en considération le fait que les micro-organismes ont été inhibés par les conditions de l'intérieur du manomètre et si nous nous imaginons l'entière surface du biofilm de la voûte de la cavité de la zone à stalactites polychromes plus les stalactites, nous pouvons arriver à la conclusion que le métabolisme général de ce consortium formé de *Acidithiobacillus ferrooxidans* et des *Deutéromycètes* du genre *Penicillium* est intense.

Dans les formations mucilagineuses, le Fe^{2+} provenant de l'oxydation biologique et chimique de la pyrite est oxydé par les bactéries chimiosynthétisantes en Fe^{3+} qui se dépose sous forme de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ à la base des stalactites mucilagineuses, du centre vers leurs bords, ou dans les écoulements mucilagineux, de leurs bords vers le centre.

Le débit des eaux qui alimentent les formations mucilagineuses est variable pendant l'année, ce qui conditionne leur métabolisme. Ainsi, pendant les périodes de sécheresse, les formations mucilagineuses se rétractent beaucoup; dans le cas des stalactites mucilagineuses, par exemple, il ne reste sur la voûte que leurs bases minéralisées. Quand le débit de l'eau augmente, sur ces bases coniques de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ apparaissent d'autres stalactites mucilagineuses qui déposeront une autre couche de $\text{Fe}(\text{OH})_3$, et si nous regardons à la loupe binoculaire une section transversale de ces bases minéralisées, nous observons qu'elles ont une structure concentrique.

Parallèlement avec le métabolisme du Fe^{2+} , les espèces de acidithiobacilles des formations mucilagineuses métabolisent aussi les produits soufrés qui émanent du sulfure. Ainsi, le S^0 est oxydé par *A. ferrooxidans*, *A. thioparus*, *A. neapolitanus*, *A. thiooxidans*; le SO_3^{2-} par *A. thioparus* et *A. thiooxidans*; le $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ par *A. ferrooxidans*, *A. thioparus*, *A. neapolitanus*, *A. thiooxidans*, et le $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ par *A. ferrooxidans* et *A. thiooxidans*.

Le métabolisme du soufre est à l'origine de l'émission d'importantes quantités de SO_4^{2-} . Le SO_4^{2-} réagit avec le $\text{Fe}(\text{OH})_3$ non déposé, auxquels s'ajoutent les ions K^+ formant alors la jarosite - $\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ – dont l'habitus est typique du système trigonal-pyramidal (*Fig. 10.2.17. a., b., c.; Fig. 10.2.18. a., b., c., d.*). Nous l'avons observée dans toutes les formations mucilagineuses, c'est-à-dire dans les stalactites, dans leur partie médiane, mais aussi dans les écoulements de plancher et pariétaux.

Dans la zone de contact des stalactites mucilagineuses avec la roche, *A. ferrooxidans* oxyde le S^0 , et de cette réaction résulte du H_2SO_4 qui mobilise des éléments des minéraux de la roche, le Cr et le Ni, qui se déposent ensuite, à côté du $\text{Fe}(\text{OH})_3$, dans les mucopolysaccharides du biofilm bactérien, vers la pointe des stalactites mucilagineuses. Ce biofilm se plie, comme un rideau qui tombe, présentant de gros plis transversaux, longitudinaux, mais aussi des microplis, les cellules bactériennes se momifient, résultant alors en une formation minérale d'origine biogène que nous avons nommée vermicule. Les processus intimes, biologiques et chimiques, à la base de l'apparition et du développement de cette formation n'ont pas été élucidés dans la présente étude, ce problème restant ouvert pour nos recherches futures.

À l'extérieur, la formation vermiculaire est enveloppée par un biofilm compact, où nous avons observé la présence de jarosite et de calcite. La calcite a été aussi observée dans le corps de la stalactite mucilagineuse, près du vermicule (*Fig. 10.2.28. a., b., c., d.*). Cette présence apparaît paradoxale dans la mesure où ce minéral est apparemment confronté à un milieu acide.

Toutefois, la formation de calcite est possible dans les consortiums mucilagineux de micro-organismes parce que des micro-milieus peuvent s'individualiser et favoriser des réactions différentes dans un contexte globalement acide. Par ailleurs, la formation de calcite dans ces "microcellules de réaction" repose probablement sur l'activité métabolique des micro-organismes hétérotrophes du consortium, qui utilisent le carbone organique comme source de d'énergie réductrice. Ainsi, de l'activité des hétérotrophes résulte du CO_2 qui se transforme en CO_3^{2-} . Celui-ci réagit avec les ions de Ca^{2+} qui, dans les formations mucilagineuses, se trouvent en grande quantité ($376,4 \text{ mg/L}^{-1}$ – la plus grande quantité de tous les sites étudiés) et il en résulte de la calcite (*Ec. 11.1.19. – 11.1.22.*).

Après sa formation, la calcite reste enveloppée dans le biofilm compact de bactéries à mucopolysaccharides, étant ainsi protégé du milieu acide entourant les formations mucilagineuses (*Fig. 10.2.28. d.*).

Les substances organiques provenant de l'activité métabolique des chimiolithotrophes ou libérées après leur mort, mais aussi les substances organiques allochtones des formations

mucilagineuses apportées par l'eau de la cavité, sont métabolisées par les micro-organismes hétérotrophes du consortium mucilagineux.

Les stalactites polychromes et les formations mucilagineuses représentent deux systèmes différentes comme fonctionnalité. Pour les stalactites polychromes, le processus biologique à la base de leur formation et de leur croissance est permanent, c'est-à-dire qu'elles sont alimentées en permanence depuis la voûte de la cavité par la solution de percolation, du fait d'un système de fines fissures. La population de chimiolithotrophes est dominante par rapport à la population d'hétérotrophes, ce qui donne un pH très acide (pH 1-1,5). La substance organique qui se produit est spécialement autochtone.

D'autre part le débit des eaux qui alimentent les formations mucilagineuses est variable pendant l'année, ce qui conditionne leur métabolisme. Les hétérotrophes sont bien représentés et la substance organique allochtone arrive en grandes quantités avec l'eau provenant des autres secteurs de la cavité. Aussi, dans les formations mucilagineuses avec un pH moins acide (pH 2,5-3) que les stalactites polychromes, l'activité métabolique des chimiolithotrophes est plus diversifiée sur le métabolisme du soufre.

Dans la flaque, comme on l'a déjà vu dans les chapitres antérieurs, existent deux types de dépôts : un dépôt blanc et un dépôt rouge.

Dans le dépôt rouge, ayant un pH faiblement acide (6,2), se déroulent des processus de chimiosynthèse, mais surtout des processus hétérotrophes de décomposition des substances organiques.

Le Fe^{2+} est oxydé, nous le supposons, par *Gallionella ferruginea* (qui connaît, semble-t-il, un important développement dans le dépôt rouge) en Fe^{3+} qui se dépose sous forme de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ sur ses filaments spiralés (chapitre 1). Ce micro-organisme n'ayant pu être isolé jusqu'à présent à cause de problèmes techniques, nos suppositions resteront à confirmer dans l'avenir. Les acidithiobacilles oxydent des composés du soufre : $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ pour *A. thiooxidans* et *A. neapolitanus* ; S^0 pour *A. neapolitanus* et le thiocyanate pour *A. thioparus*.

Située dans l'un des plus bas secteurs de la cavité Kiesberg, la flaque représente, du point de vue métabolique, un véritable bassin d'épuration biologique des eaux qui y sont drainées. Ces eaux, qui se jettent dans la flaque sont chargées de grandes quantités de substances organiques provenant des activités des consortiums de micro-organismes, des restes d'invertébrés (insectes) et de vertébrés (chauves-souris) vivant dans cette cavité, mais aussi des substances organiques qui, depuis l'extérieur, parviennent dans la cavité avec les eaux de percolation. S'y ajoutent également les substances organiques issues de l'activité des micro-organismes chimiosynthétisants présents dans la flaque elle-même. Toutes les substances organiques sont décomposées par les micro-organismes hétérotrophes.

Le dépôt blanc représente, au niveau microscopique, une agglomération de microsphérules blanches alumineuses, mais on y observe aussi des cellules bactériennes et des hyphes de champignons. Les analyses E.D.S. indiquent une abondance d'Al (environ 50%) et de Si (40%), auxquels s'ajoutent le Na (4%) et le Fe (3%) (*Fig. 10.3.4.*). En conséquence, le dépôt blanc représente le résultat de l'altération des minéraux à aluminosilicates de type feldspaths, qui sont communs dans les roches mères magmatiques ou métamorphiques.

La solubilisation des feldspaths des roches se réalise dans certains milieux par des processus chimiques, mais aussi à l'aide des organismes vivants. Comme l'ont montré de récents travaux, le genre *Penicillium sp.* contribue largement à la solubilisation et la mobilisation des aluminosilicates (Ullman, 2005).

Sur les parois de la cavité Kiesberg, dans les zones où les acidithiobacilles sont bien développés et métabolisent les composés du soufre, les feldspaths sont solubilisés à l'aide de l'acide formé par l'activité des bactéries chimiolithotrophes. Comme nous l'avons observé, dans tous les cas étudiés dans cette mine Kiesberg, dans les communautés de micro-organismes les acidithiobacilles (chimiolithotrophes) coexistent avec un nombre important d'organismes hétérotrophes, dont les champignons, qui jouent un rôle important dans la solubilisation des aluminosilicates.

Depuis le lieu de la solubilisation, les produits sont transportés jusqu'à la flaque, puis se déposent dans les zones à écoulement lent. Leur altération continue dans la flaque, dans le dépôt

blanc, sous l'action des produits métaboliques des champignons que nous y avons identifiés. (*Ec. 11.3.2.*).

Les formations pâteuses, représentées par l'écoulement pariétal blanc et la stalactite à dépôt stalagmitique blanc décrits dans les chapitres antérieurs, sont, tout comme le dépôt blanc de la flaque, le résultat de l'altération chimico-biologique des aluminosilicates de la roche sur les parois de la cavité.

Les aluminosilicates à K, Fe, Ca, Mg etc. des roches, en sus du H_2SO_4 (*Ec. 11.3.2.*), sont attaqués par d'autres acides organiques synthétisés par une gamme très large de micro-organismes hétérotrophes. Les acides organiques contiennent des groupes fonctionnels du type carboxyle (-COOH), hydroxyle (OH) ou amine (NH_2), résultant soit du catabolisme des substances organiques soit de la sécrétion des micro-organismes (Dévigne, 1980). Ils favorisent la séquestration des cations polyvalents (Al^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}) sous forme de complexes organométalliques solubles (Zarnea, 1994).

L'étape finale de la dégradation est représentée par l'apparition de composés tels que SiO_2 , Al_2O_3 , TiO_2 , FeO ou Fe_2O_3 , K_2O , Na_2O , MgO, CaO (argiles) (que nous avons identifiés en petites quantités aussi dans les formations mucilagineuses) ou de leurs solutions. Mais ces étapes finales ne sont pas toujours atteintes, dans la plupart des cas les processus de dégradation se limitent à la destruction partielle des édifices chimiques des minéraux, sans exclure la rupture de molécules architecturales (tetraèdres de SiO_4 , AlO_4 , etc.) (Zarnea, 1994). Suite à la modification de la structure chimique, par hydrolyse, il résulte des aluminosilicates plus simples, riches en groupes hydroxyle (OH), souvent amorphes, qui prennent différentes formes lamellées (*Fig. 10.4.2. b.*, *Fig. 10.4.3.*), disposés en édifices sphéroïdaux (*Fig. 10.4.1.*, *Fig. 10.4.2.*), etc. (Lăcătușu, 2000; Crăciun, 2000; Mârza, 2002).

Partie VI. Utilisation pratique des consortiums dans la déferrisation et la démanganisation des eaux de forage

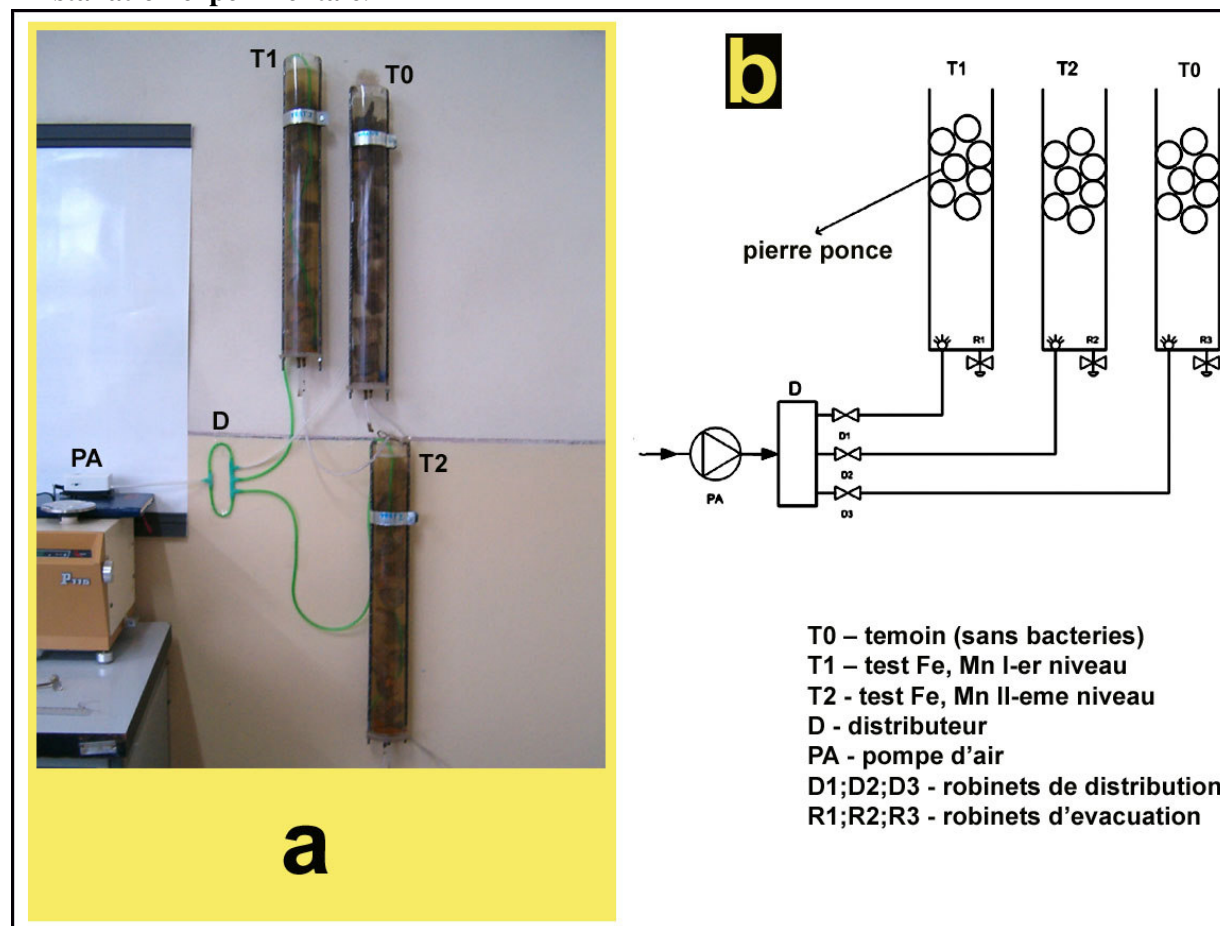
Chapitre 12. Expérimentation en colonnes aérées

Pour l'alimentation urbaine, les eaux phréatiques sont exploitées par forage à différentes profondeurs, ensuite elles sont traitées pour devenir potables. Dans les usines de traitement, les eaux provenant des forages sont déferrisées et démanganisées par une forte oxygénation, ensuite elles sont filtrées par des filtres à sable pour retenir les précipités d'hydroxyde de fer et de manganèse. À la fin du traitement, les eaux sont aussi soumises à des processus de désinfection pour éliminer les micro-organismes.

Les méthodes d'élimination des différents ions des effluents miniers à l'aide des micro-organismes ont été utilisées depuis quelque temps, parvenant à des résultats remarquables, surtout dans le cas des ions d'arsenic (Ferguson, *et al.*, 1972; Wakao, *et al.*, 1988; Mandl, *et al.*, 1992; Fuller, *et al.*, 1993; Ahmann, *et al.*, 1994; Leblanc, *et al.*, 1996; Islam, *et al.*, 2004), mais aussi de plusieurs ions de métaux lourds (Tuttle, *et al.*, 1969; Jaynes, *et al.*, 1984; Ferris, *et al.*, 1989; Baker, *et al.*, 2003; Xu, *et al.*, 2003; Gadd, 2004; Lee, *et al.*, 2006; Vanbroekhoven, *et al.*, 2007; etc).

Nous avons cherché à estimer si des consortiums microbiens tels ceux de la mine Kiesberg pouvaient accélérer substantiellement ces processus d'élimination du fer et du manganèse. Notre expérience a été réalisée sur des colonnes expérimentales de laboratoire en plexiglas, uniformément aérées, où a été testée, en deux étapes, la capacité du consortium de micro-organismes des stalactites et des écoulements mucilagineux, à oxyder le fer et le manganèse réduit de l'eau de forage, et les déposer ensuite sous forme d'oxydes. Les données obtenues ont été comparées à celles d'une colonne-témoin, sans micro-organismes, où l'on a procédé seulement à l'aération (*Fig. 12.1.1.*). A l'issue de chaque expérience, des mesures de la concentration en fer et manganèse de l'effluent du test, de l'effluent-témoin et de l'eau de forage ont été effectuées. Les mesures de la concentration en fer et manganèse de l'eau de forage qui a été soumise au traitement, a été effectuée chaque fois du fait que l'eau a été gardée plusieurs jours dans un récipient où l'oxydation chimique est possible.

Fig. 12.1.1. a. Image de l'installation expérimentale dans le laboratoire; b. Schéma de l'installation expérimentale.



Au début les trois colonnes et les parties composant l'installation ont été stérilisées avec de l'alcool à 90° pendant dix minutes. Après cette stérilisation et l'évaporation de la pellicule d'alcool des parois des colonnes et des tubes d'aération, les colonnes ont été remplies de débris de pierre ponce de grande porosité et stériles (la stérilisation de la pierre ponce a été faite en étuve à 190°C pendant 60 minutes). Le rôle de la pierre ponce est de servir de support pour le consortium de micro-organismes inoculé dans deux des trois colonnes (les colonnes-test T1 et T2), la troisième étant le témoin non inoculé (T0). Après introduction de la pierre ponce, les colonnes ont été couvertes d'un tissu multicouche en coton, également stérilisé en étuve. Pour une bonne stabilisation du consortium sur la pierre ponce, l'amorçage des colonnes a été réalisé pendant 48 heures. Des images en M.E.B. de la pierre ponce des trois colonnes peuvent être observées sur les *Fig. 12.4.1. et 12.4.2.* L'eau de forage utilisée pendant l'expérience a été stérilisée par filtration.

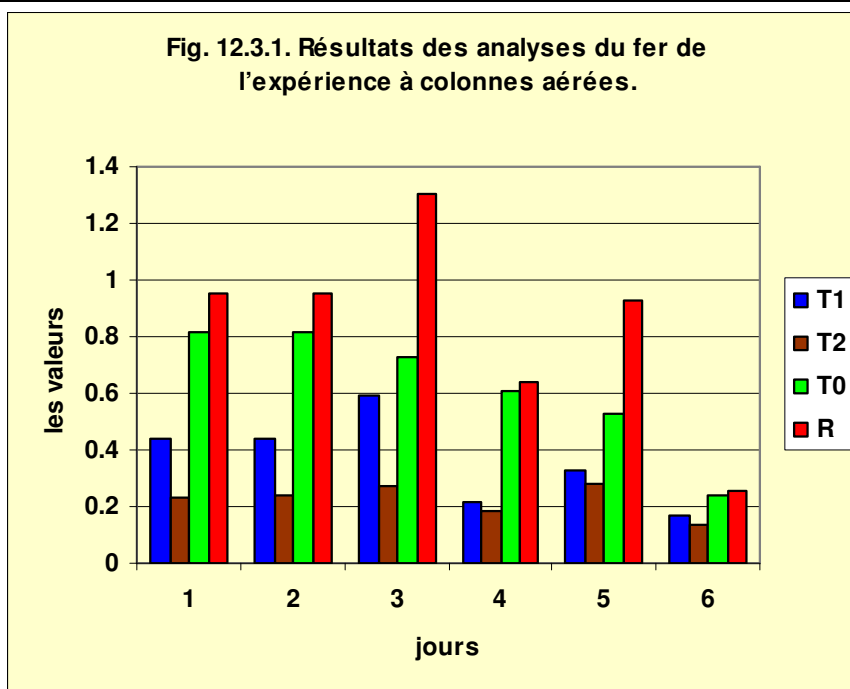
Dans les usines de traitement, les eaux provenant des forages sont déferrisées et démantanisées par un fort procédé d'oxygénation consommateur d'énergie. Aujourd'hui dans cette usine de traitement, un intervalle de 25 minutes d'oxygénation est considéré rentable du point de vue économique.

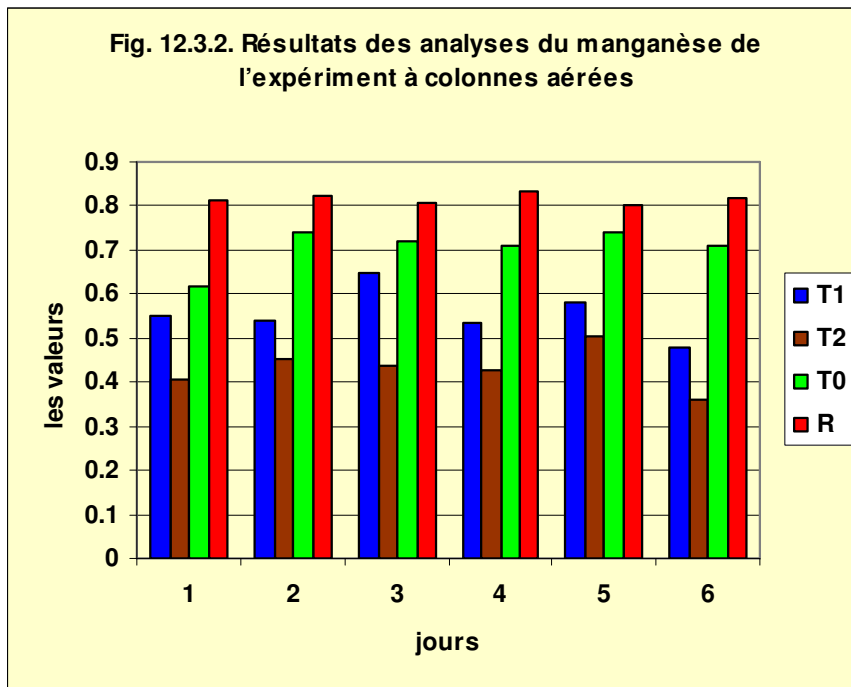
L'expérience a été réalisée pendant 25 minutes en parallèle en T1 (stade 1 du test) et dans la colonne-témoin (T0) (non inoculée). L'effluent de T1 a été placé en T2 (stade 2 du test) pendant un autre intervalle de 25 minutes. Ce deuxième stade est utile pour observer si, après les 25 minutes optimales du traitement T1, la concentration du fer et du manganèse continue à baisser, dans ce cas la période d'aération serait prolongée (au-delà de la limite de la rentabilité). L'expérience s'est déroulée pendant six jours, après chaque étape on a récolté des échantillons de l'effluent de chaque colonne et de l'eau de forage dans le récipient. Entre les étapes d'expérience, les colonnes sont alimentées avec l'eau de forage et sont oxygénées vingt minutes par heure pour maintenir active le consortium microbien testé.

La quantité de fer et de manganèse (*Tableau 12.3.1.*) a été mesurée par spectroscopie à absorption atomique au Laboratoire de Chimie de l'eau de la Régionale des Eaux Roumaines de Timișoara.

Tableau 12.3.1. Résultats des analyses du fer et du manganèse de l'expérience à colonnes aérées.

Fe				Mn			
T ₁	T ₂	T ₀	R	T ₁	T ₂	T ₀	R
0,44	0,23	0,82	0,954	0,551	0,405	0,617	0,815
0,44	0,24	0,82	0,95	0,54	0,455	0,74	0,823
0,595	0,275	0,73	1,305	0,649	0,439	0,718	0,809
0,216	0,182	0,606	0,64	0,536	0,428	0,708	0,835
0,327	0,278	0,528	0,93	0,58	0,506	0,74	0,8
0,17	0,14	0,24	0,26	0,48	0,36	0,71	0,82





À partir des valeurs du fer et du manganèse obtenues pendant les six jours (*Tableau 12.3.1.*), nous avons obtenu les *Figures 12.3.1. et 12.3.2.* et nous avons tiré quelques conclusions :

- dans les mêmes conditions expérimentales, pendant un intervalle de 25 minutes, le fer est oxydé plus rapidement que le manganèse, chimiquement mais aussi par des processus combinés, biologiques et chimiques ;

- par les processus biologiques et chimiques combinés de T1 et T2, le fer et le manganèse sont oxydés plus rapidement que par les processus purement chimiques de la T0 ;

- cette méthode biologique, d'évacuation des ions de fer et de manganèse, ne présente pas une rentabilité élevée pour une application à échelle industrielle, car elle demande un volume relativement important de substrat (pierre ponce ou matériaux céramiques poreux) qui doit être périodiquement remplacé ; de plus, ces dernières années, une méthode allemande de déferrisation et de démanganisation, par oxygénation de l'aquifère *in situ*, donne de très bons résultats, avec des coûts minimaux. Toutefois, cette expérience est importante puisque représente le point de départ de nouvelles recherches sur la capacité d'élimination des différents ions par d'autres consortiums microbiennes de la mine Kiesberg.

Conclusions générales

Des associations microbiennes formées par une grande variété de micro-organismes se développent sur les parois de l'ancienne mine d'or de Kiesberg au S-O de la Roumanie. Le fonctionnement de ces consortiums de micro-organismes est basé sur l'utilisation des composés minéraux réduits, essentiellement la pyrite, présents en grandes quantités dans la roche exposée sur les parois de la mine. Dans les microfissures de la roche, les micro-organismes chimiolithotrophes de type *Acidithiobacillus* oxydent, directement et indirectement, des quantités importantes de pyrite et d'autres sulfures métalliques. Le milieu acide qu'ils engendrent, facilite - sinon déclenche - l'altération des minéraux de la roche et la mobilisation des éléments qui les constituent. Ceux-ci forment subséquemment des précipités dont certains sont directement liés avec l'activité microbienne. Le résultat de leur métabolisation des minéraux de la roche originelle est la formation de composés oxydés, plus stables, qui se déposent en grande quantité à l'extérieur des cellules vivantes sous forme de minéraux bio-induits et dont les accumulations sont variées. Quatre grands types d'accumulations ont été identifiés. Des enduits pariétaux associés à des stalactites polychromes, des formations mucilagineuses (snotites), des dépôts de flaque, auxquels s'ajoutent des dépôts pâteux.

Les "Stalactites polychromes" constituent des spéléothèmes assez remarquables, établis à partir des enduits qui recouvrent en partie la voûte et les parois de la mine. Ces stalactites représentent le résultat de l'association mutualiste de *Acidithiobacillus ferrooxidans* et de six espèces de champignons du genre *Penicillium*. Dans cette association, la population de *A. ferrooxidans*, en tant que producteur primaire, est dominante : elle représente environ 80 % de la population totale. Les hétérotrophes, représentées par les six espèces de *Penicillium*, constituent le reste, à savoir 20 % de la population totale environ. De grandes quantités de Fe^{2+} sont oxydées par *A. ferrooxidans*, d'où résulte le $Fe(OH)_3$ qui se dépose à l'extérieur des hyphes de *Penicillium* en les minéralisant, ou à l'extérieur du biofilm, formant une lamine de $Fe(OH)_3$ microstratifiée. Les hyphes minéralisées forment le squelette interne des stalactites, et les lamines d'hydroxyde ferrique forment l'enveloppe extérieure dont certains prolongements se déploient vers l'intérieur (voir chapitre 11).

Le processus biologique à la base de leur formation et de leur croissance est permanent, c'est-à-dire qu'il se déroule pendant toute l'année, les stalactites polychromes étant alimentées en permanence depuis la voûte de la cavité par la solution de percolation, du fait d'un système de fines fissures. Cependant, durant les périodes pauvres en précipitations atmosphériques, la vitesse d'écoulement de la solution de percolation est beaucoup plus lente, d'où une concentration nettement plus élevée, ce qui entraîne des conséquences sur les microécosystèmes. Il en résulte ainsi d'importantes variations numériques des populations de micro-organismes entre les périodes riches en précipitations et les périodes pauvres. Les fléchissements dans les populations seraient dus à l'effet inhibiteur des différents ions de la solution hyperconcentrée lors des périodes sèches.

Les corrélations établies entre le nombre des micro-organismes et la valeur totale des précipitations entre saisons des pluies et saisons sèches des années 2004 et 2005, ont montré que le nombre des micro-organismes est directement proportionnel avec les précipitations pour toutes les espèces identifiées, à l'exception de *P. griseo-azureum*, qui est inversement proportionnelle. Toutefois, pour quatre évaluations numériques (deux en 2004 et deux en 2005) et pour une valeur de $p \leq 5\%$, les corrélations avec les précipitations sont significatives seulement pour *P. cyclopium*, les autres espèces présentant des corrélations non significatives.

Pour une valeur de $p \leq 5\%$ (voir le paragraphe 8.1.4. et l'Annexe VI: Tableau 8.1.4.1.) du Tableau 8.2.1.6., on observe que la seule espèce présentant des corrélations significatives avec les précipitations est *P. cyclopium*, les autres espèces présentent des corrélations non significatives.

Ce type d'association mutualiste entre *A. ferrooxidans* et *Penicillium* mis en évidence dans le présent travail n'est pas signalé dans la littérature et constitue donc un fait nouveau qu'il convenait de souligner.

Les "Formations mucilagineuses" représentent des consortiums de micro-organismes. De tels consortiums mucilagineux sont signalés en de multiples exemples dans la littérature ; ils sont plutôt communs dans les milieux riches en sulfures métalliques, thermaux ou mésothermaux, mais

n'ont guère fait à présent l'objet d'études détaillées. Dans notre cas, ils sont formés par dix-sept espèces dont les positions systématiques sont très différentes ; elles comprennent des chimiolithotrophes, mais aussi des hétérotrophes, réunies dans une masse compacte de mucopolysaccharides. Chez les chimiolithotrophes quatre espèces de acidithiobacilles, qui sont des producteurs primaires, ont été identifiées. *Acidithiobacillus intermedius* est une espèce à métabolisme mixotrophe, facultativement hétérotrophe. La substance organique autochtone des producteurs primaires (*Acidithiobacillus*) ainsi que la substance organique allochtone arrivée avec l'eau provenant des autres secteurs de la cavité, sont décomposées par les micro-organismes hétérotrophes. Ces derniers sont représentés par les actinomycètes, ainsi que par douze espèces de champignons. Les espèces bactériennes sont dominantes ; elles représentent environ 90 % de la population totale, le reste (10 %) correspondant aux champignons.

Les populations de micro-organismes identifiées subissent des variations numériques assez importantes entre les saisons riches en précipitations et les saisons sèches car le débit de l'eau qui alimente les formations mucilagineuses est très variable entre les deux saisons. En général, au cours des deux saisons (humide et sèche), les espèces dominantes sont les acidithiobacilles chimiolithotrophes avec plus de 60 %. Les hétérotrophes, qui représentent un peu plus de 30 %, comptent plus de 20 % d'actinomycètes, les espèces de champignons constituant le reste (soit 10 %).

Les corrélations établies entre le nombre le plus probable de micro-organismes et la valeur totale des précipitations des mois où ont été effectués les mesures (en 2004 et 2005), ont montré que toutes les espèces identifiées dans les formations mucilagineuses présentent des corrélations positives avec les précipitations, excepté *Cladosporium herbarum*, qui est la seule espèce à corrélations négatives. Pour quatre évaluations numériques (deux en 2004 et deux en 2005) et pour une valeur de $p \leq 5\%$, *P. expansum* présente la corrélation la plus significative avec les précipitations, tandis que *A. thioparus*, *Aspergillus nidulans* et *A. thomii* montrent des corrélations significatives. Dans le cas des autres espèces les corrélations sont non significatives.

Le métabolisme oxydatif des chimiolithotrophes est intense. Il en résulte l'oxydation de la pyrite. Celle-ci, d'une part, libère le Fe^{2+} qui est à l'origine du $\text{Fe}(\text{OH})_3$; ce composé se dépose dans les mucopolysaccharides extracellulaires constituant ainsi des formations minérales de type stalactites ou croûtes. D'autre part, sont émis les composés soufrés, d'où résultent des quantités importantes de SO_4^{2-} . Dans ces conditions, d'importantes quantités de jarosite se forment également à partir de $\text{Fe}(\text{OH})_3$, de SO_4^{2-} , ainsi que des ions K^+ provenant de l'hydrolyse des silicates (même sous forme de dépôts sur les parois de la galerie).

Dans l'une des „stalactites mucilagineuses”, des formations singulières, sortes de vermicules composés de biofilms microbiens compacts minéralisés, ont été observées. A côté du fer, la spectrométrie EDS a permis d'identifier Ni et Cr (non l'oxygène), éléments qui proviennent également de l'altération biologique (qui met en jeu H_2SO_4 provenant de l'oxydation du S^0 par les acidithiobacilles) des minéraux de la roche mère. Paradoxalement, en apparence, des cristaux de calcite se trouvent au sein des mucilages qui emballent ces vermicules. Dans la masse de mucopolysaccharides du consortium de micro-organismes, l'activité des hétérotrophes émet du CO_2 , puis du CO_3^{2-} qui réagit avec le Ca^{2+} présent. Les cristaux de calcite ainsi formés sont protégés de l'extérieur par le film de mucopolysaccharides.

Les stalactites polychromes et les formations mucilagineuses représentent deux systèmes différentes comme fonctionnalité. Les stalactites polychromes sont alimentées en permanence depuis la voûte de la cavité par la solution de percolation, du fait d'un système de fines fissures. La population de chimiolithotrophes est dominante, ce qui donne un pH très acide (pH 1-1,5) et donc la substance organique qui se produise est spécialement autochtone.

Les formations mucilagineuses sont alimentées avec un débit des eaux variable pendant l'année, ce qui conditionne leur métabolisme. Les hétérotrophes sont bien représentés et la substance organique allochtone arrive en grandes quantités avec l'eau provenant des autres secteurs de la cavité et les chimiolithotrophes ont un métabolisme du soufre plus diversifié.

La "Flaque" représente un véritable bassin d'épuration, avec un pH proche de la neutralité, où perdurent, d'une part, le métabolisme des micro-organismes chimiolithotrophes et, d'autre part, et très intensivement, le métabolisme des micro-organismes hétérotrophes. Deux types de dépôts ont été

décrits : rouges et blancs. Dans ces deux types de dépôts, treize espèces ont été identifiées, dont dix dans le dépôt rouge et trois dans le dépôt blanc.

Dans le dépôt rouge, sur les dix espèces identifiées, quatre sont des Acidithiobacilles chimiolithotrophes, quatre sont des bactéries hétérotrophes et deux, des champignons. La population est composée à plus de 90% de bactéries, le reste étant des champignons. Les hétérotrophes dominent pendant les saisons riches en précipitations, mais aussi pendant les saisons sèches, toutefois leur proportion augmente pendant les saisons sèches (plus de 50% pendant les saisons des pluies et plus de 60 % de la population totale pendant les saisons sèches), ce qui s'opère aux dépens des acidithiobacilles chimiolithotrophes (autotrophes). *Acidithiobacillus intermedius*, qui est hétérotrophe facultatif, a représenté, généralement, environ 15% de la population totale de acidithiobacilles. Le métabolisme chimiolithotrophe nécessite, d'une part, l'oxydation du Fe^{2+} , d'où il résulte du $Fe(OH)_3$ qui se dépose sur des filaments organiques spiralés (rapportés à *Gallionella ferruginea*, dont la caractérisation demeure à effectuer) qui forment le dépôt rouge, et, d'autre part, l'oxydation de composés du soufre. Les hétérotrophes, en grand nombre, métabolisent surtout la matière organique d'origine allochtone qui arrive, en grandes quantités, avec l'eau de tous les secteurs de la cavité, la flaque se trouvant à l'aval.

Le dépôt blanc représente une accumulation de produits d'altération des aluminosilicates; l'altération continue aussi dans la flaque sous l'influence des acides organiques provenant de l'activité des hétérotrophes; trois espèces de champignons sont identifiées ici.

Les "Formations pâteuses" représentent, comme le dépôt blanc de la flaque, des accumulations de différentes formes (sphéroïdales ou en plaquettes) des produits d'altération chimio-biologique des aluminosilicates de type feldspaths. Ces matériaux se trouvent soit sous forme d'écoulements sur les parois de la cavité, soit sous forme de stalactites et stalagmites. Sur les parois de la cavité Kiesberg, dans les zones où les acidithiobacilles sont bien développés, métabolisant les composés du soufre, les feldspaths sont solubilisés avec de l'acide formé par l'activité des bactéries chimiolithotrophes. En dehors des acidithiobacilles, les champignons jouent un rôle aussi important dans la solubilisation des aluminosilicates.

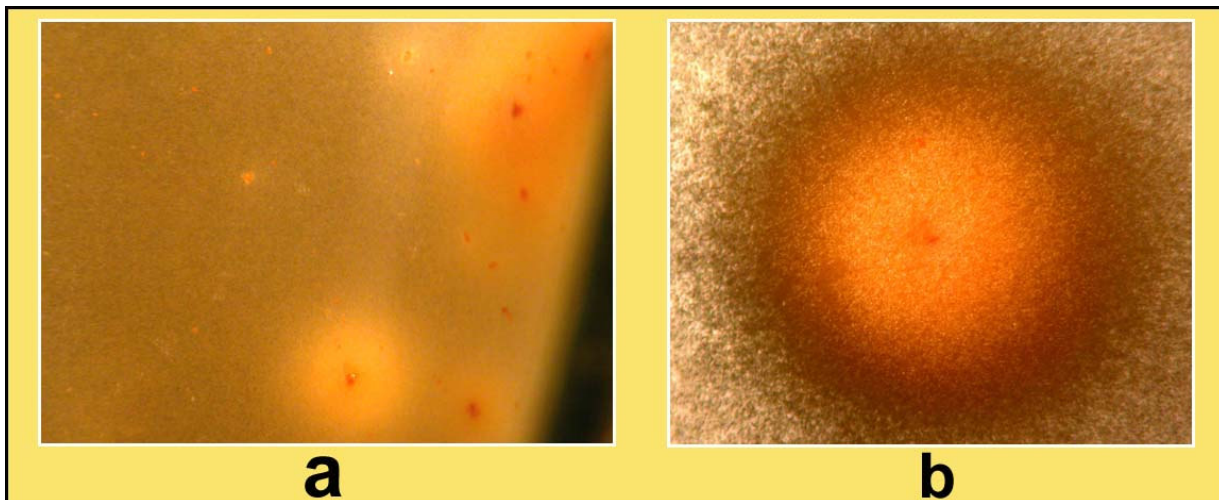
A partir du lieu de la solubilisation des feldspaths, dans les fissures de la roche sur les parois de la cavité, les produits d'altération sont ainsi transportés et stabilisés sous forme d'enduits pariétaux ou de stalactites et stalagmites à moins qu'ils ne parviennent jusqu'à la flaque pour donner les dépôts blancs.

Une expérience de déferrisation et de démanganisation d'eaux de forage a été menée en utilisant les micro-organismes échantillonnés dans les formations mucilagineuses. Les résultats sont les suivants. Dans les mêmes conditions expérimentales, par des processus combinés, biologiques et chimiques, le fer et le manganèse sont oxydés plus rapidement que par des processus purement chimiques ; par ailleurs, selon les deux types de processus, le fer est oxydé plus rapidement que le manganèse. Toutefois, la méthode biologique d'élimination des ions de fer et de manganèse que nous avons proposée ne se révèle pas rentable en cas d'application à grande échelle, du fait qu'un volume relativement important de substrat (de la pierre ponce ou des matériaux céramiques poreux) doit être changé périodiquement. A cet égard, une méthode allemande de déferrisation et de démanganisation développée ces dernières années par l'oxygénation de l'aquifère *in situ* s'avère plutôt très prometteuse et pour des coûts minimaux.

Comme de multiples questions demeurent en suspens, nous prolongerons nos recherches sur un certain nombre de points. Il s'agira tout d'abord de poursuivre les observations et les mesures sur le terrain, puis de compléter les déterminations microbiologiques par l'amélioration des techniques d'isolement sur milieu de culture, et des techniques de détermination génétique. L'identification des phases minérales pour les minéraux en très faible quantité et les phases amorphes apparaît nécessaire. Enfin, nous souhaitons poursuivre l'expérimentation sur différents types de consortiums de micro-organismes rencontrés dans la mine Kiesberg pour examiner d'éventuelles possibilités de traitement d'autres types d'eaux riches en métaux lourds.

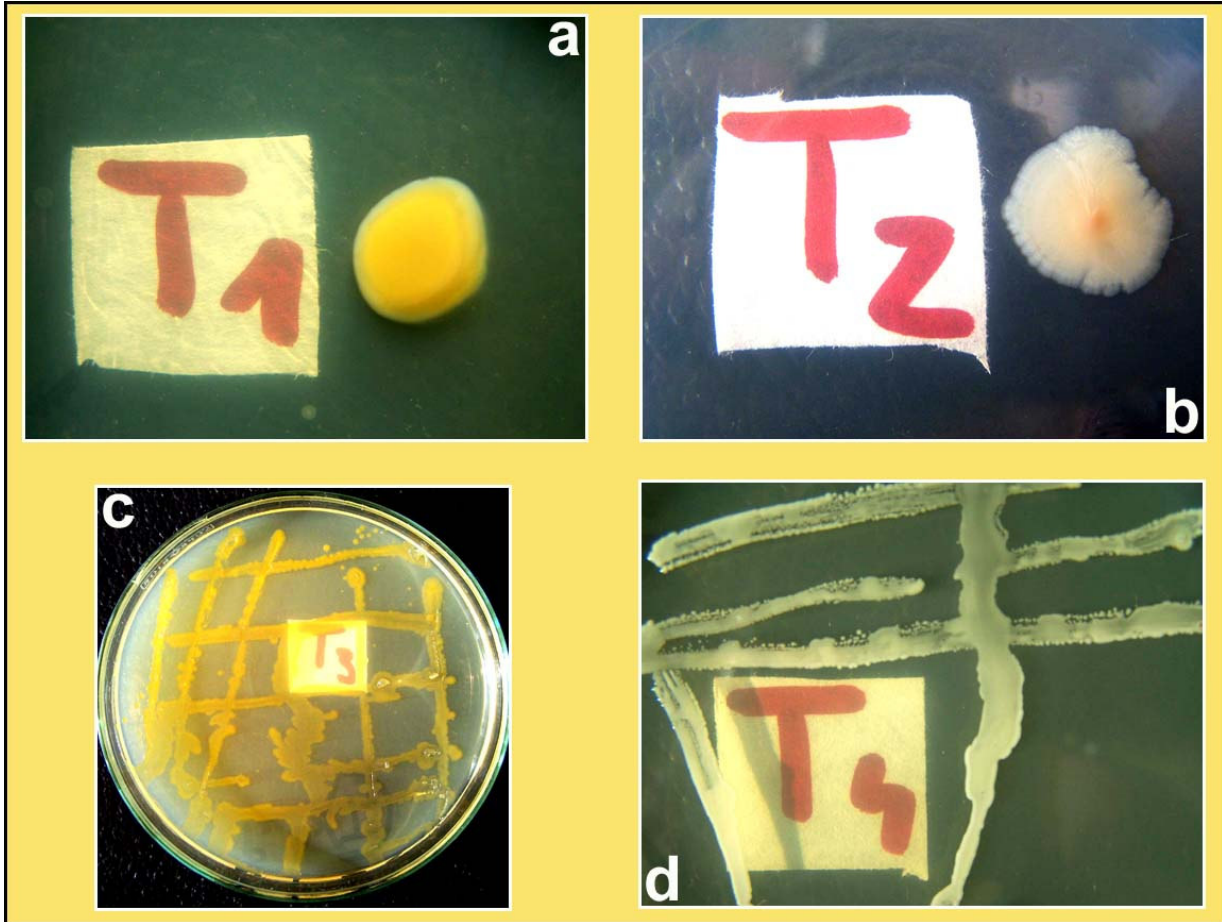
ANNEXE I

Fig. 8.1.1.1.2. a. Colonies de *Acidithiobacillus ferrooxidans* sur le milieu de culture 9K solide vues à l'œil; b. Colonie de *A. ferrooxidans* à la loupe binoculaire (grossissement 10 x 4,5).



ANNEXE II

Fig. 8.1.1.2.1. a., b., c., d. Types d'hétérotrophes isolés sur un milieu de culture gélose simple de la flaque aux dépôts.



ANNEXE III

Fig. 8.1.1.3.1. Actinomycetes isolés sur un milieu de culture Manning dans les stalactites mucilagineuses.

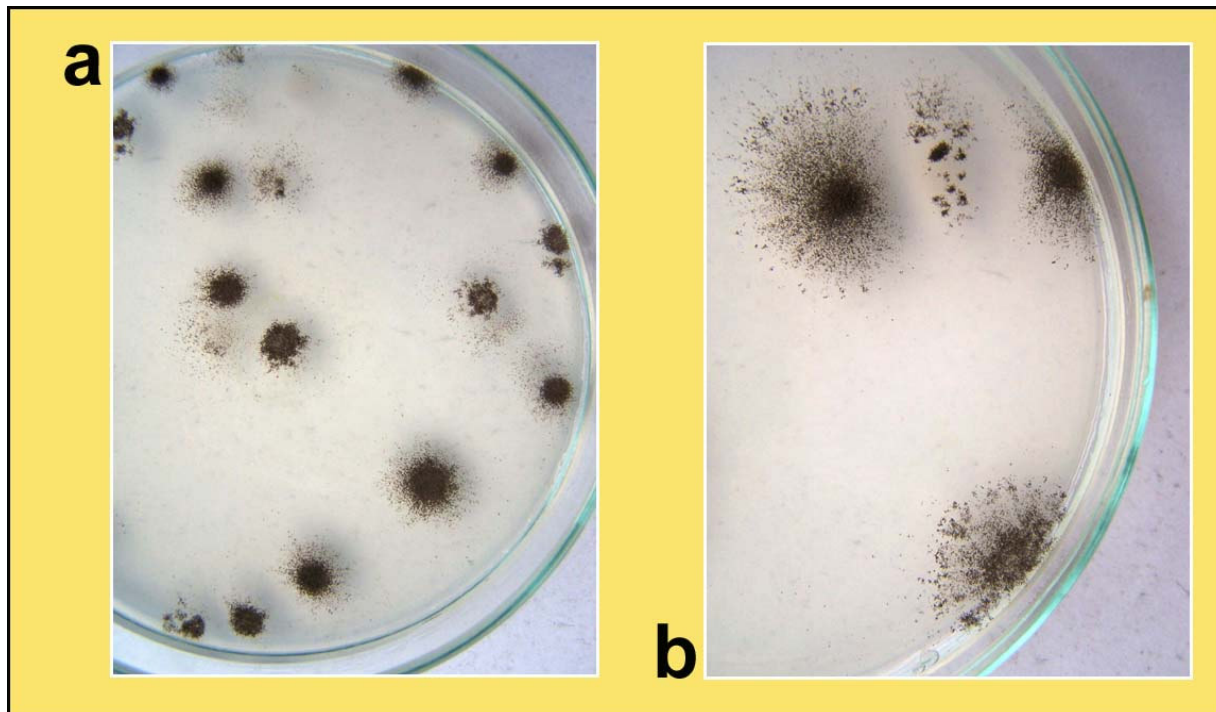


Fig.8.1.1.4.1. a., b. Champignons isolés sur un milieu de culture Czapeck.



ANNEXE VI

Tableaux 8.1.4.1. Les valeurs des coefficients de corrélation r_{\max} pour différents grades de liberté (GL) et probabilités de transgression α (p) (le test bilatéral) (Erna Weber, 1961).
GL = n - 2 (n = no. de paramètres corrélé).

GL (n-2)	$\alpha = 10\%$	$\alpha = 5\%$	$\alpha = 1\%$	$\alpha = 0,5\%$	$\alpha = 0,1\%$
1	0,988	0,997	1,000	1,000	1,000
2	0,900	0,950	0,990	0,995	0,999
3	0,805	0,878	0,959	0,974	0,991
4	0,729	0,811	0,917	0,942	0,974
5	0,669	0,755	0,875	0,906	0,951
6	0,621	0,707	0,834	0,870	0,925
7	0,582	0,666	0,798	0,836	0,898
8	0,549	0,632	0,765	0,805	0,872
9	0,521	0,602	0,735	0,776	0,847
10	0,497	0,576	0,708	0,750	0,823
11	0,476	0,553	0,684	0,726	0,801
12	0,457	0,532	0,661	0,703	0,780
13	0,441	0,514	0,641	0,683	0,760
14	0,426	0,497	0,623	0,664	0,742
15	0,412	0,482	0,606	0,647	0,725
16	0,400	0,468	0,590	0,631	0,708
17	0,389	0,456	0,575	0,616	0,693
18	0,378	0,444	0,561	0,602	0,679
19	0,369	0,433	0,549	0,589	0,665
20	0,360	0,423	0,537	0,576	0,652
25	0,323	0,381	0,487	0,524	0,597
30	0,296	0,349	0,449	0,484	0,554
35	0,275	0,325	0,418	0,452	0,519
40	0,257	0,304	0,393	0,425	0,490
45	0,243	0,288	0,372	0,403	0,465
50	0,231	0,273	0,354	0,384	0,443
60	0,211	0,250	0,325	0,352	0,408
70	0,195	0,232	0,302	0,327	0,380
80	0,183	0,217	0,283	0,307	0,357
90	0,173	0,205	0,267	0,290	0,338
100	0,164	0,195	0,254	0,276	0,321
125	0,147	0,174	0,228	0,248	0,289
150	0,134	0,159	0,208	0,227	0,264
200	0,116	0,138	0,181	0,197	0,230
300	0,095	0,113	0,148	0,161	0,188
400	0,082	0,098	0,128	0,140	0,164
500	0,074	0,088	0,115	0,125	0,146
600	0,067	0,080	0,105	0,114	0,134
700	0,062	0,074	0,097	0,106	0,124
800	0,058	0,069	0,091	0,099	0,116
900	0,055	0,065	0,086	0,093	0,109
1000	0,052	0,062	0,081	0,089	0,104

TABLE DES MATIÈRES DE LA THÈSE

Introduction.....	1
1. Milieux extrêmes de vie. Objet de l'étude et importance des recherches de la thèse	1
2. Organisation de la thèse	2
Partie I. Questions générales sur la microbiologie du fer et du soufre	
Chapitre 1. Physiologie et activité biochimique des ferrobactéries.....	3
1.1. Distribution du fer dans l'écorce terrestre	3
1.2. Propriétés géochimiques importantes	3
1.3. Importance biologique du fer	3
1.3.1. Fonctions du fer dans les cellules	3
1.3.2. Assimilation du fer par les micro-organismes	4
1.4. Le fer - source d'énergie pour les bactéries	4
Acidophiles (<i>A. ferrooxidans</i>) et autres bactéries acidophiles oxydantes du fer	4
1.5. Fe(III) comme accepteur final d'électrons dans la respiration bactérienne	11
1.5.1. Réduction bactérienne du Fe ³⁺ accompagnant la fermentation	12
1.5.2. Respiration du Fe ³⁺	12
1.5.3. Bioénergétique de la réduction désassimilatoire du Fe	13
1.5.4. Réduction du Fe ³⁺ par les Fonges	14
1.5.5. Types de composés ferriques attaqués via la réduction désassimilatrice du Fe	14
1.5.6. Oxydation non enzymatique et réduction du Fe ³⁺ par les micro-organismes	15
1.5.7. Précipitation microbienne du fer	16
1.6. Concept de ferrobactérie	17
1.7. Dépôts sédimentaires de fer d'origine biogène	17
1.8. Mobilisation microbienne du fer des minéraux se trouvant dans les minerais, le sol et les sédiments	19
1.9. Micro-organismes et le cycle du fer	20
1.10. Corrosion bactérienne des métaux	22
1.10.1. Corrosion bactérienne anaérobie	22
1.10.2. Production de l'aération différentielle sous l'action de la biomasse bactérienne et des précipités d'hydroxyde ferrique	23
1.10.3. Corrosion oxydative	23
Chapitre 2. Bases théoriques de l'action des micro-organismes dans le circuit du soufre...25	
2.1. Présence du soufre dans l'écorce terrestre	25
2.2. Propriétés du soufre importantes de point de vue géomicrobiologique	25
2.3. Importance biologique du soufre	26
2.4. Minéralisation des composés organiques du soufre	26
2.5. Assimilation du soufre	27
2.6. Types de bactéries réagissant avec le soufre et ses composés	28
2.7. Oxydation microbienne des formes réduites de soufre	32
2.8. Croissances autotrophe et mixotrophe sur des formes réduites de soufre	39
2.9. Respiration anaérobie avec des formes oxydées du soufre comme accepteurs finaux d'électrons	41
2.10. Métabolismes autotrophe, mixotrophe, hétérotrophe des bactéries sulforéductrices	44
2.11. Biodépôt du soufre natif	48
2.12. Micro-organismes et circuit du soufre	49
2.13. Biogénèse et biodégradation des minerais sulfureux	50
2.13.1. Origine des sulfures métalliques	51
2.13.2. Formation des sulfures métalliques	52
2.13.3. Bio-oxydation des sulfures métalliques	52

Partie II. Zone minière d’Oravița. La mine Kiesberg	
Chapitre 3. Caractéristiques physico-géographiques et climatiques de la zone étudiée.....	56
4.1. Caractéristiques physico-géographiques	56
4.2. Caractéristiques climatiques de la zone d’Oravița	57
4.2.1. Température de l’air	58
4.2.2. Humidité	58
4.2.3. Mouvements de l’air	59
Chapitre 4. Historique de l’exploitation minière dans la zone d’Oravița.....	60
Historique de l’exploitation minière dans la zone d’Oravița	60
3.1. Historique des mines d’or de la zone d’Oravița	60
Chapitre 5. Caractéristiques géologiques de la zone étudiée.....	63
5.1. Contexte géologique régional de la zone d’Oravița	63
5.1.1. Cristallin du Domène Gétique	63
5.1.2. Cristallin du Domène Supragétique	63
5.1.3. Formations paléozoïques	65
5.1.4. Formations post-tectoniques	66
5.1.4.1. Magmatites paléogènes	66
5.1.4.2. Roches de contact	67
5.1.5. Substances minérales utiles	67
5.1.6. Éléments structuraux	69
5.2. Gisement Policarpus. Mine Kiesberg	69
Chapitre 6. Sites établis pour les analyses.....	71
6.1. Présentation générale de la mine Kiesberg	71
6.1.1. Morphologie de la cavité Kiesberg	71
6.1.2. Caractéristiques spéo-climatiques de la cavité	72
6.2. Présentation macroscopique des sites	73
6.2.1. „Stalactites polychromes”	73
6.2.2. Stalactites mucilagineuses. Écoulements pariétaux mucilagineux. Écoulements de plancher mucilagineux	75
6.2.3. La flaque aux dépôts: A. Dépôt rouge; B. Dépôt blanc	78
6.2.4. Les „Formations pâteuses”	79
Partie III. Recherches effectuées sur les sites de la mine Kiesberg. Techniques utilisées	
Chapitre 7. Analyses chimiques effectuées.....	81
7.1. Techniques utilisées lors des analyses quantitatives et qualitatives	81
7.2. Résultats des analyses chimiques	82
Chapitre 8. Déterminations microbiologiques.....	84
8.1. Méthodes utilisées	84
8.1.1. Méthodes de séparation des micro-organismes	85
8.1.1.1. Bactéries chimiolithotrophes acidophiles du genre <i>Acidithiobacillus</i>	85
8.1.1.2. Bactéries hétérotrophes acidophiles aérobies et facultativement anaérobies	86
8.1.1.3. Actinomycètes	87
8.1.1.4. Deutéromycètes	87
8.1.2. Méthodes d’évaluation quantitative	88
8.1.2.1. Méthode „serial and-point dilution”	88
8.1.2.2. Méthode du dénombrement des colonies bactériennes	88
8.1.3. Méthodes d’évaluation qualitative	89
8.1.3.1. Détermination indirecte des espèces de <i>Acidithiobacillus</i> par le mesurage du pH des cultures. Déterminations et analyses numériques	89

8.1.3.2. Déterminations génétiques	90
8.1.4. Méthodes d'analyse statistique	92
8.2. Données obtenues	94
8.2.1. Stalactites polychromes	94
8.2.2. Formations mucilagineuse	106
8.2.3. Flaque aux dépôts	123
Partie IV. Étude électromicroscopique des échantillons	
Chapitre 9. Méthodes de travail utilisées à la préparation des échantillons.....	145
9.1. Préparation des échantillons pour la microscopie électronique à transmission (M.E.T.)	145
9.2. Préparation des échantillons pour la microscopie électronique à balayage (M.E.B.)	148
9.3. Préparation des échantillons pour la cryo-M.E.B.	149
Chapitre 10. Aspects électromicroscopiques, analyses E.D.S.....	151
10.1. Architecture électromicroscopique des „stalactites polychromes”.	151
10.2. Architecture électromicroscopique des formations mucilagineuses (stalactites, écoulements pariétaux et écoulements de plancher)	160
10.3. Architecture électromicroscopique de la flaque aux dépôts (dépôt rouge et dépôt blanc)	183
10.4. Architecture électromicroscopique des „Formations pâteuses”	186
Partie V. Mécanismes métaboliques à la base de l'apparition des formations étudiées	
Chapitre 11. Processus et mécanismes métaboliques.....	190
11.1. Mécanismes métaboliques à la base de la formation des stalactites polychromes	190
11.2. Processus ayant lieu dans les formations mucilagineuses	201
11.3. Processus ayant lieu dans la flaque aux dépôts	218
11.4. Processus ayant lieu dans les „Formations pâteuses”	221
Partie VI. Utilisation pratique des consortiums dans le déferrement et le démanganèment des eaux de forage	
Chapitre 12. Expérimentation dans des colonnes aérées.....	223
12.1. Formation des colonnes	224
12.2. Inoculation et amorçage des colonnes	225
12.3. Expérimentation et mesurage des paramètres	225
12.4. Architecture électromicroscopique du biofilm	228
12.5. Conclusions de l'expérience	229
Conclusions.....	231
Bibliographie.....	234
Annexes.....	250

Bibliographie

- Ahmann, D., Roberts, A. L., Krumholz, F., Morel, F. M. M. (1994) Microbe grows by reducing arsenic. *Nature*, **371**, 750.
- Aminuddin, M. D., Nicholas, J. D. (1974) Electron transfer during sulfide and sulfite oxidation in *Thiobacillus denitrificans*. *J. Gen. Microbiol.*, **82**, 115-123.
- Anbar, A. D., Holland, H. D. (1992) The photochemistry of manganese and the origin of banded iron formation. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **56**, 2595-2603.
- Anderson, K. J., Lundgren, D. G. (1969) Enzymatic studies of the iron-oxidizing bacterium, *Ferrobacillus ferrooxidans*: Evidence for a glycolytic pathway and Krebs cycle. *Can. J. Microbiol.*, **15**, 73-79.
- Aristovskaya, T. V., Zavarzin, G. A. (1971) Biochemistry of iron in soil, In: A. D. McLaren and J. Skujins, eds. *Soil Biochemistry*, Vol. 2 Marcel Dekker, New York, pp. 385-408.
- Arnold, R. G., Olson, T. M., Hoffmann, M. R. (1987) Kinetics and mechanism of disimilativ Fe(III) reduction by *Pseudomonas* sp. 200. *Biotech. Bioeng.*, **28**, 1657-1671.
- Avakyan, Z. A., Pivovarova, T. A., Karavaiko, G. I. (1986) Properties of a new species, *Bacillus mucilaginosus*. *Mikrobiologiya*, **55**, 477-482 (Engl. Transl. Pp. 369-374).
- Baas Becking, L. G. M., Parks, G. S. (1927) Energy relations in the metabolism of autotrophic bacteria. *Physiol. Rev.*, **7**, 85-106.
- Baas Becking, L. G. M., Kaplan, I. R. (1956) The microbiological origin of the sulfur nodules of Lake Eyre. *Trans. Roy. Soc. S. Aust.*, **79**, 62-65.
- Baas Becking, L. G. M., More, D. (1961) Biogenic sulfides. *Econ.Geol.*, **56**, 259-272.
- Bak, F., Pfennig, N. (1987) Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio sulfodismutans* sp. nov. By disproportionation of inorganic sulfur compounds. *Arch. Microbiol.*, **147**, 184-189.
- Baker, B. J., Banfield, J. (2003) Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiology Ecology*, **44(2)**, 139-152.
- Balashova, V. V., Zavarzin, G. A. (1979) Anaerobic reduction of ferric iron by hydrogen bacteria. *Mikrobiologiya*, **48**, 773-778 (Engl. Transl. Pp.635-639).
- Balashova, V. V., Vedenina, I. Ya., Markosyan, G. E., Zavarzin G. A. (1980) The autotrophic growth of *Leptospirillum ferrooxidans*. *Mikrobiologiya*, **43**, 581-585 (Engl. Transl. pp.491-494).
- Baltimore, H., Zycha, R., Siepmann. (1969) *Mucorales*, eine beschreibung aller Gattungen und Arten dieser Pilzgruppe, Verlag von J. Cramer.
- Banks, D., Younger, P. L., Arnesen R-T., Iversen E. R., Banks, S. B. (1997) Mine-water chemistry: the good, the bad and the ugly. *Environ. Geology*, **32(3)**, 157- 174.
- Báthory, L. (1973) Procesul de refacere a industriei metalurgice în România după primul război mondial (1919-1924), în „*Studia Universitatis Babeş-Bolyai*”, **XVIII**, **2**, p. 109-144.
- Báthory, L. (1968) Dezvoltarea industriei extractive a metalelor prețioase după Unirea Transilvaniei cu România, 1918-1939, în „*Anuarul Institutului de Istorie și Arheologie*”, Cluj, **XI**, p. 159-170.
- Bărbat, T. (1940) Recherches magnétiques dans la région de Cârnecea-Calina (Départtement de Caraș), pendant l'année 1934, în „*Comptes Rendus des Sèances de l'Institut Géologiques de Roumanie*”, **XXIII**, p. 117-123; Idem, Recherches magnétiques dans la région d'Oravița (Prisaca-Ogașul Coșovița), département de Caraș, în *Ibidem*, **XXIV**, p. 4-10.
- Berner, R. A. (1962) Experimental studies of the formation of sedimentary iron sulfides. In: M. L. Jensen, ed. *Biogeochemistry of Sulfur Isotopes*. Yale University Press, New Haven, pp. 107-120.
- Berthelin, J., Kogblevi, A. (1974) Influence de l'engorgement sur l'altération microbienne des miné raux dans les sols. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, **11**, 499-509.
- Biebl, H., Pfennig, N. (1977) Growth of sulfate-reducing bacteria with sulfur as electron acceptor. *Arch. Microbiol.*, **112**, 115-117.
- Blake, R. C., Waskovsky, J., Harrison, A. P. Jr. (1993) Respiratory components in acidophilic bacteria that respire on iron. *Geomicrobiol. J.*, **10**, 173-192.
- Bleahu, M., Decu, V., Negrea, St., Pleșa, C., Povară I., Viehmann, I. (1976) Peșteri din România, Ed. *Științifică și Enciclopedică*, București.

- Bloomfield, C. (1951) Experiments on the mechanism of gley formation. *J. Soil Sci.*, **2**, 196-211.
- Bloomfield, C. (1953) A study of podzolization, Part I. The mobilization of iron and aluminum by Scots pine needles, *J. Soil Sci.*, **4**, 5-16.
- Bonatti, E. (1978) The origin of metal deposits in the oceanic lithosphere. *Sci. Am.*, **238**, 54-61.
- Bontea, V. (1986) Ciuperce parazite și saprofite din România. vol **II**, București, pp.338.
- Booth, G. H. (1971) Microbiological corrosion. *Mills and Boon Limited*, London.
- Booth, C. (1971) The genus *Fusarium*, Institute Kew, England.
- Bowen, H. J. M. (1979) Environmental Chemistry of the Elements. *Academic Press*, London.
- Brierley, J. A. (1985) Thermophilic iron oxidizing bacteria found in copper leaching dumps. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 523-525.
- Brierley, C. L., Murr, L. E. (1973) Leaching: use of thermophilic chemoautotrophic microbe. *Science*, **179**, 488-490.
- Brock, T. D., Brock, K. M., Belly, R. T., Weiss, R. L. (1972) *Sulfolobus*: A new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch. Microbiol.*, **84**, 54-68.
- Brock, T. D., Madigan M. T. (1988) Biology of Microorganisms, **5th ed.** Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Brooks, R. R., Kaplan, I. R. (1972) Biogeochemistry. In: *The Encyclopedia of Geochemistry and Environmental Sciences, Encyclopedia of Earth Sciences Series*. Vol. **IVa**, 74-82 Van Nostrand Reinhold, New York.
- Bromfield, S. M. (1953) Sulfate reduction in partially sterilized soil exposed to air. *J. Gen. Microbiol.*, **8**, 378-390.
- Buchanan, R. E., Gibbons, N. E. (eds. 1974) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, **8th ed.** Williams and Wilkins, Baltimore.
- Burdige, D. J. (1993) The biogeochemistry of manganese and iron reduction in marine sediments. *Earth-Sci. Rev.*, **35**, 249-284.
- Burggraf, S., Jannasch, H. W., Nicolaus, B., Stetter, K. O. (1990) *Acheoglobus profundus* sp. nov., represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, **13**, 24-28.
- Caccavo, F. Jr., Blakemore, R. P., Lovley, D. R. (1992) A hydrogenoxidizing, Fe(III)-reducing microorganism from the Great Bay Estuary, New Hampshire. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3211-3216.
- Caccavo, F. Jr., Lonergan, D. J., Lovley, D. R., Davis, M., Stolz, J. F., McInerney, M. J. (1994) *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3752-3759.
- Carlson, L., Lindstroem, E. B., Hallberg, K. B., Touvinen, O. H. (1992) Solid-phase products of bacterial oxidation of arsenical pyrite. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1046-1049.
- Ceapoiu, N. (1968) Metode statistice aplicate în experiențele agricole și biologice, *Ed. Agro-Silvică*, București.
- Chapelle, F.H. (1993) Ground-water microbiology and geochemistry. John Wiley and Sons, New York.
- Charles, A. M., Suzuki, I. (1966) Mechanism of thiosulfate oxidation by *Thiobacillus novellas*. *Biochim. Biophys. Acta*, 510-521.
- Cholodny, N. (1924) Zur Morfologie der Eisenbakterien *Gallionella* und *Spirophyllum*. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **42**, 35-44.
- Cloud, P. E. Jr. (1973) Paleogeological significance of the banded-iron-formation. *Econ. Geol.*, **68**, 1135-1143.
- Cioflica, G., Savu, H., Borcoș, M., Stefan, A., Istrate, G. (1973) Alpine Volcanism and Metallogenesis in the Apuseni Mountains. Guide to excursion **3AB**, Symposium "Volcanism and Metallogenesis". Inst. Geol. and Geophys., Bucharest, 70 p.
- Cioflica, G., Vlad, N. S. (1973) Contributions a la connaissance des types structuraux de pyrometasomatites laramiens de Roumanie. *Rév. roum. géol., géophys., géogr., ser. géol.*, **17(1)**, 3-13, București.

- Ciulca, S. (2006) Metodologii de experimentare în agricultură și biologie. *Ed. Agroprint*, Timișoara.
- Codarcea, Al. (1931) Studiul geologic și petrografic al regiunii Ocna de Fier-Bocșa Montană (jud.Caraș, Banat). *An.Inst.Geol.Rom.*, **XV**, 1-424, București.
- Codarcea, Al. (1967) Mineralogie, *Ed Didactică și Pedagogică*, București.
- Cohen, Y., Krumbein, W. E., Shilo, M. (1977) Solar Lake (Sinai). Stromatolitic cyanobacterial mats. *Limnol.Oceanogr.*, **22**, 635-656.
- Coleman, M. L., Hedrick, D. B., Lovley, D. R., Whrite, D. C., Pye, K. (1993) Reduction of Fe(III) in sediments by sulfat-reducing bacteria. *Nature (Lond.)*, **361**, 436-438.
- Colmer, A. R., Temple, K. L. (1950) An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. *J. Bacteriol.*, **59(3)**, 317-28.
- Constantinof, D. (1957-1959) planșa nr. **5** – sc. 1:50 000, *arhiva Caransebeș*.
- Crăciun, C. (2000) Mineralele argiloase din sol. Implicații în agricultură, *Editura G.N.P. Minischool* București.
- Crerar, D. A., Knox, G. W., Means, J. L. (1979) Biogeochemistry of bog iron in the New Jersey Pine Barrens. *Chem. Geol.*, **24**, 111-135.
- Cunningham, K. I., Northup, D. E., Pollastro, R. M., Wright, W. G., LaRock, E. J. (1995) Bacteria, fungi and biokarst in Lechuguilla Cave, Carlsbad Caverns National Park, New Mexico. *Environ. Geol.*, **25**, 2-8.
- David, I. (1998) *Grundwasserhzdraulik, Stromungs-und Transportvorgänge*, Braunschweig, Wiesbaden, Vieweg.
- David, I. (2006) In situ treatment of groundwater containing high iron concentration, Institute of Numerical Methods and Informatics in Civil Engineering Petersenstrabe, Darmstad.
- David, I., Wilhelm, U., Manuel, S. (2005) Entwicklung und Bereitstellung eines Mathematisch-Numerischen Prognoseinstrumentariums zur Simulation subterrestrischer Aufbereitungsprozesse im Grundwasser, gefordert durch die Fritz und Margot Faudi-Stiftung, Frankfurt am Main, Bewilligungs-Nr.64, Darmstadt.
- water. *IAHS Pub.*, **220**, 439-447.
- Davis, E. A., Johnson, E. J. (1967) Phosphorylation coupled to the oxidation of sulfide and 2-mercaptoethanol in extracts of *Thiobacillus thioeparus*. *Can. J. Microbiol.*, **13**, 873-884.
- Dévigne, J-P. (1968) Precipitation du sulfure de plomb par un micrococcus tellurique. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **267**, 935-937.
- Dévigne, J-P. (1973) Une métalogenèse microbienne probable en milieux sédimentaires: celle de la galène. *Cah. Geol.* No. **89**, pp. 35-37.
- Din, G. A., Suzuki, I., Lees, H. (1976) Ferrous iron oxidation by *Ferrobacillus ferrooxidans*. Purification and properties of Fe⁺⁺-cytosome c reductase. *Can. J. Biochem.*, **45**, 1523-1546.
- Din, G. A., Suzuki, I., Lees, H. (1976) Carbon dioxide fixation and phosphoenolpyruvate carboxylase in *Ferrobacillus ferrooxidans*. *Can. J. Microbiol.*, **13**, 1413-1419.
- Domsch, K. H., Gams, W. (1972) *Fungi in agricultural soil*, *Mills and Boon Limited*, London.
- Donald G., Davis, M., Palmer, V., Arthur N. (1990) Extraordinary Subaqueous Speleothems in Lechuguilla Cave, New Mexico, *National Speleological Society*, **52(1)**, 70-86.
- Douca, N. (1986) Istoria exploatării zăcămintelor aurifere din zona Oravița. comunicare susținută la Simpozionul „*Minerit și metalurgie*”, Bocșa.
- Drake, H. L., Akagi, J. M. (1978) Dissimilatory reduction of bisulfite by *Desulfovibrio vulgaris*. *J. Bacteriol.*, **136**, 916-923.
- Drăgan-Bularda, M. (1983) *Lucrări practice de microbiologie generală*, Universitatea „Babeș-Bolyai”, Cluj-Napoca.
- Drăgan-Bularda, M. (2000) *Microbiologie generală, Lucrări practice*, Cluj-Napoca.
- Drăgan-Bularda, M., Kiss, Ș. (1986) *Microbiologia solului*, Univ. Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca.
- Dubina, G. A. (1978) Mechanism of the oxidation of divalent iron and manganese by iron bacteria growing at a neutral pH of the medium. *Mikrobiologiya*, **47**, 591-599, (Engl. Transl. 471-478).

- Dubina, G. A. (1978) Functional role of bivalent iron and manganese oxidation in *Leptotrix pseudoochracea*. *Mikrobiologiya*, **47**, 783-789, (Engl. Transl. 631-636).
- Eckhardt, F. E. W. (1980) Microbial degradation of silicates. Release of cation from aluminosilicate minerals by yeasts and filamentous fungi, pp. 107-116, *In*: T. A. Oxley, G. Becker, D. Allsopp, eds. Biodeterioration. The Proceedings of the Fourth International Biodeterioration Symposium, Berlin. Pitman, London.
- Edwards, K. J., Bond, P. L., Gihring, T. M., Banfield, J. F. (2000) An Archaeal Iron-Oxidizing Extreme Acidophile Important in Acid Mine Drainage. *Science*, **287**(5459), 1796 – 1799.
- Egovora, A. A., Deryugina, Z. P. (1963) The spore forming thermophilic thiobacterium: *Thiobacillus thermophilica*. *Imschenetskii nov. Spec. Mikrobiologiya*, **32**, 439-446.
- Ehrlich, H. L. (1995) Geomicrobiology, Marcel Dekker, Inc., New York Basel, pp.312-602.
- Ehrlich, H. L. (1993) Bacterial mineralization of organic carbon under anaerobic conditions, *In*: J-M. Bollag and G. Stotzky, eds. Soil Biochemistry, Vol. **8**. Marcel Dekker, New York, pp. 219-247.
- Ehrlich, H. L., Fox, S. I. (1967) Copper sulfide precipitation by yeasts from acid mine-waters. *Appl. Microbiol.*, **15**, 135-139.
- Ehrlich, H. L., Yang, S. H., Mainwaring, J. D. (1973) Bacteriology of manganese nodules. VI. Fate of copper, nickel and cobalt, and iron during bacterial and chemical reduction of the manganese (IV). *Z. Allg. Mikrobiol.*, **13**, 39-48.
- Ellis, M. B. (1976) More Dematiaceous Hyphomycetes, *Elsevier Biomedical Press*. London.
- Emerson, D., Ghiorse, W. C. (1993) Ultrastructure and chemical composition of the sheath of *Leptothrix discophora* SP-6. *J. Bacteriol.*, **175**, 7808-7818.
- Emerson, D., Ghiorse W. C. (1993) Role of disulfide bonds in maintaining the structural integrity of the sheath of *Leptothrix discophora* SP-6. *J. Bacteriol.*, **175**, 7819-7827.
- Ernst, J. F., Winkelman, G. (1977) Enzymatic release of iron from sideramines in fungi NADH: sideramine oxidoreductase in *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta*, **500**, 27-41.
- Fauque, G., LeGall, J., Barton, L. L. (1991) Sulfate-reducing and sulfur-reducing bacteria, *In*: J.M. Shively and L., L., Barton, eds. Variation in Autotrophic Life. Academic Press, London, pp. 271-337.
- Ferris, F. G., Schultze, S., Witten, T. C., Fyfe, W. S., Beveridge, T. J. (1989) Metal interactions with microbial biofilms in acidic and neutral pH environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1249-1257.
- Frankel, R. B., Papaefthymiou, C. G., Blakemore, R. P., O'Brien, W. (1983) Fe₃O₄ precipitation in magnetotactic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **763**, 147-159.
- Freney, J. R. (1967) Sulfur-containing organics. *In*: A.D. McLaren and G.H. Petersen, eds. *Soil Biochemistry*, Marcel Dekker, New York, pp. 229-259.
- Freney, J. R., Lazaroff, N., Packer, L. (1977) Sulfate-dependent iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*: Characterization of a new EPR detectable electron transport component on the reducing side of rusticyanin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **246**, 650-654.
- Fry, N. K., Fredrickson, J. K., Fishbain, S., Wagner, M., Stahl, D. A. (1997) Population structure of microbial communities associated with two deep, anaerobic, alkaline aquifers. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(4), 1498-1504.
- Fukumori, Y., Yano, T., Sato, A., and Yamanaka, T. (1988) Fe(II)-oxidizing enzyme purified from *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **50**, 169-172.
- Fuller, C. C., Davis, J. A., Waychunas, G. E. (1993) Surface chemistry of ferrihydrite: Part 2 Kinetics of arsenic adsorption and coprecipitation. *Geochim. cosmochim. Acta*, **57**, 2271-2282.
- Gadd, G. M. (2004) Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, **122**, 109-119.
- Gale, N. L., Beck, J. V. (1967) Evidence for the Calvin cycle and hexose monophosphate pathway in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.*, **94**, 1052-1059.
- Garlick, S., Oren, A., Padan, E. (1977) Occurrence of facultative anoxygenic photosynthesis among filamentous and unicellular cyanobacteria. *J. Bacteriol.*, **129**, 623-629.
- Garrity G. M., Bell, J. A., Lilburn, T. G. (2004) Taxonomic outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Springer New York, U.S.A.

- Geldreich, E.E. (1990) Microbiological quality of source waters for water supply. pp. 3-31 in: G. A. McFeters (ed.) *Drinking Water Microbiology: Progress and Recent Developments*. Springer-Verlag, New York.
- Ghiorse, W. C. (1984) Biology of iron- and manganese-depositing bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **38**, 515-550.
- Ghiorse, W. C. (1988) Microbial reduction of manganese and iron. In: A. J. B. Zehnder, ed. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Wiley, New York, pp. 305-331.
- Ghiorse, W. C., Ehrlich, H. L. (1992) Microbial biomineralization of iron and manganese. In: H. C. W. Skinner and R. W. Fitzpatrick (eds.). *Biomineralization. Process of Iron and Manganese. Modern and Ancient Environments*. Catena Supplement 21. Catena Verlag, Cremlingen, Germany, pp. 75-99.
- Goldschmidt, V. M. (1954) *Geochemistry*, Clarendon Press, Oxford, U.K., pp. 621-642.
- Goldsmith, D. (1997) The hunt for life on Mars. *Penguin Group*, Toronto, Canada.
- Gräf, R. (1996) Domeniul bănăţean al StEG, 1855-1920, Reşiţa, *Editura Banatica*, p. 41;
- Gräf, R. (1987) Mineritul și metalurgia bănăţeană la mijlocul secolului XIX. comunicare susţinută la *Simpozionul de Istorie Naţională*, Deva.
- Guay, R., Silver, M. (1975) *Thiobacillus acidophilus* sp. nov., isolation and some physiological characteristics. *Can. J. Microbiol.*, **21**, 281-288.
- Hake, R., Waskovsky, J., Harrison, A. P. Jr. (1992) Respiratory components in acidophilic bacteria that respire on iron. *Geomicro-biol. J.*, **10**, 173-192.
- Hallberg, K. B., Coupland, K., Kimura, S., Johnson, D. B. (2006) Macroscopic Streamer Growths in Acidic, Metal-Rich Mine Waters in North Wales Consist of Novel and Remarkably Simple Bacterial Communities. *Appl Environ Microbiol.*, **72(3)**, 2022–2030.
- Hallbeck, L., Pedersen., K. (1990) Culture parameters regulating stalk formation and growth rate of *Gallionella ferruginea*. *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 1675-1680.
- Hallbeck, L., Pedersen., K. (1991) Autotrophic and mixotrophic growth of *Gallionella ferruginea*. *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 2657-2661.
- Hanert, H. (1974) Untersuchungen zur individuellen Entwicklungskinetik von *Gallionella ferruginea* in statischer Mikrokultur. *Arch. Mikrobiol.*, **96**, 59-74.
- Hanert, H. H. (1981) The genus *Gallionella*. pp. 509-515, In: M.P. Starr, H. Stolp, H. G. Trueper, A. Balows, H. G. Schlegel, *The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolations, and Identification of Bacteria*, Springer-Verlag, Berlin.
- Hansen, T. A., van Gernerden, H. (1972) Sulfide utilization by purple sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.*, **86**, 49-56.
- Hansen, T. A., Veldkamp, H. (1973) *Rhodospseudomonas sulfidophila* nov. spec a new species of the purple nonsulfur bacteria. *Arch. Mikrobiol.*, **92**, 45-58.
- Harder, E. C. (1919) Iron depositing bacteria and their geologic relations. *U. S. Geol. Surv. Prof. Pap.*, **113**, pp. 89.
- Harrison, A. G., Thode, H. (1957) The kinetic isotope effect in the chemical reduction of sulfat. *Trans. Faraday Soc.*, **53**, 1-4.
- Harrison, A. P. Jr. (1986) The phylogeny of iron-oxidizing bacteria. In: H. L. Ehrlich and D. S. Holmes, eds. *Workshop on Biotechnology for the Mining, Metal-Refining and Fossil Fuel Processing Industries*. Wiley, New York, pp. 311-317.
- Harrison, A. P. Jr., Norris, P. R. (1985) *Leptospirillum ferrooxidans* and similar bacteria: some characteristics and genomic diversity. *FEMS Microbiol. Lett.*, **30**, 99-102.
- Heldal, M., Tumor, O. (1983) *Gallionella* form metalimnion in an eutrophic lake: morphology and X-ray energy-dispersive microanalysis of apical cells and stalks. *Can. J. Microbiol.*, **29**, 303-308.
- Holm, N. G. (1987) Biogenic influence on the geochemistry of certain ferruginous sediments of hydrothermal origin. *Chem. Geol.*, **63**, 45-57.
- Holthuijzen, Y. A., van Breemen, J. F. L., Kuenen, J. G., Konings, W. N. (1986) Electron microscopic studies of carboxysomes of *Thiobacillus neapolitanus*. *Arch. Microbiol.*, **144**, 258-262.
- Holthuijzen, Y. A., van Dissel-Emiliani, F. F. M., Kuenen, J. G., Konings, W. N. (1987) Energetic aspects of CO₂ uptake in *Thiobacillus neapolitanus*. *Arch. Microbiol.*, **147**, 285- 290.

- Huber, H., Stetter, K. O. (1989) *Thiobacillus prosperus* sp. nov., represents a new group of halotolerant metal-mobilizing bacteria isolated from a marine geothermal field. *Arch. Microbiol.*, **151**, 479-485.
- Hutchinson, M., Johnstone, K. I., White, D. (1966) Taxonomy of the acidophilic thiobacilli. *J. Gen. Microbiol.*, **44**(3), 373-381.
- Hutchinson, M., Johnstone, K. I., White, D. (1965) The taxonomy of certain thiobacilli. *J. Gen. Microbiol.*, **41**(3), 357-366.
- Hutchinson, M., Johnstone, K. I., White, D. (1967) Taxonomy of anaerobic thiobacilli. *J. Gen. Microbiol.*, **47**(1), 17-23.
- Ingledeu, W. J. (1982) *Thiobacillus ferrooxidans*. The bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. *Biochim. Biophys. Acta*, **683**, 89-117.
- Islam, F. S., Gault, A. G., Boothman, C., Polya, D. A., Charnock, J. M., Chatterjee, D., Lloyd, J. R. (2004) Role of metal-reducing bacteria in arsenic release from Bengal delta sediments. *Nature*, **430**, 68-71.
- Ivanov, M. V. (1968) Microbiological Processes in the Formation of Sulfur Deposits. Israel Program for Scientific Translation. U. S. Department of Agriculture and National Science Foundation, Washington, DC.
- Ivarson, C. K., Sojak, M. (1978) Microorganisms and ochre deposition field drains of Ontario. *Can. J. Soil Sci.*, **58**, 1-17.
- Iverson, W. P. (1968) Corrosion of iron and formation of iron phosphide by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Nature*, **217**, pp. 1265-1267.
- Jannasch, H. W., Taylor, C. D. (1984) Deep-sea microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.*, **38**, 487-514.
- Jannasch, H. W., Wirsén, C. O., Molyneux, S. J., Langworthy, T. A. (1988) Extremely fermentative archaeobacteria of the genus *Desulfurococcus* from deep-sea hydrothermal vents. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1203-1209.
- Janssen, P. H., Morgan, H. W. (1992) Heterotrophic sulfur reduction by *Thermotoga* sp. strain FjSS3B1. *FEMS Microbiol. Lett.*, **96**, 213-218.
- Jaynes, D. B., Rogowski, A. S., Pionke, H. B. (1984) Acid Mine Drainage From Reclaimed Coal Strip Mines 1. Model Description. *Water Resources Research*, **20**(2), 233-242.
- Johnson, D. B., Kelso, W. I. (1983) *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 29 - 69.
- Johnson, D. B., Kelso W. I. (1983) Detection of heterotrophic contaminants in cultures of *Thiobacillus ferrooxidans* and their elimination by subculturing in media containing copper sulfate. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 2969-2972.
- Johnson, D. B., McGinness, S. (1991) A highly efficient and universal solid medium for growing mesophilic and moderately thermophilic, iron-oxidizing acidophilic heterotrophic bacteria. *J. Microbiol. Methods*, **13**, 113-122.
- Johnson, D. B., Paula, Bacelar-Nicolau (1999) Leaching of Pyrite by Acidophilic Heterotrophic Iron-Oxidizing Bacteria in Pure and Mixed Cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(2), 585-590.
- Johnson, D. B., Rolfe, S., Hallberg, K. B., Iversen, E. (2001) Isolation and phylogenetic characterization of acidophilic microorganisms indigenous to acidic drainage waters at an abandoned Norwegian copper mine. *Environ. Microbiol.*, **3**(10), 630-637.
- Joly, P. (1964) The Genus *Alternaria*. *Ed. Lechevalier*, Paris.
- Jones J. G., Gardener, S., Simon, B. M. (1984) Reduction of ferric iron by heterotrophic bacteria in lake sediments. *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 45-51.
- Jones G. E., Starkey, R. L. (1957) Fractionation of stable isotope of sulfur by microorganisms and their role in deposition of native sulfur. *Appl. Microbiol.*, **5**, 111-118.
- Jørgensen, B. B. (1990) A thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments. *Science*, **249**, 152-154.
- Kaplan, I. R., Rittenberg, S. C. (1962) The microbiological fractionation of sulfur isotopes. In: M. L. Jensen, ed. Biogeochemistry of Sulfur Isotopes. N.S.F. Symposium, Yale University Press, New Haven, CT, pp. 80-93.

- Kaplan, I. R., Rittenberg, S. C. (1964) Microbiological fractionation of sulfur isotopes. *J. Gen. Microbiol.*, **34**, 195-212.
- Karavaiko, G. I., Avakyan., A. A. (1970) Mechanisms of *Thiobacillus ferrooxidans* multiplication. *Mikrobiologiya*, **39**, 950-952 (Engl, transl. pp. 383-398).
- Karavaiko, G. I., Avakyan., A. A., Krutsko, V. S., Mel'nikova, E. O. (1979) Microbiological investigations on a spodumene deposit. *Mikrobiologiya*, **48**, 502-508 (Engl, transl. pp. 833-836).
- Karavaiko., G. I., Rossi., G. I., Agate., G., Groudev, A. D., Avakzyan, S. N. (1988) Biotechnology of metals, Moscova.
- Kelly, D. P. (1982) Biochemistry of the chemolithotrophic oxidation of inorganic sulfur. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **298**, 499-528.
- Kelly, D. P., Jones., C. A. (1978) Factors affecting metabolism and ferrous iron oxidation in suspensions and batch cultures of *Thiobacillus ferrooxidans*: relevance to ferric iron leach solution regeneration. In: L. E. Murr, A. E. Torma, J. A. Brierley, eds. Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena. Academic Press, New York, pp. 19-44.
- Kelly, D. P., Lu, W-P., Poole, R. K. (1993) Cytochromes in *Thiobacillus tepidarius* and the respiratory chain involved in the oxidation of thiosulfate and tetrathionate. *Arch. Microbiol.*, 87-95.
- Kelly, D. P., Tuovinen., O. H. (1972) Recommendation that the names *Ferrobacillus ferrooxidans* Leathen and Braley and *Ferrobacillus sulfooxidans* Kinsel be recognized as synonymous of *Thiobacillus ferrooxidans* Temple and Colmer. *Int. J. Syst. Bacterid.*, **22**, 170-172.
- Kelly, D. P., Wood, A. P. (2000) Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**, 511-516.
- Kenneth., R., Fennell Doroty (1965) The genus *Asppergillus*, Baltimore.
- Koh, A. (1983) Methods of bacteriology, *F. Gerhard, et al (eds.)*, Mir, Moscow.
- Kovalenko, T. V., Karavaiko, G. I., Piskunov, V. P. (1982) Effect of Fe³⁺ ions in the oxidation of ferrous iron by *Thiobacillus ferrooxidans* at various temperatures. *Mikrobiologiya*, **51**, 156-160 (Engl, transl. pp. 142-146).
- Krul, I. M., Hirsch, P., Staley, J. T. (1970) *Toxothrix trichogenes* (Mol) Berger and Bingmann: The organism and its biology. *Antonie v. Leeuwenhoek*, **36**, 409-420.
- Kuenen, J. G., Beudeker, R. F. (1982) Microbiology of thiobacilli and other sulfur-oxidizing autotrophs, mixotrophs and heterotrophs. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **B298**, 473-497.
- Kuever, J., Kulmer, J., Janssen, S., Fischer, U., Blotvogel, K.-H. (1993) Isolation and characterization of a new spore-forming sulfate-reducing bacterium growing by complete oxidation of catechol. *Arch. Microbiol.*, **159**, 282-2881.
- Laishley, E. J., Krouse, H. R. (1978) Stable isotope fractionation by *Clostridium pasteurianum*. 2. Regulation of sulfite reductases by sulfur amino acids and their influence on sulfur isotope fractionation during SO₃²⁻ and SO₄²⁻ reduction. *Can. J. Microbiol.*, **24**, 716-724.
- Lazaroff, N. (1963) Sulfate requirement for iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 78-83.
- Lazaroff, N. (1977) The specificity of the anionic requirement for iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Microbiol.*, **101**, 85-91.
- Lazaroff, N. (1983) The exclusion of D₂O from the hydration sphere of FeSO₄.7H₂O oxidized by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Science*, **222**, 1331-1334.
- Lazaroff, N., Sigal, W., Wasserman, A. (1982) Iron oxidation and precipitation of ferric hydroxysulfates by resting *Thiobacillus ferrooxidans* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 924-938.
- Lazaroff, N., Melanson, L., Lewis, E., Santoro, N., Pueschel, C. (1985) Scanning electron microscopy and infrared spectroscopy of iron sediments formed by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Geomicrobiol. J.*, **4**, 231-268.
- Lăcătușu, R. (2000) Mineralogia și chimia solului., Editura Universității „Al. I. Cuza” Iași.
- Leblanc, M., Achard, B., Othman, D. B., Luck, J. M., Bertrand-Sarfati, J., Personné, J. Ch. (1996) Accumulation of arsenic from acidic mine waters by ferruginous bacterial accretions (stromatolites). *Applied Geochemistry*, **11(4)**, 541-554.
- Lee, J. S., Chon H. T. (2006) Hydrogeochemical characteristics of acid mine drainage in the vicinity of an abandoned mine, Daduk Creek, Korea, *Journal of Geochemical Exploration*, **88**, 37-40.

- Lieske, R., 1919, Zur Ernaehrungsphysiologie der Eisenbakterien. *Z. Bakt. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. II*, **49**, 413-425.
- Liu, C-L., Hart, N., Peck, H., D. Jr. (1982) Inorganic pyrophosphate: Energy source for sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfoto-maculum*. *Science*, **217**, 363-364.
- London, J. (1963) *Thiobacillus intermedius* nov. sp. a novel type of facultative autotroph. *Arch. Mikrobiol.*, **46**, 329-337.
- London, J., Rittenberg, S. C. (1964) Path of sulfur in sulfide and thio-sulfate oxidation by thiobacilli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **52**, 1183-1190.
- London, J., Rittenberg, S. C. (1966) Effects of organic matter on the growth of *Thiobacillus intermedius*. *J. Bacteriol.*, **91**, 1062-1069.
- London, J., Rittenberg, S. C. (1967) *Thiobacillus perometabolis* nov. sp., a non-autotrophic thiobacillus. *Arch. Mikrobiol.*, **59**, 218-225.
- Lorinczi Fr. (1969) O specie nouă de *Aspergillus* izolată dintr-o peșteră, *Contr. bot., Univ. Babeș- Bolyai Cluj*, pg. 341 - 347
- Lorinczi Fr., Turcu L. (1966) Micromycete izolate din sol și peșteri. În: *Flora și Vegetația rezervației naturale. Defileul Crișului Repede*. *Contr. bot., Univ. Babeș- Bolyai Cluj*, pp 69 – 82.
- Lorinczi Fr. (1973) Contribuții la cunoașterea utilizării diferitelor surse de azot de către câteva micromycete izolate din sol. *Contr. bot., Univ. Babeș- Bolyai Cluj*, pg 233 – 246,
- Lovley, D. R. (1987) Organic matter mineralization with the reduction of ferric iron: a review. *Geomicrobiol. J.*, **5**, 375-399.
- Lovley, D. R. (1991) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol. Rev.*, **55**, 259-287.
- Lovley, D. R., Phillips, E. J. P. (1986) Organic matter mineralization with the reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 683-689.
- Lovley, D. R., Phillips, E. J. P. (1987) Competitive mechanisms for inhibition of sulfate reduction and methane production in the zone of ferric iron reduction in sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **M**, 2636-2641.
- Lovley, D. R., Phillips, E. J. P. (1988) Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1472-1480.
- Lovley, D. R., Phillips, E. J. P., Roden, E. E., Woodward, J. C. (1993) Enzymatic iron and uranium reduction by sulfate-reducing bacteria. *Marine Geol.*, **113**, 41-53.
- Lundgren, D. G., Dean, W. (1979) Biogeochemistry of iron. In: P, A, Trudinger and D, J, Swaine, eds. *Biogeochemical Cycling of Mineral-Forming Elements*, Elsevier, Amsterdam, pp. 211-251.
- Luther, G. W. III. (1991) Pyrite synthesis via polysulfide compounds. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **55**, 2839-2849.
- Lu, W-P. (1986) A periplasmic location for the thiosulfate-oxidizing multi-enzyme system from *Thiobacillus versutus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **34**, 313-317.
- Lu, W-P., Kelly, D. P. (1983) Purification and some properties of two principal enzymes of the thiosulfate-oxidizing multienzyme system from *Thiobacillus A₂*. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 3549-3564.
- Lu, W-P., Kelly, D. P. (1988) Respiration-driven proton translocation in *Thiobacillus versutus* and the role of the periplasmic thiosulfate-oxidizing enzyme system. *Arch. Microbiol.*, **149**, 297-302.
- Madsen, E. L., Ghiorse, W. C. (1993) Groundwater microbiology: subsurface ecosystem processes. pp. 167-214 in: T.E. Ford (ed.) *Aquatic Microbiology*. Blackwell Scientific Publications, Boston.
- Madsen, E. L., Morgan, M. D., Good, R. E. (1986) Simultaneous photoreduction and microbial oxidation of iron in a stream in the New Jersey Pinelands. *Limnol. Oceanogr.*, **31**, 832-838.
- Mandl, M., Matulova, P., Docekalova, H. (1992) Migration of As III during bacterial oxydation of arsenopyrite in chalcopyrite concentrates by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 429-431.

- Mann, H., Tazaki, T., Fyfe, W. S., Beveridge, T. J., Humphrey, R. (1987) Cellular lepidocrocite precipitation and heavy-metal sorption in *Euglena* sp. (unicellular alga): implications for biomineralization. *Chem. Geol.*, **63**, 39-43.
- Markosyan, G. E. (1973) A new mixotrophic sulfur bacterium developing in acidic media *Thiobacillus organoparus* sp. *Dokl. Akad. Nauk SSSR Ser. Biol.*, **211**, 1205-1208.
- Marnette, E. C., Van Breemen, L. N., Hordijk, K. A. (1993) Pyrite formation in two freshwater systems in the Netherlands. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **57**, 4165-4177.
- Marshall, C. P., Cypionka, H. (1993) Influence of oxygen on sulfate reduction and growth of sulfate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.*, **159**, 168-173.
- Martin, H. W., Brigmon, R. L. (1994) Biogeochemistry of sulfide oxidizing bacteria in freatic karst, *In: Sarovsky, I., D., Palmer, M., V., (Eds.) Breakthroughs in Karst Geomicrobiology and Karst Water Ins.*, Colorado Springs, Colorado.
- Mason, J., Kelly, D. P. (1988) Mixotrophic and autotrophic growth of *Thiobacillus acidophilus* on tetrathionate. *Arch. Microbiol.*, **149**, 317-323.
- Massmann, G., Tichomirowa, M., Merz, C., Pekdeger, A. (2003) Sulfide oxidation and sulfate reduction in a shallow groundwater system (Oderbruch Aquifer, Germany). *Journal of Hydrology*, **278**, 231-143.
- Mărușteri, M., [www. Umftgm.ro/info/carte_statistica.pdf](http://www.Umftgm.ro/info/carte_statistica.pdf) – Noțiuni fundamentale de biostatistică.
- Mârza., I. (2002) Geneza zăcămintelor de origine magmatică. Metalogenia hidrotermală (Ediția a-II-a)., Presa *Universitară Clujeană*, Cluj-Napoca.
- Mc. Dowell, E. M., Trump, B. J. (1976) Histological fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **100**, 405-414, London.
- Mechalas, B. J., Rittenberg, S. C. (1960) Energy coupling in *Desulfovibrio desulfuricans*. *J. Bacteriol.*, **80**, 501-507.
- Meinel, J., Meinel, E. (1967) Experimental Microbiology, (Theory and Practice). *Mir, Moscow*, 347pp.
- Merkle, F. G. (1955) Oxidation-reduction processes in soils, *In: F. E. Bear, ed. Chemistry of the Soil*. Reinhold, New York, pp. 200-218.
- Meulenberg, R., Pronk, J. T., Hazeu, W., Frank, J., Bos, P., Kuenen J. G. (1993) Purification and partial characterization of thiosulfate dehydrogenase from *Thiobacillus acidophilus*. *J. Gen. Microbiol.*, **139**, 2033-2039.
- Mihăescu, G. (2000) Microbiologie generală și virusologie, *Editura Universității din București*, pp. 570-573.
- Miller, J. D. A., Wakerley, D. S. (1966) Growth of sulfate-reducing bacteria by fumarate dismutation. *J. Gen. Microbiol.*, **43**, 101-107.
- Miller, L. P. (1950) Formation of metal sulfides through the activities of sulfate reducing bacteria. *Boyce Thompson Inst. Contr.*, **16**, 85-89.
- Moore, A. M., De Long, C. H., Young, A. T. (2003) Rate and Extent of Aqueous Perchlorate Removal by Iron Surfaces. *Environ Sci. Technol.*, **37(14)**, 3189-3198.
- Mosser, J. L., Mosser, A. G., Brock, T. D. (1973) Bacterial origin of sulfuric acid in geothermal habitats. *Science*, **179**, 1323-1324.
- Muntean, V., Ștef, L. C., Drăgan-Bularda, M. (2004) Cercetări enzimologice asupra unor sedimente din râul Mureș, *Romanian Biological Sciences*, vol. **I (3-4)**, 107-114.
- Muntean, V., Ștef, L. C., Brăgan-Bularda, M. (2005) Cercetări microbiologice asupra unor sedimente de pe cursul mijlociu al râului Mureș, *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Biologia*, **L(2)**, 175-181.
- Nathansohn, A. (1902) Ueber eine neue Gruppe von Schwefelbakterien und ihren Stoffwechsel. *Mitt. Zool. Sta. Neapel*, **15**, 655-680.
- Nealson, K. H., Myers, C. R. (1990) Respiration-linked proton translocation coupled to anaerobic reduction of manganese(IV) and iron(III) in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J. Bacteriol.*, **172**, 6232-6238.
- Nelson, D. C., Jannasch, H. W. (1983) Chemoautotrophic growth of a marine *Beggiatoa* in sulfide-gradient cultures. *Arch. Microbiol.*, **136**, 262-269.

- Nielsen, A. M., Beck, J. V. (1972) Chalcocite oxidation and coupled carbon dioxide fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Science*, **175**, 1124-1126.
- Nitescu, S. (1977) Deferizarea și demanganizarea apei, *Editura Tehnică*, București.
- Norris, P. R. (1990) Acidophilic bacteria and their activity in mineral sulfide oxidation. In: H. L. Ehrlich and C. L. Brierley (eds.), *Microbial Mineral Recovery*. McGraw-Hill, New York, pp. 3-27.
- Northup, Diana E., Reysenbach, A-L., Pace, N. (1997) Microorganisms and speleothems, In: Hill, C. Forti, P. (Eds.), *Cave minerals of the World*, 2nd ed., p.261-266, Natl. Speleol. Soc. Inc., Huntsville, Alabama.
- Obuekwe, C. O., Westlake, D. W. S. (1982) Effect of reducible compounds (potential electron acceptors) on reduction of ferric iron by *Pseudomonas* species. *Microbios. Lett.*, **19**, 57-62.
- Ottow, J. C. G. (1967) The distribution and differentiation of iron-reducing bacteria in gley soils. *Zbltt. Bakteriolog. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 2.*, **123**, 600-615.
- Ottow, J. C. G. (1980) Bacterial mechanism of gley formation in artificially submerged soil. *Nature (Lond.)*, **225**:103.
- Ottow, J. C. G., von Klopotek, A. (1969) Enzymatic reduction of iron oxide by fungi. *Appl. Microbiol.*, **18**, 41-43.
- Pavelescu, L. (1954) Studiu geologic și petrografic al părții centrale și de sud-est a Munților Poiana Ruscă. *An.Com.Geol.*, **XXVII**, 337-373, București.
- Pavelescu, L. (1958) Geologia și petrografia regiunii Rușchița. *An.Com.Geol.*, **XXXI**, 259-375, București.
- Pavelescu, L., Kissling, Al. (1971) Studiul cristalografic și cristalochimic al fluorinei de la Ocna de Fier. *St.cerc.geol., geofiz., geogr., ser.Geol.*, **16(2)**, 511-513, București
- Pavelescu, L., Maier, O., Kräutner, H., Mureșan, M., Kräutner, F. (1964) Structura și stratigrafia șisturilor cristaline din regiunea Rușchița (Poiana Ruscă). *An.Com.Geol.*, **XXXIV/1**, 115-147, București
- Peck, H. D. Jr. (1962) Symposium on metabolism of inorganic compounds. V. Comparative metabolism of inorganic sulfur compounds in microorganisms. *Bacteriol. Rev.*, **26**, 67-94.
- Peck, H. D. Jr. (1993) Bioenergetic strategies of the sulfate-reducing bacteria. In: J. M. Odom and R. Singleton, Jr., eds. *The Sulfate-reducing Bacteria: Contemporary Perspectives*. Springer-Verlag, New York, pp. 41-76.
- Perry, E. C. Jr., Tan, F. C., Morcy, G. B. (1973) Geology and stable isotope geochemistry of Biwabik Iron Formation, northern Minnesota. *Econ Geol.*, **68**, 1110-1125.
- Perry, K. A., Kostka, J. E., Luther, G. V., Nealson, K. H. (1993) Mediation of sulfur speciation by a Black Sea facultative anaerobe. *Science*, **259**, 801-803.
- Pfennig, N. (1977) Phototrophic green and purple bacteria: a comparative, systematic survey. *Annu. Rev. Microbiol.*, **31**, 275-290.
- Pfennig, N., Biebl, H. (1981) The dissimilatory sulfur-reducing bacteria, In: M. P. Starr, H. G. Trueper, H. Stolp, H. G. Trueper, A. Balows, and H. G. Schlegel, eds. *The Prokaryotes, a Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*. Vol. 1. Springer-Verlag, Berlin, pp. 941-947.
- Postgate, J. R. (1984) *The Sulfate-Reducing Bacteria*. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Povară, I., Schmidt, N., Petcu, A. (1970) Observations morphospéologique effectuées dans la zone située entre Oravița et Ciclova Montană (Banat). In: „Livre du Centenaire Emile G. Racovitza (1868-1968)”, București, p. 621-626
- Pronk, J. T., Meulenberg, R., Hazeu, W., Bos, P., Kuenen, J. G. (1990) Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by acidophilic thiobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.*, **75**, 293-306.
- Pronk, J. T., Liem, K., Bos, P., Kuenen, J. G. (1991) Energy transduction by anaerobic ferric iron respiration in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2063-2068.
- Pronk, J. T., De Bruyn, J. C., Box, P., Kuenen, J. G. (1992) Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ., Microbiol.*, **58**, 2227-2230.
- Pronk, J. T., de Bruyn, P., Kuenen, J. G. (1992) Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ., Microbiol.*, **58**, 2227-2230.
- Pronk, J. T., Johnson D. B. (1992) Oxidation and reduction of iron by acidophilic bacteria. *Geomicro. J.*, **10**, 149-171.

Rådström, P., Bäckman, A., Ny Qian, Kraggsbjerg, P., Pålsson, C., Olcén, P. (1994) Detection of Bacterial DNA in Cerebrospinal Fluid by an Assay for Simultaneous Detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and Streptococci Using a Seminested PCR Strategy. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 2738-2744.

Rafalet, A. (1963) L'Etude pétrographique des roches métamorphiques au contact des régions Sasca Montana et Oravitz (Banat). In: „Asociation géologique carpatho-balkanique”, résumés des communications, Varşovia, p. 202-204

Ramirez C. (1982) Manual and Atlas of the *Penicillia*. Elsevier Biomedical Press. London.

Rankama, K., Sahama, T. G. (1950) Geochemistry. *University of Chicago Press*, Chicago, pp. 657-676.

Rawlings, D. E., Kusano, T. (1994) Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.*, **58**, 39-55.

Rawlings, D. E., Pretorius, I. M., Woods, D. R. (1986) Expression of *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid functions and the development of genetic systems for the thiobacilli, In: H. L. Ehrlich and D. S. Holmes, eds. Workshop on Biotechnology for the Mining, Metal-Refining and Fossil Fuel Processing Industries. Wiley, New York, pp. 281-287.

Reuter, P., Rabus, R., Wilkes, H., Aeckersberg, F., Rainey, F. A., Jannasch, H. V., Widdel, F. (1994) Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulfate-reducing bacteria. *Nature (Lond.)*, **372**, 455-458.

Roberts, J. L. (1947) Reduction of ferric hydroxide by strains of *Bacillus polymyxa*. *Soil Sci.*, **63**, 135-140.

Roden, E. E., Lovley, D. R. (1993) Dissimilatory Fe(III) reduction by the marine microorganism *Desulfuromonas acetoxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 734-742.

Rodina, Antonina, Gavrilovna (1972) Methods in Aquatic Microbiology, (translated, edited and revised by Colwell, RR and Zambruski, MS), *University Park Press*, Baltimore.

Romanenko, V. I., Kuznetsov, S. I. (1990) Ecology of Microorganisms in Fresh Water Basins. *Nauka*, Leningrad, 191pp.

Rott, U., Meyerhoff, R. (1993) Physical, Chemical and Biological Processes in Consequences of In-Situ-Treatment of Groundwater. *IAHS Pub.*, **220**, 439-447.

Roy, A. B., Trudinger, P. A. (1970) The Biochemistry of Inorganic Compounds of Sulfur. *Cambridge University Press*, Cambridge.

Savu, H. (1977) Genesis of pegmatites from Banat (Romania). *D.S. Inst. Geol. Geofiz.*, **LXIII**, 99-111, Bucureşti.

Schauder, R., Preuss, A., Jetten, M., Fuchs, G. (1989) Oxidative and reductive acetyl CoA/carbon monoxide dehydrogenase pathway in *Desulfobacterium autotrophicum*. *Arch. Microbiol.*, **151**, 84-89.

Schauder, R., Kroeger, A. (1993) Bacterial sulfur respiration. *Arch. Microbiol.*, **159**, 491-497.

Schedel, M., Trueper, H. G. (1980) Anaerobic oxidation of thiosulfate and elemental sulfur in *Thiobacillus denitrificans*. *Arch. Microbiol.*, **124**, 205-210.

Schrenk, M. O., Edwards, K. J., Goodman, R. M., Hamers, R. J., Banfield, J. F. (1998) Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: Implications for Generation of Acid Mine Drainage. *Science*, **279(5356)**, 1519 – 1522.

Segerer, A., Neuner, A., Kristiansson, J. K., Stetter, K. O. (1986) *Acidianus infernus* gen. nov., sp. nov., and *Acidianus brierleyi* comb. nov.: Facultatively aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulfur-metabolizing archaeobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**, 559-564.

Segerer, A., Neuner, A., Kristjansson, J. K., Stetter, K. O. (1986) *Acidianus infernus* gen. nov., sp. nov., and *Acidianus brierleyi* comb. nov.: Facultatively aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulfur-metabolizing archaeobacteria. *Arch. Microbiol.*, **36**, 559-564.

Seitz, H-J., Cypionka, H. (1986) Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio desulfuricans* with hydrogen coupled to ammonification of nitrate or nitrite. *Arch. Microbiol.*, **146**, 63-67.

Shturm, L. D. (1948) Sulfate reduction by facultative aerobic bacteria. *Mikrobiologiya*, **17**, 415-418.

Silver, M., Ehrlich, H. L., Ivarson, K. C. (1986) Soil mineral transformation mediated by soil microbes, In: P. M. Huang and M. Schnitzer, eds. Interactions of soil minerals with natural organics

and microbes. *SSSA Special Publication Number 17. Soil Science Society of America, Madison, WI*, pp. 497-519.

Silverman, M. P., Ehrlich, H. L. (1964) Microbial formation and degradation of minerals. *Adv. Appl. Microbiol.*, **6**, 153-206.

Silverman, M. P., Lundgren, D. G. (1959) Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *J. Bacteriol.*, **77(5)**, 642-7.

Smith, A. L., Kelly, D. P., Wood, A. P. (1980) Metabolism of *Thiobacillus* A₂ grown under autotrophic, mixotrophic, and heterotrophic conditions in chemostat culture. *J. Gen. Microbiol.*, **121**, 127-138.

Smith, D. W., Rittenberg, S. C. (1990) On the sulfur-source requirement for growth of *Thiobacillus intermedius*. *Arch. Microbiol.*, **100**, 65-71.

Sokolova, G. A., Karavaiko, G. I. (1968) Physiology and geochemical activity of thiobacilli. English translation. U.S. Department of Commerce. Clearinghouse. *Fed. Sci Tech. Info., Springfield, VA*.

Sorensen, J., Jorgensen, B. B. (1987) Early diagenesis in sediments from Danish coastal waters: microbial activity and Mn-Fe-S geochemistry. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **51**, 1583-1590.

Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L., Painter, P. L. (1986) *The Microbial World. 5th ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ*.

Starkey, R. L., Robert, L. (1934) Cultivation of Organisms Concerned in the Oxidation of Thiosulfate. *J. Bacteriol.*, **28(4)**, 365-386.

Starkey, R. L. (1945) Precipitation of ferric hydrate by iron bacteria. *Science*, **102**, 532-533.

Starkey, R. L., Halvorson, H. O. (1927) Studies on the transformations of iron in nature. II. Concerning the importance of microorganisms in the solution and precipitation of iron. *Soil Sci.*, **24**, 381-402.

Stetter, K. O. (1988) *Archaeog JobUS fulgidus* gen. nov., sp. nov.: a new taxon of extremely thermophilic archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, **10**, 172-173.

Stetter, K. O., Lauerer, G., Thomm, M., Neuner, A. (1987) Isolation of extremely thermophilic sulfate reducers: evidence for a novel branch of archaeobacteria. *Science*, **236**, 822-824.

Stevens, C. J., Dugan, P. R., Tuovinen, O. H. (1986) Acetylene reduction (nitrogen fixation) by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **8**, 351-359.

Strahler, A. N. (1977) *Principles of Physical Geology. Harper & Row, New York*.

Strohl, W. R., Larkin, J. M. (1978) Enumeration, isolation, and characterization of *Beggiatoa* from freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 755-770.

Stumbea, D. (1999) Alterarea supergenă a rocilor și mineralelor., *Editura Universității „Al. I. Cuza” Iași*.

Sugio, T., Hirose, T., Li-Zhen, Y., Tano, T. (1992) Purification and some properties of sulfite: ferric ion oxidoreductase from *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.*, **174**, 4189-4192.

Sugio, T., White, K. J., Shute, E., Choate, D., Blake, R. C. (1992) Existence of a hydrogen sulfide:ferric ion oxidoreductase in iron-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 431-433.

Tabita, R., Lundgren, D. G. (1971) Utilization of glucose and the effect of organic compounds on the chemolithotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.*, **108**, 328-333.

Tabita, R., Lundgren, D. G. (1971) Heterotrophic metabolism of the chemolithotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.*, **108**, 334-342.

Tasaki, M., Kamagala, Y., Nakamura, K., Mikami, E. (1991) Isolation and characterization of a thermophilic benzoate-degrading, sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum thermobenzoicum* sp. nov. *Arch. Microbiol.*, **155**, 348-352.

Taylor, P. D., Palmer, T. J. (1994) Submarine caves in a Jurassic reef (La Rochelle, France) and evolution of cave biotas. *Naturwissenschaften*, **81**, 357-360.

Temple, K. L., Colmer, A. R. (1951) The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium, *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.*, **62(5)**, 605-11.

Temple, K. L., LeRoux, N. (1964) Syngeneses of sulfide ores: Desorption of adsorbed metal ions and their precipitation as sulfides. *Econ Geol.*, **59**, 647-655.

- Thamdrup, B., Finster, K., Hansen, J. W., Bak, F. (1993) Bacterial disproportionation of elemental sulfur coupled to chemical reduction of iron and manganese. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 101-108.
- Tittley, S. R. (1981) Porphyry copper. *Am. Scientist*, **69**, 632-638.
- Tonazzio, Valérié (1998) Thèse de doctorat, Université Henri-Poincaré de Nancy, France.
- Torrufford, B., Bloomfield, D. C., Kelso, W. I., Pruden, G. (1973) Ochre formation in field drains in pyritic soils. *J. Soil Sci.*, **24**, 453-460.
- Tuovinen, O. H., Kelly, D. P. (1972) Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable numbers, and comparison with ¹⁴C₂O₂-fixation and iron oxidation as measures of growth. *Arch. Mikrobiol.*, **88**, 285-298.
- Tuovinen, O. H., Kelly, D. P. (1973) Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. II. Toxicity of uranium to growing cultures and tolerance conferred by mutation, other metal cations and EDTA. *Arch. Mikrobiol.*, **95**, 153-164.
- Tuttle, J. H., Dugan, P. R., Randles, C. I. (1969) Microbial Sulfate Reduction and Its Potential Utility as an Acid Mine Water Pollution Abatement Procedure, *Appl. Microbiol.*, **17**(2), 297-302.
- Tuttle, J. H., Ehrlich, H. L. (1986) Coexistence of inorganic sulfur metabolism and manganese oxidation in marine bacteria. *Abstr., Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol.* **1**(21), p. 168.
- Tuttle, J. H., Holmes, P. E., Jannasch, H. V. (1974) Growth rate stimulation of marine pseudomonads by thiosulfate. *Arch. Mikrobiol.*, **99**, 1-14.
- Vainshtein, M. B. (1977) Oxidation of hydrogen sulfide by thionic bacteria. *Mikrobiologiya*, **46**, 1114-1116 (Engl. transl. pp. 898-899).
- Vanbroekhoven, K., Van Roy, S., Gielen, C., Maesen, M., Ryngaert, A., Diels, L., Seuntjens, P. (2007) Microbial processes as key drivers for metal (im)mobilization along a redox gradient in the saturated zone. *Environ. Pollution*, **148**(3), 759-769.
- Van den Ende, F. P., van Gernerden, H. (1993) Sulfide oxidation under oxygen limitation by a *Thiobacillus thioautotrophicus* isolated from a marine microbial mat. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **13**, 69-78.
- Van Gernerden, H. (1986) Production of elemental sulfur by green and purple sulfur bacteria. *Arch. Mikrobiol.*, **146**, 52-56.
- Vishniac, W., Santer, M. (1957) The thiobacilli. *Bacteriol. Rev.*, **21**, 195-213.
- Vishniac, W. (1952) The metabolism of *Thiobacillus thioautotrophicus*. I. The oxidation of thiosulfate. *J. Bacteriol.*, **64**, 363-373.
- Vlad, S. N. (1974) Mineralogeneza skarnelor de la Dognecea, *Ed.Acad.RSR*, București.
- Vlad, S. N. (1994) Skarn from Ocna de Fier (Banat). Compositional and structural investigation. *Rév.roum, ser.géol.*, **38**, 25-32, București
- Vlad, S. N., Borcoș, M. (1997) Alpine metallogenesis of the Romanian Carpathians. *Rom. J. Mineral Deposits*, **78**, 5-20, București.
- Vlăsceanu, Luminița, Popa, R., Kinkle, B. K. (1997) Characterization of *Thiobacillus thioautotrophicus* LV43 and its distribution in a chemoautotrophically based groundwater ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3123-3127.
- Vlăsceanu, Luminița, Sârbu, Ș., Engel, A. S. (2000) Acidic cave-wall biofilms located in the Frasassi Gorge, Italy. *Geomicrobiol. J.*, **17**, 125-139.
- Vorreiter, L., Madgwick, J. C. (1982) The effect of sodium chloride on bacterial leaching of low-grade copper ore. *Proc. Australas. Inst. Min. Metall.*, No. **284**, pp. 63-66.
- Wakao, N., Koyatsu, H., Komai, Y., Shimokawara, H., Sakurai, Y., Shiota, H. (1988) Microbial oxidation of arsenic and occurrence of arsenic oxidizing bacteria in acid mine water from sulfur pyrite mine. *Geomicrobiol. J.*, **6**, 11-24.
- Walker, J. C. G. (1987) Was the Archean biosphere upside down? *Nature (Lond.)*, **329**, 710-712.
- Walker, J. C. G., Klein, C., Schidlowski, M., Schopf, J. W., Stevenson, D. J., Walter, M. R. (1983) Environmental evolution of the Archean-Early Proterozoic Earth. In: J. W. Schopf, ed. *Earth's Earliest Biosphere. Its Origin and Evolution*. Princeton University Press, Princeton, NJ, pp. 260-290.
- Walsh, F., Mitchell, R. (1972) An acid-tolerant iron-oxidizing *Metallogenium*. *J. Gen. Microbiol.*, **72**, 369-376.

- Walsh, F., Mitchell, R. (1972) An acid-tolerant iron-oxidizing *Metallogenium*. *J. Gen. Microbiol.*, **72**, 369-376.
- Walsh, F., Mitchell, R. (1972) The pH-dependent succession of iron bacteria. *Environ. Sci. Technol.*, **6**, 809-812.
- Wichlacz, P. L., Unz, R. F., Langworthy, T. A. (1986) *Acidiphilium angustum* sp. nov., *Acidiphilium rubrum* sp. nov.: acidophilic heterotrophic bacteria isolated from acidic coal mine drainage. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**, 197-201.
- Widdel, F., Schnell, S., Heising, S., Ehrenreich, A., Assmus, B., Schink, B. (1993) Ferrous iron oxidation by anoxygenic phototrophic bacteria. *Nature (Lond.)*, **362**, 834-836.
- Widdel, F., Pfennig, N. (1981) Sporulation and further nutritional characteristics of *Desulfotomaculum acetoxidans*. *Arch. Microbiol.*, **129**, 401-402.
- Winogradsky, S. (1888) Ueber Eisenbakterien. *Bot. Ztg.*, **46**, 261-276.
- Winogradsky, S. (1922) Eisenbakterien als Anorgoxydanten. *Z. Bakteriologie. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. II*, **57**, 1-21.
- Winogradski, S. M. (1952) Soil microbiology (in Russian). *Probl. Met. Izd. AN SSSR*, Moscow, 792 pp.
- Wirsen, C. O., Jannasch, H. W. (1978) Physiological and morphological observations on *Thiovulum* sp. *J. Bacteriol.*, **136**, 765-774.
- Wood, A. P., Kelly, D. P. (1983) Autotrophic, mixotrophic and heterotrophic growth with denitrification by *Thiobacillus A₂* under anaerobic conditions. *FEMS Microbiol. Lett.*, **16**, 363-370.
- Wood, A. P., Kelly, D. (1991) Isolation and characterization of *Thiobacillus halophilus* sp. nov., a sulfur-oxidizing autotrophic eubacterium from a Western Australian hypersaline lake. *Arch. Microbiol.*, **156**, 277-280.
- Wood, P. (1988) Chemolithotrophy, In: C. Anthony, ed. *Bacterial Energy Transduction*. Academic Press, London, pp. 183-230.
- Zarnea, G. (1994) *Tratat de Microbiologie generală*, (în V volume) *Editura Academiei Române*, București.
- Zavarzin, G. A. (1972) Heterotrophic satellite of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Mikrobiologiya*, **41**, 369-370 (Engl. trans., pp. 323-324).
- Zillig, W., Yeats, S., Holz, I., Boeck, A., Gropp, F., Rettenberger, M., Lutz, S. (1985) Plasmid-related anaerobic autotrophy of the novel archaeobacterium *Sulfolobus ambivalens*. *Nature (Lond.)*, **313**, 789-791.
- Zycha H., Siepmann R. (1969) *Mucorales*, eine beschreibung aller Gattungen und Arten dieser Pilzgruppe. *Verlag von J. Cramer*.
- Xu, J., Song, Y., Min, B., Steinberg, L., Logan, B. E. (2003) Microbial Degradation of Perchlorate: Principles and Applications. *Environ. Eng. Sci.*, **20(5)**, 405-422.

Résumé

Les parois de l'ancienne mine d'or Kiesberg du S-O de la Roumanie, sont alimentées par l'eau des précipitations météoriques qui percole depuis la surface au travers des microfissures jusqu'à la cavité. Ces parois sont colonisées par des associations microbiennes diversifiées. Le fonctionnement de ces consortiums repose sur l'oxydation de minéraux, essentiellement des sulfures particulièrement abondants dans la roche, et il induit la formation de composés minéraux oxydés qui se déposent en grande quantité à l'extérieur des cellules vivantes et forment des accumulations de divers types. Comprendre le fonctionnement de ces microécosystèmes et la genèse des dépôts minéraux induits nécessitait un inventaire microbiologique (techniques classiques et méthode génétique), le suivi au cours du temps des populations des microorganismes en parallèle avec la chimie des solutions, d'établir les rapports spatiaux et temporels entre minéraux et organismes, nécessitant des observations macroscopiques et microscopiques par l'utilisation de la microscopie électronique (MET, MEB-EDS, cryo-MEB).

Les enduits et "Stalactites polychromes", représentent le résultat de l'association mutualiste de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (chimiolithotrophe) et de six espèces de champignons du genre *Penicillium* (hétérotrophe) dans un milieu acide (pH 1,2). De grandes quantités de Fe^{2+} sont oxydées par *A. ferrooxidans*, d'où en résulte le $\text{Fe}(\text{OH})_3$ qui se dépose à l'extérieur des hyphes de *Penicillium*, ainsi qu'à l'extérieur du biofilm, formant une lamine de $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Les hyphes minéralisées forment le squelette interne de la stalactite qu'enveloppent les lamines d'hydroxyde ferrique.

Les consortiums des "Formations mucilagineuses", sont constitués par dix-sept espèces de micro-organismes comprenant des chimiolithotrophes (4 espèces de acidithiobacilles), et des hétérotrophes (actinomycètes et 12 espèces de champignons), réunis dans une masse compacte de mucopolysaccharides, dans un contexte relativement acide (pH 2,8). Les chimiolithotrophes dominent et leur intense métabolisme induit l'oxydation de la pyrite. Il s'ensuit (1) la libération de Fe^{2+} donnant du $\text{Fe}(\text{OH})_3$, qui se dépose dans les mucopolysaccharides extracellulaires conduisant à la formation de stalactites ou de croûtes, (2) la libération de composés soufrés, d'où résultent des quantités importantes de SO_4^{2-} . Du $\text{Fe}(\text{OH})_3$ non déposé et du SO_4^{2-} , auxquels s'ajoutent des ions K^+ , résulte la précipitation de jarosite, au sein des stalactites mais aussi sur les parois de la mine. Dans certaines conditions, des composés de Fe, Ni, Cr (mobilisés de la roche par le H_2SO_4 engendré par l'activité bactérienne) précipitent sur les biofilms microbiens des „formations mucilagineuses", sous forme de vermicules. Les sous-produits de l'activité de certains hétérotrophes, au sein des mucopolysaccharides, peut conduire à la formation de calcite protégée du milieu acide par le mucilage.

Une "Flaque" disposée vers le fond de la mine, représente un véritable bassin d'épuration, avec un pH proche de la neutralité, où perdure le métabolisme des micro-organismes chimiolithotrophes, ainsi que l'intense métabolisme des hétérotrophes. Deux types de dépôts floconneux (rouges et blancs) s'y individualisent, au sein desquels 13 espèces sont identifiées (10 dans le dépôt rouge et 3 dans le blanc). Le dépôt rouge se caractérise par un métabolisme chimiolithotrophe qui engendre, outre l'oxydation de composés du soufre, l'oxydation du Fe^{2+} d'où résulte du $\text{Fe}(\text{OH})_3$, qui se dépose sur des filaments organiques spiralés de *Gallionella ferruginea*. Les nombreux hétérotrophes métabolisent l'abondante matière organique d'origine allochtone, provenant de tous les secteurs de la cavité avec l'eau. Le dépôt blanc est essentiellement constitué de l'accumulation de micro- et nanopores d'alumine dont l'Al résulte de l'altération des silicates (feldspaths) de la roche mère.

Mots clés: Mine, Roumanie, sulfures, pyrite, jarosite, alumine, hydroxydes de fer, oxydation, spéléothèmes, stalactites, snotites, croûtes, mucopolysaccharides, mucilages, bactéries, *Acidithiobacillus*, champignons, *Penicillium*, actinomycètes, altération, chimiolithotrophie, hétérotrophie, consortiums, microbiologie, MET, MEB.