

MICROBIOLOGIA ȘI BIOTEHNOLOGIA

TULPINI BACTERIENE - POTENȚIALI DISTRUCTORI AI PESTICIDELOR

Chiselița Oleg, Bafîr Ludmila, Slanina Valerina

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei

Rezumat

În articol sunt prezentate date cu privire la influența erbicidului trifluralina asupra creșterii și viabilității tulpinilor de bacterii, izolate din solurile poluate și celor din Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene. În rezultatul cercetărilor au fost selectate 7 tulpini de bacterii cu capacitate de creștere în prezența concentrațiilor înalte 200-500 mg/L de trifluralină, unele din ele manifestând antagonism față de diverse microorganisme fitopatogene. Aceste tulpini, potențiali distructori ai pesticidelor, pot contribui la elaborarea tehnologiilor autohtone de bioremediere a solurilor poluate.

Cuvinte cheie: bacterii, activitate antimicrobiană, viabilitate, trifluralină, distructori.

Depus la redacție: 05 mai 2017

Adresa pentru corespondență: Chiselița Oleg, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei, str. Academiei, 1, MD-2028 Chișinău, Republica Moldova; e-mail: chiselita@mail.ru

Introducere

Actualmente, activitatea antropogenă provoacă poluarea pe scară largă a mediului natural. Progresul tehnologic, dezvoltarea industrială rapidă, creșterea cererii de produse chimice, îngrășăminte minerale, pesticide și produse farmaceutice, pentru susținerea și îmbunătățirea calității vieții omului, duce la contaminarea aerului, apei și solului cu diferiți poluanți persistenți care prezintă un pericol enorm pentru mediul ambiant.

În Republica Moldova de asemenea persistă problema acută a poluării solurilor cu substanțe nocive [8, 32], îndeosebi în jurul fostelor depozite de pesticide [29, 30]. Pesticidele periculoase abandonate și depozitele devastate au un impact negativ asupra populației și mediului [32, 36]. Pesticidele în mod constant, sunt utilizate pentru protejarea integrată a plantațiilor agricole și silvice de plantele și animalele dăunătoare, microorganismele fitopatogene și bolile endemice transmise de insecte [9, 31]. Utilizarea lor asigură o eficacitate ridicată și eficiență economică înaltă, însă aplicarea continuă și nelimitată a pesticidelor provoacă daune severe, uneori ireversibile, mediului, calității solului și resurselor acvatice, durabilității agricole și are un impact negativ asupra calității produselor agricole, implicit asupra sănătății omului [13, 42].

În Republica Moldova există 1604 zone potențial poluate cu poluanți organici persistenți [25, 32]. Pentru decontaminarea lor au fost propuse și inițiate diferite activități [35] ce țin mai mult de tehnologiile costisitoare de excavare a solului poluat [15, 26], precum și de fitoremediere [7].

Pentru remedierea zonelor contaminate biotehnologiile sunt cele mai preferate datorită siguranței lor ecologice, costurilor reduse și eficienței înalte, care au fost demonstrate în mod repetat în soluționarea diverselor probleme ecologice.

Utilizarea microorganismelor în degradarea, detoxifierea, mineralizarea sau transformarea poluanților din mediul ambiant este cunoscută sub denumirea de bioremediere [34, 38]. Bioremedierea este o strategie de utilizare a microorganismelor pentru transformarea completă sau parțială a poluanților toxici în produse finale inofensive sau cu toxicitate și mobilitate scăzută [17, 38, 39].

În ultimele două decenii, s-au înregistrat progrese vizibile în tehnicile de bioremediere cu scopul de a restabili în mod eficient mediile poluate printr-o abordare “eco-friendly” și cost-eficientă, însă nu există nici o tehnică de bioremediere universală, care ar asigura remedierea zonelor poluate, indiferent de condițiile climaterice și natura poluantului.

Conform unor cercetători, cheia pentru rezolvarea multor probleme asociate cu biodegradarea și bioremedierea substanțelor poluante o dețin microorganismele indigene, prezente în microbiota unei anumite zone geografice, inclusiv în solurile poluate [37], care sunt deja adaptate la condițiile pedo-climaterice existente. Ca urmare, eficiența tehnicilor de remediere dezvoltate poate fi complet diferită pentru diverse regiuni și tipuri de sol. Astfel, elaborarea și implementarea tehnologiilor autohtone de bioremediere a solurilor contaminate este foarte actuală.

Bacteriile și fungii sunt agenți de reciclare naturali capabili să transforme substanțele chimice naturale și sintetice în sursă de energie și materie primă pentru creșterea și dezvoltarea proprie. Microorganismele au capacitatea de a transforma, imobiliza, sau detoxifica poluanții prin diverse mecanisme [19, 21, 23, 24, 28]. Capacitatea microorganismelor de a degrada pesticidele este asociată cu multiplele reacții biochimice efectuate și cu nivelul înalt de adaptare al acestora la condițiile mediului.

Printre bacteriile heterotrofe capabile să transforme (distrugă) xenobioticele se regăsesc reprezentanți din diferite genuri, însă cele mai eficiente și des utilizate în diverse tehnologii de bioremediere sunt cele din genul *Pseudomonas* [2, 18, 22, 40, 41] și *Bacillus* [11, 16, 49].

Eficacitatea degradării contaminanților de către microorganismele depinde, în mare măsură, de concentrația lor în mediu. Astfel, la concentrații mari substanțele chimice sunt toxice pentru microorganismele, chiar dacă aceeași substanță chimică este rapid degradată la concentrații mai mici [27]. Toxinele blochează reacțiile metabolice, inhibă creșterea și dezvoltarea microorganismelor, producerea de biomasă necesară pentru degradarea rapidă și eficientă a contaminanților [1].

Astfel, bioremedierea devine o alternativă din ce în ce mai populară metodelor convenționale de tratare a mediilor contaminate, bazată pe activitatea microbiană naturală, mediată de diferite tulpini sau consorții microbiene, fapt ce evidențiază necesitatea și actualitatea cercetărilor ce țin de izolarea și selectarea tulpinilor noi de microorganismele cu potențial bioremediator înalt.

În această ordine de idei, scopul acestor cercetări constă în selectarea tulpinilor de bacterii capabile de creștere în prezența trifluralinei.

Obiectivele principale:

- Izolarea din solul poluat cu poluanți organici persistenti a culturilor noi de bacterii cu capacitate de creștere și dezvoltare în prezența trifluralinei, evaluarea caracterelor morfologice și activității antimicrobiene ale microorganismelor selectate;

- Screening-ul bacteriilor depozitate în CNMN, capabile de creștere și dezvoltare în prezența trifluralinei.

Materiale și metode

Ca obiecte de studiu au servit 37 tulpini de bacterii din Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene din genurile *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Corynebacterium*, *Sarcina*, *Micrococcus*, *Azotobacter*, *Escherichia*, *Criptococcus*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, unele din ele cu activitate antimicrobiană înaltă [3, 4, 5] și 6 culturi de bacterii, izolate din solul poluat cu poluanți organici persistenți (POP) din preajma depozitelor abandonate de pesticide din orașelul Sângera, municipiul Chișinău. Izolarea și caracterizarea morfologică a tulpinilor de bacterii noi a fost efectuată cu utilizarea metodelor clasice descrise în literatura de specialitate [6, 43, 44, 47, 52, 53]. Menținerea culturilor de bacterii a fost efectuată pe medii agarizate caracteristice fiecărui grup taxonomic conform metodei standard [45, 50, 51].

Pentru efectuarea cercetărilor, în dependență de scopul urmărit, au fost utilizate mediile nutritive agarizate: agar-agar, agar-nutritiv, agar-nutritiv +10% apă, King B, mediul mineral E8 care conține în g/L: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ - 0,5; KH_2PO_4 - 0,7; NaCl - 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,8; apă distilată - 1 L; pH 7,2 și mediul nutritiv lichid - bulion peptonat de carne.

În calitate de (POP) a fost utilizat erbicidul trifluralina [12, 14] (în continuare - TF) care a fost adăugat la mediile experimentale în concentrații de 50; 100; 200; 250; 300 și 500 mg/L.

Activitatea de creștere a bacteriilor a fost evaluată prin estimare simplă:

“-” lipsa creșterii, “+” - creștere slabă, “++” - creștere moderată, “+++” - creștere activă și contării unităților formatoare de colonii (UFC) pe cutii Petri, după efectuarea diluțiilor succesive. Numărul UFC a fost exprimat prin \log_{10} . Viabilitatea tulpinilor pe mediile experimentale a fost exprimată în % față de martor.

Activitatea antimicrobiană a metaboliților tulpinilor de bacterii asupra culturilor fitopatogene a fost determinată prin metoda difuziei, utilizând blocurile de geloză [48]. În calitate de test-culturi au fost utilizate tulpini de fungi și bacterii fitopatogene: *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Xantomonas campestris* B-60, *Xantomonas campestris* 8003b, *Erwinia carotovora*, *Corinebacterium michiganensis* 10.

Toate experiențele au fost efectuate în 3 repetări. Prelucrarea statistică a rezultatelor obținute a fost efectuată cu utilizarea programului Office Excel 2010.

Rezultate și discuții

Inițial, prin utilizarea tehnicilor specifice, din solul poluat cu POP din preajma depozitelor abandonate de pesticide din orașelul Sângera au fost izolate în cultură pură 6 tulpini de bacterii, care au fost denumite simbolic - tulpina Nr. 1, 2, 3, 4, 5 și 6. Pentru caracterizarea proprietăților morfo-culturale a bacteriilor izolate, tulpinile au fost cultivate pe mediul lichid bulion peptonat de carne și mediile agarizate King B și agar nutritiv. Astfel, s-a determinat că pe mediul lichid tulpinile au următoarele proprietăți:

- Tulpina Nr. 1 – formează pe suprafața mediului o peliculă subțire stabilă la agitare;
- Tulpina Nr. 2 – formează peliculă uniformă la suprafață, stabilă la agitare;
- Tulpina Nr. 3 – peliculă de formă conică ce tulbură mediul la agitare;
- Tulpina Nr. 4 – nu formează peliculă;
- Tulpina Nr. 5 – formează un inel subțire pe pereții vasului la limita dintre faza lichidă și gazoasă;

- Tulpina Nr. 6 – formează peliculă subțire care la agitare se dispersează în faza lichidă sub formă de fulgi.

Pe medii agarizate coloniile au avut următoarele caracteristici:

- Tulpinile Nr. 1 și 3 – colonii rotunde, bombate, de formă circulară cu marginea întregă, profilul convex.

Pe mediul King B coloniile sunt opace au consistență vâscoasă, de culoare verzuie, cu suprafață strălucitoare. Aspectul coloniilor neted de tip „S”.

- Tulpile Nr. 2 și 5 – pe mediul agar-nutritiv formează colonii mari cca 2 mm, de formă neregulată, translucide, de consistență mucoasă, profil plat, margine lobată cu aspect de tip „R”.

- Tulpina Nr. 4 – pe mediul agar-nutritiv formează colonii de mărime mijlocie, rotunde, de culoare galbenă, marginea întregă, profil ușor convex, de tipul „S”. Mediul King B – colonii rotunde de culoare albă, marginile ondulate, profilul convex.

- Tulpina Nr. 6 – pe mediul agar nutritiv formează colonii mari zbârcite, cu margine ondulată, suprafață încrețită, aspectul coloniei de tip „R”.

Rezultatele colorației Gram sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1. Caracteristica tulpinilor izolate din solul poluat conform colorației Gram

Tulpina	Caracteristica Gram	Tulpina	Caracteristica Gram
Nr. 1	G–	Nr. 4	G–
Nr. 2	G+	Nr. 5	G+
Nr. 3	G–	Nr. 6	G+

Astfel, în baza testelor fiziologo-biochimice efectuate și colorației Gram, tulpinile izolate, Nr. 1, 3 și 4, fac parte din g. *Pseudomonas*, iar tulpinile Nr. 2, 5 și 6 din g. *Bacillus*.

În continuare a fost cercetată capacitatea tulpinilor izolate din solul poluat de a sintetiza metaboliți cu activitate antagonistă față de diverse bacterii și fungi fitopatogeni. Astfel, s-a stabilit că din 6 tulpini testate, 4 posedă activitate antimicrobiană. Tulpinile Gram– Nr. 1 și 4 manifestă activitate antibacteriană iar tulpinile Gram+ Nr. 2 și 6 activitate antifungică (figura 1).

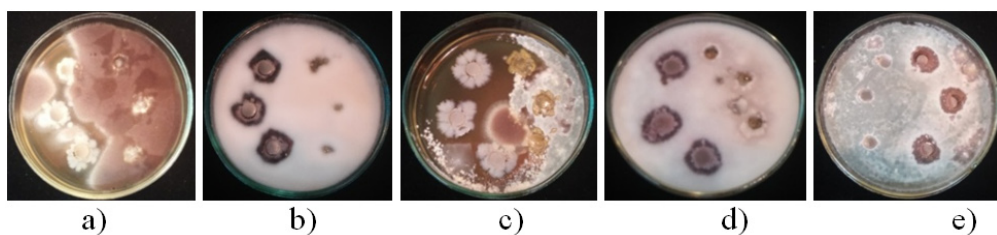


Figura. 1. Activitatea antifungică a tulpinilor izolate, față de fitopatogenii *A. niger* (a), *A. alternata* (b), *B. cinerea* (c), *F. oxysporum* (d) și *F. solani* (e).

În continuare a fost evaluată capacitatea tulpinilor izolate de a crește în prezența TF. Pentru aceasta tulpinile au fost cultivate pe mediul agarizat bulion peptonat de carne (martor) cu adaos de TF în concentrație de 200 și 250 mg/L. În rezultat s-a stabilit

că din 6 tulpini, numai tulpinile Nr. 2, 4 și 6 posedă capacitate de creștere în prezența TF în concentrațiile susmenționate, celelalte, Nr. 1, 3 și 5 nu au manifestat creștere. Inhibiția totală a creșterii tulpinilor Nr. 1, 3 și 5 denotă toxicitatea înaltă a TF pentru microorganismele din sol, în același timp, viabilitatea de 83,7-93,4% față de martor a tulpinilor Nr. 2, 4 și 6 (figura 2), evidențiază faptul că unele din ele posedă un mecanism puternic de adaptare la condițiile mediului.

În continuare, prin estimarea prezenței sau absenței creșterii, a fost evaluată capacitatea tulpinilor de bacterii din Colecția Națională de Microorganisme Neputogene de a crește pe diferite medii de cultură, în prezența TF în diferite concentrații. Screening-ul a 37 de tulpini a fost efectuat pe 3 medii nutritive agarizate: agar-nutritiv - bogat în substanțe nutritive, agar-agar – lipsit de substanțe nutritive și mediul sintetic E8 în componența căruia sunt incluse diferite săruri minerale. Mediile experimentale au fost suplinite cu TF în concentrație de 50, 100 și 200 mg/L, în ultimile două TF servind ca sursă unică de carbon.

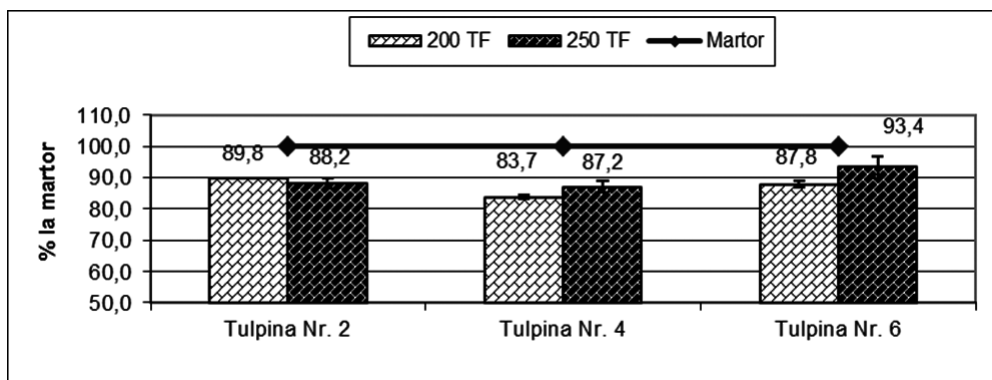


Figura. 2. Viabilitatea tulpinilor de bacterii la cultivare pe mediul agarizat bulion peptonat de carne, suplimentat cu TF în diferite concentrații.

În rezultatul cercetărilor s-a stabilit capacitatea tuturor bacteriilor de a crește și a se dezvolta pe agar-nutritiv, inclusiv și în prezența TF, indiferent de concentrația ei. În același timp, nici o tulpină de bacterii nu a manifestat creștere pe agar-agar suplimentat cu TF în diferite concentrații, fapt ce evidențiază incapacitatea acestor tulpini de a utiliza TF în calitate de sursă unică de carbon, în cazul absenței depline a oricăror substanțe nutritive. Evaluând creșterea bacteriilor pe mediul mineral E8 s-a determinat că din 37 de tulpini, 11 nu manifestă creștere pe acest mediu, nici în proba control (fără TF), nici în prezența TF. Din 26 tulpini, care au crescut pe mediul mineral E8, 21 au crescut în prezența a 50 mg/L TF și 7 din ele, la suplینirea mediului cu 100 mg/L de TF. Majorarea concentrației TF pînă la 200 mg/L influențează negativ asupra bacteriilor, doar unele tulpini manifestând semne de viabilitate. Rezultatele cercetărilor sunt prezentate în tabelul 2.

Astfel, în baza rezultatelor obținute, pentru cercetările ulterioare au fost selectate 6 tulpini de bacterii, care au manifestat creștere pe mediul mineral E8 suplimentat cu TF în concentrație de 50-100 mg/L, luându-se în considerație și activitatea antimicrobiană a acestor bacterii față de diverse microorganisme fitopatogene. Aceste 6 tulpini fac parte din genurile *Bacillus* și *Pseudomonas*.

Tabelul 2. Influența diferitor medii nutritive, suplimentate cu TF în diferite concentrații, asupra creșterii tulpinilor de bacterii.

Tulpina	agar-nutritiv				Agar-agar				E-8			
	Control	Concentrația de TF (mg/L)			Control	Concentrația de TF (mg/L)			Control	Concentrația de TF (mg/L)		
		50	100	200		50	100	200		50	100	200
<i>B. cereus</i> var. <i>fluor.</i> CNMN-BB-07	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Ps. fluorescens</i> CNM-PFB-01	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Ps. fluorescens</i> CNMN-02	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ps. fluorescens</i> B-970	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Ps. fluorescens</i> B-896	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Ps. fluorescens</i> B-561	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Ps. fluorescens</i> B-330	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ps. fluorescens</i> B-894	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Ps. chlororaphis</i> B-897	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Ps. aurantiaca</i> CNMN-PsB-08	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Ps. aurantiaca</i> B-875	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ps. aureofaciens</i> B-1249	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ps. aureofaciens</i> CNMN-PSB05	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Ps. aureofaciens</i> 6/1	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Ps. aureofaciens</i> CNMN-PsB-07	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	±
<i>Pseudomonas</i> sp. 41	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. 63	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. 64	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. 65	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. 68	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. 80	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>X. campestris</i> B-60	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>X. campestris</i> 8003b	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>C. michiganense</i> 13a	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>S. lutea</i> B-110	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>M. laur</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	±	-
<i>Az. croococum</i> A-888	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>E. coli</i> B-60	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>C. citri</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	±	-
<i>E. caratovora</i> 8982	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>A. tumefaciens</i> 8628	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>B. subtilis</i> CNMN-BB-01	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	±
<i>B. subtilis</i> var. <i>mesentericus</i> CNMN-BB-02	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	±
<i>B. megaterium</i> B-394	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>B. cereus</i> B-370	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	±	±
<i>B. mesentericus</i> B-61	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	±	±
<i>B. mesentericus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-

În continuare, pentru a stabili tulpinile cele mai rezistente la prezența erbicidului, a fost majorată substanțial concentrația TF în mediul de cultivare până la 300 – 500 mg/L. Deoarece pe mediul mineral E8 concentrația TF de 200 mg/L a fost fatală pentru dezvoltarea bacteriilor, în continuare pentru cercetări s-a utilizat mediul agar-nutritiv + 10% apă (martor), care a fost suplinit cu TF în concentrații de 200, 300 și 500 mg/L.

Analizând rezultatele obținute, prezentate în tabelul 3, putem evidenția 4 tulpini de bacterii, trei din genul *Pseudomonas* și una din genul *Bacillus*, care au manifestat creștere activă în prezența concentrațiilor foarte înalte (300-500 mg/L) de TF în mediul de cultivare. Probabil, aceste tulpini posedă un puternic mecanism de adaptare la condițiile mediului contaminat, bazat pe sinteza enzimelor și altor metaboliți, necesari pentru descompunerea contaminantului și utilizarea lui în calitate de nutrient [33].

Tabelul 3. Activitatea de creștere a tulpinilor de bacterii pe mediul agar-nutritiv+ 10% apă (martor) cu adaos de TF în diferite concentrații.

Mediul	Tulpina					
	<i>B. cereus</i> var. <i>fluores.</i> CNMN-BB-07	<i>Ps. fluorescens</i> CNM-PFB-01	<i>B. subtilis</i> var. <i>mesent.</i> CNMN-BB-02	<i>Ps.</i> <i>sp. 65</i>	<i>B. subtilis</i> CNMN-BB-01	<i>Ps. aureofaciens</i> CNMN-PsB-07
martor	+++	+++	+++	+++	+++	+++
+ 200 mg/L TF	+	+++	+++	+++	+	+++
+ 300 mg/L TF	–	+++	+++	+++	–	+++
+ 500 mg/L TF	–	+++	+++	+++	++	+++

Rezultatele obținute, sunt în concordanță cu studiile biochimice care au demonstrat că diverse tulpini de pseudomonade sunt capabile să degradeze cca 100 de compuși organici așa ca pesticidele, hidrocarburile, alcanii și compușii poliaromatici. Deseori aceeași tulpină poate utiliza ca sursă de azot și carbon mai mulți compuși înrudiți. Mai mult ca atât, unele bacterii folosesc contaminanții ca unică sursă de carbon și energie. Multe bacterii din genul *Pseudomonas* posedă plasmide care codifică enzimele ce catalizează scindarea compușilor organici aromatici și halogenați [46].

Reacțiile enzimatiche cheie ale degradării aerobe se bazează pe procesul de oxidare și sunt catalizate de mono- și dioxigenaze, precum și peroxidaze. Oxigenazele sunt oxidoreductaze care utilizează moleculele de O₂ pentru a incorpora oxigenul în structura contaminantului destabilizând-ul [20].

Căile de degradare a unei varietăți mari de compuși aromatici sunt asemănătoare prin obținerea unor produse intermediare monoaromatice, de tip cateholi și protocatecuete (sau derivații lor metilați), care sunt subsecvent degradate în intermediari ai metabolismului central care intră în ciclul acizilor tricarboxilici și sunt utilizați pentru biosinteză [10].

Astfel, conform rezultatelor obținute, putem menționa că TF posedă un efect toxic asupra bacteriilor, însă unele din ele posedă mecanisme puternice de adaptare la prezența xenobioticului în mediul de cultivare, fapt ce le permite să supraviețuiască și să se dezvolte în condiții de stres. Cele mai active din acest punct de vedere au fost 4 tulpini: *Pseudomonas fluorescens* CNM-PFB-01, *Pseudomonas sp. 65*, *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-07 și *Bacillus subtilis* var. *mesentericus* CNMN-BB-02.

Concluzii

1. Din solul poluat cu pesticide au fost izolate în cultură pură și caracterizate 6 tulpini de bacterii, 3 dintre care au manifestat activitate antimicrobiană față de diverse microorganisme fitopatogene și viabilitate înaltă în prezența concentrațiilor mari de TF de 200-250 mg/L.

2. Din 37 tulpini de bacterii din CNMN au fost selectate 4 tulpini din genurile *Pseudomonas* și *Bacillus* cu creștere activă pe medii cu 300-500 mg/L de TF, care pot servi ca potențiali distructori ai pesticidelor.

3. Rezultatele obținute pot contribui la elaborarea tehnologiilor autohtone de bioremediere a solurilor contaminate cu pesticide.

Bibliografie

1. Agarry S.E., Durojaiye A.O., Solomon B.O. Microbial degradation of phenols: a review. //Int. J. Environ Pollut., 2008, vol. 32:12–28.

2. Agarry S.E., & Solomon B.O. Kinetics of batch microbial degradation of phenols by indigenous *Pseudomonas fluorescens*. //Int. J. Env. Sci. Technology., 2008, vol. 5(2):223–232.

3. Batîr L., Slanina V., Sîrbu T. Procedeu de conservare a tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* cu activitate antifungică. Brevet de invenție de scurtă durată MD 1071, BOPI nr. 9/2016, p. 26.

4. Batîr L., Slanina V., Sîrbu T. Procedeu de conservare a tulpinii *Pseudomonas aureofaciens* cu activitate antifungică. Brevet de invenție de scurtă durată MD 1072, BOPI nr. 9/2016, p. 26-27.

5. Batîr L., Slanina V., Sîrbu T., Chiselîța O. Procedeu de conservare a tulpinii *Pseudomonas aurantiaca* cu activitate antifungică. Brevet de invenție de scurtă durată MD 1056, BOPI nr. 7/2016, p. 33-34.

6. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Hensyl WR(ed.), 9th edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia: 1994; p. 816. ISBN 0-683-00603-7.

7. Bogdevich O., Cadocinicov O. Elimination of acute risks from obsolete pesticides in Moldova: phytoremediation experiment at a former pesticide storehouse. Application of Phytotechnologies for Cleanup of Industrial, Agricultural and Wastewater Contamination. Springer, NATO book series, C. Environmental Security, 2009, pp. 61-87.

8. Children's health and environment in the Republic of Moldova. The Fifth Ministerial Conference on Environment and Health "Protecting children's health in a changing environment", Parma, Italy, 10-12 March, 2010. Chisinau, 2010, 63 p.

9. Ecobichon Donald J. Pesticide use in developing countries. //Toxicology., 2001, vol. 160(1-3):27–33.

10. Fuchs G. Oxidation of organic compounds. In Biology of the Prokaryotes. JW Lengeler, G Drews, HG Schlegel, (eds.). Stuttgart: Thieme, 1999, p. 187–233.

11. Furukawa K., Oxygenases and Dehalogenases: Molecular Approaches To Efficient Degradation of Chlorinated Environmental Pollutants. //Boisci. Biotechnol. Biochem., 2006, vol. 70:2335–2348.

12. <https://en.wikipedia.org/wiki/Trifluralin>.

13. Hussain S., Siddique T., Arshad M., Saleem M. Bioremediation and phytoremediation of pesticides: recent advances. //Crit. Rev. Environ. Sci. Technol., 2009, vol. 39:843–907.

14. Jason M. Tor, Caifen Xu, Joseph M. Stucki, Michelle M. Wander, Gerald K. Sims. Trifluralin degradation under microbiologically induced nitrate and Fe(III) reducing conditions. //Environ. Sci. & Technol., 2000, vol. 34(15):3148-3152.

15. Juc L., Stratulat T., Bouvet Y., Ungureanu D., Volneanschi A. Unele aspecte ale poluării solurilor cu pesticide organoclorurate. //Mediul Ambient., 2007, nr. 1(31), p. 9-16.

16. Juliana F. Santos-Gandelman, Kimberly Cruz, Sharron Crane, Guilherme Muricy, Marcia Giambiagi-deMarval, Tamar Barkay, Marinella S. Laport. Potential Application in Mercury Bioremediation of a Marine Sponge-Isolated *Bacillus cereus* strain Pj1. //Current Microbiology., 2014, vol. 69(3):374–380.
17. Kamaludeen S.P.B., Arunkumar K. R., Avadainayagam S., & Ramasamy K. Bioremediation of chromium contaminated environments. //Indian Journal of Experimental Biology., 2003, vol. 41:972–985.
18. Kumar A., Kumar S., & Kumar S. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. //Biochemical Engineering Journal., 2005, vol. 22:151–159.
19. Kunamneni A., Camarero S., Garcia-Burgos C., Plou F. J., Ballesteros A., & Alcalde M. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. //Microbial Cell Factories., 2008, vol. 7:32-35.
20. Larkin M.J., Kulakov L.A., & Allen C. C. R. Rhodococcus: Genetics and Functional Genomics. In Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer Berlin Heidelberg 2010, p. 1345-1353.
21. Mai P., Jacobsen O.S., & Aamand J. Mineralization and co-metabolic degradation of phenoxyalkanoic acid herbicides by a pure bacterial culture isolated from an aquifer. //Applied Microbiology and Biotechnology., 2001, vol. 56(3–4):486–490.
22. Mollaeia M., Abdollahpoura S., Atashgahia S., Abbasia H., Masoomi F., Rad I., et al. Enhanced phenol Environ Monit Assess degradation by *Pseudomonas sp.* SA01: gaining insight into the novel single and hybrid immobilizations., //Journal of Hazardous Materials., 2010, vol. 175(1–3):284–292.
23. Müller R.H., Kleinstauber S., & Babel W. Physiological and genetic characteristics of two bacterial strains utilizing phenoxypropionate and phenoxyacetate herbicides. //Microbiology Research., 2001, vol. 156(2):121–131.
24. Nawaz K., Hussain K., Choudary N., Majeed A., Ilyas U., Ghani A., et al. Eco-friendly role of biodegradation against agricultural pesticides hazards. //African Journal of Microbiology Research., 2011, vol. 5(3):177–183.
25. Obsolete pesticides, 2012. <https://obsoletepesticides.net/site/home/countries/moldova/>
26. Pleșca V.; Barbărasă I.; Cupcea L.; Marduhaeva L. Poluanții organici persistenți în Republica Moldova: probleme, abordări, soluții, realizări. //Mediul Ambient., 2008, nr. 5(41), p. 16-18.
27. Ramos J.L., Krell T, Daniels G, Segura A, Duque E. Responses of *Pseudomonas* to small toxic molecules by a mosaic of domains. //Curr Opin Microbiol., 2009, vol. 12:215-220.
28. Rao M.A., Scelza R., Scotti R., & Gianfreda L. Role of enzymes in the remediation of polluted environments. //J. Soil Science Plant Nutrition., 2010, vol. 10(3):333–353.
29. Republic of Moldova. National Implementation Plan for the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. Ministry of Ecology and Natural Resources. 2004. *World Bank*, Edit. Știința, Chisinau: 80 p. <http://www.pops.int/documents/implementation/nips/submissions/moldova.pdf>.
30. State of the Environment in the Republic of Moldova in 2003 (National Report). Ch.: Inst. Naț. de Ecologie, 2004, 130 p. ISBN 9975-9642-1-4.
31. Sen R, Chakrabarti S. Biotechnology-applications to environmental remediation in resource exploitation. //Curr. Sci., 2009, vol. 97:768–775.
32. State of the Environment in the Republic of Moldova, 2007-2010 (National Report – Synthesis). Chisinau, “Nova Imprim” SRL, 2011, 88 p. ISBN 978-9975-4224-3-7.
33. Talley W.F., Sleeper P.M. Roadblocks to the implementation of biotreatment strategies. Ann. NY Acad. Sci., 2006, p. 16–29.

34. Talley J. Introduction of recalcitrant compounds. In W. Jaferey & L. Talley (Eds.), *Bioremediation of recalcitrant compounds*. 2005, (pp. 1–9). Boca Raton: CRC.
35. Tehnologii de remediere. Oficiul Managementul Durabil POP. http://cleanup.vox.md/index.php?option=com_content&task=view&id=12&Itemid=34.
36. The Eliminators in Moldova. GEF/FAO project Capacity Building on Obsolete and POPs Pesticides in Eastern European, Caucasus and Central Asian Countries (EECCA). Brochure, 2011, 46 p. <http://milieukontakt.net/en/wp-content/uploads/2011/10/The-Eliminators-in-Moldova-obsolete-pesticides.PDF>.
37. Verma J.P., Jaiswal D.K. Book review: advances in biodegradation and bioremediation of industrial waste. //Front. Microbiol., 2016 vol. 6:1–2. doi:10.3389/fmicb.2015.01555.
38. Wasi S., Jeelani G., & Ahmad M. Biochemical characterization of a multiple heavy metal, pesticides and phenol resistant *Pseudomonas fluorescens* strain. //Chemosphere., 2008, vol. 71: 1348-1355.
39. Wasi S., Tabrez S., & Ahmad M. Isolation and characterization of a *Pseudomonas fluorescens* strain tolerant to Environ Monit Assess major Indian water pollutants. //Journal of Bioremediation and Biodegradation., 2010, vol. 1:101-106.
40. Wasi S., Tabrez S., & Ahmad M. Suitability of immobilized *Pseudomonas fluorescens* SM1 strain for remediation of phenols, heavy metals and pesticides from water. //Water, Air, and Soil Pollution., 2011, vol. 220(1-4): 89-99.
41. Wasi S., Tabrez S., & Ahmad M. Use of *Pseudomonas* spp. for the bioremediation of environmental pollutants: a review. //Environmental Monitoring and Assessment., 2013, vol. 185(10): 8147-8155.
42. Wilson C, Tisdell C. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. //Ecological Economics., 2001, vol. 39(3): 449-462.
43. Zarnea G., Mihăiescu GR., Velehorsch V. Principii și tehnici de microbiologie generală. București, 1992, vol. 1, p. 234.
44. Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. Москва, МГУ, 1989, с. 336.
45. Герхард Ф. Хранение, субкультивирование, проверка чистых культур. М Мир, 1983, с 352-356.
46. Глик Б., Пастернак Дж. «Молекулярная биотехнология. Принципы и применения»/ Бернард Глик, Джек Пастернак / Пер. с англ. - М.: Мир, 2002. - 589 с.
47. Добровольская Г.Г. и др. Методы выделения и идентификация почвенных бактерии Москва, МГУ, 1989, с. 72.
48. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М. Изд-во. „Наука”, 2004, 528 с.
49. Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Журенко Е.Ю. Антагонистическая активность бактерий деструкторов хлорфеноксикислот рода *Vacillus*. //Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2013, Выпуск № 1 (39), с. 219-221.
50. Звягнецев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. Москва, МГУ 1980, с. 224.
51. Сидякина Т.М. Методы консервации микроорганизмов. Пущино, 1988, 60 с.
52. Скворцова И.Н. Идентификация почвенных бактерий. Часть I, 1983, с. 24.
53. Скворцова И.Н. Идентификация почвенных бактерий. Часть II, 1984, с. 63.