



RAPORT DE ACTIVITATE

ELIMINAREA COMPUȘILOR TOXICI (PESTICIDE, METALE GRELE, ETC.) DIN SOLURI PRIN FITOREMEDIERE

Întocmit,

Asist. cerc. dr. Ardelean Mirela

Avizat,

Prof. Univ.dr. Anton Fikai

2018

Cuprins

Scopul studiului	2
Obiectivele studiului	2
Introducere	2
I.GENERALITĂȚI PRIVIND SURSELE DE POLUARE CU METALE GRELE ȘI PROCEDURA DE FITOREMEDIERE	3
I.1. Utilizarea tehnicilor in vitro, caracterizare și aplicabilitate practică în fitoremediere	6
II.STUDIUL EXPERIMENTAL – MATERIALE ȘI METODE UTILIZATE ÎN IMPLEMENTAREA STUDIULUI DE CERCETARE	8
II. 1. Creșterea plantulelor pe medii nutritive suplimentate cu diferite concentrații de metale grele	8
II.1.1. Inițierea culturilor in vitro pe medii de cultură suplimentate cu diferite tipuri de metale grele și de diferite concentrații	8
II. 1.1.1. Spațiile de lucru și aparatura utilizată pentru efectuarea experimentelor	8
II.1.1.2. Materialul vegetal, compoziția mediului de cultură și regimul de vitrocultură	9
II.1.2. Urmărirea evoluției unor parametri morfologici, fiziologici și biochimici ca potențiali indicatori	10
II. 1.2.1. Biometrizarea vitroculturilor	10
II.1.2.2. Examinarea morfo-fiziologică a vitroplantulelor obținute pe medii cu metale	10
II.1.2. 2. 1. Analiza materialului vegetal la microscopul electronic cu baleiaj (SEM)	10
II.1.2. 2. 2. Examinarea fiziologică a vitroplantulelor obținute pe medii cu metale grele	11
II.1.3. Determinările biochimice a vitroplantulelor obținute pe medii cu metale grele	11
III. Metoda ICP-MS	12
IV. Metode statistice aplicate în interpretarea rezultatelor obținute	12
V.REZULTATE ȘI DISCUȚII	12
V.1.2. Urmărirea evoluției unor parametri morfologici, fiziologici și biochimici ca potențiali indicatori	12
V. 1.2.1. Biometrizarea vitroculturilor	12
V.1.2.2. Examinarea morfologică a vitroplantulelor obținute pe medii cu metale	21
V.1.2. 2. 1. Analiza materialului vegetal la microscopul electronic cu baleiaj (SEM)	21
V.1.3. Examinarea fiziologică a vitroplantulelor obținute pe medii cu metale grele	26
V.1.4. Determinările biochimice a vitroplantulelor obținute pe medii cu metale grele	28
Concluzii	33
Anexe	34
Bibliografie	52

Scopul acestui studiu este investigarea raspunsurilor morfologice, fiziologice și biochimice ale plantelor crescute *in vitro* la excesul de metale grele. Rezultatele obtinute la diferite concentratii ale fiecarui metal vor fi comparate pentru a releva existenta unei relatii doza-raspuns.

Obiectivele și beneficiile aduse în cadrul acestui studiu. Contaminarea solului cu metale grele persistente și potențial toxice este omniprezentă în întreaga lume. Concentrația acestor metale grele în sol a crescut drastic în ultimele decenii, reprezentând astfel un risc enorm pentru mediu și sănătatea umană. Unele tehnologii s-au folosit de mult timp pentru a remedia metalele grele periculoase. Având în vedere nevoia imperativă de a reduce poluarea la scară largă, în prezent se dezvoltă alte tehnologii. În alegerea tehnologiei aplicabile, trebuie să luăm în considerare factori precum compoziția poluantului, eficiența tehnologiei, intervalul de timp, costul și dispozițiile legale. Obiectivele pe care ni le-am propus au fost următoarele:

1. Evaluarea efectului diferitelor doze de metale asupra creșterii plantelor *in vitro*;
2. Studiul efectelor metalelor grele asupra proceselor metabolice asociate;
3. Creșterea plantelor pe medii nutritive suplimentate cu diferite concentrații de metale grele și urmărirea evoluției unor parametri biochimici potențiali indicatori;
4. Corelarea datelor biochimice cu parametrii biometrici ai plantelor, monitorizați pe durata experimentului și evidențierea unor aspecte dinamice.

Introducere

Poluarea cu metale grele cauzată de diverse activități naturale și antropice este una dintre cele mai importante probleme de mediu. Deși diferite metode fizice și chimice au fost propuse pentru a elimina astfel de metale periculoase din mediul înconjurător, acestea au cel mai puțin succes din punct de vedere al costurilor, limitărilor și generării de substanțe nocive.

Ideea utilizării plantelor ce acumulează metale, pentru înlăturarea selectivă și reciclarea metalelor aflate în exces în mediu, a fost introdusă în 1983, a câștigat interes deosebit în anii 1990 și a fost examinată tot mai mult ca o tehnologie practică, puțin costisitoare comparativ cu metodele clasice de înlocuire sau spălare a solurilor poluate.

Fitoremedierea se referă la bioremedierea botanică și implică utilizarea plantelor verzi pentru decontaminarea solurilor, apelor și aerului. Este o tehnologie care poate fi aplicată atât poluanților organici cât și poluanților anorganici (metale mai ales) prezenți în sol, apă sau aer.

Tehnicile de fitoremediere pot oferi singura cale eficientă de refacere a sutelor de mii de km² de sol și ape poluate în urma activităților umane, constituind o alternativă ieftină și ecologică a metodelor fizice de remediere, distructive pentru mediu, folosite curent.

Fitoremedierea este considerată o tehnologie care protejează mediul perturbator, spre deosebire de metode de curățire mecanice, cum ar fi excavare sol sau de pompare a apelor subterane poluate. În ultimii 20 de ani, această tehnologie a devenit tot mai populară și a fost folosită pentru soluri contaminate cu plumb, uraniu, precum și arsen.

Cu toate acestea, un dezavantaj major al fitoremedierii este că acesta necesită un angajament pe termen lung deoarece procesul este dependent de creșterea plantelor, toleranța la toxicitate și capacitate de bioacumulare. Cultura țesuturilor vegetale reprezintă un instrument convenabil de laborator pentru studii de fitoremediere. Formele de cultură tisulară cel mai des utilizate sunt suspensiile celulare, calusurile și organogeneza. Odată stabilite, aceste culturi *in vitro* pot fi propagate pe o perioadă nedeterminată și sunt disponibile la cerere. În schimb, plantele întregi sunt cultivate fie în sol, fie hidroponice, sistemele au o durată de viață limitată și fiecare plantă individuală trebuie să fie înlocuită și restabilită după fiecare experiment. Prin urmare, timpul necesar pentru a efectua investiția poate fi redus substanțial folosind culturile de țesut mai degrabă decât plantele întregi. Așadar, în acest studiu ne-am propus ca prin utilizarea tehnicilor de biotehnologii vegetale să studiem *in vitro* capacitatea de bioacumulare a metalelor grele, utilizând diferite specii vegetale.

I. Generalități privind sursele de poluare cu metale grele și procedura de fitoremediere

Contaminarea solului, o problemă importantă în UE. 3,5 milioane de site-uri din Uniunea Europeană au fost estimate în 2012 ca potențial contaminate cu 0,5 milioane de situri care sunt întrădevar contaminate și au nevoie de remediere (Raport, DG ENV B1, 2014). Acest lucru este important de evaluat, deoarece solul este o sursă neregenerabilă; acțiunile trebuie întreprinse la toate nivelurile. Cu toate acestea, la nivel european, există o cunoaștere cât mai clară a contextului de contaminare a solului, o mare difuzare a celor mai bune practici. UE oferă, de asemenea, orientări și obiective, gestionează impacturile transfrontaliere și investește în cercetare. România dispune de o reglementare specifică a solului la nivel național, folosind metode de praguri ca tip de metodologie (Dumitriu, 2014). Contaminarea solului cu metale grele, cum ar fi cadmiul (Cd), cuprul și mercurul, a devenit o preocupare deosebită, în special în instalațiile de placare a metalelor, în zonele miniere și în zonele învecinate, precum și în zonele rezidențiale și agricole din regiunea în aval din aceste zone. În unele cazuri, metalele grele din sol intră în apă râu și apoi difuzează pe terenurile agricole cu irigații, ceea ce duce la răspândirea unor valori relativ scăzute de metale grele în zone mai largi, în loc să fie localizate în concentrații ridicate.

Deși metalele grele sunt omniprezente în materialele parentale ale solurilor, principalele surse antropice de metale grele în soluri sunt : deșeurile orășenești, mineritul, arderea combustibililor, etc. (fig.1.)

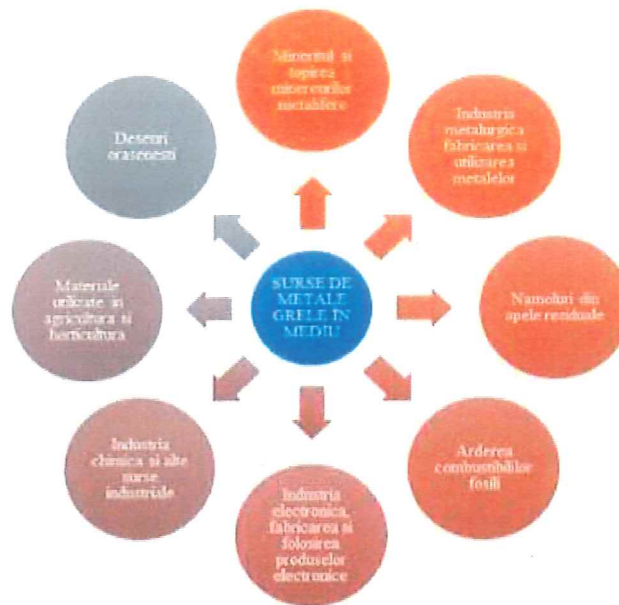


Fig.1 Surse de poluare a solului cu metale grele

Poluarea cu metale grele cauzată de diverse activități naturale și antropice este una dintre cele mai importante probleme de mediu. Deși diferite metode fizice și chimice au fost propuse pentru a elimina astfel de metale periculoase din mediul înconjurător, acestea au cel mai puțin succes din punct de vedere al costurilor, limitărilor și generării de substanțe nocive (Wuana și Okieimen, 2011).

Tabelul 1. Valori normale ale metalelor grele în sol și plante mg kg⁻¹ (ppm) și concentrația critică (Boroș și Micle., 2015).

Element	Valori normale în sol	Concentrații critice în sol	Valori normale în plante	Concentrații în soluri metalifere
Cd	0,01-2,0	3-8	0,1-3	11-317
Cr total	5-1500	75-100	0,2-5	47-8.450
Cu	2-250	60-125	5-25	52-50.900
Hg	0,01-0,5	0,3-5	0,1-9,5	100-400
Ni	2-750	100	1-10	19-11260
Pb	2-300	100-400	0,1-5	3.870-49.910
Zn	1-900	70-400	2-400	109-70.480

Din punct de vedere al fitoremedierii planta poate fi considerată ca fiind un sistem de pompare și tratare care poate preveni răspândirea contaminării solurilor. Contaminanți, cum ar fi metale, pesticide, solvenți, explozibili, țigări au fost diminuate în proiectele de fitoremediere din întreaga lume.

Plantele cu potențial de fitoremediere mare pot fi speciile din flora spontană ce cresc în locuri poluate sau plantele cultivate care au trăsături specifice, determinate de mediul poluant. Poluanții pot fi absorbiți în plante prin câteva procese naturale biofizice și biochimice, și anume prin: absorbție, transport, translocare, hiperacumulare și transformare. În prezent se cunosc 45 de familii de plante care contin specii hiperacumulatoare de metale (metalofie); ele pot acumula Cu,Co,Cd,Mn,Ni, Se sau Zn în cantități de 100 – 1000 de ori mai mare decât cele acumulate de plante în mod obișnuit .

Posibilitatea acumulării active a metalelor în partea aeriană a plantelor oferă o abordare promițătoare atât pentru curățirea solurilor contaminate antropic cât și pentru extragerea, în scopuri comerciale, a metalelor din solurile natural bogate în metale.

Fitoremedierea poate fi înțeleasă ca utilizarea plantelor (arbori, arbuști, ierburi și plante acvaticе) și microorganismele asociate acestora pentru a îndepărta, degrada sau izola substanțele toxice din mediul înconjurător. Cuvântul „fitoremediere” provine din grecescul "phyton", adică "plantă" și latină "remedium", ceea ce înseamnă "a remedia" sau "a corecta".

Substanțele care pot fi supuse unei fitoremediere includ metale (Pb, Zn, Cd, Cu, Ni, Hg), metaloizi (As, Sb), compuși anorganici (NO₃-NH₄ +, PO₄³⁻), hidrocarburi petroliere (BTEX), pesticide și erbicide (atrazină, bentazonă, compuși clorurați și nitroaromatici), explozivi (TNT, DNT), solvenți clorurați (TCE, PCE) și deșeurii organice industriale (PCPs) (Favas și colab., 2014).

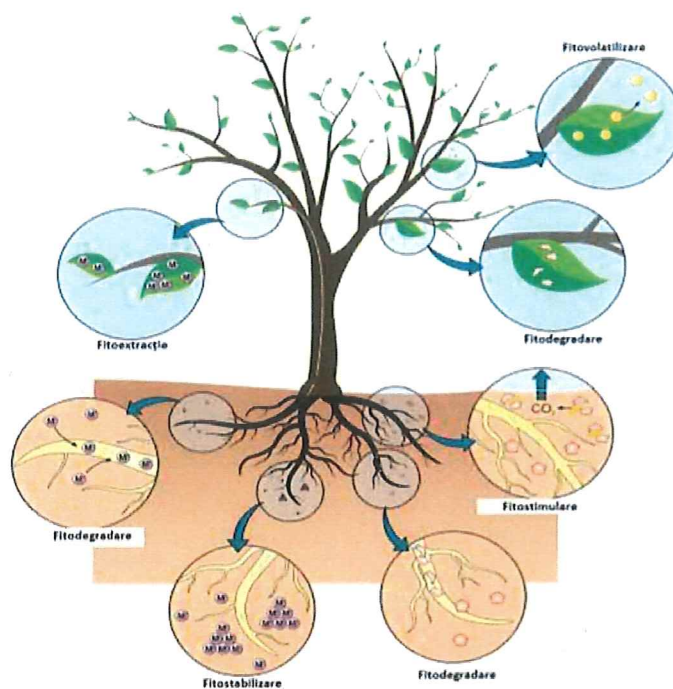


Fig.2. Principalele tipuri de fitoremediere

Fitoremedierea utilizează plantele verzi vii pentru fixarea sau adsorbția contaminanților, pentru curățarea contaminanților sau pentru reducerea sau dispariția riscurilor. Fitostabilizarea, fitovolatilizarea și fitoextracția sunt principalele trei tipuri ale fitoremedierii.

Conform regulilor departamentului de energie din S.U.A., plantele hiperacumulatoare trebuie să îndeplinească următoarele caracteristici: să aibă o eficiență ridicată acumulând sub concentrația scăzută de contaminanți; acumulare de concentrații mari de contaminanți; sistem de rădăcini foarte ramificate, acumularea mai multor tipuri diferite de metale grele; creștere rapidă și biomasă mare; rezistență la dăunători și la boli, necomestibile pentru om și animale, ușor de recoltat (Yao și colab., 2012).

Studiile care utilizează culturi de plante pot fi efectuate conform condițiilor impuse în laborator care sunt mai ușor de controlat decât cu instalații de creștere a solului, în special în ceea ce privește mediul de cultură, compoziția, parametrii nutriționali, nivelurile fitohormonului și capacitatea de a manipula celulele și țesuturile. Deși pot fi adăugate substanțe efective solului, ele pot fi indisponibile pentru plante datorită adsorbției sau legării cu componentele solului. Această acțiune este minimizată în culturile de țesuturi, facilitând astfel transportul substanțelor și absorbția de către celule (Camper și McDonald, 1989).

I.1. Utilizarea tehnicilor *in vitro*, caracterizare și aplicabilitate practică în fitoremediere

În sens larg, prin cultura *in vitro* se înțelege creșterea pe medii artificiale, în condiții de asepsie deplină și de factori ambientali bine controlați, a unor organe, părți de organe, țesuturi sau celule vegetale. Reușita culturii depinde de o multitudine de factori și este vizibilă în momentul în care explantul crește (Cachiță și colab., 2009).

Explantul, numit și *fitoinocul*, este un fragment vegetal - organ, țesut, celulă sau protoplast, care desprins fiind dintr-o plantă donor (mamă), este inoculat și crescut în condiții sterile, pe un mediu artificial de cultură. Evoluția explantului vitrocultivat este dirijată de operator în funcție de scopul urmărit. Acesta poate regenera o nouă plantă (sau mai multe plante - neoplantule), prin stimularea neogenezei de organe aeriene (tulpina și frunzele) sau/și de rădăcini, ori poate forma calus, prin stimularea înmulțirii nediferențiate a celulelor, sau poate da naștere la embrioni somatici (Cachiță și colab., 2008).

Totipotența este însușirea celulelor - în cazul de față a celor vegetale - de a se prolifera, și de a genera o plantă identică cu planta mamă. Teoretic, fiecare celulă vie este totipotentă, însă în practică s-a observat că nu toate celulele au capacitatea de a-și exprima acest caracter, datorită - pe de o parte - diferențierii și a îmbătrânirii celulelor, iar - pe de altă parte - a gradului mare de specializare al acestor celule (Cachiță și colab., 2005).

Spre deosebire de multiplicarea tradițională, unde se operează cu semințe sau cu porțiuni mari de plantă (marcote, butași, altoi), la multiplicarea *in vitro* se folosesc explante mici, de ordinul milimetrilor sau chiar microscopice (celule, protoplaști), explante care în condiții normale de cultură nu ar reuși să crească, fiind lipsite de capacitatea de a sintetiza sigure substanțele nutritive necesare proceselor de creștere și de morfogeneză (Gautheret, 1934).

Din acest motiv, pentru reușita culturii de celule și țesuturi vegetale, se cer respectate următoarele condiții:

- prepararea unui mediu de creștere care să asigure explantului o bună nutriție respectiv sursa energetică dintr-un compus organic, glucidic accesibil metabolismului plantelor;
- asigurarea și controlarea factorilor de mediu (temperatură, lumină, umiditate), în limitele optime pentru fiecare specie, soi și fază de creștere, în funcție de cerințele acestora și de scopul urmărit;
- stimularea creșterii și a diferențierii sau a dediferențierii celulelor explantelor, prin utilizarea corespunzătoare a regulatorilor de creștere;
- asigurarea unei asepsii depline pe tot fluxul de producere a plantelor *in vitro*, printr-o corectă dezinfectie a materialului vegetal, sterilizarea mediului și a vaselor de cultură, precum și efectuarea corectă a tuturor operațiunilor executate în hota cu flux de aer laminar steril, folosind instrumentar dezinfectat prin flambare.

O vitrocultură nu poate fi considerată ca fiind reușită atunci când celulele sale supraviețuiesc, se multiplică și inoculul *crește*, ci numai dacă din cultura *in vitro* realizată, după un timp, pot fi operate *subculturi*. Altfel spus, după inițierea vitroculturii - numită și *cultură primară* – simpla menținere în viață a inoculilor nu este o adevărată vitrocultură, ci doar dacă aceasta poate fi perpetuată în timp, fie așa cum cultura a fost înființată (de exemplu, ca și o cultură de *calus* sau ca și o cultură de *celule*), fie trecându-se de la un anumit gen de cultură, respectiv de la o cultură de calus, la un alt tip de cultură, de exemplu la suspensii celulare, sau la generarea de embrioni somatici (Cachiță și colab., 2004).

Calitatea și evoluția *fitoculturilor* vor depinde nu numai de condițiile *ecofiziologice* din *in vitro* și din camera de creștere, ci și de *calitatea materialului biologic* inoculat, de *starea fiziologică a plantelor mame* sau a *organelor donatoare* de explante, ori a *vitroculturilor* care urmează să fie subcultivate (*mediile* de pe care provin, *vârsta* și *tipul* culturii, *condițiile* de cultură etc.). Capacitatea regenerativă, creșterea culturilor și procesele de morfogeneză, postinoculare, depind foarte mult de: *viabilitatea* celulelor introduse în cultură, *vârsta* acestora, *gradul de diferențiere* și capacitatea lor de *multiplicare* și de *creștere*, *procentul de celule vii și totipotente*, aflate în cultură, din totalul celulelor care constituie fitoinoculul, *încărcătura genetică* a acestora, și altele (Cachiță și colab., 2004).

II. STUDIUL EXPERIMENTAL – MATERIALE ȘI METODE UTILIZATE ÎN IMPLEMENTAREA STUDIULUI DE CERCETARE

După cum am specificat în partea introductivă, scopul acestui studiu este investigarea răspunsurilor morfologice, fiziologice și biochimice ale plantelor crescute *in vitro* la excesul de metale grele. Rezultatele obținute la diferite concentrații ale fiecărui metal vor fi comparate pentru a releva existența unei relații doză-răspuns. Astfel, ca material biologic de studiu am ales specia *Sedum telephium* ssp. *maximum*, o plantă care crește în țara noastră spontan, dar poate fi și cultivată, în scop ornamental, nu și alimentar. Plantele utilizate pentru fitoremediere prezintă în mod ideal caracteristicile de a fi ușor de cultivat, având o rată de înmulțire ridicată, rezistență la agenți patogeni, o adaptare bună la diferite condiții de mediu cât și meteo, capacitatea de acumulare și translocarea metalelor grele, toleranță la efectele toxice ale poluanților țintă. Speciile de plante care acumulează cantități mari de metale grele sunt cunoscute și denumite ca plante hiperacumulatoare. Conform regulilor departamentului de energie din S.U.A., plantele hiperacumulatoare trebuie să îndeplinească următoarele caracteristici: creștere rapidă și biomasă mare; rezistență la dăunători și la boli; necomestibile pentru om și animale; ușor de recoltat; sistem de rădăcini foarte ramificate; acumularea mai multor tipuri diferite de metale grele (Yao și colab., 2012). În urma rezultatelor preliminare, (*in vitro* și *ex vitro*), am considerat că această specie îndeplinește aceste condiții.

II. 1. Creșterea plantulelor pe medii nutritive suplimentate cu diferite concentrații de metale grele

II.1.1. Inițierea culturilor *in vitro* pe medii de cultură suplimentate cu diferite tipuri de metale grele și de diferite concentrații

II. 1.1.1. Spațiile de lucru și aparatura utilizată pentru efectuarea experimentelor

Experimentele de obținere a culturilor *in vitro* de *Sedum telephium* ssp. *maximum* și testarea acestora la tratamente cu metale grele de diferite concentrații au fost realizate în cadrul departamentului de Biotehnologii vegetale ale *Institutului de Științe ale Vieții*, U.V.V.G din Arad care cuprinde mai multe încăperi, grupate în două zone, organizate în funcție de lucrările care se execută în el și anume:

- *zona nesterilă (septică)*, ce cuprinde: spălătorul, camera de distilare a apei, laboratorul de preparare a mediilor, camera pentru sterilizarea sticlăriei și a mediilor de cultură, camera de creștere, camera frigorifică, camera de aclimatizare; camera de depozitare;

- *zona sterilă (aseptică)*, care este constituită dintr-o cameră sau incintă sterilă, unde se face asepsizarea, dimensionarea și inocularea *in vitro* a materialului vegetal.

II.1.1.2. Materialul vegetal, compoziția mediului de cultură și regimul de vitrocultură

Substratul de cultură utilizat în cadrul tuturor experimentelor de vitrocultură a fost constituit din mediu de bază (MB) *Murashige - Skoog* (1962) (MS) agarizat, care a constat din macroelemente, Fe EDTA și microelemente, amestec mineral conform cu rețeta originală, compoziție la care s-a adăugat m- inozitol 100 mg/l, zaharoză 30 g/l și agar - agar 10 g/l; la acest mediu de bază (MB) nu s-au adăugat regulatori de creștere (citochinine sau auxine). Au fost adăugate metale grele, respectiv **Cd SO₄** și **Pb Cl₂**. Variantele de mediu constituite în cadrul experimentelor, prezentate în ordinea în care acestea au fost efectuate, precum și concentrația metalelor grele adăugate în mediul de cultură, au fost inserate în tabelul 1. Prealabil aseptizării mediului de cultură, pH-ul acestuia a fost reglat la valoarea de 5.5, cu acid clorhidric sau cu NaOH, în funcție de bazicitatea sau de aciditatea mediului final.

Tabelul 2. Schemă generală privind organizarea experimentelor de vitrocultură

Nr. Crt.	TIP EXPERIMENT	COD VARIANTE EXPERIMENTALE	COMPOZIȚIA MEDIILOR DE CULTURĂ <i>MURASHIGE – SKOOG</i> (1962) ȘI DENUMIREA METALULUI GREU	CONCENTRAȚIA METALULUI GREU	DURATA DE VITROCULTURĂ
1.	Germinarea semințelor de <i>Sedum telephium</i> ssp. <i>maximum</i> L. în condiții aseptice pe mediul de cultură <i>Murashige - Skoog</i> (1962) lipsit de regulatori de creștere.	-	Mediu de bază <i>Murashige – Skoog</i> (1962) lipsit de regulatori de creștere	-	30 de zile
2.	Inițierea vitroculturilor de <i>Sedum telephium</i> ssp. <i>maximum</i> L. din minibutași apicali din plantule regenerare din embrionii zigotici ai semințelor în cea de-a 30-a zi de vitrogerminație pe mediul de cultură <i>Murashige - Skoog</i> (1962).	V ₀ (varianta control)	Mediu de bază <i>Murashige – Skoog</i> (1962) lipsit de metale grele	-	30 de zile
		V ₁	Mediu de bază <i>Murashige – Skoog</i> (1962) cu Cd SO₄	50 ppm	
		V ₂	Mediu de bază <i>Murashige - Skoog</i> (1962) cu Pb Cl₂	50 ppm	
		V ₃	Mediu de bază <i>Murashige- Skoog</i> (1962) cu Cd SO₄	25 ppm	
		V ₄	Mediu de bază <i>Murashige Skoog</i> (1962) cu Pb Cl₂	25 ppm	

Câte 15 ml de mediu au fost introduși în recipientele de cultură din sticlă incoloră, termorezistentă care a avut înălțimea de 8 cm și diametrul de 4 cm; pentru autoclavare, recipientele, în cazul tuturor experimentelor, după porționarea mediului de cultură, au fost obturate cu folie de aluminiu. Sterilizarea recipientelor cu medii de cultură s-a realizat prin autoclavare, la temperatura de 121°C, timp de 30 de minute, presiunea de 1 atm.. Materialul vegetal utilizat pentru inițierea vitroculturilor a fost reprezentat de lăstari laterali cu 1-2 noduri plus mugure apical (*minibutași apicali*) cu lungimea

de aproximativ 2 cm recoltați de la plantule de *Sedum telephium* ssp. *maximum* L., regenerate din embrionii zigotici ai semințelor germinate timp de 30 de zile pe mediul de cultură *Murashige - Skoog* (1962) lipsit de regulatori de creștere. Semințele din care au provenit explantele, au fost aseptizate, într-o soluție de hipoclorit de sodiu în concentrație 0,1%, diluată cu apă sterilă în raport de 1:2, la care s-a adăugat Tween 20, câte 2 - 3 picături la 150 ml soluție dezinfectantă.

Recipientele cu inoculi au fost trecute în camera de creștere și au fost amplasate pe rafturi, expuse la o temperatură care a variat între $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, în perioada de lumină și de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, în perioada de întuneric și o fotoperioadă de 16 ore lumină/24h, intensitatea luminoasă fiind de 1700 de luși, lumină emisă de tuburi fluorescente de culoare albă cu lungimea de undă de 590 nm, dimensiuni: Lx590 mm Øx26 mm, procurate de la firma Osram.

II.1.2. Urmărirea evoluției unor parametri morfologici, fiziologici și biochimici ca potențiali indicatori

II. 1.2.1. Biometrizarea vitroculturilor

II.1.2.2. Examinarea morfo-fiziologică a vitroplantulelor obținute pe medii cu metale

II.1.2. 2. 1. Analiza materialului vegetal la microscopul electronic cu baleiaj (SEM)

Probele pentru examinarea în SEM au fost montate pe suporturi conductive din cupru sau aluminiu cu ajutorul unor discuri de carbon adezive pe ambele fețe. Orientarea probei pe suport în această fază este foarte importantă, ținând cont de posibilitatea limitată de înclinare a probei în microscop, așa încât zona de interes să fie expusă direct fasciculului de electroni ce balează proba. Astfel, montarea probelor s-a realizat sub lupa microscopului binocular, abia apoi realizându-se acoperirea cu metale a acestora (Ardelean și colab., 2015).

Probele astfel pregătite s-au introdus în microscop și s-au examinat la diferite mărimi, imaginile fiind preluate în format digital sau clasic pe film.

O anexă importantă a SEM este sistemul de microanaliză elementară cu raze X (EDX). Detectorul special al EDX identifică, pe baza radiației X (specifică fiecărei specii chimice) generate de probă, compoziția chimică a probei analizate atât calitativ cât și cantitativ, putându-se realiza chiar hărți cu distribuția fiecărui element chimic în zona luată în studiu (Ardelean și colab., 2015).

În vederea observării materialului vegetal la microscopul electronic cu baleiaj, după 28 de zile de creștere *in vitro* în mediul de cultură suplimentat cu metale grele, probele proaspete de *Sedum telephium* ssp. *maximum* L., reprezentate de: rădăcină, tulpină și frunză recoltate de la toate variantele incluse în experiment, au fost supuse următoarelor procese:

- a). îndepărtarea particulelor de praf prin spălarea materialului vegetal cu apă distilată;
- b). îndepărtarea surplusului de apă;
- c). secționarea unor fragmente și fixarea lor pe banda carbonică.

De asemenea, probele au fost analizate cu sistemul de microanaliză elementară cu raze X

(EDX), care a generat compoziția chimică a probei analizate atât calitativ cât și cantitativ, deci și a Cd-ului și Pb-ului.

Materialul vegetal astfel prelucrat a fost observat și fotografiat la microscopul electronic cu baleiaj Quanta 250.

II.1.2. 2. 2. Examinarea fiziologică a vitroplantulelor obținute pe medii cu metale grele

Determinările fiziologice efectuate cu aparatele LCI pentru **fotosinteză** și aparatul pentru **fluorescență clorofiliană** au drept scop stabilirea stării fiziologice ale culturilor *in vitro* ca urmare a tratamentului cu metale grele. Acest lucru s-a realizat prin măsurarea fotosintezei cu ajutorul aparatului LCI și a fluorescenței clorofiliene cu aparatul pentru fluorescență ACD bioscientific. Aparatul LCI măsoară cantitatea de dioxid de carbon utilizată de plante pentru realizarea fotosintezei exprimată în mgCO₂/m²/s. Cu cât valoarea lui A este mai mare, plantele fac mai multă fotosinteză și starea lor fiziologică este mai bună (Muneer și colab., 2014)

Aparatul ACD bioscientific pentru fluorescență clorofiliană măsoară fluorescența frunzelor, adică cantitatea de lumină refractată de către frunze. Aparatul emite un puls de lumină pe suprafața frunzei, prin intermediul unei fibre optice, și înregistrează cantitatea de lumină care este refractată. Dacă plantele adsorb multă lumină înseamnă că sunt eficiente în utilizarea luminii, fotosistemul II care este responsabil de transferul de electroni din timpul procesului de fotosinteză funcționează. Dacă adsorb puțină lumină sau excesiv de multă lumină atunci planta suferă un stres fiziologic, cum ar fi cel cauzat de metalele grele (Muneer și colab., 2014).

Metodele de lucru au fost următoarele:

- Pentru determinarea fluorescenței s-a folosit aparatul portabil Fluorescence Monitoring System 2 de la Hansatech care arată eficiența fotosistemului II pe parametri: F0, FM, FV, FV și FV/FM. S-au efectuat câte 3 citiri la fiecare probă, utilizând-se frunzulițe și vitrofrunzulițe de aceeași vârstă și aproximativ aceeași dimensiune.
- Pentru determinarea fotosintezei s-a folosit aparatul portabil LCI Bioscientific LDL bazat pe detecția CO₂ cu senzori cu infraroșu. Plantele întregi au fost introduse în camera aparatului efectuându-se câte 3 citiri/probă.

II.1.3. Determinările biochimice a vitroplantulelor obținute pe medii cu metale grele

Extractele au fost preparate prin macerarea a 5 g de plante proaspăt măcinate în 95 ml de apă distilată sau 30% în greutate / volum etanol timp de 24 ore. S-au determinat:

- **Pigmenții clorofilieni, xantofila, carotenoizii** au fost determinate la spectrofotometrul UV-1700 Pharma Spec, Shimadzu după metoda descrisă de Lichtenthaler și Wellburn în anul 1983.

- **Fenolii și flavonoidele** au fost determinate spectrofotometric după metoda Folin-Ciocalteu descrisă de Singleton și Rossi în anul 1965.
- **Determinarea activității antioxidante** utilizând DPPH (metodă spectrofotometrică)
- **Enzimele de stres oxidativ:** catalaza (CAT) a fost determinată după metoda Sinha, peroxidaza (POD) a fost determinată după metoda Gutkova și Degtiari, guaiacol peroxidaza (GPOX) și proteinele solubile au fost determinate după metoda Bradford, superoxidismutaza (SOD) a fost determinată după metoda Winterbourn Hawkins, Brian și Carrell (Artenie și colab., 2008).

III. Metoda ICP-MS. Evaluarea nivelului de metale grele s-a realizat utilizând un echipament ICPMS Agilent 8800, triplu cuadropol. Evaluarea conținutului de metale grele s-a făcut după digestia acid în câmp de microunde a plantelor în prezența de HNO₃ (ICP grade). Cuantificarea s-a putut realiza pe baza curbei de calibrare utilizând 5 soluții etalon multielementare de concentrații adecvate.

IV. Metode statistice aplicate în interpretarea rezultatelor obținute

Rezultatele au fost exprimate în medii \pm eroarea standard. Pentru a evalua diferențele semnificative statistic între tratamente, mediile au fost comparate prin analize ale varianțelor (ANOVA). Datele au fost testate pentru normalitatea și omogenitatea varianțelor cu testul Levene. Când rezultatele au fost semnificative din punct de vedere statistic, a fost utilizat un test de comparație multiplă post hoc Tukey ($p \leq 0,05$). Software-ul folosit pentru analizele statistice a fost IBM SPSS v20.

V. REZULTATE ȘI DISCUȚII

V.1.2. Urmărirea evoluției unor parametri morfologici, fiziologici și biochimici ca potențiali indicatori

V. 1.2.1. Biometrizarea vitroculturilor

Vitroplantulele cultivate au fost monitorizate periodic din 7 în 7 zile, timp de 4 săptămâni. Biometrizarea caracterelor calitative și cantitative ale vitroplantulelor luate în studiu a constat în efectuarea următoarelor observații:

- măsurători asupra sistemului aerian (vegetativ) al plantelor efectuate cu ruleta (în cm):
 - lungimea medie a tulpinițelor;
 - numărul de ramificații de la bază;
 - lungimea medie a ramificațiilor;
 - numărul de frunzulițe;
 - lungimea medie a frunzulițelor;
 - lățimea medie a frunzulițelor
- măsurători asupra sistemului radicular al plantelor efectuate cu ruleta (în cm):
 - numărul rădăcinițelor ;

- lungimea totală a rădăcinițelor.

Observațiile efectuate pe parcursul celor 4 săptămâni de cultivare *in vitro* pe mediul de cultură MB-MS ne-au permis să afirmăm faptul că dezvoltarea plantulelor de *Sedum* a fost pozitiv influențată de suplimentarea mediului de cultură cu metale grele, atât Pb Cl₂ cât și Cd SO₄, lungimea medie a tulpiniței la 28 de zile a înregistrat valori semnificativ mai mari față de varianta control, în special la plantulele crescute pe mediul de cultură MB-MS suplimentat cu Pb, varianta V₄ (fig.3).

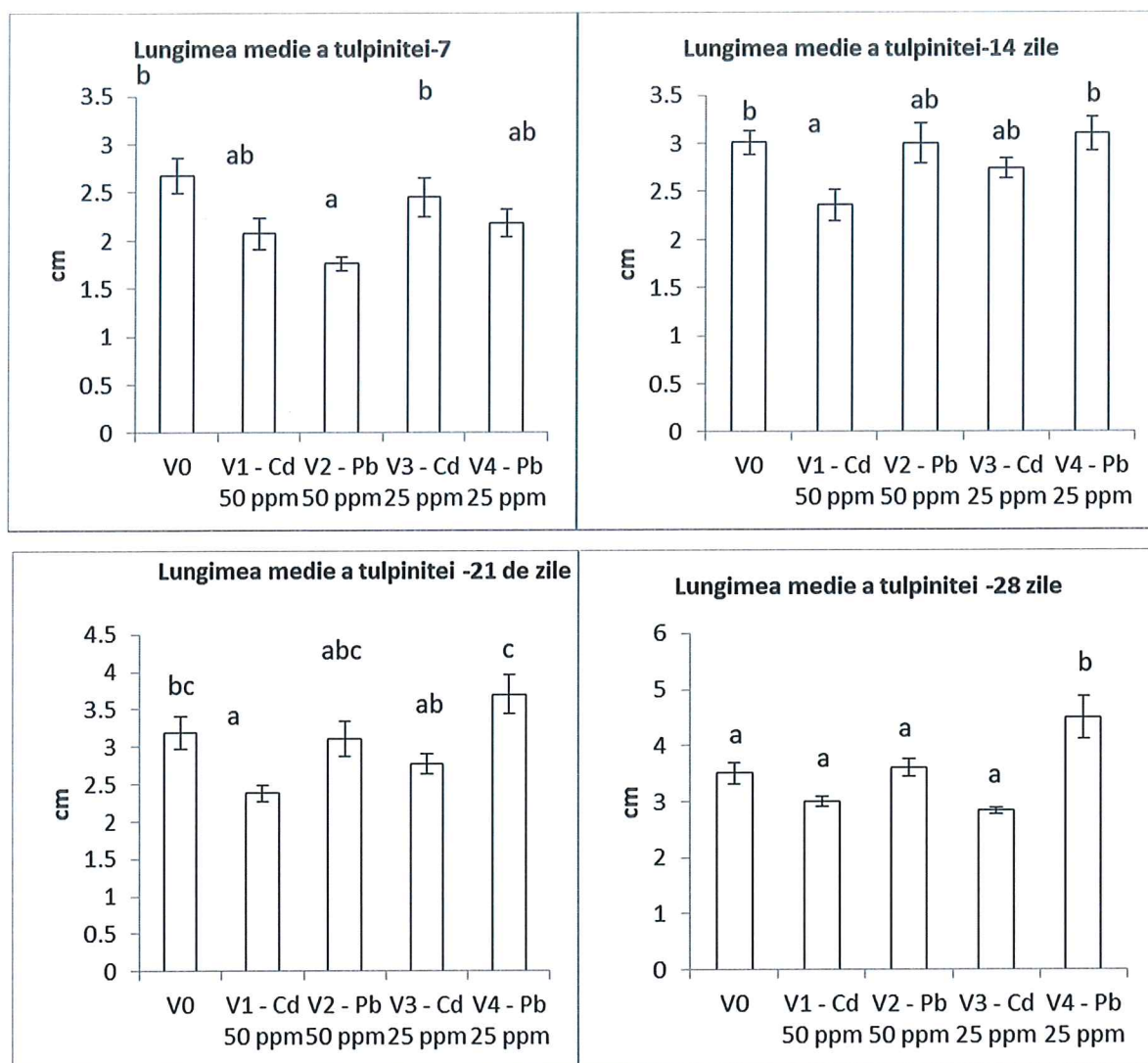


Fig.3. Reprezentarea grafică a valorilor medii corespunzătoare lungimii medii a tulpinței la nivelul vitroculturilor de *Sedum telephium* ssp. *maximum* L., crescute timp **de 7 -28 zile** pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) lipsit de regulatori de creștere (V₀ – varianta control) și a celor crescute pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) suplimentat cu Cd SO₄ și Pb Cl₂. Notă: valorile reprezintă media ± eroarea standard (n=10). Literale diferite reprezintă diferențe semnificative (p<0,05).



V₀—varianta control



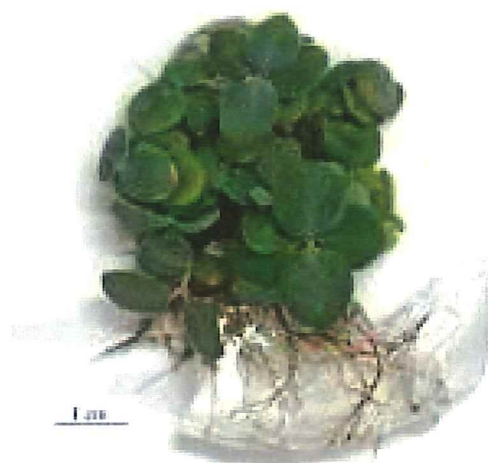
V₁- Cd 50ppm



V₂-Pb 50 ppm



V₃-Cd 25 ppm



1

Fig.4. Aspecte morfologice după 28 de zile de cultură *in vitro* ale plantulelor cultivate pe mediile de cultură lipsite de metale grele (V₀-varianta control) și a celor cultivate pe medii cu metale grele (V₁-V₄).

În ceea ce privește creșterea plantelor prin formarea de *ramificații tulpinale laterale*, plantele cultivate pe varianta V₄- PbCl₂, concentrația de 25 ppm a înregistrat valori mai mari față de varianta V₃-Cd SO₄ de concentrație de 25 ppm, însă ambele variante prezintă ramificații semnificativ mai mici față de varianta control. În schimb, după 28 de zile, vitroplantulele crescute pe mediul de cultură MB-Ms suplimentat cu 25 ppm Cd SO₄ (V₃) au prezentat *număr de frunzulițe* crescut comparativ cu varianta V₄- PbCl₂, dar semnificativ mai mic față de V₀ (fig.7).

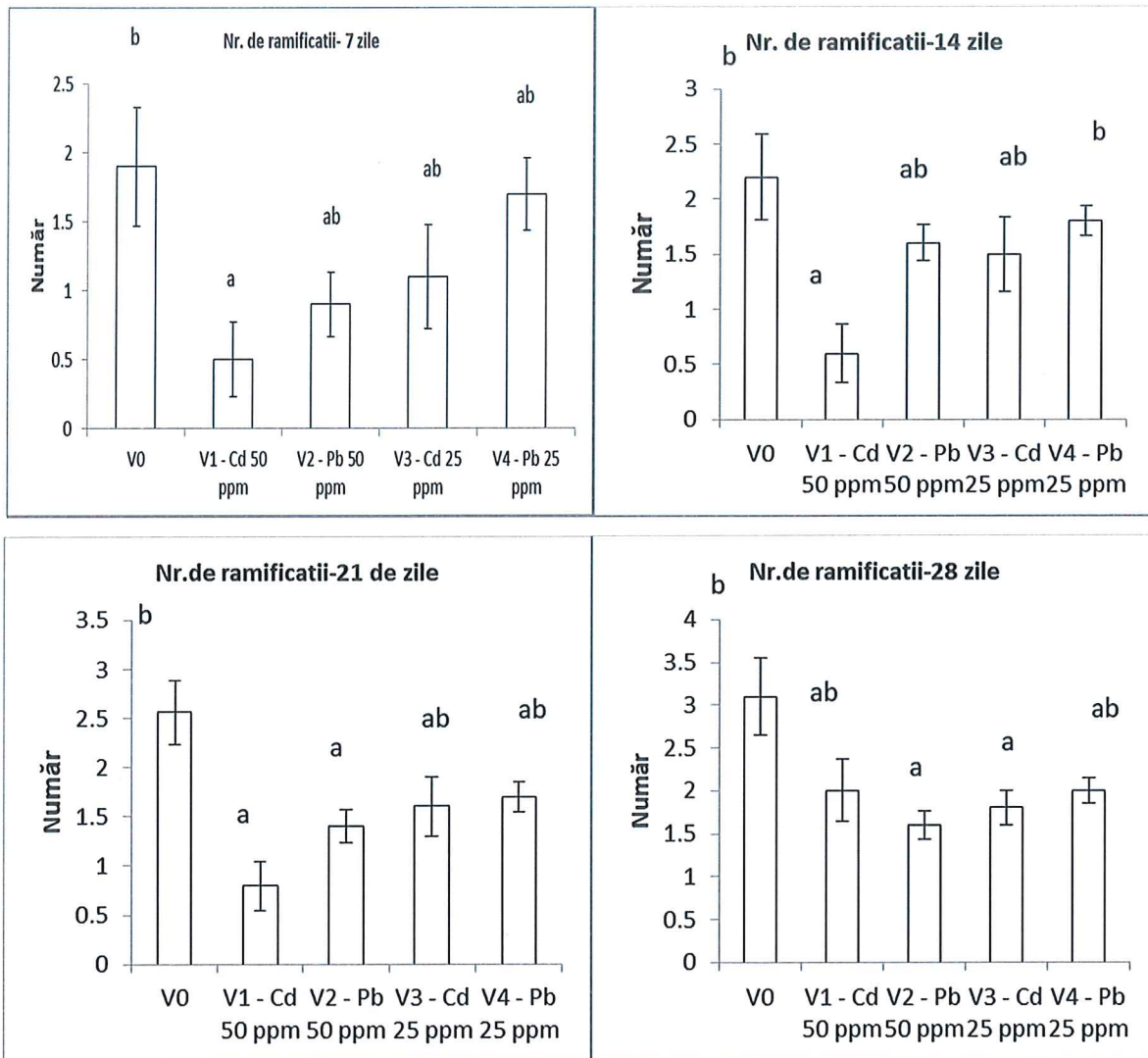


Fig.5. Reprezentarea grafică a valorilor medii corespunzătoare *număr de ramificații* la nivelul vitroculturilor de *Sedum telephium* ssp. *maximum* L., crescute timp **de 7 -28 zile** pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) lipsit de regulatori de creștere (V₀ - varianta control) și a celor crescute pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) suplimentat cu **Cd SO₄** și **Pb Cl₂** . Notă: valorile reprezintă media ± eroarea standard (n=10). Literele diferite reprezintă diferențe semnificative (p<0,05).

Însă, *lungimea medie a ramificațiilor* la varianta V₄ a atins valorile cele mai mari, comparativ cu restul variantelor experimentale, urmată de varianta V₂, putându-se observa faptul că Pb Cl₂ adăugat în mediul de cultură în concentrație de 25 ppm, a stimulat formarea și dezvoltarea frunzelor. Astfel, putem observa că odată cu acumularea metalului, are loc stimularea creșterii în lungime a plantulelor, a lungimii și lățimii frunzelor dar mai ales a rizogenezei (fig.4; fig.6; fig.8;fig.10).

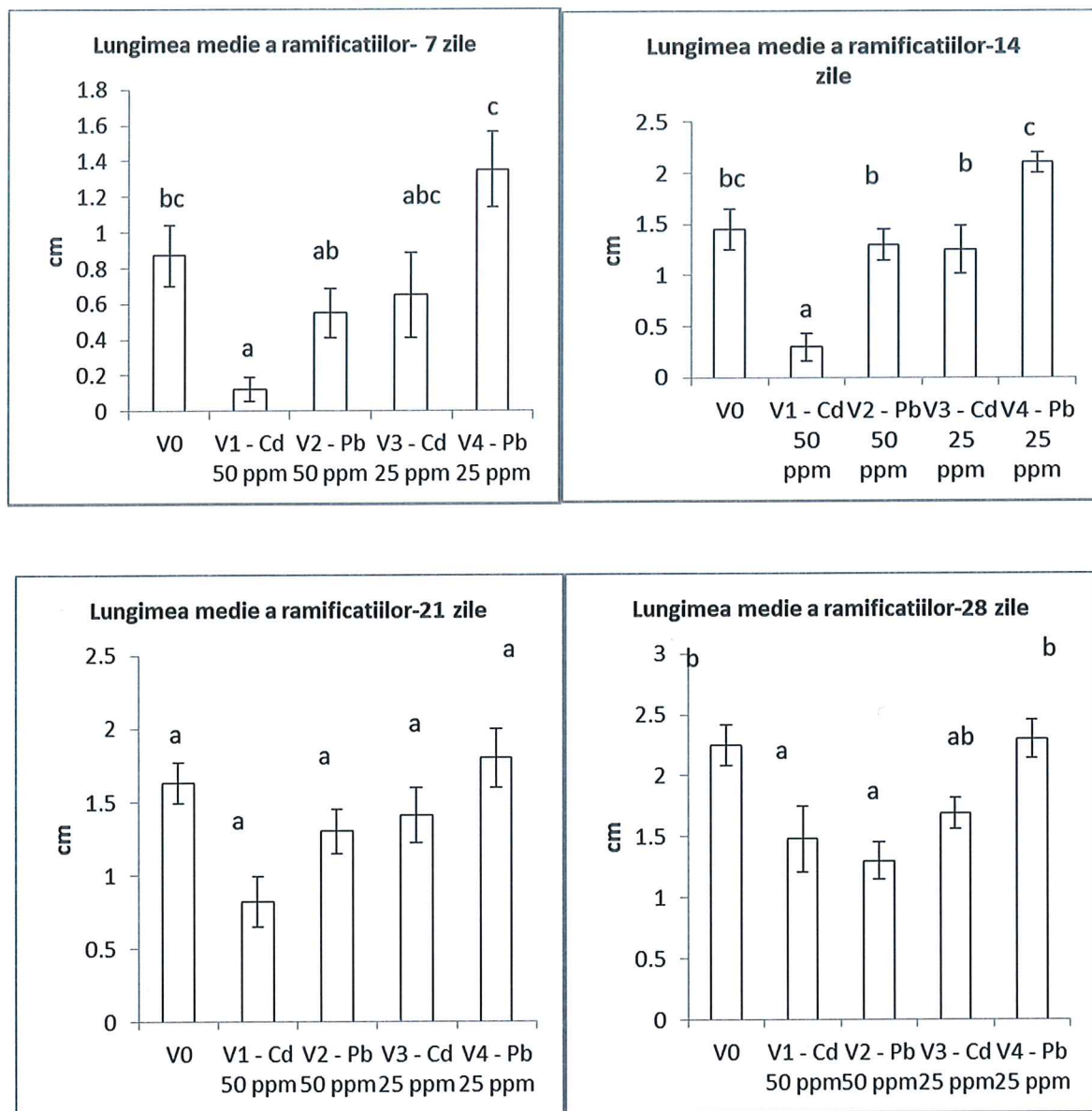


Fig.6. Reprezentarea grafică a valorilor medii corespunzătoare *lungimii medii a ramificațiilor* la nivelul vitroculturilor de *Sedum telephium* ssp. *maximum* L., crescute timp **de 7 -28 zile** pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) lipsit de regulatori de creștere (V₀ - varianta control) și a celor crescute pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) suplimentat cu Cd SO₄ și Pb Cl₂. Notă: valorile reprezintă media ± eroarea standard (n=10). Literele diferite reprezintă diferențe semnificative (p<0,05).

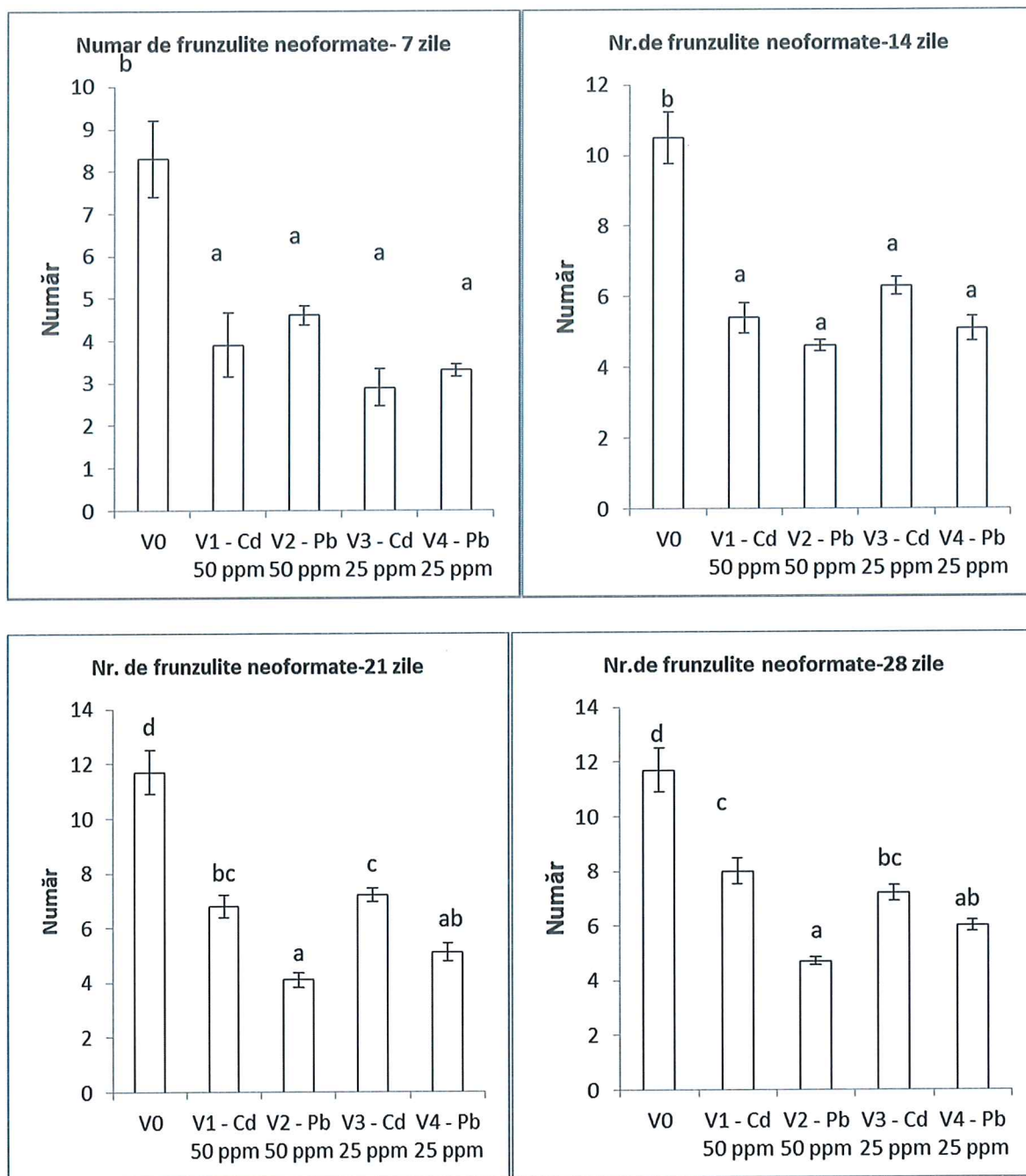


Fig.7. Reprezentarea grafică a valorilor medii corespunzătoare numărului de frunzulite neoformate la nivelul vitroculturilor de *Sedum telephium* ssp. *maximum* L., crescute timp de 7 -28 zile pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) lipsit de regulatori de creștere (V₀ - varianta control) și a celor crescute pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) suplimentat cu Cd SO₄ și Pb Cl₂. Notă: valorile reprezintă media ± eroarea standard (n=10). Literele diferite reprezintă diferențe semnificative (p<0,05).

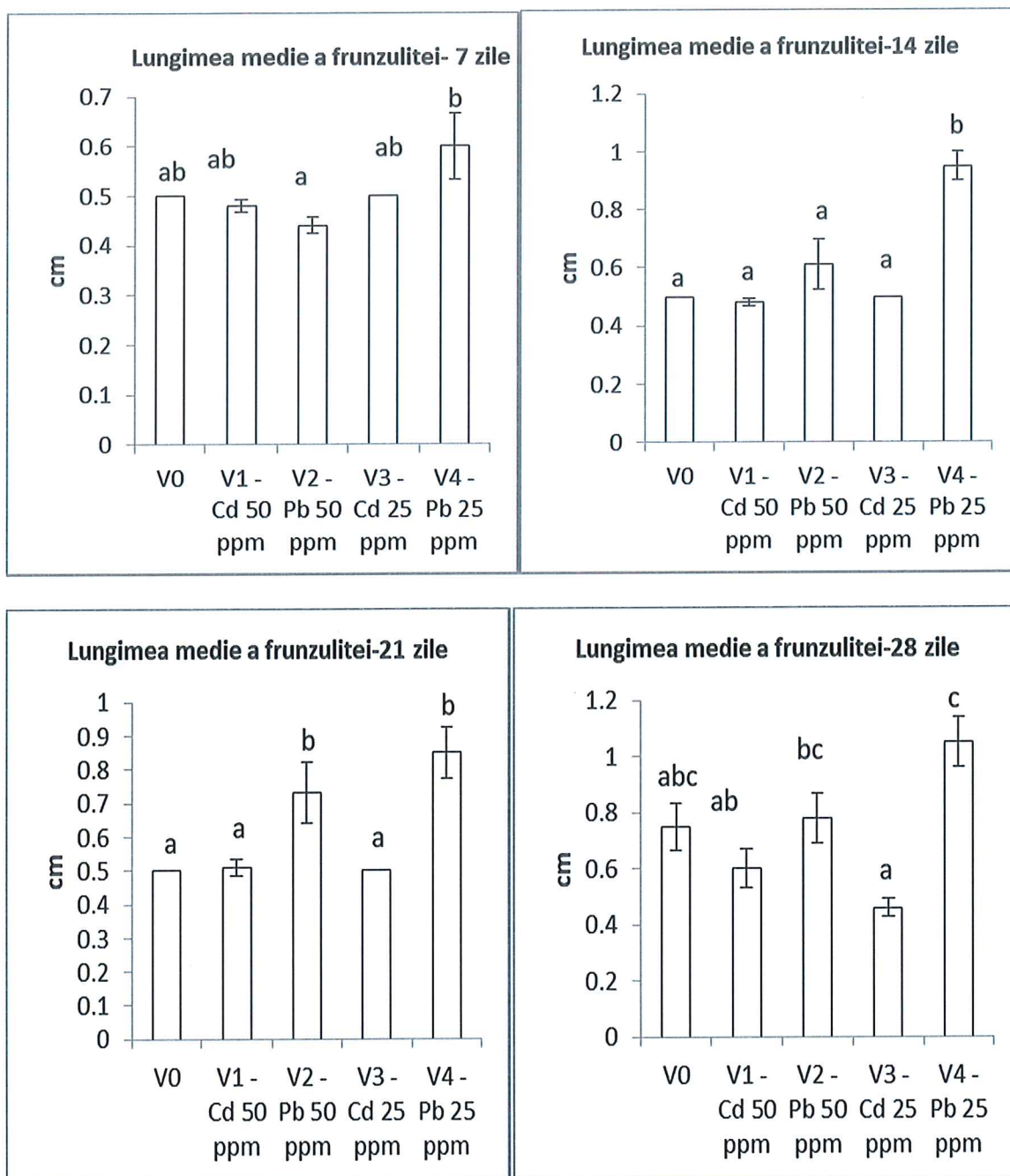


Fig.8. Reprezentarea grafică a valorilor medii corespunzătoare a lungimii medii a frunzuliței la nivelul vitroculturilor de *Sedum telephium* ssp. *maximum* L., crescute timp de 7 -28 zile pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) lipsit de regulatori de creștere (V₀ - varianta control) și a celor crescute pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) suplimentat cu Cd SO₄ și Pb Cl₂. Notă: valorile reprezintă media ± eroarea standard (n=10). Literele diferite reprezintă diferențe semnificative (p<0,05).

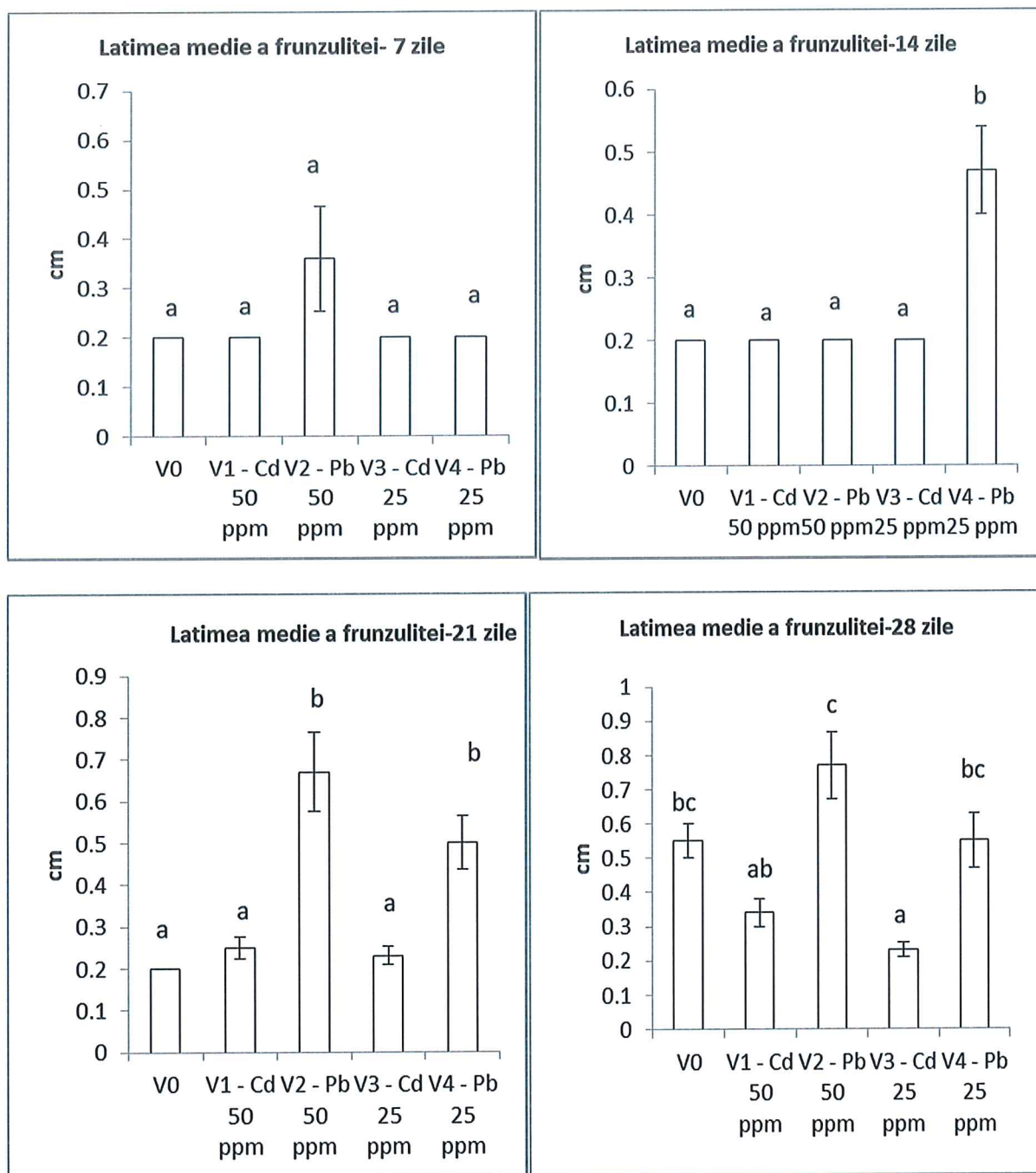


Fig.9. Reprezentarea grafică a valorilor medii corespunzătoare lățimii medii a frunzuliței la nivelul vitroculturilor de *Sedum telephium* ssp. *maximum* L., crescute timp de 7 -28 zile pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) lipsit de regulatori de creștere (V₀ - varianta control) și a celor crescute pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) suplimentat cu Cd SO₄ și Pb Cl₂. Notă: valorile reprezintă media ± eroarea standard (n=10). Literele diferite reprezintă diferențe semnificative (p<0,05).

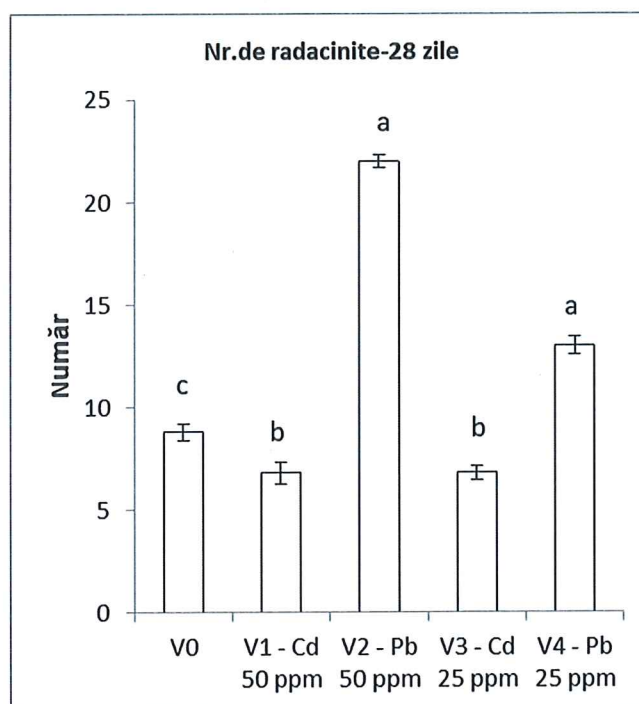
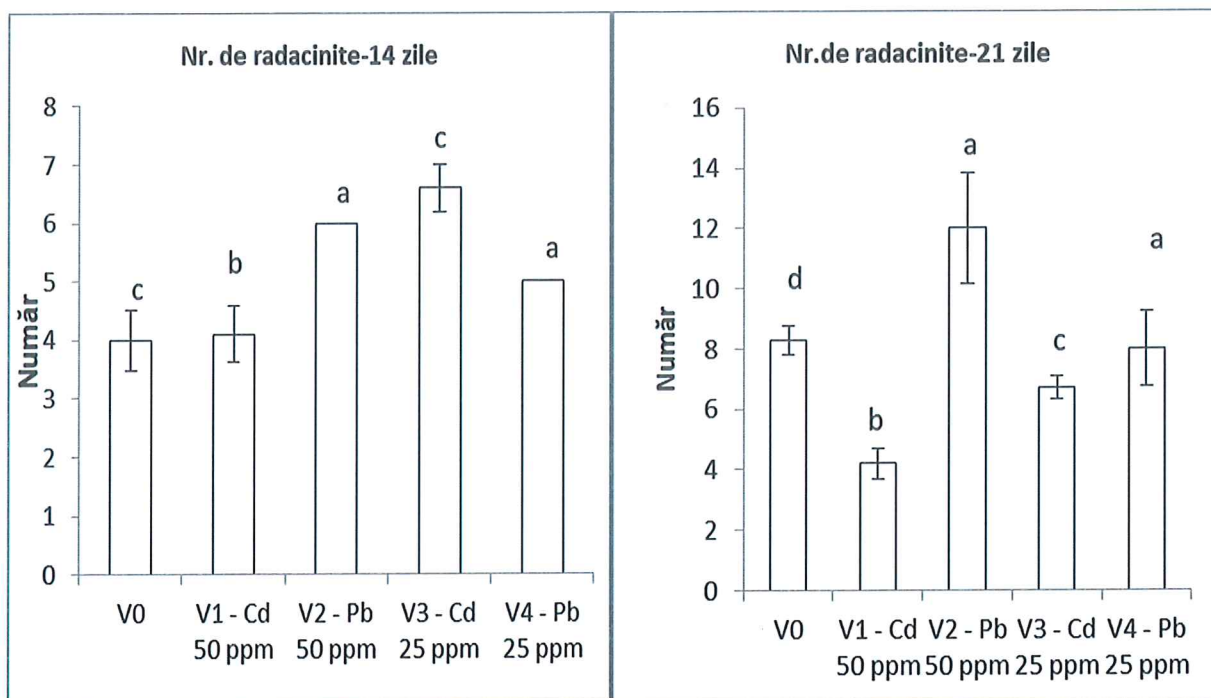


Fig.10. Reprezentarea grafică a valorilor medii corespunzătoare a numărului de rădăcinițe la nivelul vitroculturilor de *Sedum telephium* ssp. *maximum* L., crescute timp de 7 -28 zile pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) lipsit de regulatori de creștere (V₀ – varianta control) și a celor crescute pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) suplimentat cu Cd SO₄ și Pb Cl₂. Notă: valorile reprezintă media ± eroarea standard (n=10). Literele diferite reprezintă diferențe semnificative (p<0,05).

Considerăm că rezultatele noastre sunt în concordanță cu datele prezentate de literatura de specialitate (Lipiec și colab., 2003) conform cărora metalele grele pot induce reducerea anumitor trăsături morfologice specifice la plantele cultivate, în cazul nostru: reducerea numărului de frunzulițe, a numărului de ramificații, dar nu s-a produs încetinirea creșterii ci din contră mediul de cultură suplimentat cu concentrația cea mai mare de $Pb Cl_2(V_4)$ a stimulat biomasa vegetală iar vitroplantulele nu au fost afectate morfologic (fig.4) ceea ce semnifică faptul că acestea au capacitatea de a tolera concentrațiile de metal adăugate mediului de cultură și de asemenea de a le acumula.

V.1.2.2. Examinarea morfologică a vitroplantulelor obținute pe medii cu metale

V.1.2. 2. 1. Analiza materialului vegetal la microscopul electronic cu baleiaj (SEM)

La vârsta de 28 de zile plantulele aparținând celor 4 variante experimentale, au fost examinate din punct de vedere morfologic la microscopul cu baleiaj Quata 250, după metoda de lucru menționată în partea de „Material și metode de lucru”. Au fost examinate organele vegetative (rădăcina, tulpina și limbul foliar) al plantulelor aparținând variantei control și a celor crescute pe medii de cultură suplimentat cu metale grele, putându-se constata că, la acest nivel, nu au existat diferențe din punct de vedere morfologic (anexa 1).

La toate variantele experimentale, **rădăcina**, prezintă la exterior o **peridermă** formată din mult suber cu celule cu pereți tabulari. **Scoarța** este amiliferă, groasă, formată din celule cu pereți subțiri, celulozici. La varianta V4, s-a putut observa *mineralizarea rădăcinii* care a constat în impregnarea pereților celulari cu cristale de oxalat de calciu, prin mineralizare, peretele celular a căpătat o rezistență mecanică sporită la metalul greu adăugat substratului de cultură.

Tulpina, prezintă un contur circular, epiderma cuprinde celule înalte, cu peretele extern bombat. **Limbul foliar** cu epiderma vazută de față: **epiderma superioară** prezintă celule cu pereți ondulați, între care se observă numeroase **stomate** de tip anizocitic (stomate înconjurate de 3 celule, de dimensiuni diferite); **epiderma inferioară** prezintă și ea celule cu pereți ondulați, dar ondulațiile au o amplitudine mai mare decât în epiderma superioară; și aici sunt prezente **stomate** de tip anizocitic, deci limbul este amfistomatic. În ambele epiderme se pot observa chiar celule în diviziune, urmărindu-se astfel formarea stomatelor (anexa 1). Astfel, analizele morfo-anatomice nu relevă prezența unui stres la acest nivel, indus de elementelor chimice investigate și prezente în mediul de creștere.

Plantulele au prezentat valori similare între variantele tratate și cele martor, în ceea ce privește analiza morfologică. Acest lucru sugerează că influența asupra ciclului celular e minimă, posibilele efecte fiind manifestate la alte nivele. În ceea ce privește acumularea de metale, s-a observat preluarea

și translocarea Pb și Cd la diferite nivele morfo-anatomice. Astfel, în cadrul analizei elementale EDAX, s-a observat acumularea Pb-ului în rădăcină la varianta V₂- PbCl₂ în concentrație de 50 ppm dar nu și a Cd-ului (anexa 2).

În cazul Cd, acesta se acumulează predominant în țesuturile parenchimatice și nu în epidermă, fapt sugerat de prezența metalului greu în analizele ICP-MS (tabelul 3) efectuate pe întreg materialul vegetal și absența lui în analizele elementale de suprafață EDAX.

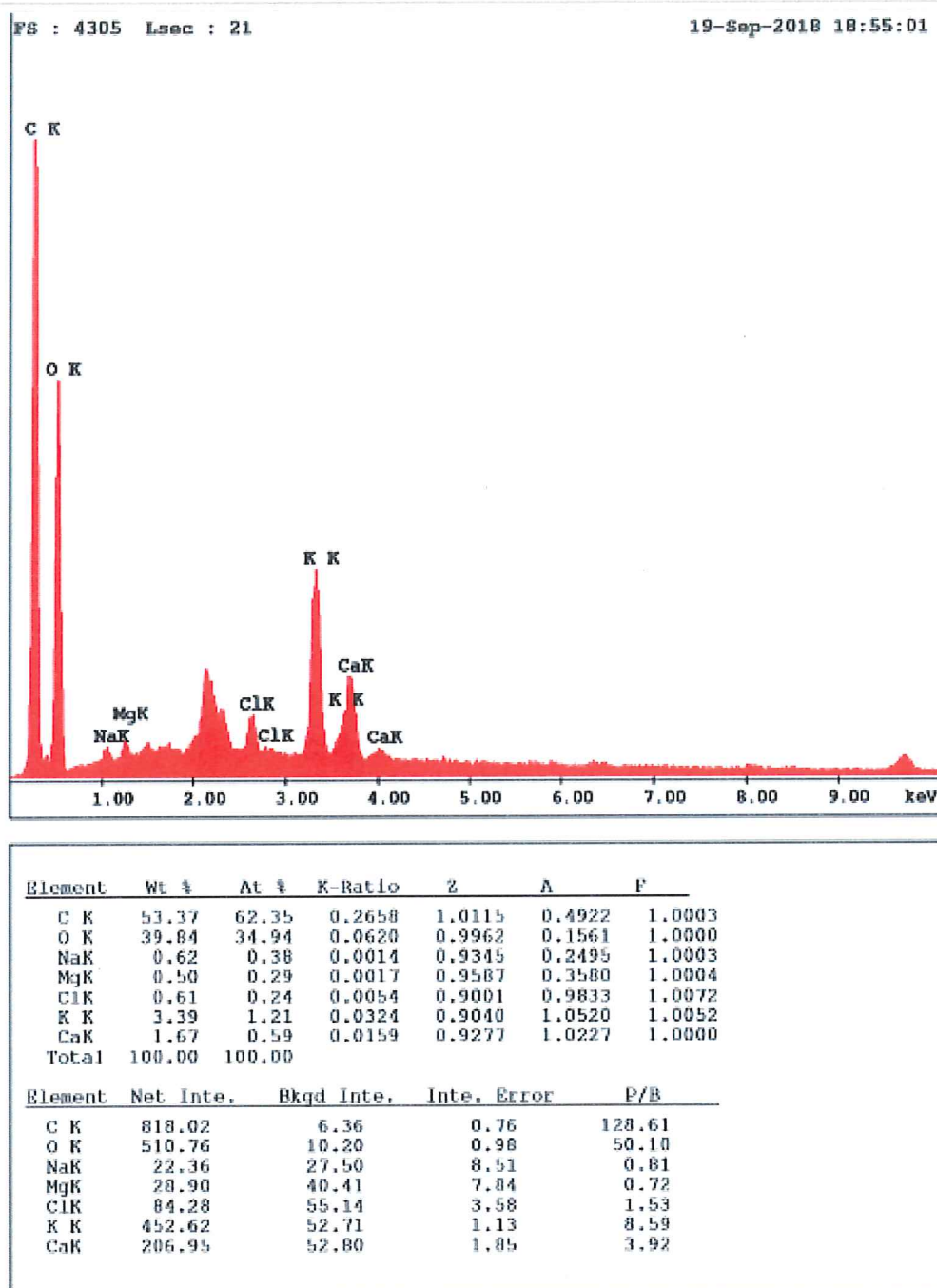


Fig.11. Spectrul măsurătorilor realizate prin analiza EDAX și elementele chimice identificate la nivelul rădăcinii de *Sedum telephium* ssp. *maximum* L.cultivat pe mediul de cultură MB-MS fără metale grele (V₀-varianta control).

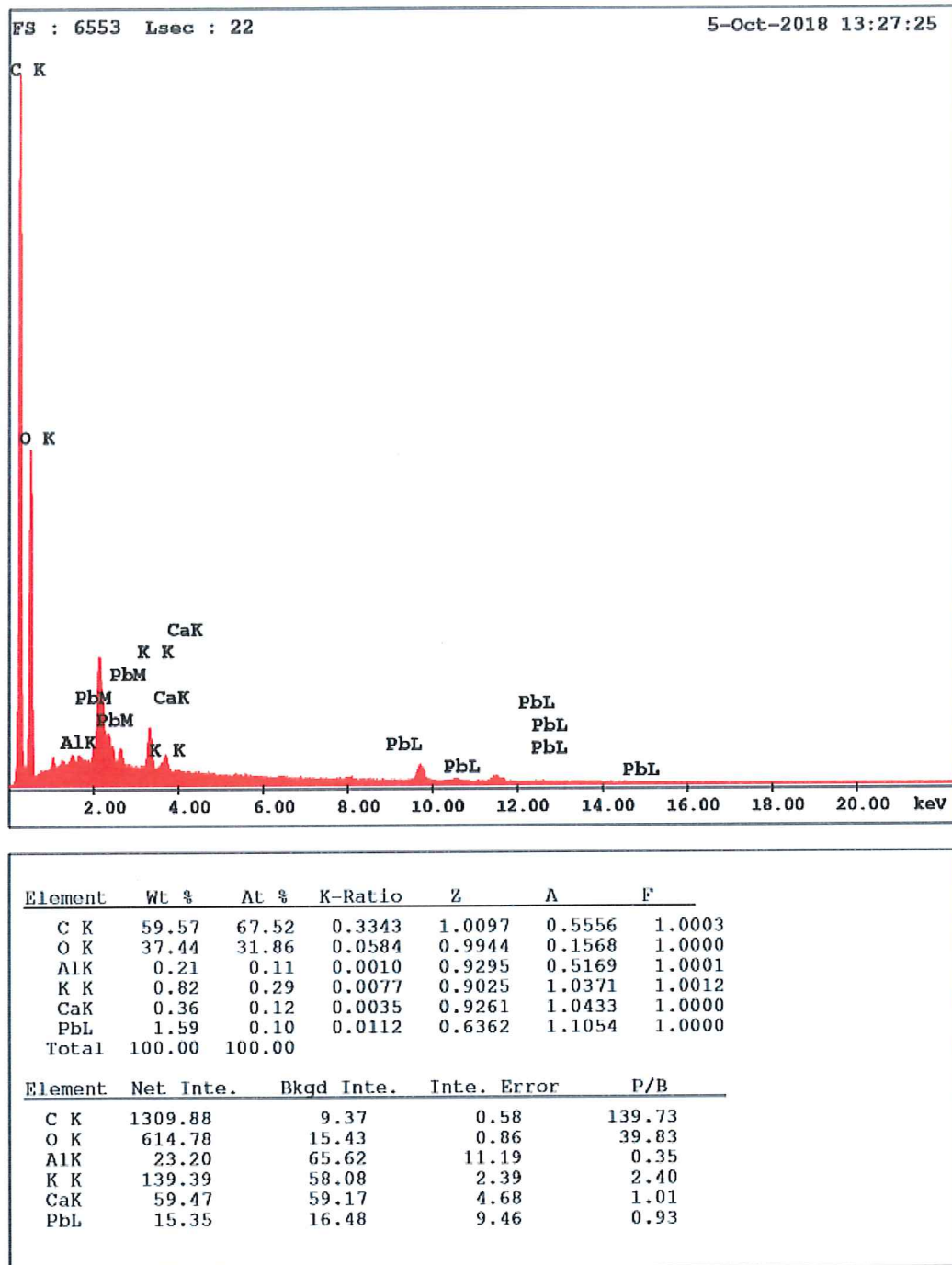


Fig.12. Spectrul măsurătorilor realizate prin analiza EDAX și elementele chimice identificate la nivelul rădăcinii de *Sedum telephium* ssp. *maximum* L.cultivat pe mediul de cultură MB-MS cu Pb Cl₂ în concentrație de 50 ppm (V₂).

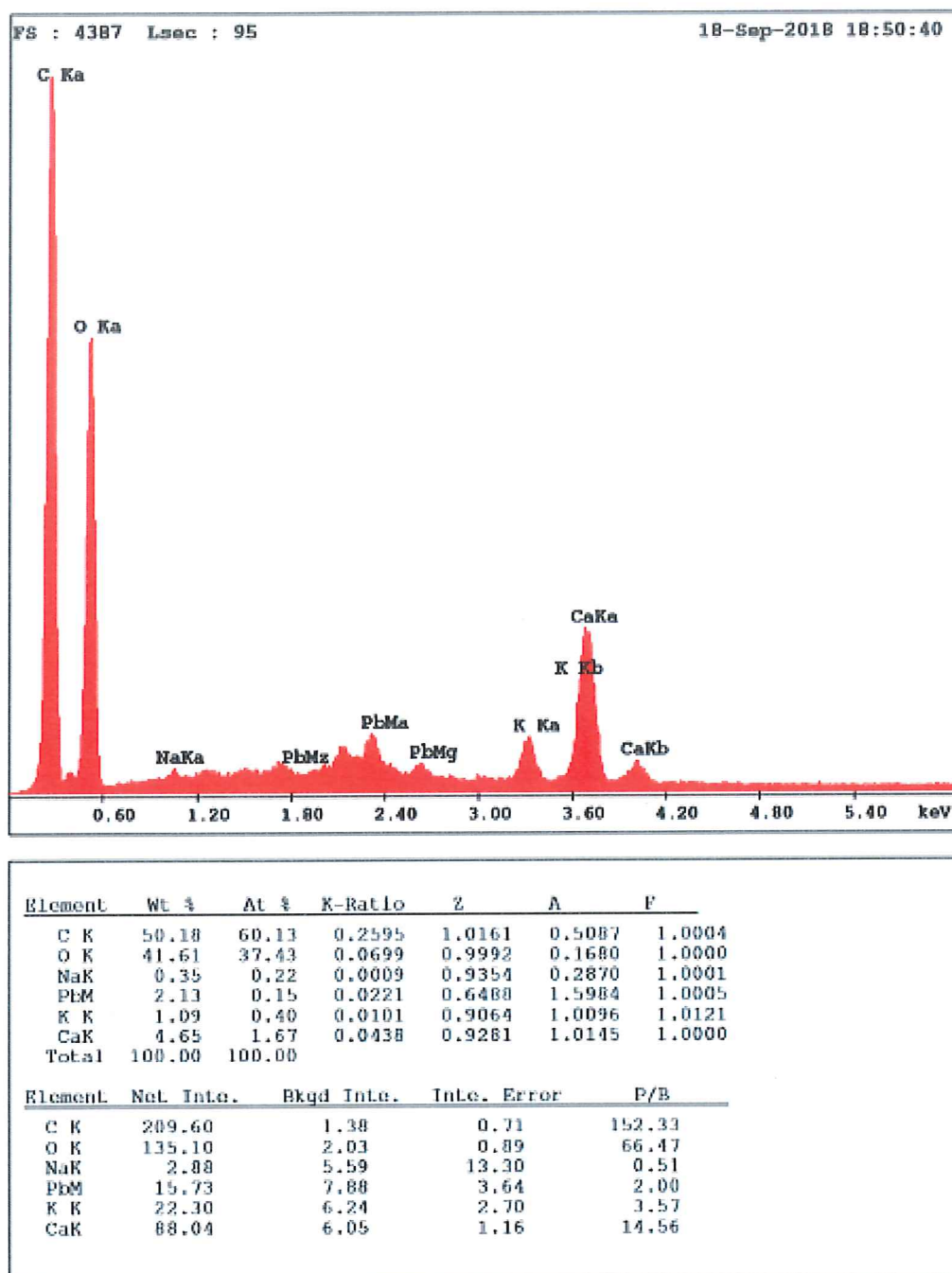


Fig.13. Spectrul măsurătorilor realizate prin analiza EDAX și elementele chimice identificate la nivelul rădăcinii de *Sedum telephium* ssp. *maximum* L.cultivat pe mediul de cultură MB-MS cu Pb Cl₂ în concentrație de 25 ppm (V₄).

Tabelul 3. Rezultate privind determinarea concentrației de Cd și a altor elemente chimice prezente în plantulele de Sedum crescute timp de 28 zile pe mediul de cultură suplimentat cu Cd So4 în concentrație de 50 ppm și 25 ppm, prin metoda ICP-MS.

1			23 Na	24 Mg	28 Si	39 K	43 Ca	44 Ca	111 Cd
2	masa de proba in grame		Conc. [ug/g]	Conc. [ug/g]	Conc. [ug/g]	Conc. [ug/g]	Conc. [ug/g]	Conc. [ug/g]	Conc. [ug/g]
3	0.3641	V2_28zile	503	241	169	2,750	1,165	1,741	15
4	0.3847	V2_21zile	491	157	178	1,839	398	553	11
5	0.4102	V2_14zile	410	172	162	1,973	556	823	11
6	0.5147	V2_07zile	480	146	131	1,648	371	523	11
7	0.4669	V1_28zile	926	242	137	2,680	713	1,090	26
8	0.2536	V1_21zile	694	153	271	2,093	381	817	21
9	0.3548	V1_14zile	898	168	191	2,302	326	402	21
10	0.4757	V1_07zile	438	166	132	2,126	401	572	19
11	0.336	V0_28zile	623	204	199	2,909	638	986	0
12	0.2174	V0_21zile	285	182	333	2,286	185	374	0.0
13	0.2586	V0_14zile	370	166	265	1,852	476	666	0
14	0.3291	V0_07zile	773	172	189	2,168	486	646	0
15									

Tabelul 4. Rezultate privind determinarea concentrației de Pb și a altor elemente chimice prezente în plantulele de Sedum crescute timp de 28 zile pe mediul de cultură suplimentat cu Pb Cl2 în concentrație de 50 ppm și 25 ppm, prin metoda ICP-MS.

V.1.3. Examinarea fiziologică a vitroplantulelor obținute pe medii cu metale grele

Intensitatea procesului de **fotosinteză** (A) a înregistrat valori mai scăzute la plantulele cultivate pe medii cu metale grele față de varianta control (fig.14). Plantele cultivate pe metale grele, în special pe Pb Cl₂ au înregistrat cel mai mic conținut de clorofilă totală, precum și de fracții clorofiliene (clorofilă a, b) comparativ cu varianta control, diferențele fiind semnificative din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) (fig.15.). Concomitent, aceleași plantule au înregistrat un conținut de pigmenți carotenoizi mai crescut, comparativ cu plantele aparținând variantei control. Varianta de cultivare pe mediu de cultură cu Cd So₄ a înregistrat valori mai mari atât față de varianta de cultivare pe Pb Cl₂. În același timp, în mod surprinzător, plantulele cultivate pe V₃-Cd So₄ 25 ppm au înregistrat conținutul cel mai mare de clorofilă b față de toate variantele experimentale.

Așa după cum specifică și literatura de specialitate (Manios și colab., 2003), la plantele test conținutul crescut de clorofilă aparținând variantei martor, poate fi influențat de concentrația mare de elemente esențiale (N, P, K Mg, Mn, Fe, Zn etc.) utilizate în biosinteza clorofilei. Interpretările noastre nu trebuie însă să facă abstracție și de alte informații comunicate de literatura de specialitate (Singh și Agrawal, 2007), conform cărora conținutul ridicat de metale grele poate conduce, totuși, la reducerea conținutului de clorofilă la unele specii. În această situație, considerăm că, cercetările viitoare ne vor permite conturarea unui răspuns clar susținut, prin rezultate practice, referitor la variația acestui parametru biochimic la plantulele de *Sedum* cultivate pe substraturi cu metale grele.

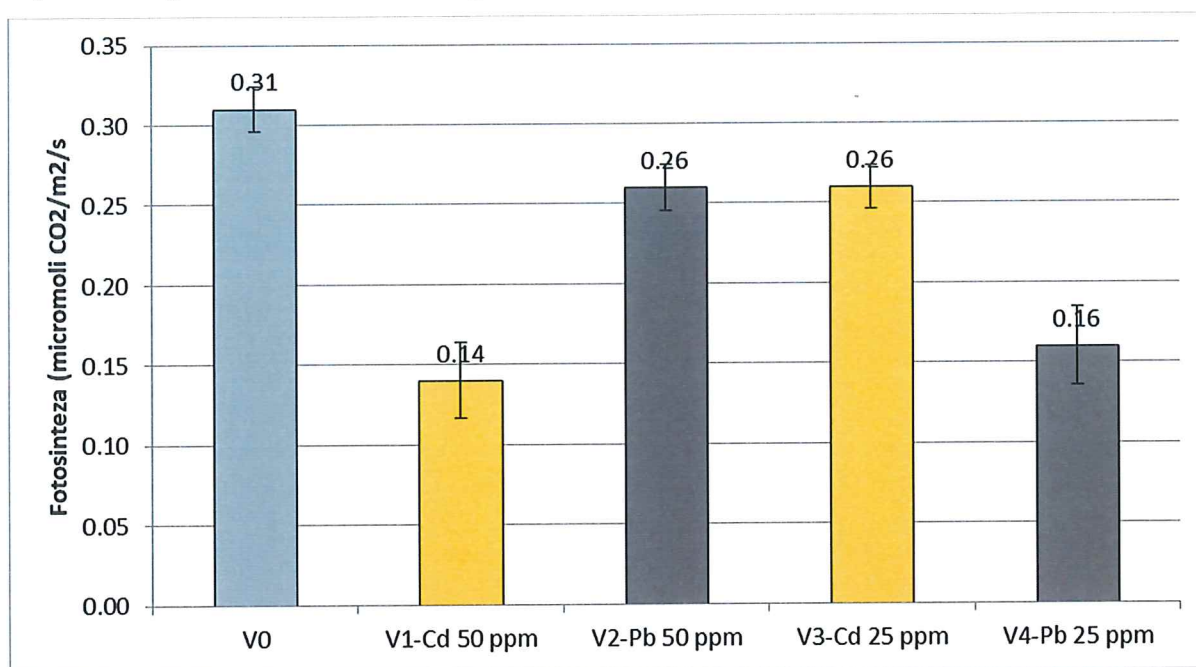


Fig 14. Reprezentarea grafică a *activității fotosintetice* la nivelul vitroculturilor de *Sedum telephium* ssp. *maximum* L., crescute timp **28 zile** pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) lipsit de regulatori de creștere (V₀- varianta control) și a celor crescute pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) suplimentat cu Cd SO₄ și Pb Cl₂.

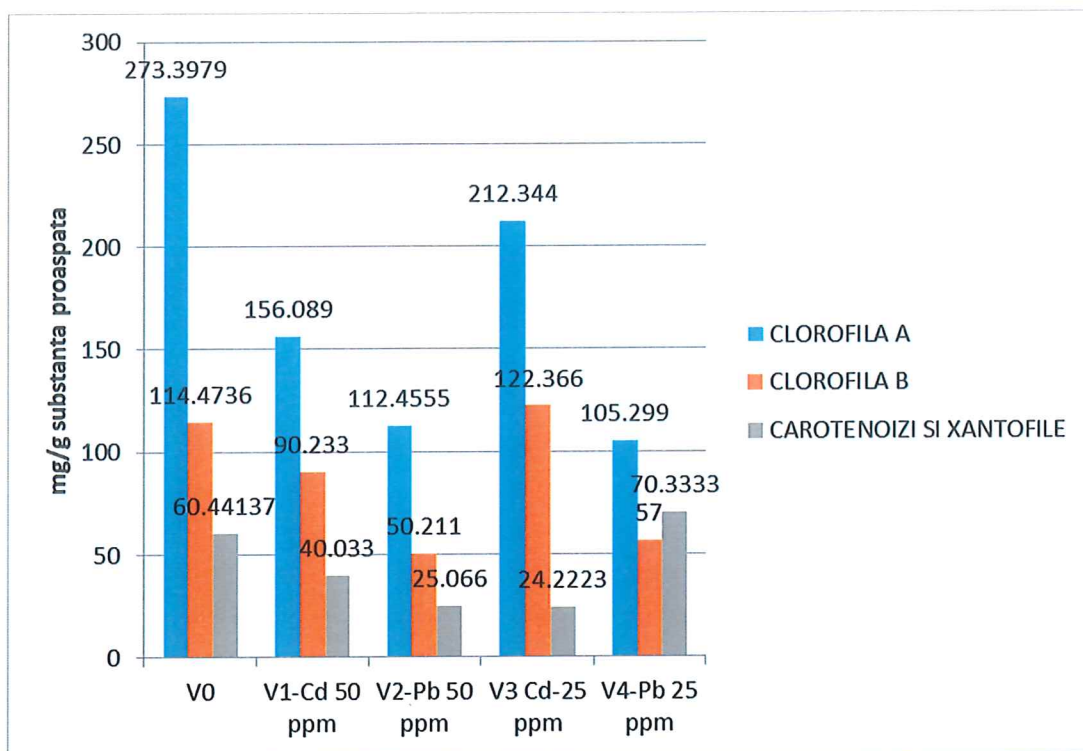


Fig.15. Reprezentarea grafică a pigmentilor asimilatori la nivelul vitroculturilor de *Sedum telephium* ssp. *maximum* L., crescute timp **28 zile** pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) lipsit de regulatori de creștere (V₀ – varianta control) și a celor crescute pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) suplimentat cu Cd SO₄ și Pb Cl₂.

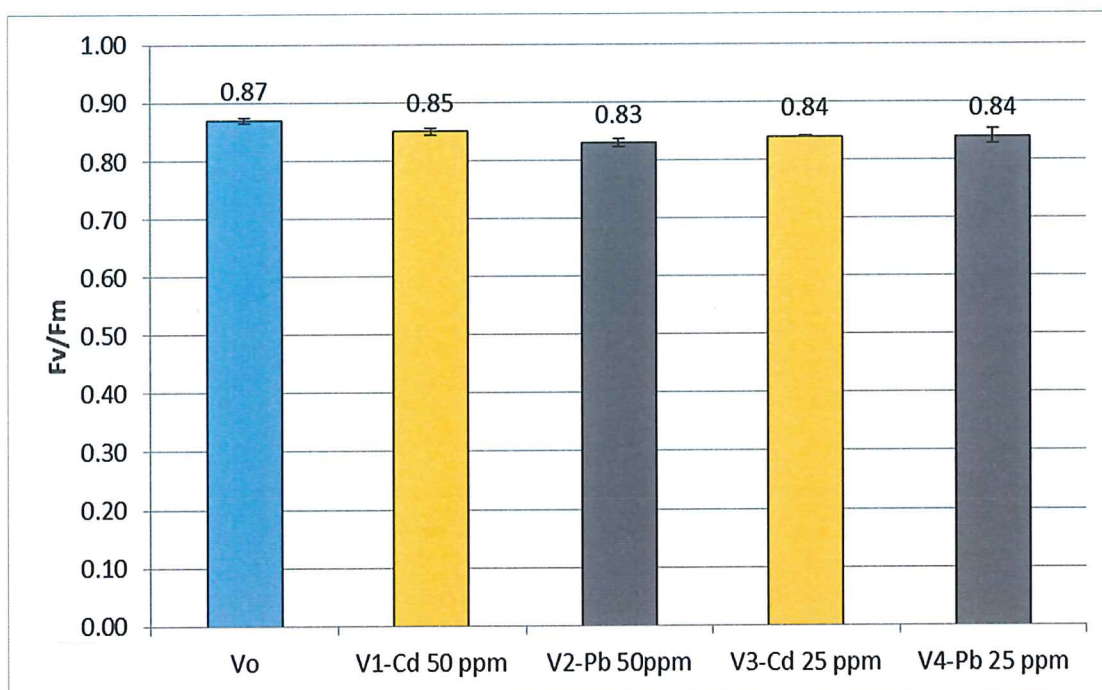


Fig 16. Reprezentarea grafică a fluorescenței clorofiliene la nivelul vitroculturilor de *Sedum telephium* ssp. *maximum* L., crescute timp **28 zile** pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) lipsit de regulatori de creștere (V₀ – varianta control) și a celor crescute pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) suplimentat cu Cd SO₄ și Pb Cl₂.

Considerăm în această situație că, în conformitate cu datele prezentate de literatură, scăderea indicatorilor mai sus menționați semnaleză prezența unui stres foto-oxidativ asupra aparatului fotosintetic la plantule (Murchie și Lawson 2013).

Din punct de vedere al eficienței cuantice a PSII, observăm, în experimentele practice organizate, o scădere a parametrului Φ PSII la plantulele cultivate pe mediul de cultură MB-MS suplimentat cu Pb Cl₂, în concentrație de 50 ppm față de varianta control, în timp ce restul variantelor au prezentat valori apropiate de cele ale variantei control (fig.16). În experimentul nostru am constatat că tipul de metal greu utilizat nu a indus modificări semnificative statistic asupra eficienței cuantice maxime a PSII (Fv/Fm) comparativ cu varianta control.

V.1.4. Determinările biochimice a vitroplantulelor obținute pe medii cu metale grele

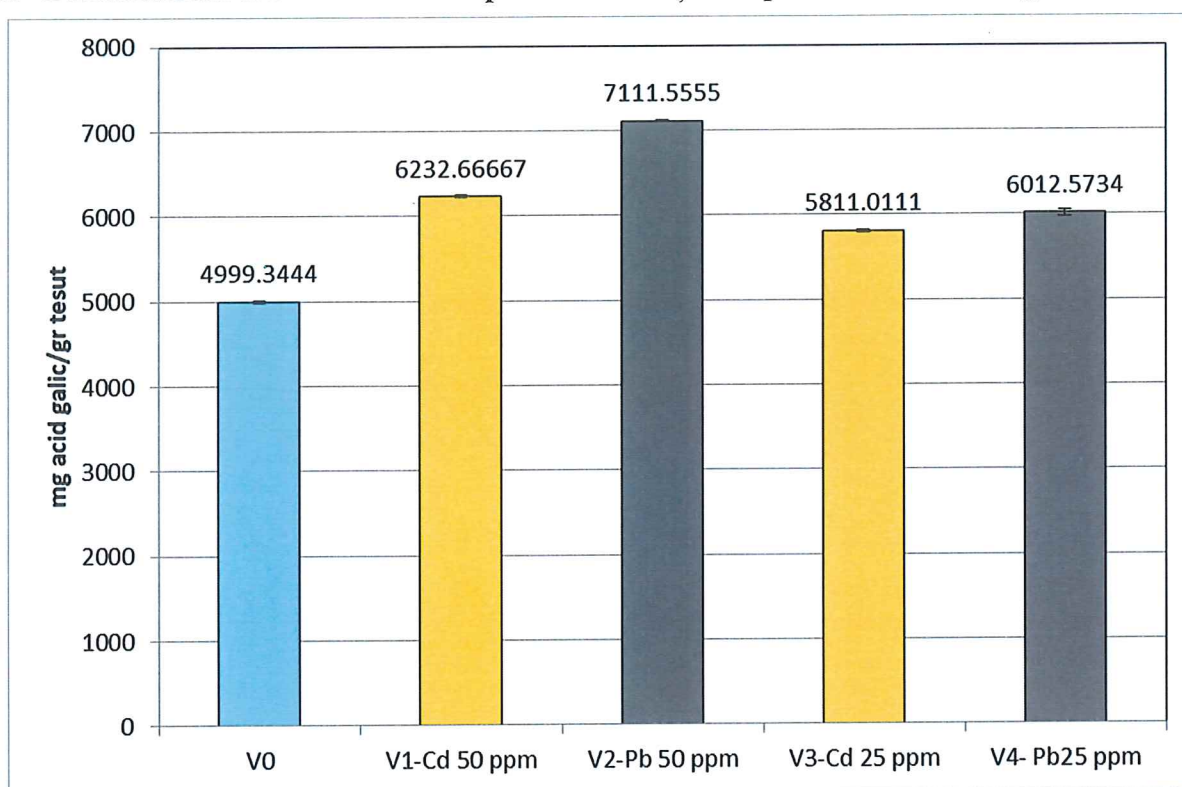


Fig.17. Reprezentarea grafică a conținutului de fenoli la nivelul vitroculturilor de *Sedum telephium* ssp. *maximum* L., crescute timp 28 zile pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) lipsit de regulatori de creștere (V₀ – varianta control) și a celor crescute pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) suplimentat cu Cd SO₄ și Pb Cl₂.

În experimentele realizate, conținutul total de polifenoli și flavonoide a crescut la plantele cultivate pe medii cu metale grele, în special pe varianta V₂ cu Pb Cl₂, precum și pe cel cu Cd So₄ (V₁), comparativ cu plantele din varianta control (fig.17).

Rezultatele noastre susțin aceste ipoteze, prin prisma faptului că plantele cultivate pe substrat cu un conținut ridicat de metale grele au înregistrat o rată mai scăzută a fotosintezei față de varianta control, concomitent cu o creștere a conținutului de fenoli totali. În același timp, dintr-o perspectivă fiziologică, plantele cultivate pe substrat cu metale grele au folosit produsul de fotosinteză (seva elaborată) cu precădere pentru metabolismul secundar, astfel încât conținutul de compuși fenolici a crescut, în timp ce unii indicatori de producție au scăzut.

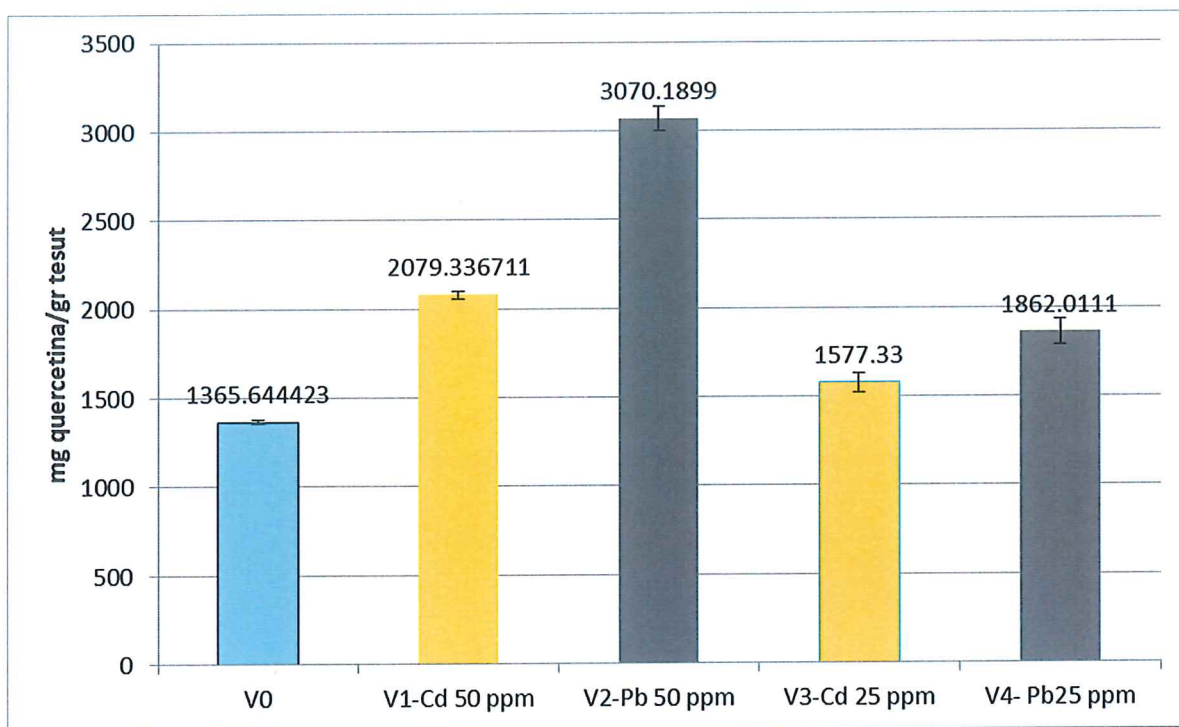


Fig.18. Reprezentarea grafică a conținutului de flavonoide la nivelul vitroculturilor de *Sedum telephium* ssp. *maximum* L., crescute timp **28 zile** pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) lipsit de regulatori de creștere (V₀ – varianta control) și a celor crescute pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) suplimentat cu **Cd SO₄** și **Pb Cl₂**.

Activitatea antioxidantă (fig.19) a extractelor din frunze de *Sedum* cultivat pe mediu cu metale grele de concentrație de 50 și 25 ppm a crescut, în timp ce plantele cultivate pe mediul control (V₀) au înregistrat o scădere a acestui parametru biochimic, față de toate variantele experimentale. Rezultatele noastre confirmă, practic, datele din literatură, potrivit cărora activitatea antioxidantă se corelează, în general, cu conținutul de compuși fenolici, cu toate că această relație nu este tot timpul una pozitivă, putând apărea variații, ca urmare a unor factori interni sau externi (Flanigan and Niemeyer, 2014). În același timp, aceste rezultate ne permit să considerăm că metalele grele adăugate substratului poate influența activitatea antioxidantă.

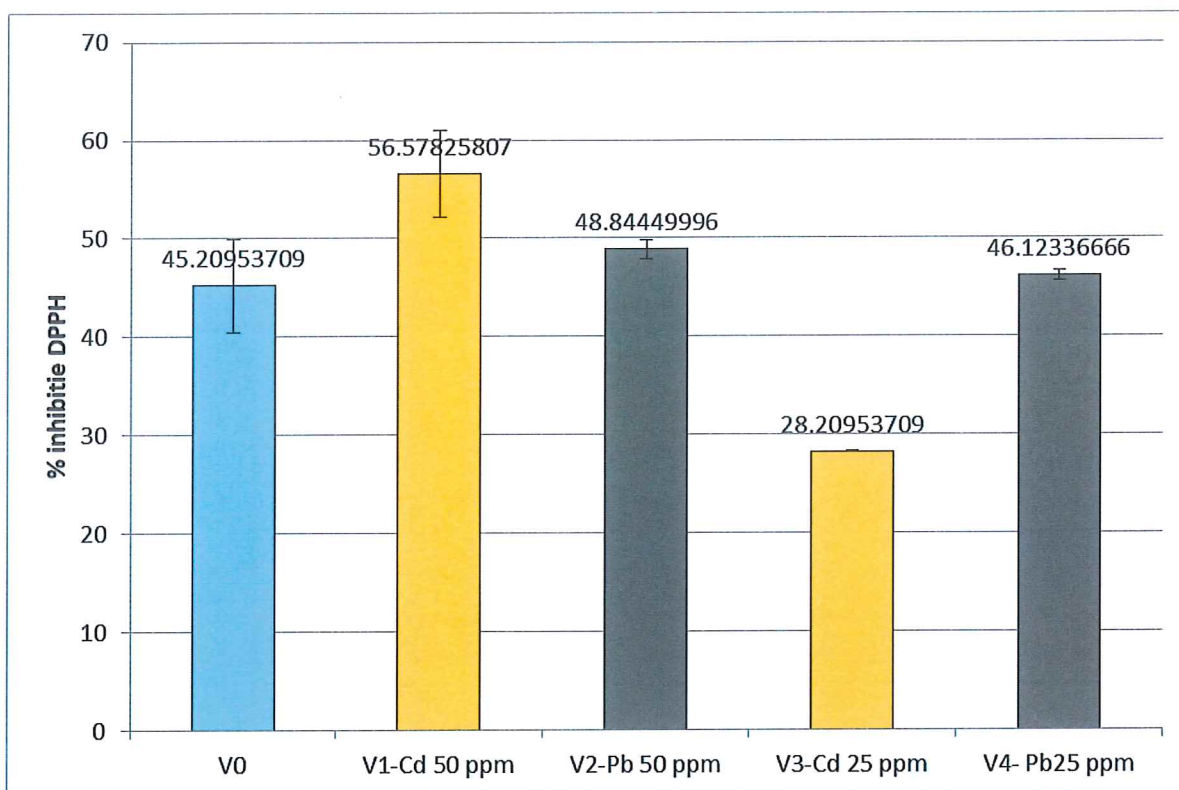


Fig.19. Reprezentarea grafică a *activității antioxidante* la nivelul vitroculturilor de *Sedum telephium ssp. maximum L.*, crescute timp **28 zile** pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) lipsit de regulatori de creștere (V₀ - varianta control) și a celor crescute pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) suplimentat cu **Cd SO₄** și **Pb Cl₂**.

Radicalii liberi sunt specifici atât plantelor, cât și animalelor și se produc prin reducerea incompletă sau excitarea moleculelor de oxigen în timpul metabolismului aerob. Radicalii liberi au un rol dublu, în funcție de reacțiile de oxidare pe care le produc; astfel, în cantități mici constituie mesageri secundari în transmiterea informațiilor la nivel celular și participă la desfășurarea reacțiilor biochimice ale metabolismului, influențând procesul de dezvoltare, fagocitoză, stimulând sinteza enzimelor antioxidante.

Este bine cunoscut faptul că în plantele expuse la stres (metale grele, temperaturi scăzute, salinitate, radiații UV, metale grele, secetă), formarea speciilor reactive de oxigen (SRO) și generarea stresului oxidativ sunt principalii factori care afectează planta la nivel celular (Gill și Tuteja, 2010). Pentru diminuarea efectelor negative ale SRO, plantele au dezvoltat atât mecanisme de apărare non-enzimatică (producere de acid ascorbic, glutatationul redus, tocoferoli etc.), cât și mecanisme enzimatică (activarea enzimelor superoxid dismutază - SOD, catalază - CAT și peroxidază - POD).

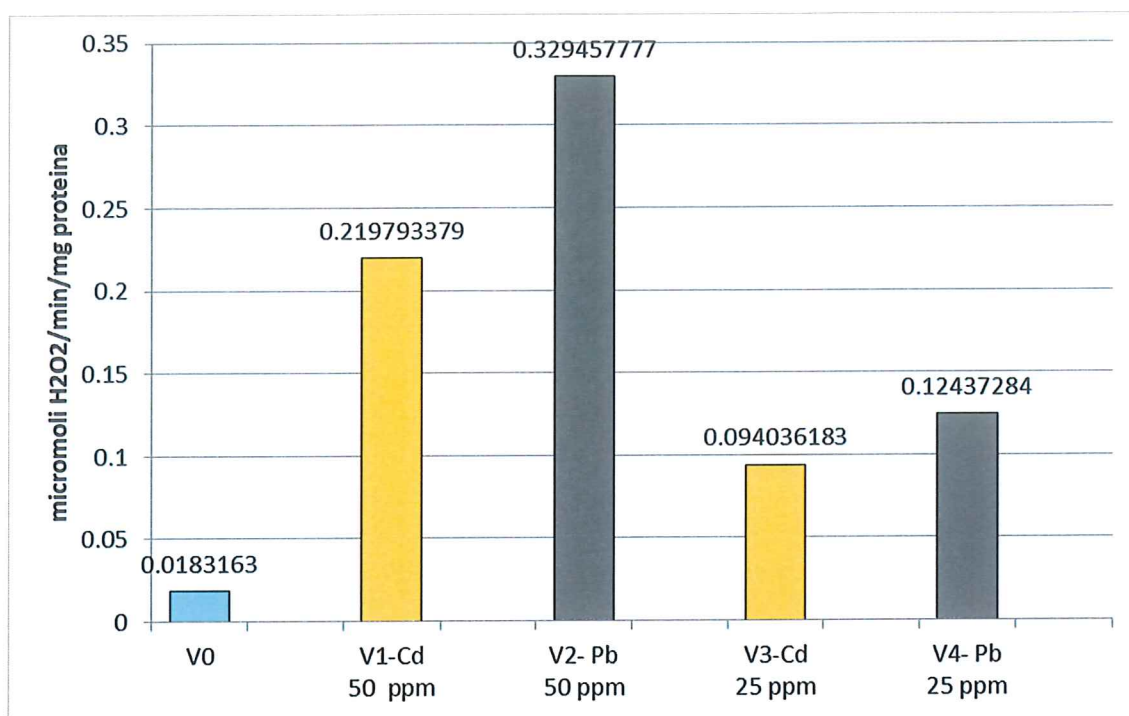


Fig.20. Reprezentarea grafică a *activității catalazei* la nivelul vitroculturilor de *Sedum telephium* ssp. *maximum* L., crescute timp **28 zile** pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) lipsit de regulatori de creștere (V₀ - varianta control) și a celor crescute pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) suplimentat cu **Cd SO₄** și **Pb Cl₂**.

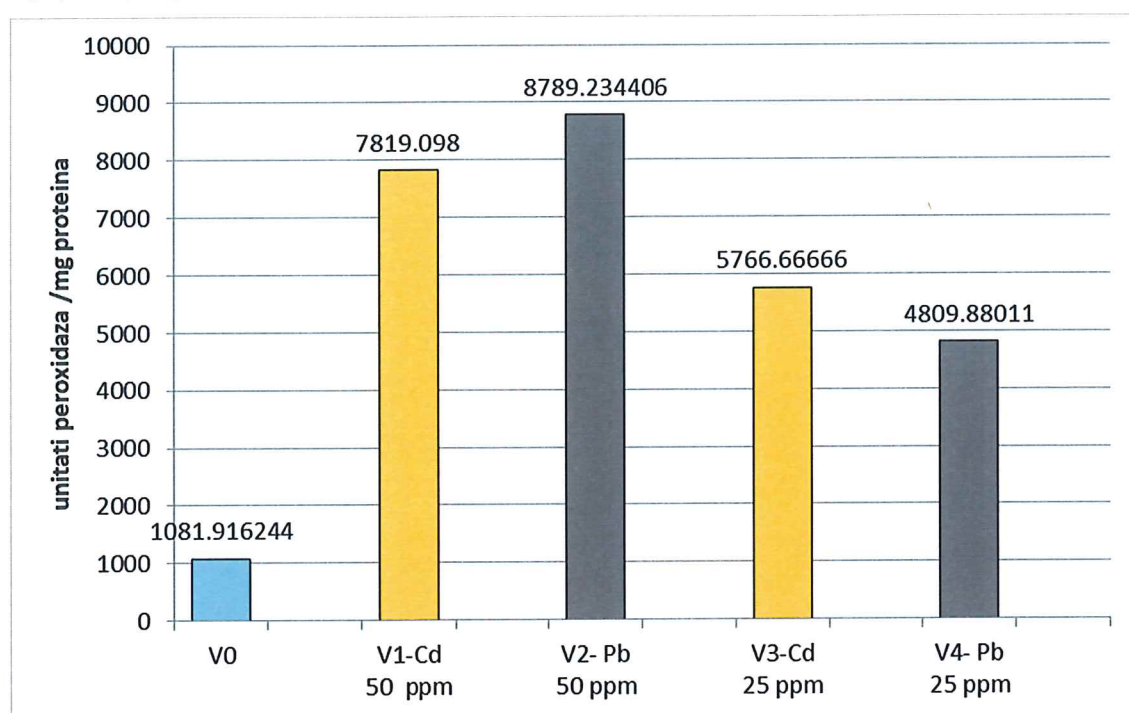


Fig.21. Reprezentarea grafică a *activității peroxidazei* la nivelul vitroculturilor de *Sedum telephium* ssp. *maximum* L., crescute timp **28 zile** pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) lipsit de regulatori de creștere (V₀ - varianta control) și a celor crescute pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) suplimentat cu **Cd SO₄** și **Pb Cl₂**.

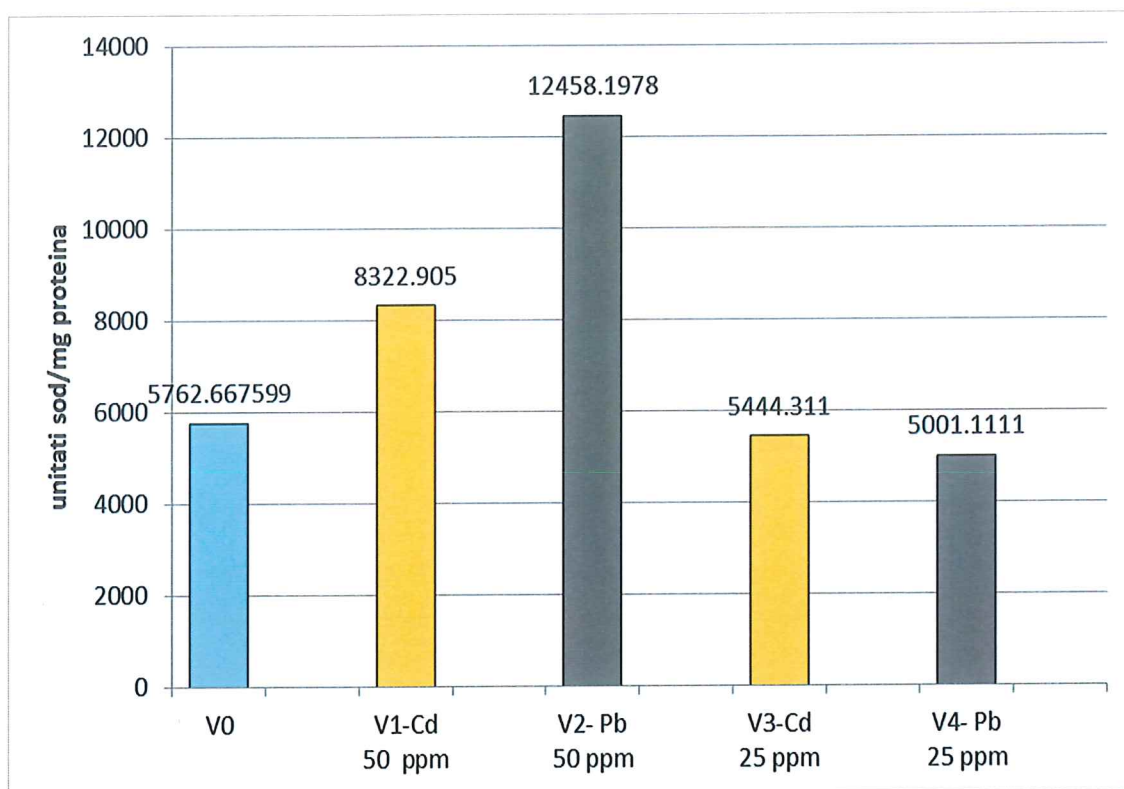


Fig.22. Reprezentarea grafică a *activității superoxidismutazei* la nivelul vitroculturilor de *Sedum telephium ssp. maximum L.*, crescute timp **28 zile** pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) lipsit de regulatori de creștere (V_0 – varianta control) și a celor crescute pe mediu de bază *Murashige – Skoog* (1962) suplimentat cu **Cd SO₄** și **Pb Cl₂**.

Superoxid dismutaza reprezintă principala enzimă cu rol în detoxifierea radicalilor superoxid, prin catalizarea H_2O_2 și O_2 la o viteză foarte mare. În urma activității SOD, concentrația celulară de H_2O_2 crește dar, printr-un mecanism cascadă, enzimele CAT și POD intervin și metabolizează excesul de H_2O în apă și O_2 .

În experimentul nostru, activitatea enzimelor antioxidante, în special SOD a crescut semnificativ statistic la plantulele cultivate pe mediul de cultură suplimentat cu metale grele în special la nivelul celor crescute pe $V_2Pb Cl_2$ - 50 ppm, urmată de cea înregistrată la plantele cultivate V_1 - Cd 50 ppm față de varianta control (fig.22). Activitatea catalazei, de asemenea a crescut foarte mult la plantele cultivate pe medii cu $Pb Cl_2$ față de varianta control. Diferențele semnificativ statistice obținute la variantele de cultivare pe metale grele ne arată implicarea acestei enzime în catalizarea speciilor reactive de oxigen ce apar ca urmare a unui conținut ridicat de metale în substrat. De asemenea, activitatea peroxidazei a crescut semnificativ, comparativ cu plantele din varianta control (fig.21).

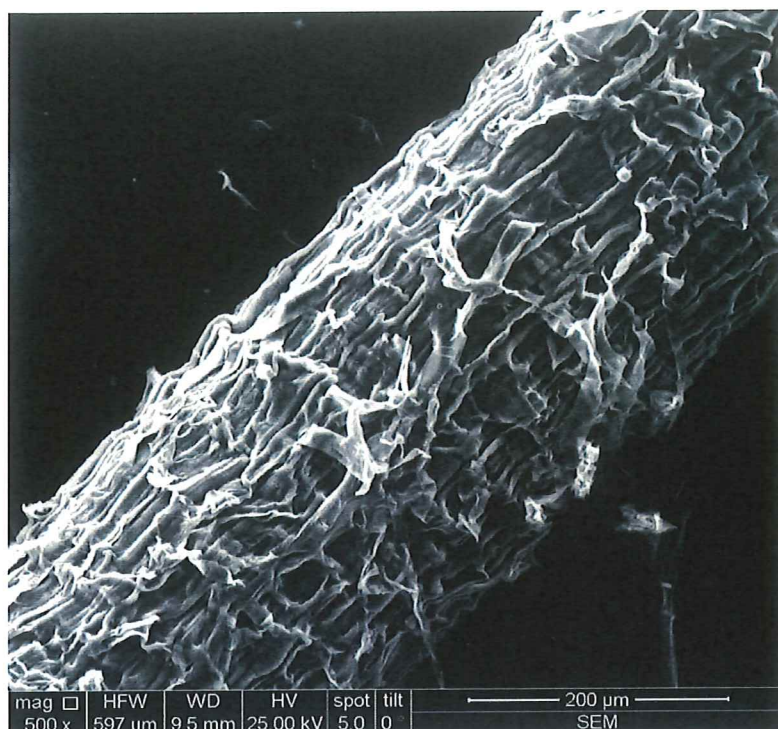
Concluzii

1. Plantulele de *Sedum telephium* ssp *maximum* cultivate *in vitro* pe medii suplimentate cu Cd SO₄ și Pb Cl₂ de diferite concentrații, prezintă o creștere rapidă, odată cu acumularea metalului, având loc și stimularea creșterii în lungime a plantulelor, a lungimii și lățimii frunzelor a lungimii ramificațiilor, față de plantulele cultivate pe mediul lipsit de metale grele (varianta V₀-control).
2. Pb Cl₂, în concentrație de 50 ppm stimulează rizogeneza, comparativ cu restul variantelor experimentale, dar mai ales comparativ cu varianta martor.
3. Plantulele cultivate *in vitro* pe medii suplimentate cu Cd SO₄ și PbCl₂ de diferite concentrații nu au fost afectate morfologic, ceea ce semnifică faptul că acestea au capacitatea de a tolera concentrațiile de metal adăugate mediului de cultură.
4. În ceea ce privește acumularea de metale, s-a observat preluarea și translocarea Pb-ului și Cd-ului la diferite nivele. În cadrul analizei elementale EDAX, s-a observat acumularea Pb-ului în rădăcină la varianta V₂- PbCl₂ în concentrație de 50 ppm dar nu și a Cd-ului.
5. În cazul Cd, acesta se acumulează predominant în țesuturile parenchimatice și nu în epidermă, fapt sugerat de prezența metalului greu în analizele ICP-MS efectuate pe întreg materialul vegetal și absența lui în analizele elementale de suprafață EDAX.
6. Conținutul ridicat de metale grele a condus la reducerea conținutului de clorofilă, semnalând prezența unui stres foto-oxidativ asupra aparatului fotosintetic la plantule, dar fără afectarea indicatorilor de producție.
7. Plantele cultivate pe substrat cu metale grele au folosit produsul de fotosinteză (seva elaborată) cu precădere pentru metabolismul secundar, astfel încât conținutul de compuși fenolici și flavonoide a crescut.
8. Activitatea antioxidantă a fost corelată cu conținutul de compuși fenolici, metalele grele adăugate substratului au influențat activitatea antioxidantă.
9. Activitatea enzimelor antioxidante, în special SOD a crescut semnificativ la plantulele cultivate pe mediul de cultură suplimentat cu metale grele, ceea ce indică implicarea acestei enzime în catalizarea speciilor reactive de oxigen ce apar ca urmare a unui conținut ridicat de metale în substrat.

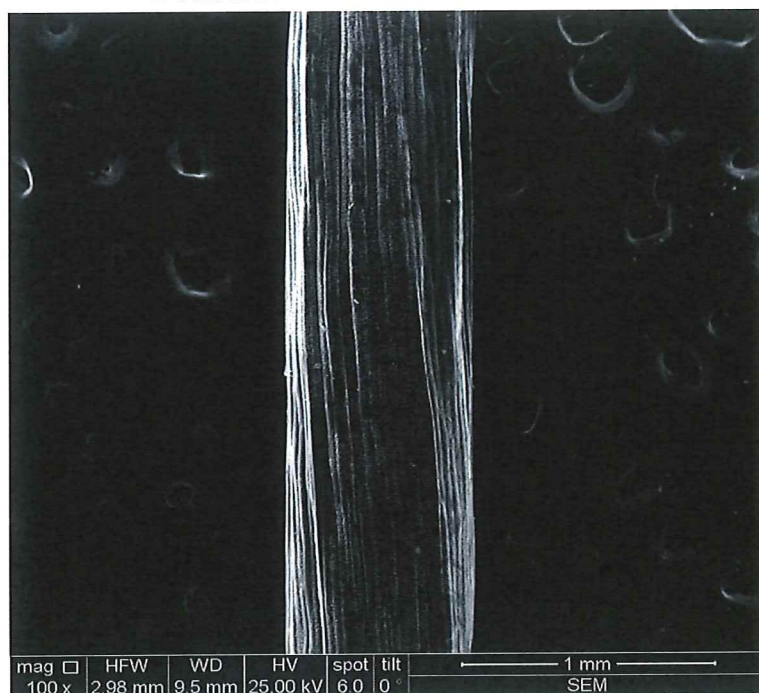
ANEXE

ANEXA 1 a. ANALIZA MATERIALULUI VEGETAL CULTIVAT PE MEDIUL DE CULTURĂ MB-MS SUPLIMENTAT CU CdSO_4 (V_1 - 50 ppm, V_3 -25 ppm) ȘI A VARIANTEI CONTROL (V_0) LA MICROSCOPUL ELECTRONIC CU BALEAIAJ (SEM)

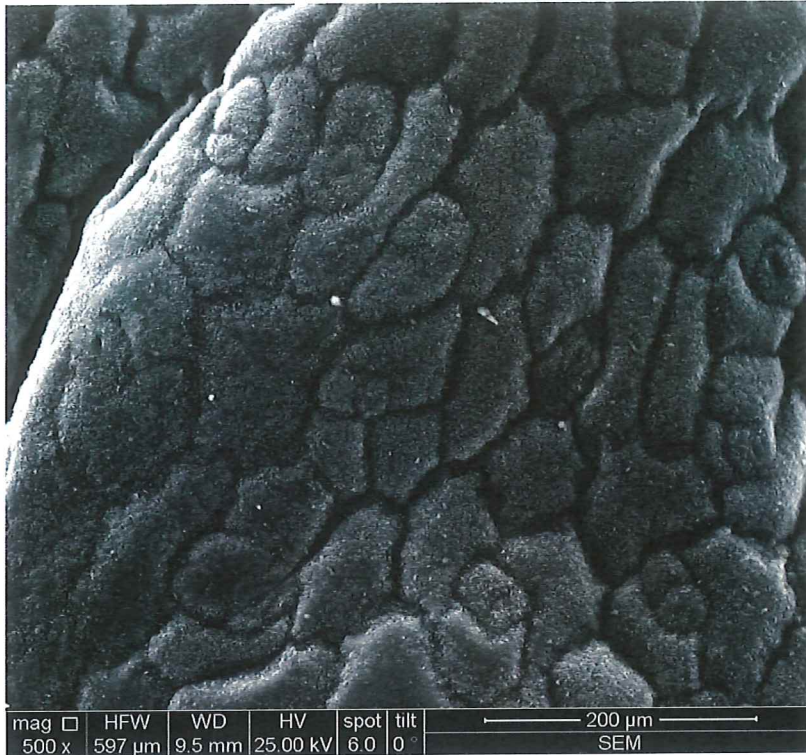
I. VARIANTA CONTROL (V_0)
- RĂDĂCINA



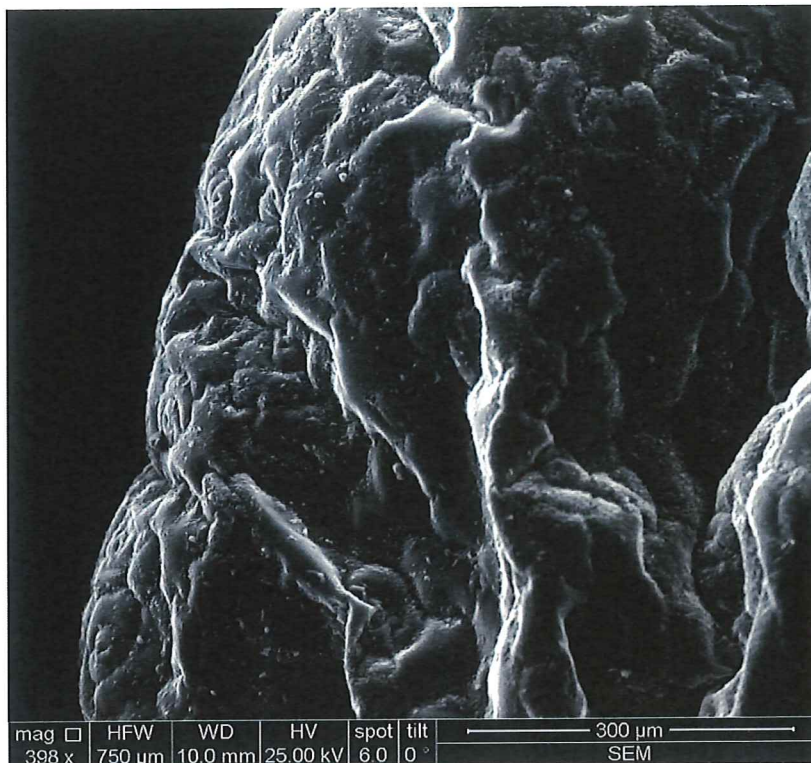
- TULPINA



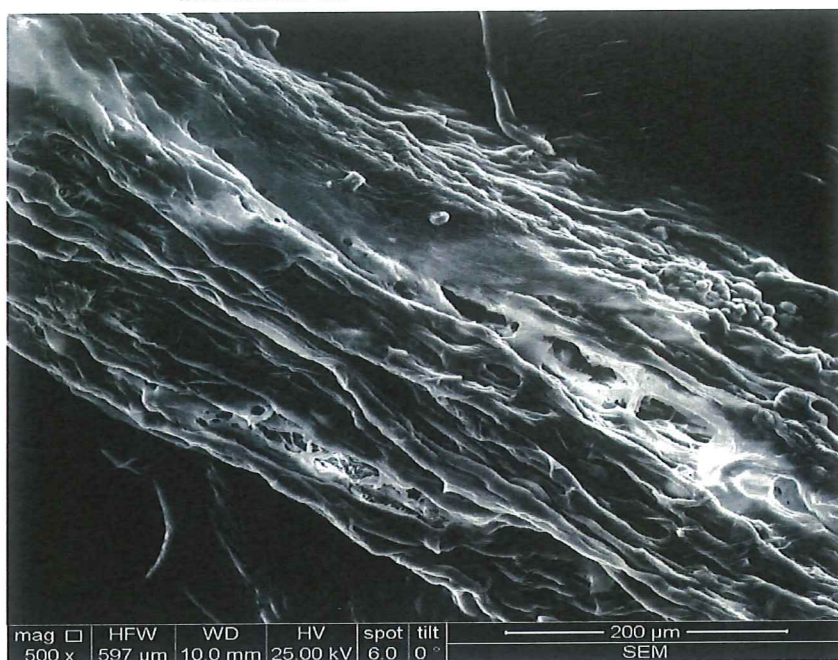
- LIMB FOLIAR- EPIDERMA SUPERIOARA



- LIMB FOLIAR- EPIDERMA INFERIOARA



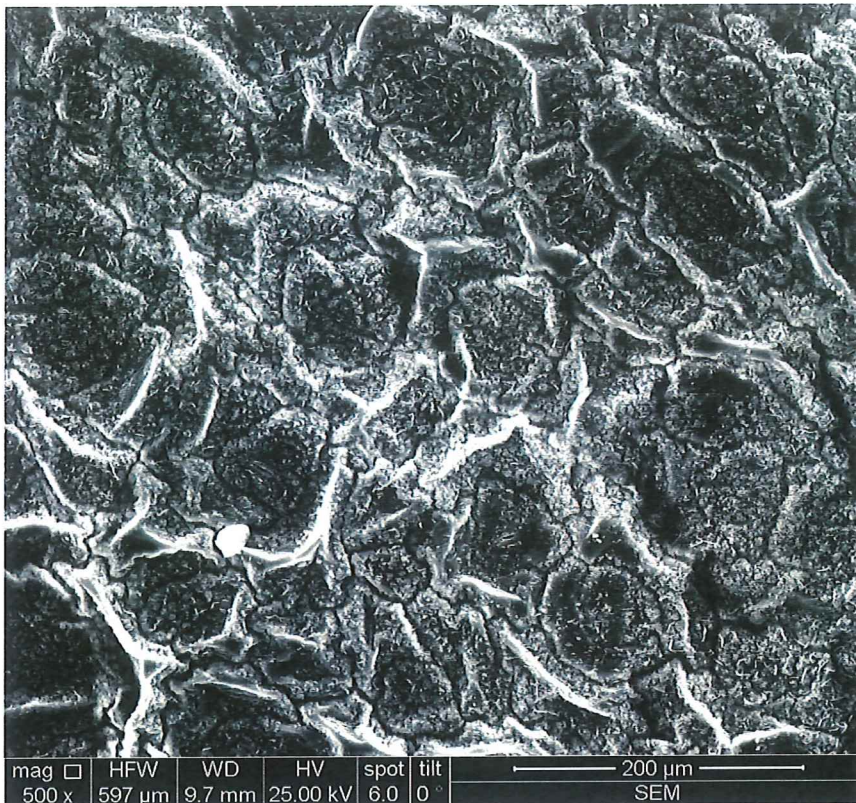
II. VARIANTA V₁
- RĂDĂCINA



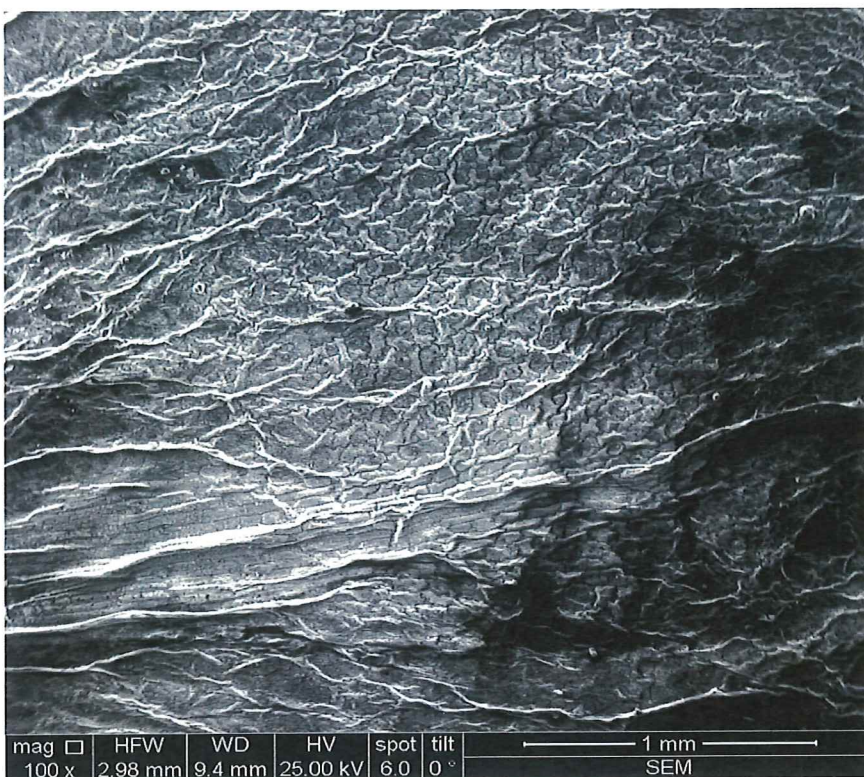
- TULPINA



- LIMB FOLIAR- EPIDERMA SUPERIOARA

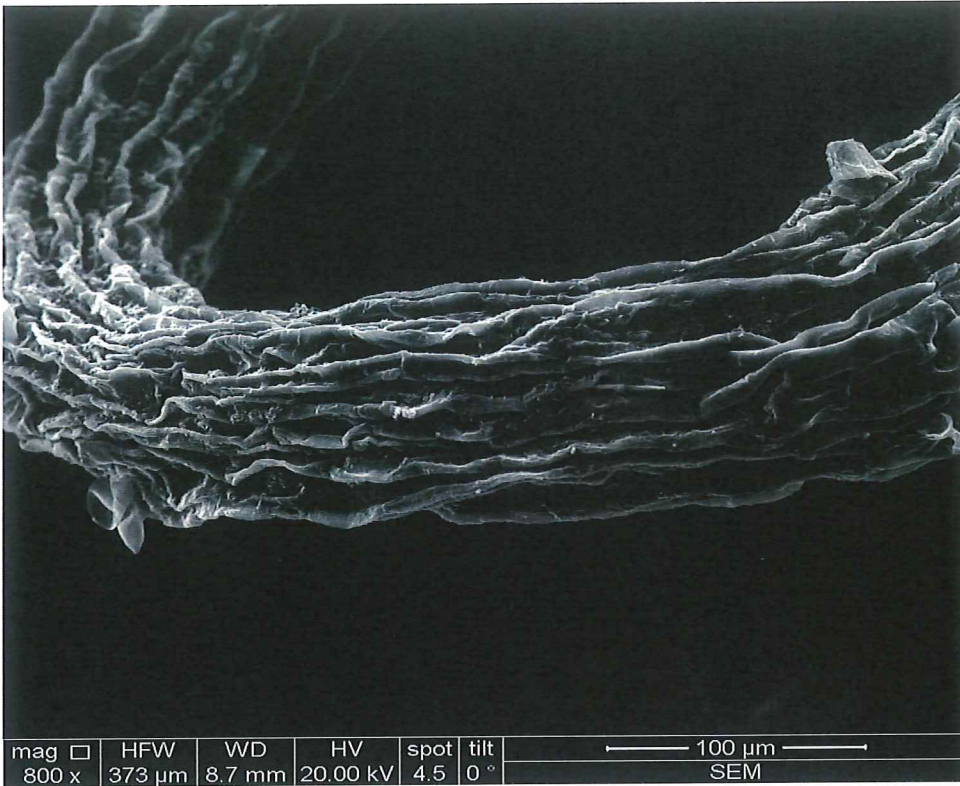


- LIMB FOLIAR- EPIDERMA INFERIOARA

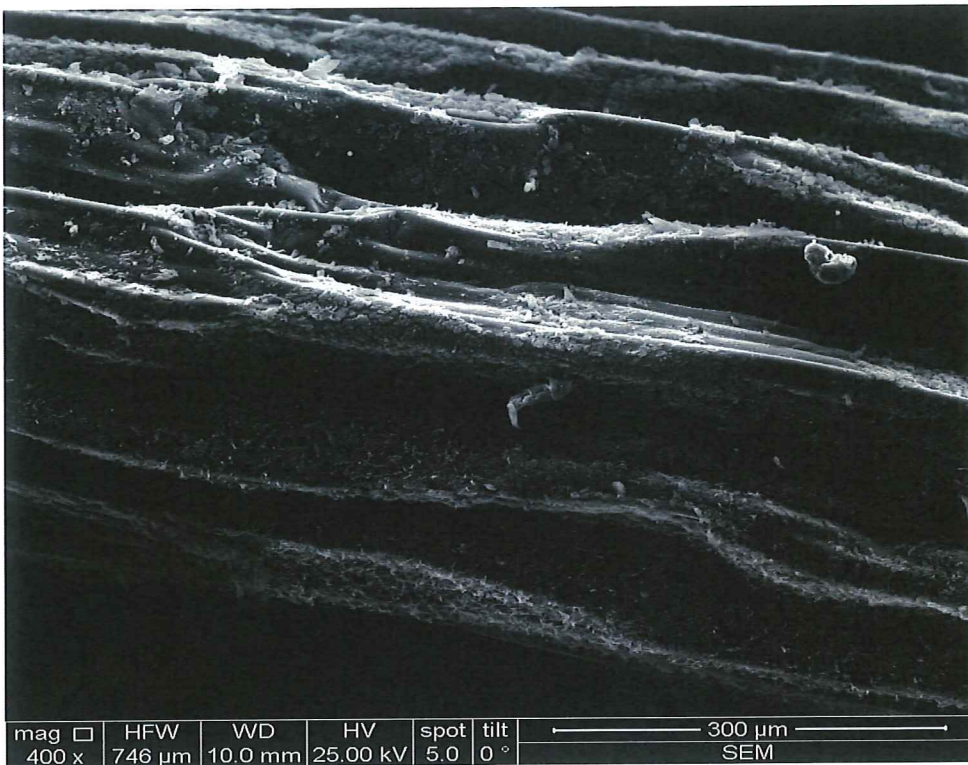


III. VARIANTA V₃

- RĂDĂCINĂ



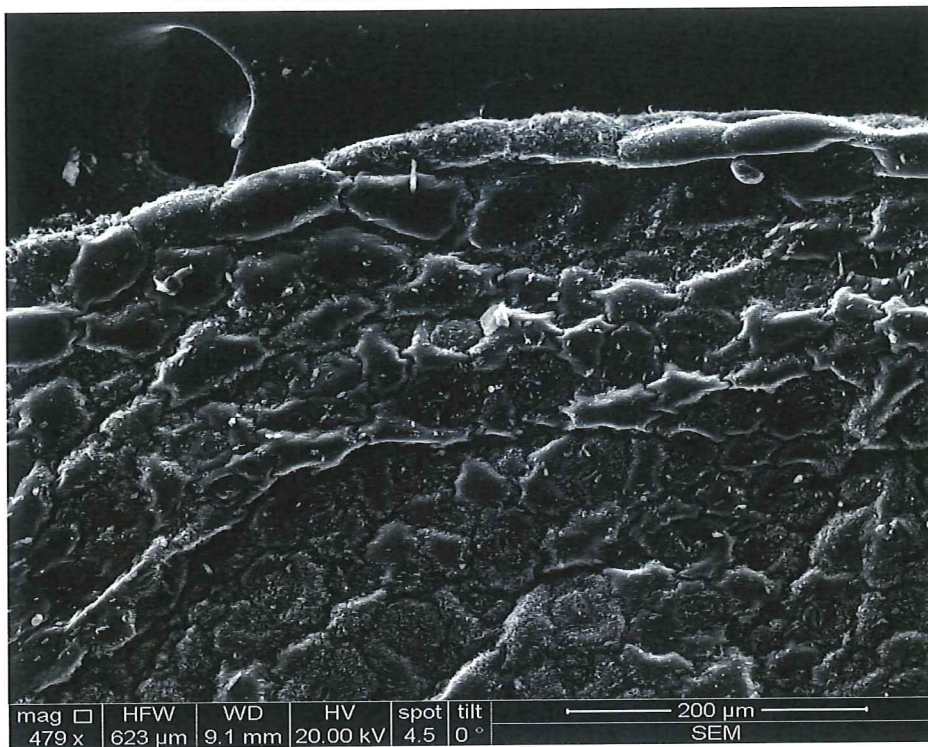
- TULPINĂ



LIMB FOLIAR- EPIDERMA SUPERIOARA



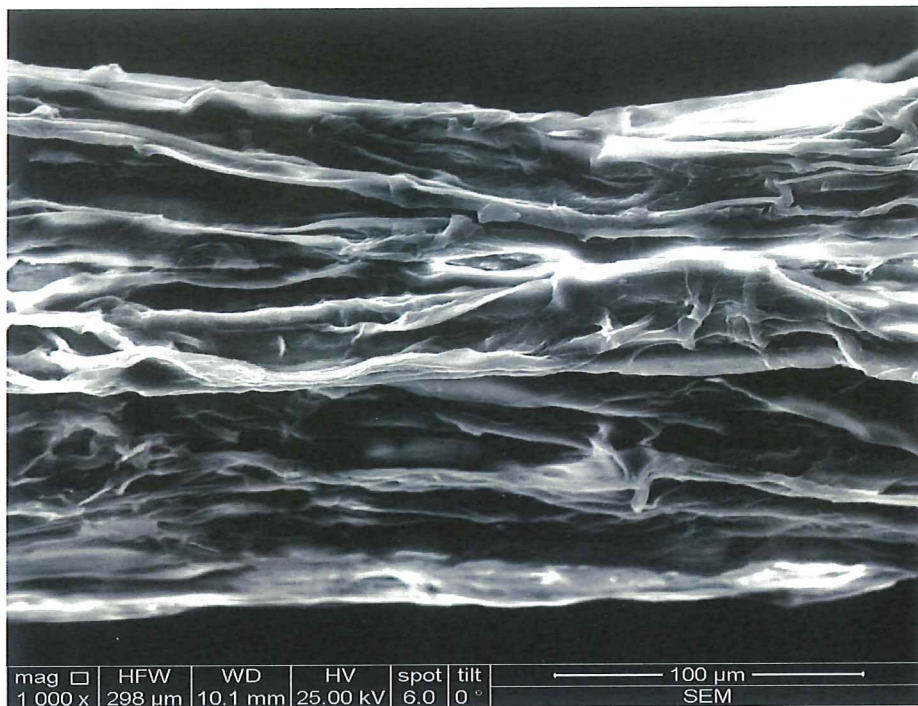
LIMB FOLIAR- EPIDERMA INFERIOARA



ANEXA 1b. ANALIZA MATERIALULUI VEGETAL CULTIVAT PE MEDIUL DE CULTURĂ MB-MS SUPLIMENTAT CU Pb Cl₂ (V₂- 50 ppm, V₄-25 ppm) ȘI A VARIANTEI CONTROL (V₀) LA MICROSCOPUL ELECTRONIC CU BALEIAJ (SEM)

I. VARIANTA CONTROL (V₀)

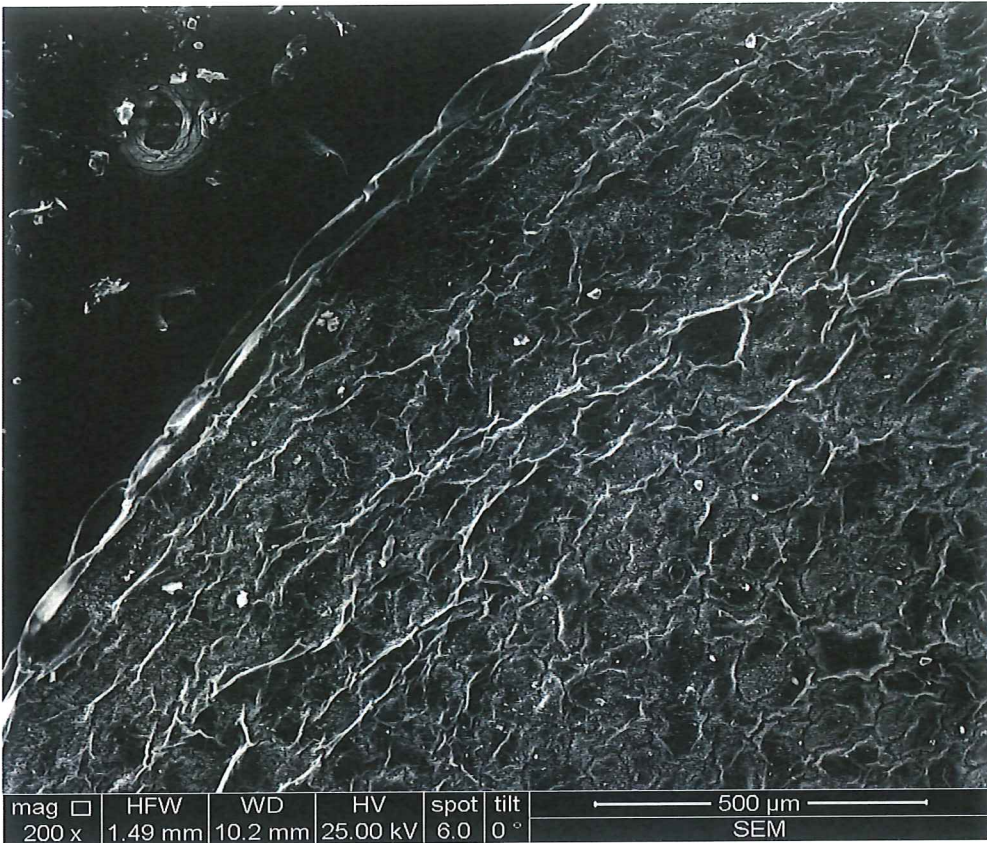
- RĂDĂCINA



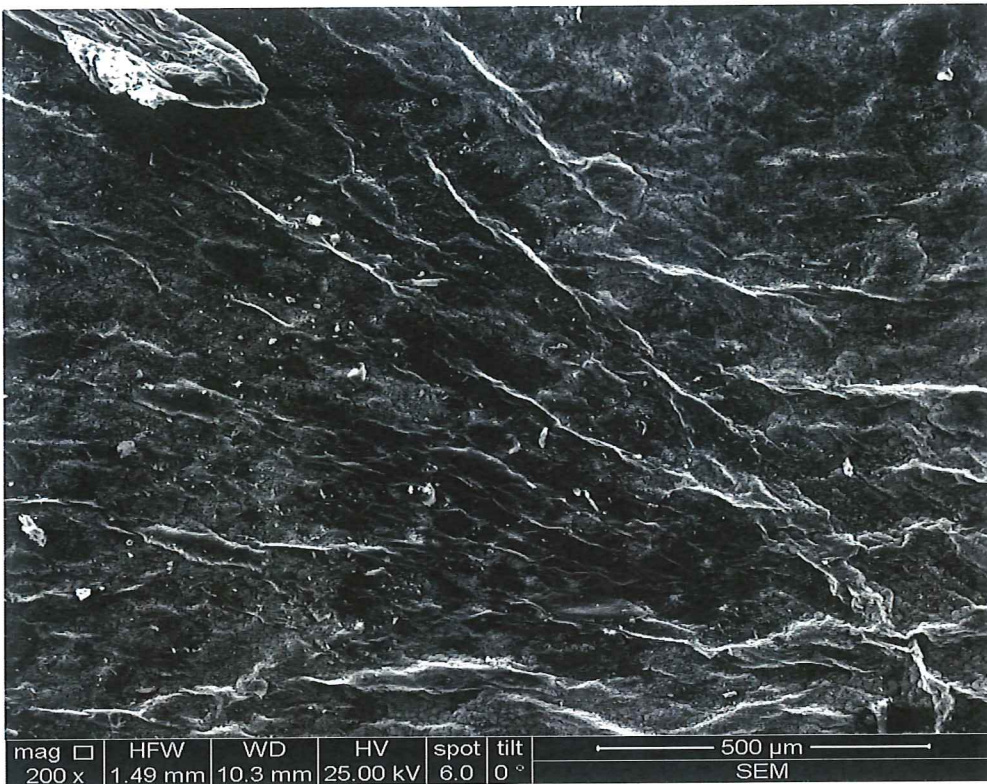
- TULPINA



LIMB FOLIAR- EPIDERMA SUPERIOARA



LIMB FOLIAR- EPIDERMA INFERIOARA

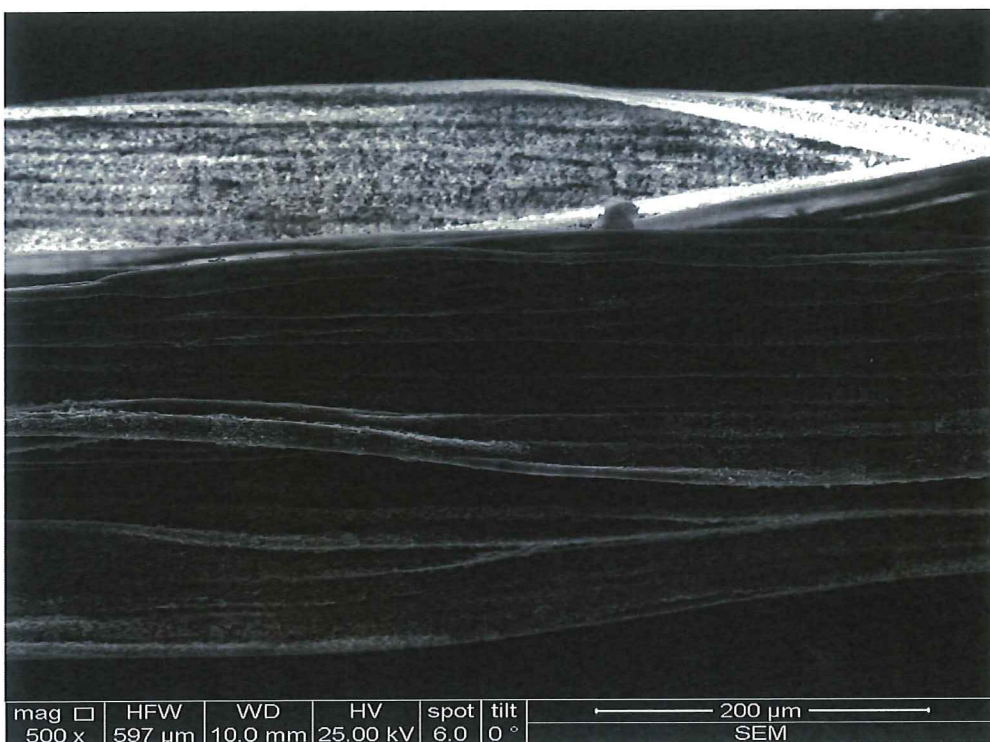


II. VARIANTA V₂

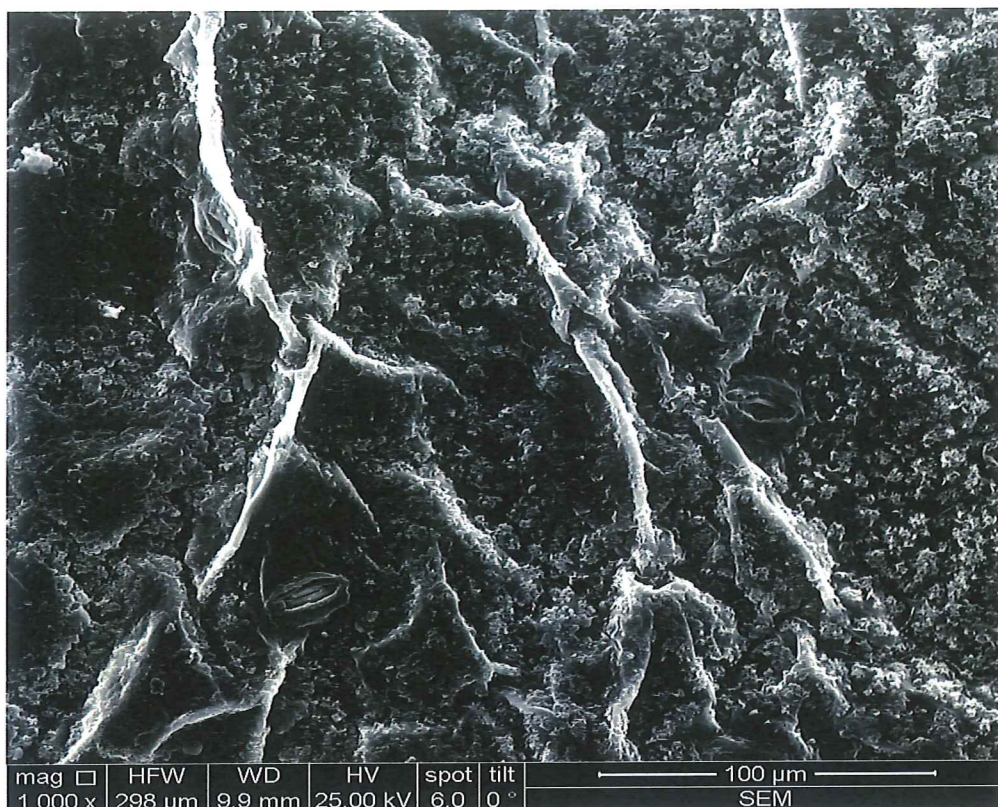
- RĂDĂCINA



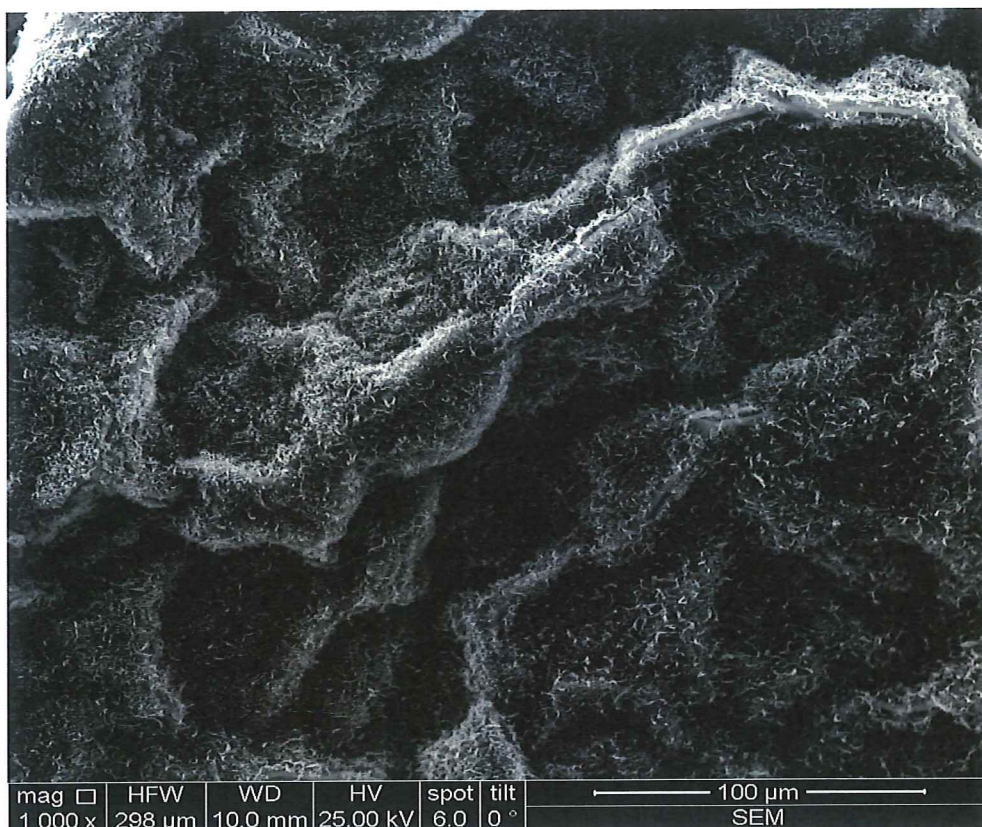
- TULPINA



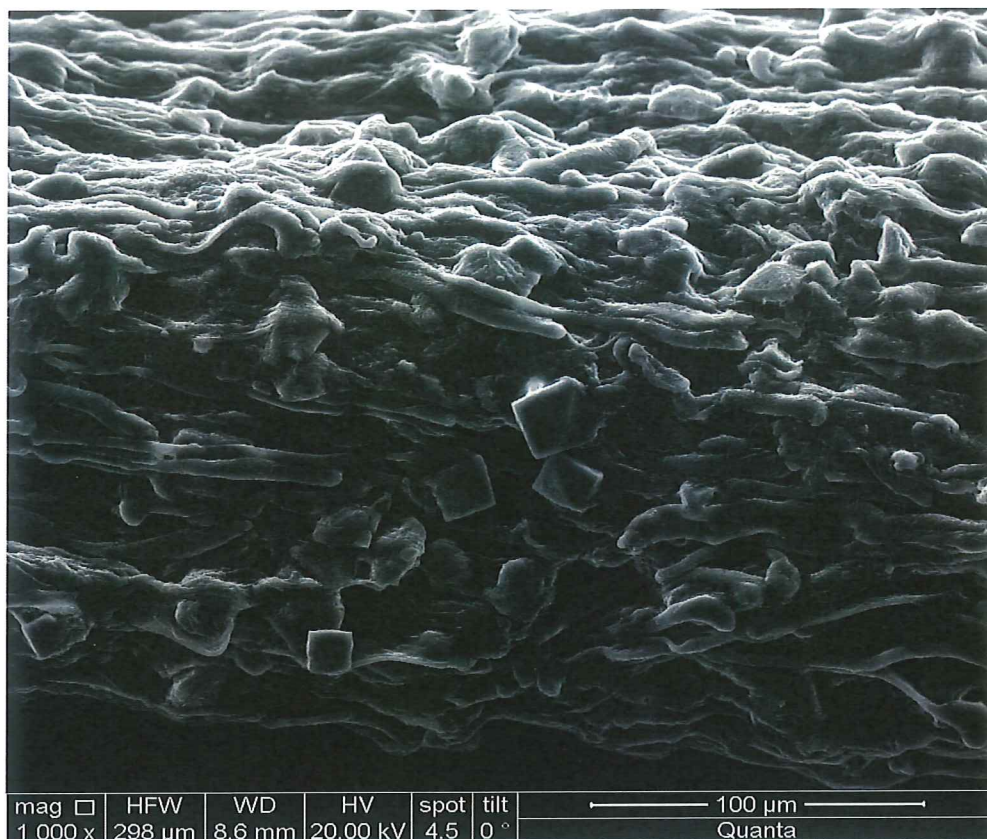
LIMB FOLIAR- EPIDERMA SUPERIOARA



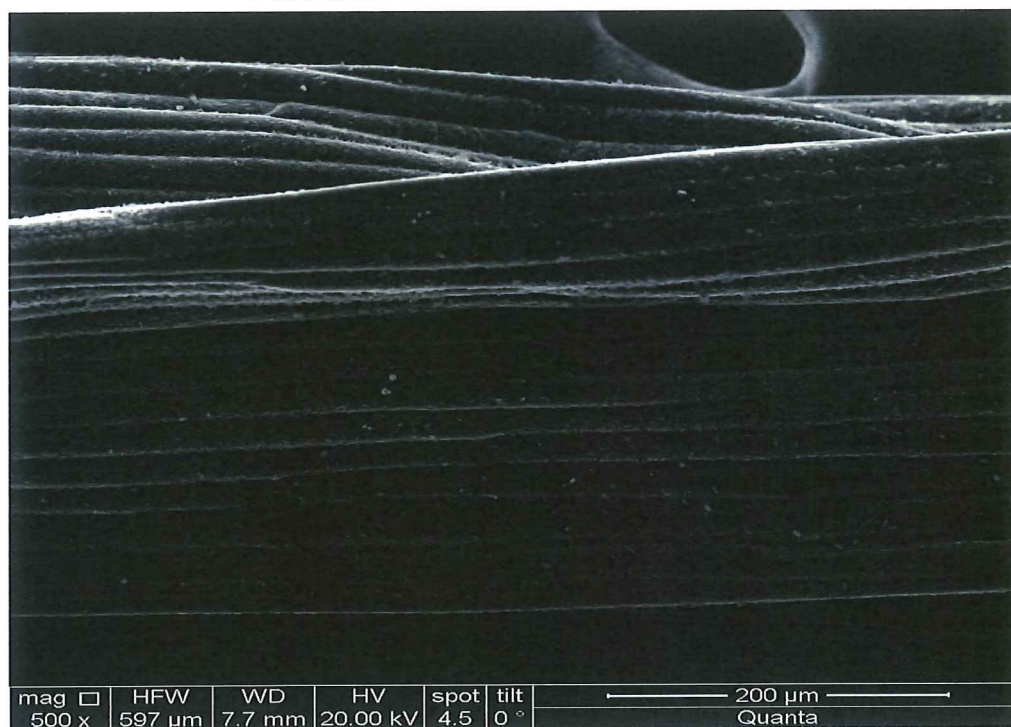
LIMB FOLIAR- EPIDERMA INFERIOARA



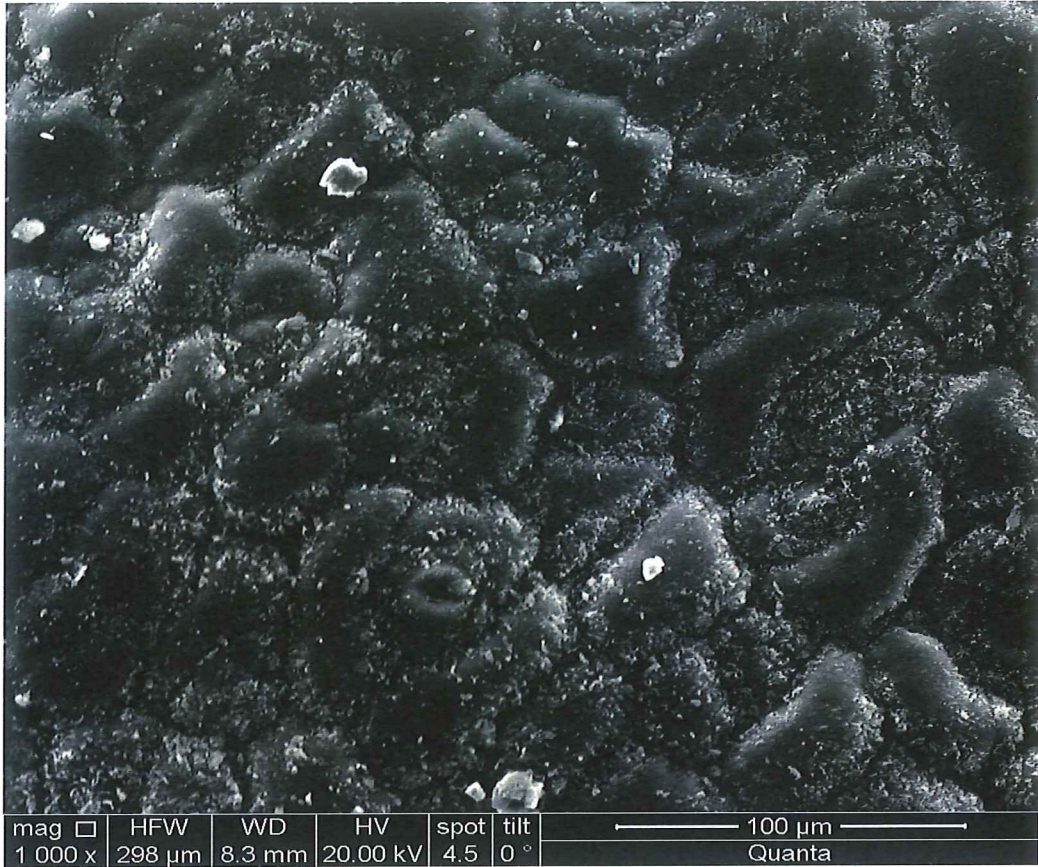
IV. VARIANTA V₄
- RĂDĂCINA



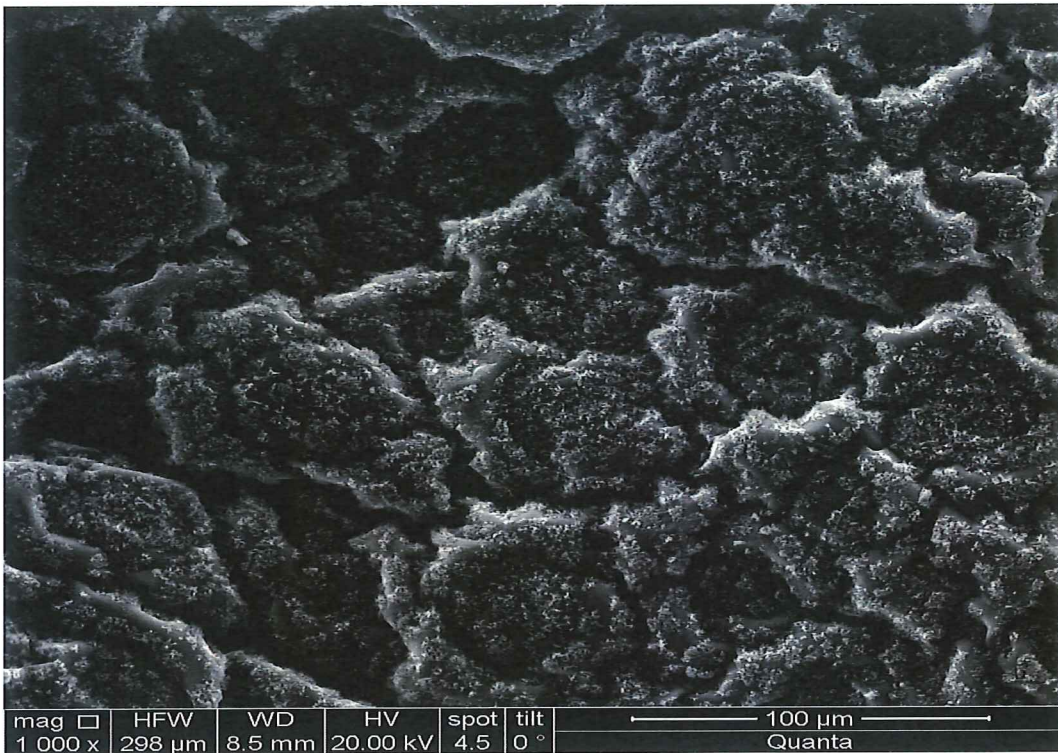
- TULPINA



- LIMB FOLIAR- EPIDERMA SUPERIOARA

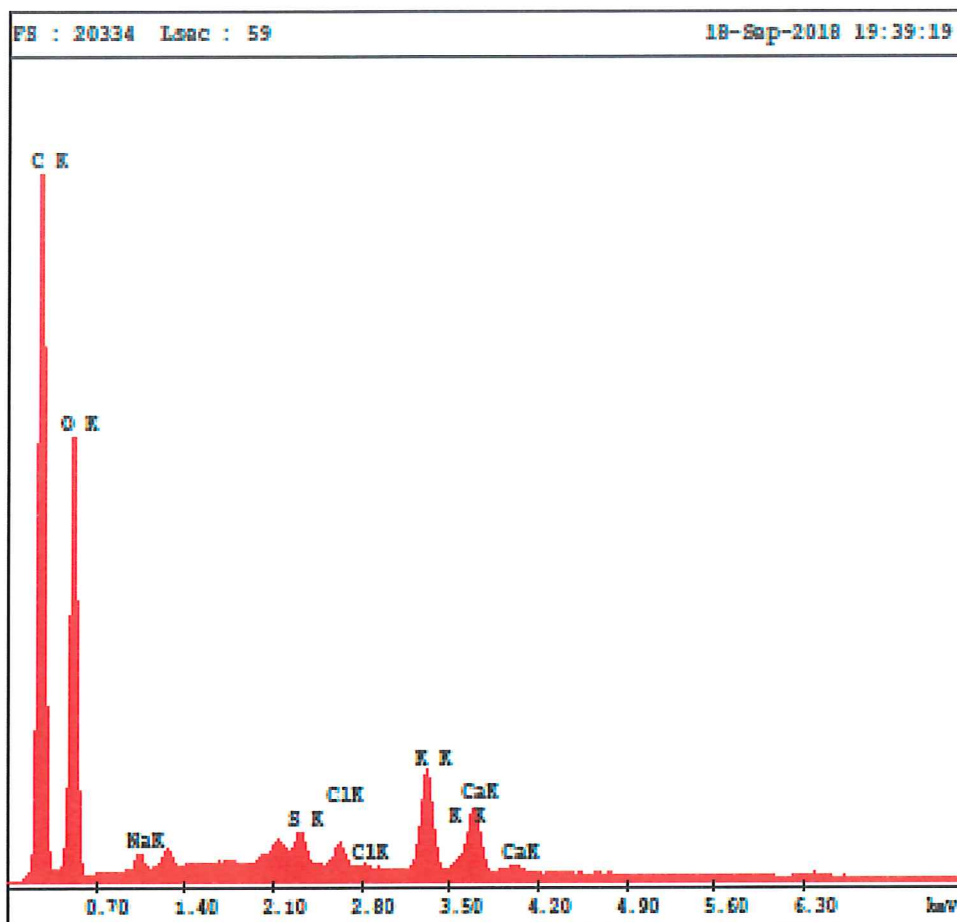


- LIMB FOLIAR- EPIDERMA INFERIOARA



ANEXA 2 a. DETERMINAREA ELEMENTELOR CHIMICE LA NIVELUL ORGANELOR VEGETATIVE APARTINÂND VARIANTELOR CRESCUTE PE MEDIUL DE CULTURĂ SUPLIMENTAT CU Cd SO₄ PRIN SISTEMUL DE MICROANALIZA ELEMENTALA (EDAX)

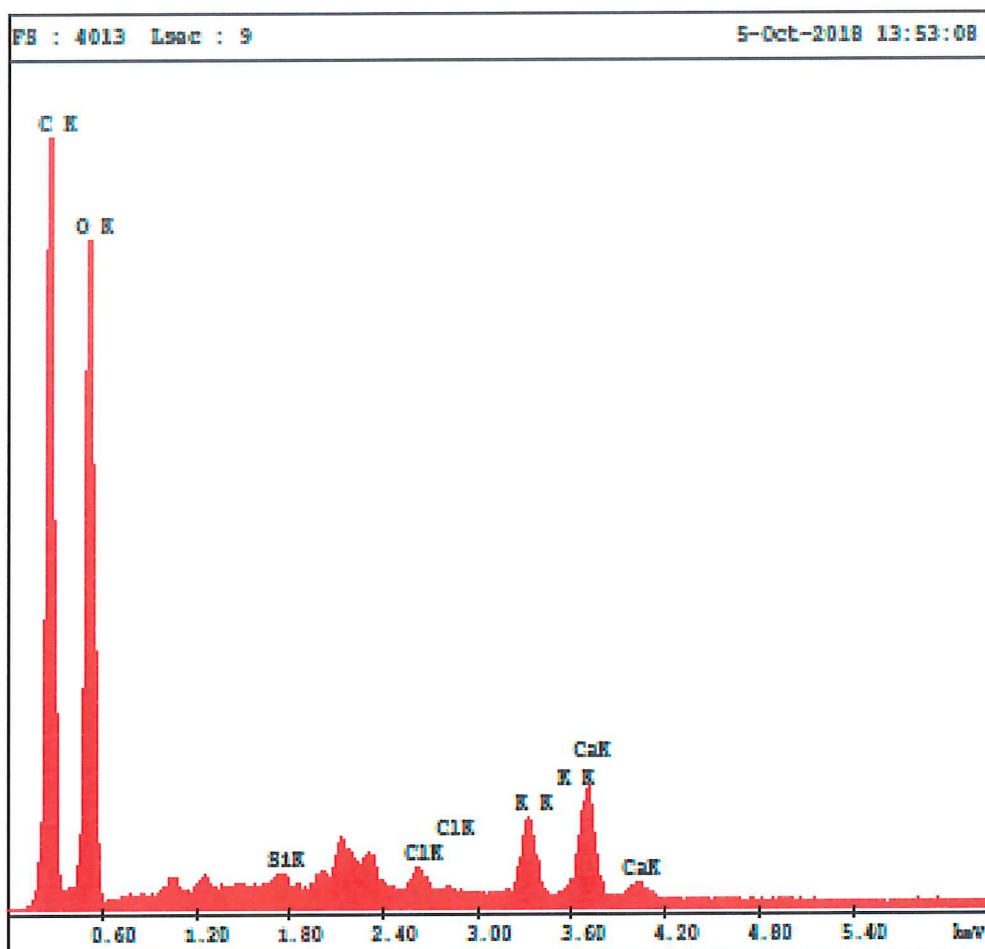
1. Vo



Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
C K	54.71	62.87	0.2737	1.0095	0.4954	1.0004
O K	41.08	35.44	0.0662	0.9942	0.1620	1.0000
NaK	0.64	0.39	0.0015	0.9327	0.2504	1.0001
S K	0.48	0.21	0.0042	0.9507	0.9155	1.0027
ClK	0.35	0.14	0.0031	0.8980	0.9804	1.0039
K K	1.62	0.57	0.0154	0.9019	1.0539	1.0038
CaK	1.11	0.38	0.0108	0.9257	1.0478	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Ints.	Reqd Ints.	Ints. Error	F/B
C K	1382.13	7.96	0.35	173.62
O K	895.12	11.97	0.44	74.75
NaK	38.23	36.61	3.58	1.04
S K	112.04	65.38	1.80	1.71
ClK	79.54	59.59	2.30	1.33
K K	354.35	51.27	0.78	6.91
CaK	290.09	48.07	1.02	4.79

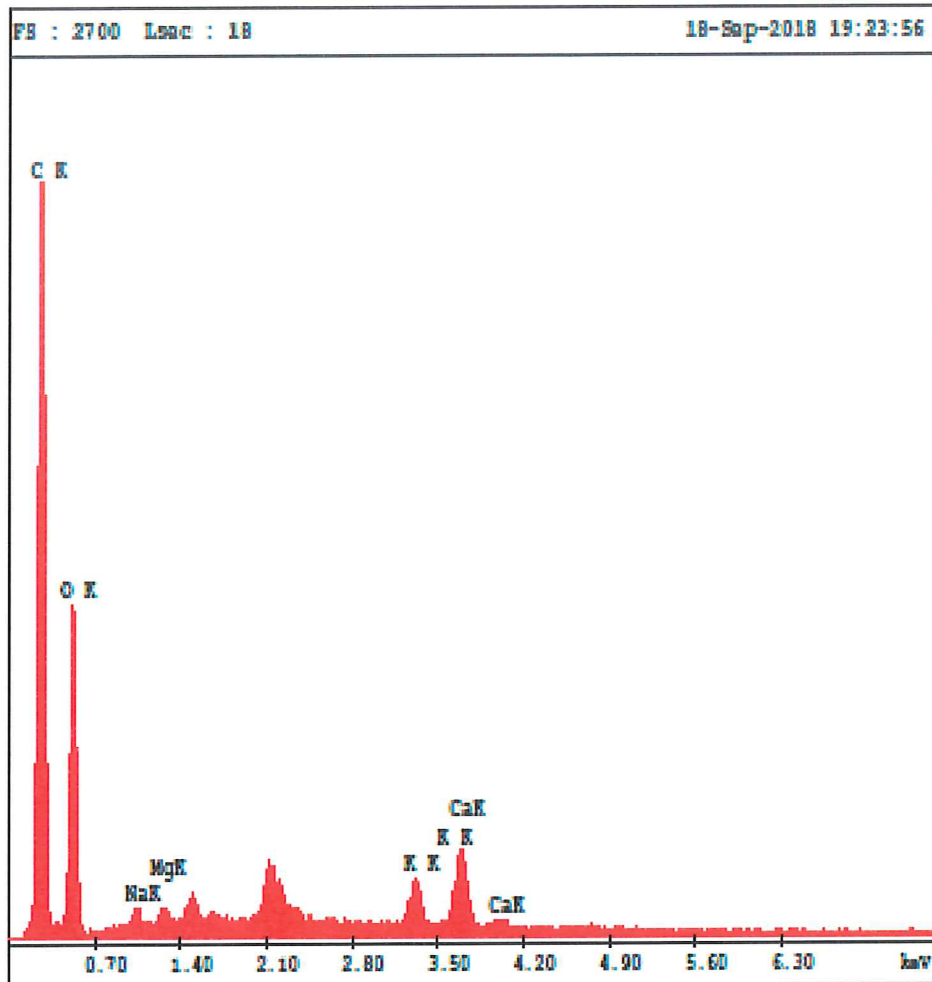
2. V_I



Element	WT %	At %	K-Ratio	Z	A	F
C K	49.32	57.37	0.3495	1.0097	0.5008	1.0004
O K	47.47	41.46	0.0832	0.9944	0.1762	1.0000
Si K	0.18	0.09	0.0011	0.9573	0.6474	1.0007
Cl K	0.29	0.12	0.0026	0.8982	0.9779	1.0037
K K	1.09	0.39	0.0104	0.9021	1.0539	1.0058
Ca K	1.66	0.58	0.0162	0.9259	1.0554	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Ints.	Bkgd Ints.	Ints. Error	P/B
C K	1737.70	13.46	0.77	129.06
O K	1551.53	20.96	0.82	74.04
Si K	41.30	96.07	11.77	0.43
Cl K	91.01	78.66	5.51	1.16
K K	328.91	58.11	2.04	5.66
Ca K	477.63	54.36	1.61	8.79

3.V₃

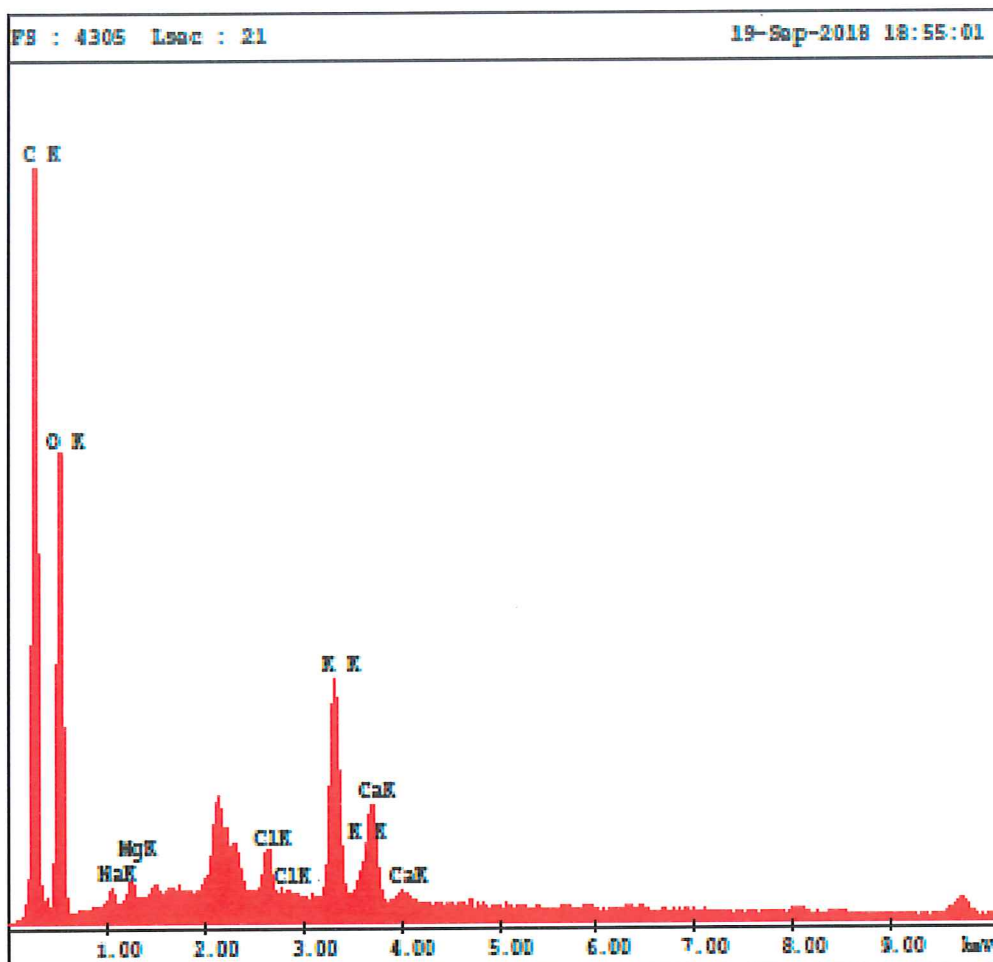


Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
C K	59.78	67.47	0.3372	1.0081	0.5594	1.0003
O K	36.61	31.02	0.0559	0.9929	0.1537	1.0000
NaK	0.74	0.43	0.0018	0.9314	0.2601	1.0001
MgK	0.46	0.26	0.0017	0.9555	0.3722	1.0001
K K	0.85	0.30	0.0083	0.9005	1.0685	1.0059
CaK	1.55	0.52	0.0153	0.9243	1.0694	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Inte.	Reqd Inte.	Inte. Error	P/B
C K	599.42	2.58	0.96	232.38
O K	265.96	4.01	1.46	66.38
NaK	15.97	14.60	9.86	1.09
MgK	15.97	19.87	10.95	0.80
K K	66.79	20.53	3.64	3.25
CaK	115.36	20.86	2.55	5.53

ANEXA 2 b. DETERMINAREA ELEMENTELOR CHIMICE LA NIVELUL ORGANELOR VEGETATIVE APARTINÂND VARIANTELOR CRESCUTE PE MEDIUL DE CULTURĂ SUPLIMENTAT CU PbCl₂ (V₂- Pb 50 ppm, V₄- Pb 50 ppm) PRIN SISTEMUL DE MICROANALIZA ELEMENTALA (EDAX)

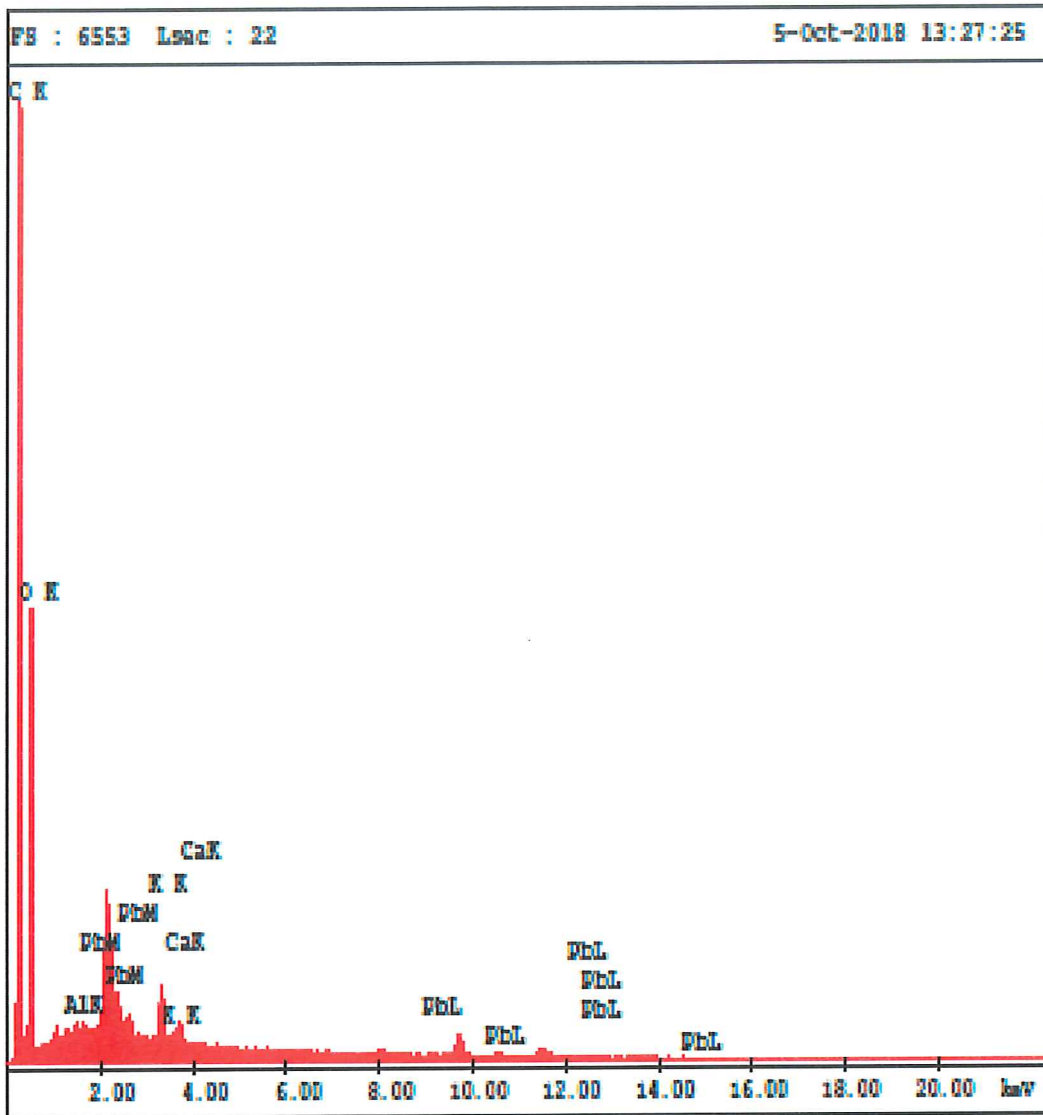
1. V₀



Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
C K	53.37	62.95	0.2658	1.0115	0.4922	1.0003
O K	39.84	34.94	0.0620	0.9962	0.1561	1.0000
NaK	0.62	0.38	0.0014	0.9345	0.2495	1.0003
MgK	0.50	0.29	0.0017	0.9587	0.3580	1.0004
ClK	0.61	0.24	0.0054	0.9001	0.9833	1.0072
K K	3.39	1.21	0.0324	0.9040	1.0520	1.0052
CaK	1.67	0.59	0.0159	0.9277	1.0227	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Ints.	Bkgd Ints.	Ints. Error	F/B
C K	818.02	6.36	0.76	128.61
O K	510.76	10.20	0.98	50.10
NaK	22.36	27.50	8.51	0.81
MgK	28.90	40.41	7.84	0.72
ClK	84.28	55.14	3.58	1.53
K K	452.62	52.71	1.13	8.59
CaK	206.95	52.80	1.85	3.92

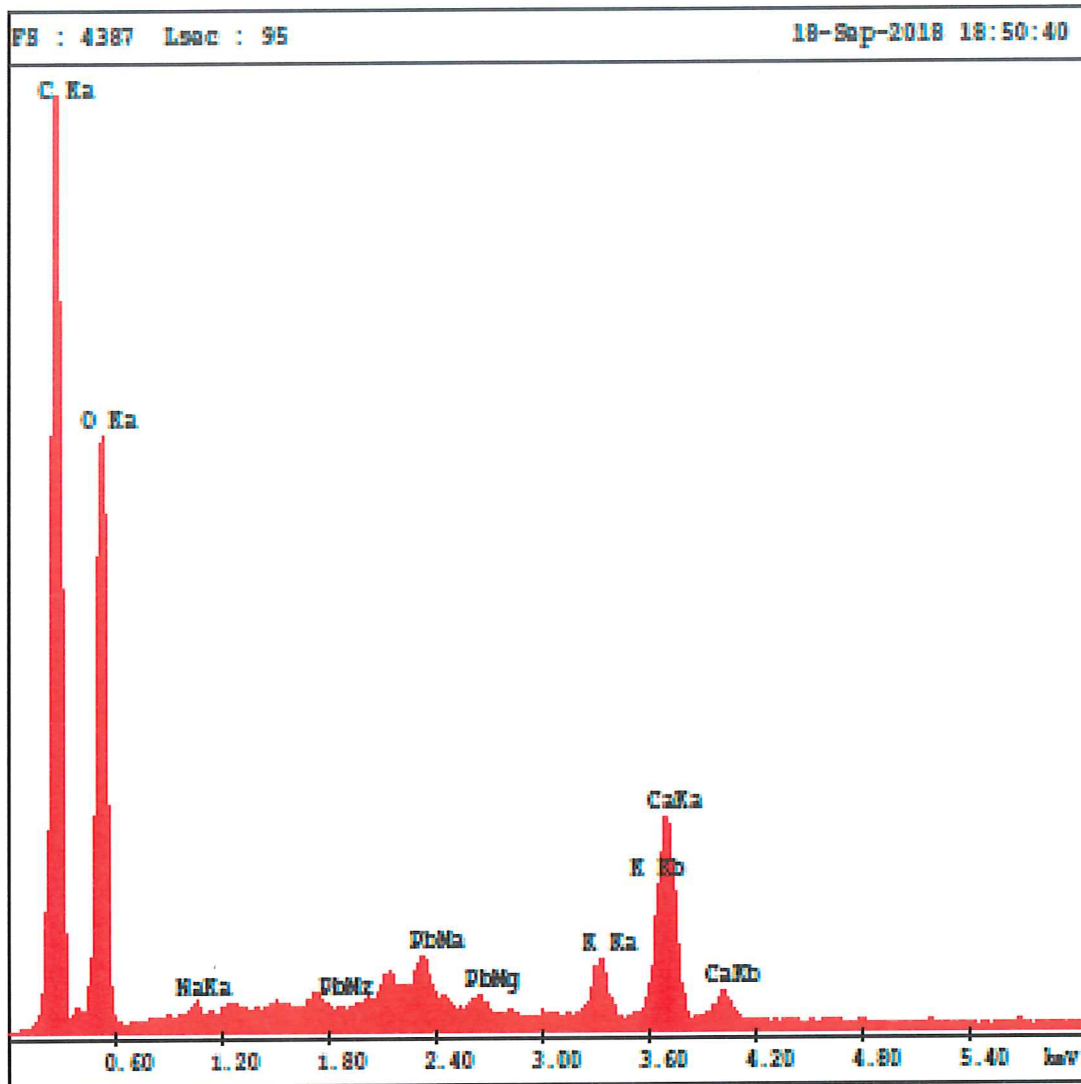
2. V₂



Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
C K	59.57	67.52	0.3343	1.0097	0.5556	1.0003
O K	37.44	31.86	0.0584	0.9944	0.1568	1.0000
AlK	0.21	0.11	0.0010	0.9295	0.5169	1.0001
K K	0.82	0.29	0.0077	0.9025	1.0371	1.0012
CaK	0.36	0.12	0.0035	0.9261	1.0433	1.0000
PbL	1.59	0.10	0.0112	0.6362	1.1054	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Ints.	Bkgd Ints.	Ints. Error	F/B
C K	1309.88	9.37	0.58	139.73
O K	614.78	15.43	0.86	39.83
AlK	23.20	65.62	11.19	0.35
K K	139.39	58.08	2.39	2.40
CaK	59.47	59.17	4.68	1.01
PbL	15.35	16.48	9.46	0.93

3. V₄



Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
C K	50.18	60.13	0.2595	1.0161	0.5087	1.0004
O K	41.61	37.43	0.0699	0.9993	0.1680	1.0000
NaK	0.35	0.22	0.0009	0.9354	0.2670	1.0001
PbM	2.13	0.15	0.0221	0.6488	1.5984	1.0005
K K	1.09	0.40	0.0101	0.9064	1.0096	1.0121
CaK	4.65	1.67	0.0438	0.9281	1.0145	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Ints.	Bkgd Ints.	Ints. Error	P/B
C K	209.60	1.38	0.71	152.33
O K	135.10	2.03	0.89	66.47
NaK	2.88	5.59	13.30	0.51
PbM	15.73	7.88	3.64	2.00
K K	22.30	6.24	2.70	3.57
CaK	88.04	6.05	1.16	14.56

Bibliografie

1. Ardelean, M., Cachiță-Cosma, D., Aurel Ardelean, Tripon, S., 2015. *Particular changes produced by aphids in wild Sedum telephium ssp. maximum L. plants: morphological and anatomical aspects*. Romanian Biotechnological Letters Vol. 20, No. 3, 2015, pp.10461-10469.
2. Artenie, V., Ungureanu, E., Negură, A. M., 2008. *Metode de investigare a metabolismului glucidic și lipidic*, Editura PM.
3. Boroș M., Micle V., 2015, A Review. Study on soil decontamination by phytoremediation in the case of former industrial sites, ProEnvironment 8 (2015) 468 – 475.
4. Bradford, M., 1976. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Anal. Biochem., 72, 248-254.
5. Cachiță, C.D., Ardelean, A., 2005, *Vitroculturile la cormofite, modele experimentale în cercetările de biologie*. In: Al XIII-lea Simpozion Național de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale, Sighișoara 10 iunie 2004, Ed. BION, Satu Mare, p. 311.
6. Cachiță, C.D., Ardelean, A., 2009, *Tratat de biotehnologie vegetală*, vol. II, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, p. 32 - 116.
7. Cachiță, C.D., Ardelean, A., Crăciun, C., Turcuș, V., Barbu-Tudoran, L., 2008, *The procaine hydrochlorate effect onto the corpuscular anthocyanins from the vacuolar sap of different plant cells*. In: 14th European Microscopy Congress, Aachen, Germany, p. 109 - 110.
8. Cachiță, C.D., Crăciun, C., 2004, *Hiperhidria la vitroculturile de cormofite - o boală fiziologică neoplazică*. In: Lucr. Celui de alXII lea Simp. Naț. De Cult. De Țes. Și Cl. Vegetale, Jibou 5 iunie 2003, intitulat: *Fitopatologia celulei vegetale în regim de vitrocultură*, (Ed. Coord.) Cachiță, C.D., Ardelean, A., Fati, V. (Edt.) Daya Satu Mare, p. 30 – 42.
9. Dumitriu D., 2014, *Restoration of heavy metals polluted soils case study – Camelina*, AgroLife Scientific Journal - Volume 3, Number 2, 2014.
10. Favas J.C.P., Pratas J., Varun M., D'Souza R., Manoj S.P., 2014, *Phytoremediation of Soils Contaminated with Metals and Metalloids at Mining Areas: Potential of Native Flora*, în: *Earth and Planetary Sciences » Soil Science » "Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*, Ed. Hernandez-Soriano C., DOI: 10.5772/57086.
11. Flanigan, P.M.; Niemeyer, E.D. *Effect of cultivar on phenolic levels, anthocyanin composition, and antioxidant properties in purple basil (Ocimum basilicum L.)*. Food Chem. 2014, 164, 518-526.
12. Gautheret, R.J., 1934, *Culture du tissu cambial*. C.R. Acad. Sci. Paris; 198, p.2195-2196.
13. Gill SS, Tuteja N (2010) *Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants*. Plant PhysiolBiochem 48:909–930

14. Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R., 1983. *Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extract in different solvents*. Biochemical Society Transactions 11, 591–592.
15. Manios, T., Millner, P.A., Stentiford, E.I., 2002. The effect of heavy metals on the total protein concentration of *Typha latifolia* plants, growing in a substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferous wastewater. J. Env. Sci. Health A37 (8), 925/936
16. Muneer, S., Kim, E.J., Jeong, S. P., Lee.,J,H. 2014. *Photosynthetic Activity under Different Light Intensities in Lettuce Leaves (Lactuca sativa L.)* International Journal of Molecular Sciences ISSN 1422-0067.
17. Murashige, T., Skoog, F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. In: Physiol. Plant. 15:473 - 497.
18. Murchie EH, Lawson T. Chlorophyll Fluorescence Analysis: A Guide to Good Practice and Understanding some new Applications. J Exp Bot. 2013
19. Singh, K.P., D. Mohon, S. Sinha & R. Dalwani. 2004. Impact assessment of treated/untreated waste water toxicants discharge by sewage treatment plants on health, agricultural, and environmental quality in waste water disposal area. Chemosphere 55: 227- 255.
20. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents*. Am. J. Enol. Vitic. 1965, 16, 144-158.
21. Wuana RA, Okieimen FE (2011). Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. Communicat Soil Sci. Plant Anal 42: 111-122.
22. Yao Z., Li J., Xie X., Yu C., 2012, Review on remediation technologies of soil contaminated by heavy metals, Procedia Environmental Sciences 16 (2012) 722–729. Camper ND, McDonald SK. 1989. Tissue and cell cultures as model systems in herbicide research. Rev Weed Sci 4:169–190.