



RAPORT DE ACTIVITATE

Nr.2

Materiale și metode de lucru

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

Asist. cerc. dr. Ardelean Mirela

2018

Cuprins

I. Creșterea plantulelor pe medii nutritive suplimentate cu diferite concentrații de metale grele	3
I.1. Inițierea culturilor <i>in vitro</i> pe medii de cultură suplimentate cu diferite tipuri de metale grele și de diferite concentrații	3
I. 1.1. Spațiile de lucru și aparatura utilizată pentru efectuarea experimentelor	3
I.1.2. Materialul vegetal, compoziția mediului de cultură și regimul de vitrocultură	3
II. Urmărirea evoluției unor parametri morfologici, fiziologici și biochimici ca potențiali indicatori	5
II. 1. Biometrizarea vitroculturilor	5
II. 2. Examinarea morfologică a vitroplantulelor obținute pe medii cu metale	5
II.2. 1. Analiza materialului vegetal la microscopul electronic cu baleiaj (SEM)	5
II. 3. Examinarea fiziologică a vitroplantulelor obținute pe medii cu metale grele	6
II. 4. Determinările biochimice a vitroplantulelor obținute pe medii cu metale grele	7
III. Metode statistice aplicate în interpretarea rezultatelor obținute	7
Bibliografie	8

STUDIUL EXPERIMENTAL – MATERIALE ȘI METODE UTILIZATE ÎN IMPLEMENTAREA STUDIULUI DE CRECETARE

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.

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

I.1. Inițierea culturilor *in vitro* pe medii de cultură suplimentate cu diferite tipuri de metale grele și de diferite concentrații

I. 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 ele 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 aseptizarea, dimensionarea și inocularea *in vitro* a materialului vegetal.

I.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 (citochine 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 1. 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 regenerate din embrionii zigotici ai semințelor în cea de-a 30-a zi de vitrogerminație pe mediul de cultură <i>Murashige - Skoog</i> (1962).	V₀ (varianta control)	Mediu de bază <i>Murashige – Skoog</i> (1962) lipsit de metale grele	-	30 de zile
		V₁	Mediu de bază <i>Murashige – Skoog</i> (1962) cu Cd SO₄	50 ppm	
		V₂	Mediu de bază <i>Murashige - Skoog</i> (1962) cu Cd SO₄	25 ppm	
		V₃	Mediu de bază <i>Murashige- Skoog</i> (1962) cu Pb Cl₂	50 ppm	
		V₄	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 lucși, 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. Urmărirea evoluției unor parametri morfologici, fiziologici și biochimici ca potențiali indicatori

II. 1. Biometrizarea vitroculturilor

Vitroplantulele 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.

II.2. Examinarea morfologică a vitroplantulelor obținute pe medii cu metale

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

Probele pentru examinarea în SEM sunt 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 se va realiza sub lupa microscopului binocular, abia apoi realizându-se acoperirea cu metale a acestora (Ardelean și colab., 2015).

Probele astfel pregătite se introduc în microscop și se examinează 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: 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.3. 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 micromoliCO₂/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.4. 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).
- **Evaluarea nivelului de metale grele** s-a realizat utilizând un echipament ICPMS Agilent 8800, triplu cuadрупol. 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 multielement de concentrații adecvate.

III. 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.

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. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Murashige, T., Skoog, F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. In: Physiol. Plant. 15:473 - 497.
7. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents*. Am. J. Enol. Vitic. 1965, 16, 144-158.

Întocmit,

Asist.cerc.dr., Mirela Ardelean

Avizat,

Prof.univ.dr. Ficai Anton