



RAPORT DE ACTIVITATE

Eliminarea compușilor toxici (pesticide, metale grele, etc.) din soluri prin fitoremediere

Asist. cerc. dr. Ardelean Mirela

Avizat favorabil
Prof. dr. ing. Anton FICAI

2018

Cuprins

Scopul proiectului	3
Scopul studiului	3
Obiectivele și beneficiile aduse în cadrul acestui studiu	3
Introducere	4
Generalități privind sursele de poluare cu metale grele și procedura de fitoremediere	5
Utilizarea tehnicilor in vitro, caracterizare și aplicabilitate practică în fitoremediere	8
Plan de lucru în implementarea studiului	9
Bibliografie	10

Scopul proiectului este realizarea unui grup interdisciplinar capabil să evalueze capacitatea anumitor plante de a asigura remedierea unor soluri încărcate cu compuși toxici de tipul pesticidelor și/sau metalelor grele. În aceste condiții, proiectul își propune realizare la nivel de laborator a unor culturi adecvate pentru fitoremediere și evaluarea conținutului de substanțe toxice la nivelul plantelor în funcție de timpul de expunere, umiditatea solurilor, pH. Plantele propuse se vor selecta din gama plantelor cu viteza mare de creștere, eventual plante care să poate fi cultivate de 2-3ori pe an, bioacumularea toxinelor trebuie să se realizeze la nivelul părților supraterane astfel încât acestea să poată fi adunate și procesate adecvat în scopul recuperării (de exemplu, în cazul metalelor grele, prin peletizare urmată de incinerare și valorificare sau inertizare cenușă) sau distrugerii (în special în cazul pesticidelor sau a derivaților acestora).

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.

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 sunt 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 investigații 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.

1. 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 într-adevăr 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 orașenești, 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).

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

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

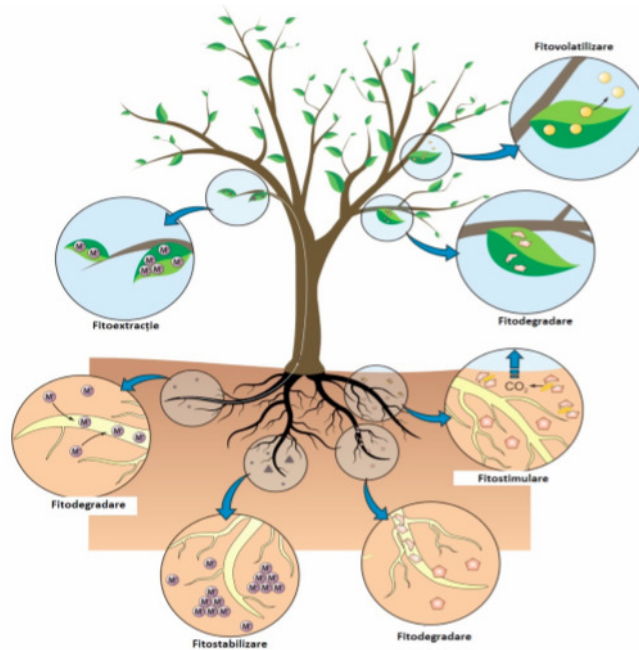
Din punct de vedere al fitoremedierii planta poate fi considerată ca fiind un sistem de pompare și tratare care poate preveni răspândirea contaminării solurilor. Contaminanți, cum ar fi metale, pesticide, solvenți, explozibili, țigări au fost diminuate în proiectele de fitoremediere din întreaga lume.

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 acvatice) 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 fitoremedieri includ metale (Pb, Zn, Cd, Cu, Ni, Hg), metaloizi (As, Sb), compuși anorganici ($\text{NO}_3\text{-NH}_4^+$, PO_4^{3-}), hidrocarburi petroliere (BTEX), pesticide și erbicide (atrazină, bentazonă, compuși clorurați și nitroaromatici), explozivi (TNT, DNT), solvenți clorurați (TCE, PCE) și deșeuri organice industriale (PCPs) (Favas și colab., 2014).



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 hiperacumuloare 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 efectoare 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).

2. 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 limite 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 dezinfecție 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).

3. Plan de lucru în implementarea studiului

- Inițierea culturilor *in vitro* pe medii de cultură suplimentate cu diferite tipuri de metale grele și de diferite concentrații;
- Monitorizarea la 7, 14, 21, 28 zile a vitroculturilor inițiate;
- Biometrizarea vitroculturilor;
- Examinarea morfologică a vitroplantulelor obținute;
- Corelarea parametrilor biometrici cu datelor morfologice, fiziologice și biochimice ale vitroplantulelor, monitorizate pe durata experimentului.

Bibliografie

1. Dumitriu D., 2014, Restoration of heavy metals polluted soils case study – Camelina, *AgroLife Scientific Journal* - Volume 3, Number 2, 2014.
2. 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.
3. Boroş 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. 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.
5. 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.
6. Camper ND, McDonald SK. 1989. Tissue and cell cultures as model systems in herbicide research. *Rev Weed Sci* 4:169–190.
7. Cachiță, C.D., Ardelean, A., 2009, *Tratat de biotehnologie vegetală*, vol. II, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, p. 32 - 116.
8. 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.
9. 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.
10. Gautheret, R.J., 1934, *Culture du tissu cambial*. C.R. Acad. Sci. Paris; 198, p.2195-2196.
11. 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.