



**Universitatea Babeș-Bolyai din Cluj-Napoca**  
**Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică**



## **Rezumatul tezei de doctorat**

# **NOI TEHNICI DE BIOREMEDIERE A METALELOR GRELE DIN SOLUȚII APOASE PRIN METODE DE BIOSORBȚIE ȘI FITOEXTRACȚIE**

Conducător științific  
**Prof. Dr. Luminița Silaghi-Dumitrescu**

Doctorand  
**Nagy Boldizsár Árpád**

Cluj Napoca

2013

## Cuprins

Introducere	3
Bioremediere, Fitoremediere	4
1. Biosorbția metalelor grele	9
1.1. Date din literatură	9
1.2. Parte experimentală	15
1.2.1. Biomase utilizate în studiul de biosorbție	15
a. Rumeguș de brad - <i>Abies alba</i>	15
b. Fungii: <i>Agaricus bisporus</i> și <i>Lactarius piperatus</i>	19
c. Drojdie- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
1.2.2. Prepararea soluțiilor de metale grele	23
1.2.3. Rezultate experimentale obținute în studii de biosorbție	23
1.2.4. Caracterizarea procesului de biosorbție	25
Influența vitezei de agitare	25
Influența cantității de biomasă	26
Influența concentrației inițiale a metalului	28
Timpul de contact	33
Influența pH-ului inițial a soluției	35
Influența temperaturii	39
Efectul iradierii cu ultrasunete și microunde	41

1.2.5. Caracterizarea la echilibru a procesului de biosorbție	43
1.2.5.1. Izoterma Langmuir	44
1.2.5.2. Izoterma Freundlich	44
1.2.6. Modelarea (optimizarea) nonlineară	51
1.2.7. Termodinamica biosorbției	59
1.2.8. Cinetica adsorbției	62
1.2.8.1. Modelul cinetic de pseudo-ordin-întâi (Lagergren)	62
1.2.8.2. Modelul cinetic de pseudo-ordin-doi (Ho's model)	63
1.2.8.3. Difuzia prin pori în procesul de biosorbție	73
1.2.8.4. Difuzia prin film în procesul de biosorbție	73
1.2.9. Caracterizarea biomaselor utilizate	82
1.2.9.1. Analiza spectrală FTIR	82
1.2.9.2. Analiza SEM	92
1.2.9.3. Analiza spectrală AFM	95
1.2.10. Concluzii pentru procesul de biosorbție	98
2. Fitoextracția metalelor grele	102
2.1. Date din literatură	102
2.1.1. Plante hiperacumulatoare	103
2.1.2. Răspunsul biochimic al plantelor la efectul toxic al metalelor	104
2.2. Partea experimentală	106

2.2.1. Procesul de fitoextracție - <i>Vallisneria spiralis</i>	106
2.2.2. Rezultate experimentale obținute în studii de fitoextracție	107
2.2.2.1. Caracterizarea procesului de fitoextracție	108
2.2.3. Proteine HSP din <i>Vallisneria spiralis</i>	109
2.2.3.1. Microchip electroforeză	110
2.2.3.2. Rezultate obținute	111
2.2.4. Concluzii pentru procesul de fitoextracție	116
Concluzii generale	118
Bibliografie selectivă	119
Publicații proprii în tematica tezei	126
Mulțumiri	127

**Cuvinte cheie:** metale grele, bioremediere, biosorbție, rumeguș de brad (*Abies alba*), fungii *Agaricus bisporus* și *Lactarius piperatus*, *Saccharomyces cerevisiae*, modelare lineară și nelineară, cinetică, termodinamică, fitoremediere, fitoextracție, *Vallisneria spiralis*, proteine de stress.

## INTRODUCERE

Intensificarea activităților industriale și explozia demografică a avut ca rezultat poluarea severă a mediului înconjurător, cu consecințe dramatice asupra atmosferei, apelor și solului.

Ritmul de producere și dispersie a poluanților a depășit, în prezent, procesele naturale de biodegradare. În căutarea remediilor tehnologice a poluării mediului, procesele fizice și chimice pot fi esențiale, dar și procesele biologice oferă importante perspective.

Metalele grele sunt poluanți toxici, importanți ai apelor naturale, nedegradabili, care persistă în mediu, cu posibilitate de acumulare în organismele vii, devenind un factor de risc în sănătatea populației. (Mehmet et al., 2007).

Complexitatea problemelor poluării cu metale grele, cu dorința de recuperare a metalelor din apele reziduale a dus la dezvoltarea mai multor tehnologii convenționale (precipitare chimică, extracții cu solvenți, osmosă inversă, utilizarea unor schimbători de ioni). O alternativă de perspectivă este bioremedierea, tehnica se bazează pe utilizarea organismelor biologice în rezolvarea problemelor de mediu, de exemplu purificarea apei sau a solului (Vidali, 2001).

Prezenta teză de doctorat prezintă rezultatele obținute în studiile de *bioremediere* a unor metale grele din soluții apoase prin tehnici de biosorbție și fitoextracție.

**Biosorbția** poate fi definită ca și abilitatea unor biomateriale de a acumula metale grele din soluții apoase printr-un mecanism controlat metabolic, sau prin procese fizico-chimice. Avantajele metodelor de biosorbție față de cele convenționale sunt: costul mic, eficiența mult mai mare, posibilitatea de recuperare a biosorbantului și a metalelor grele etc. (Ahalya., et. al., 2003).

Fitoremedierea constă în utilizarea directă a plantelor verzi și a microorganismelor asociate în procesele de remediere *in situ* și constă în stabilizarea, îndepărtarea, degradarea poluanților din sol, ape de suprafață sau subterane.

**Fitoextracția** este un subproces a fitoremedierii, în care elemente periculoase și toxice din apă și sol sunt îndepărtate prin utilizarea plantelor. Prin procesul de fitoextracție, metalele grele din sol sau apă sunt preluate prin rădăcină și transportate în părțile superioare a plantelor care pot fi recoltate (Adesodun et al; 2010; Sakakibara et al., 2011).

Succesul fitoextracției în procesul de remediere depinde de abilitatea plantelor de a extrage și a transporta metalul. În scopul realizării unor procese aplicabile, este necesar un studiu detaliat a procesului, a factorilor de influență și de cunoașterea a biochimiei procesului în absorbția, transportul și acumularea metalelor grele. Noi perspective se deschid prin dezvoltarea unor procese bazate pe plante transgenice, cu capacitate de hiperacumulare a poluanților.

Studiile de biosorbție s-au efectuat în scopul obținerii unor noi tipuri de biosorbanți, cu capacitatea de adsorbție mărită și de a aduce contribuții în elucidarea mecanismului de adsorbție.

Cercetările de fitoremediere a metalelor grele din soluții apoase s-au axat pe studii de fitoextracție cu plante acvatiche. Procesul de fitoextracție s-a corelat cu răspunsul biochimic al plantelor la efectul de stres cauzat de toxicitatea metalelor grele.

## CONTRIBUȚII ORIGINALE

Lucrarea cuprinde două părți principale ce include (A) biosorbția și (B) fitoextracția metalelor grele și răspunsurile biochimice la efectul toxic.

### 1. Biosorbția

#### 1.1. Biomateriale utilizate în procesul de biosorbție

Pentru studiile de biosorbție sau urmărit noi tipuri de biomateriale ușor accesibile, ”prietenos” cu mediul, cu costuri reduse, precum: rumegușul de brad (*Abies alba*), fungile de crescătorie *Agaricus bisporus* și de pădure *Lactarius piperatus* și două tipuri de drojdii conținând aceeași tulpină, *Saccharomyces cerevisiae* (RBW-reziduri provenite după procese de fermentare și DSM 1333 tulpină pură crescută în laborator), utilizate în sistem de suspensie în mai multe forme (tratate chimic și immobilizate pe bază de biocompozit).

### **a. Biomasa din rumeguș de brad (*Abies alba*)**

Rumegușul este un produs secundar din industria lemnului, ușor accesibil în cantități foarte mari și ieftin din punct de vedere economic. În România, industria de prelucrare a lemnului este larg extinsă, în special a lemnului de brad, prin urmare cantități mari de rumeguș de brad sunt produse anual. Bradul *Abies alba* este un arbore foarte extins în zonele de pădure din Transilvania.

Rumegușul de brad a fost obținut de la o fabrică de cherestea din Huedin, Județul Cluj. Înainte de utilizare biomasa a fost spălată cu apă distilată în scopul de a elimina impuritățile și într-un final a fost uscat la o temperatură de 105°C timp de 24 h. Astfel biomasa uscată a fost măcinată și sitată la diferite granulații. Rumegușul ales pentru studiile biosorbției a fost caracterizat pentru determinarea umidității, densității și analiza elementară.

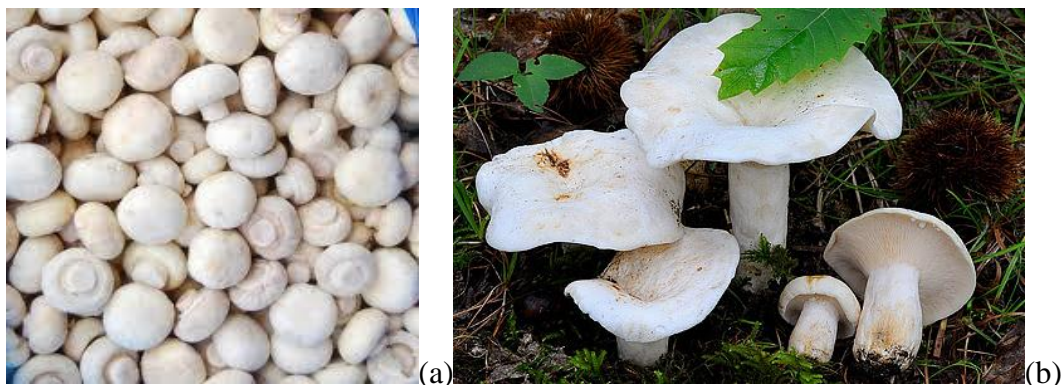


**Figura 1.** Rumegușul de brad natural *Abies alba*.

În scopul de a îmbunătăți capacitatea de biosorbție, rumegușul de brad a fost supus unor tratamente chimice (cu NaOH și H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), după care cantitatea de biomasă tratată a fost utilizată pentru îndepărtarea ionilor de Cd(II) din soluțiile apoase.

### **b. Biomasa de ciuperci: *Agaricus bisporus* și *Lactarius piperatus***

Fungiile *Agaricus bisporus* au fost achiziționate de la o fermă de crescătorie specială din comuna Nușfalău, Județul Sălaj. Un substrat special pentru cultivare a fost produs din paie de cereale modificate pe bază de azot ce au fost supuse la o fermentare aerobă (compostare), procedeu prin care carbonul și compușii de azot s-au transformat în complexe humice bogate. Acest mediu foarte selectiv este pasteurizat și inoculat cu micelii de *Agaricus bisporus*.



**Figura 2.** Fungile (a) de crescătorie *Agaricus bisporus* și (b) de pădure *Lactarius piperatus*.

Biomasa *Lactarius piperatus* a fost colectată din pădurile situate în apropierea orașului Cluj-Napoca.

Aceste tipuri de biomasa au fost utilizate ca adsorbant în sistem de suspensie în forma lor naturală și imobilizată (pe bază de biocompozit). Procedura cross-linking cu ajutorul alginatului de sodiu a fost utilizat pentru imobilizarea biomasei în vederea obținerii unui biocompozit (Zhao and Duncan, 1997).

### **c. Biomasa din drojdie de bere *Saccharomyces cerevisiae***

*S. cerevisiae* este un biosorbent foarte important și larg studiat pentru capacitățile sale în legarea ionilor de metal greu din soluții apoase. Pentru studiile de biosorbție s-au folosit două tipuri de biosorbenți conținând aceeași tulpină de drojdie *S. cerevisiae*.

Biomasa de drojdie reziduală (RBW), provine de la fabrica de bere din Ciuc (Miercure-Ciuc) după folosire în procesul de fermentație a berii. Aceste biomase au fost transportate în laborator în recipiente speciale ermetice. Probele de RBW au fost apoi spălate cu apă bidistilată separate mai apoi prin filtrare la vid și uscate în etuvă la 80°C timp de 24 h ore.

Biomasa de drojdie cu tulpină pură DSM 1333 provine de la Universitatea din Pécs, Ungaria în formă liofilizată. Compoziția stratului în care a fost crescut este de tip Muller-Hilton care conține 3% glucoză, peptonă, drojdie suplimentară, NaCl, pH=7.





**Figura 3.** Biomasa *Saccharomyces cerevisiae* (a) reziduală (RBW) și (b) crescută în laborator (DSM 1333).

Scopul studiului a fost de a investiga capacitățile de biosorbție și randamentele acestor două tipuri de biomase de drojdie în eliminarea ionilor de Cd (II) sub formă netratată (nemodificată) și după o irradie cu microunde și ultrasunete.

## 1.2. Prepararea soluțiilor de metale grele

S-au studiat posibilitățile de eliminare din soluții apoase a ionilor de Cd (II) și Zn (II). Soluțiile de stoc de 1 g/L de Cd (II) și Zn (II) au fost preparate prin dizolvarea sărurilor de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  și  $\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  în apă distilată. Concentrațiile necesare au fost obținute prin diluarea soluției stoc la concentrațiile dorite în interval de 45-365 mg/L. Soluțiile volumetriche de HCl (0.1M) și NaOH (0.1 M) au fost utilizate pentru reglarea pH-lui din soluție. Reactivii chimici utilizați au fost de puritate analitică.

## 1.3. Rezultate experimentale obținute în studiile de biosorbție

Biosorbția ionilor de Cd (II) și Zn (II) utilizând biomasele menționate în diferite forme (natural și sub formă imobilizată) au fost folosite în sisteme de suspensie. Biomasele au fost introduse într-o soluție de 100 mL de Cd (II) și Zn (II) timp de 240 minute, până la atingerea echilibrului. Pentru a stabili evoluția procesului în timp, 100  $\mu\text{L}$  de probă au fost colectate și analizate la diferite intervale de timp stabilite.

Probele colectate au fost filtrate (microfiltru ME celuloză 0.45 $\mu\text{m}$ ), iar concentrația din soluția apoasă a fost determinată cu ajutorul spectrofotometrului de absorbție atomică (SensAA Dual GBS Scientific Equipment, Australia).

Pentru a evalua cantitatea reținută a ionilor de Cd (II) și Zn (II) pe unitatea de biomasă, capacitățile de adsorbție au fost calculate cu următoarea ecuație:

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e) \cdot V}{m} \quad (1)$$

unde:  $q_e$  este cantitatea adsorbită la echilibru (mg/g),  $C_0$  este concentrația inițială de metal (mg/L),  $C_e$  este concentrația ionilor de metal la echilibru (mg/L),  $V$  este volumul soluției (L), iar  $m$  este masa de biosorbent.

Randamentele de eliminare,  $E$  (%), au fost calculate ca raport între ionii de Cd(II) și Zn (II) absorbiți la timpul  $t$  (mg/L) și concentrația inițială a ionilor de metal greu (mg/L).

$$E, (\%) = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

Datele experimentale au fost utilizate pentru stabilirea timpului necesar atingerii echilibrului și a determinării concentrațiilor de echilibru. Procesul s-a urmărit în funcție de parametrii: viteza de agitare, cantitatea de biomasă, pH-ul inițial și temperatură. De asemenea datele experimentale au fost folosite pentru stabilirea izotermelor (regresie liniară și neliniară) modelelor cinetice și pentru calcularea parametrilor termodinamici.

Toate experimentele au fost repetate de trei ori, valorile prezentate au fost calculate utilizând media valorilor de concentrație.

#### **1.4. Caracterizarea procesului de biosorbție**

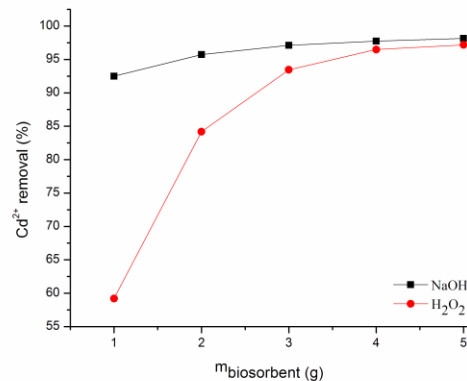
În experimentele efectuate s-a urmărit stabilirea condițiilor optime, în scopul obținerii unei capacități maxime adsorbție. Parametrii studiați au fost:

- influența cantității
- influența concentrației inițiale a ionului metalic
- influența timpului de contact

- influența pH-ului inițial din soluție
- influența temperaturii
- influența sistemului de amestecare

## Cantitatea de biomasă

Cantitatea de biomasa utilizată, are o influență importantă în procesul de biosorbție, procesul s-a urmarit in intervalul de 1-5 g biomasa la o concentrație de 50 mg/L de Cd (II) și Zn (II) mg/L. În cazul experimentelor de imobilizare (pe bază de biocompozit) s-au folosit cantități de biomasă între 0.5-2.5 g.



**Figura 4.** Influența cantității rumegușului de brad asupra reținerii ionilor de Cd (II) utilizând rumeguș tratat chimic;  $C_i = 50$  mg/L,  $d = 0.4-0.6$  mm, 296 K, pH 5.5, 700 rpm.

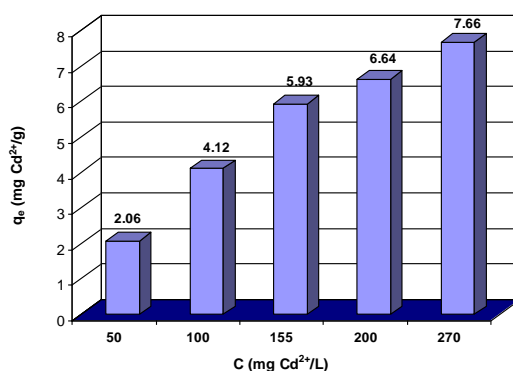
Creșterea cantității de biomasă crește eficiența de eliminare a ionilor de Cd (II) și Zn (II) datorită numărului mare a siturilor disponibile și ionilor transferabili pe suprafața biomasei (Nagy et al., 2013b).

Această tendință se poate observa pentru toate biomasele utilizate atât în forma naturală cât și imobilizată. Capacitatea de adsorbție și randamentul de îndepărtare/eliminare au fost mult mai eficiente în cazul rumegușului de brad tratat supus unor tratamente chimice. Cele mai bune rezultate s-au obținut la tratarea hidroxid de sodiu. În urma acestor studii, s-a stabilit cantitățile optime de biomasă pentru fiecare tip de adsorbant.

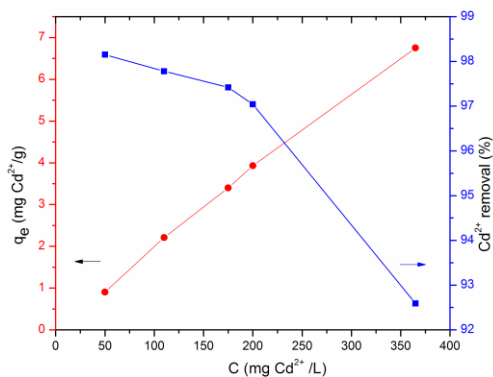
## Influența concentrației inițiale a ionilor de metal

Pentru fiecare biomasă în parte s-a studiat influența concentrației inițiale și s-au calculat randamentele de îndepărtare. Experimentele au fost efectuate cu cinci concentrații de Cd (II) și Zn (II), în intervalul de 50 - 365 mg/L, la temperatura camerei, sub agitare la o viteză de 700 rpm, cu cantități de adsorbant (5 g pentru materialul natural, respectiv 2 g pentru cel imobilizat).

Valorile maxime admise în România pentru Cd (II) și Zn (II) sunt 0.2 respectiv 0.5 mg/L. Pentru a studia procesul de bioremediere, s-au ales concentrații mai mari pentru a determina randamentul de reținere a metalelor grele și pentru a vedea, dacă procesul poate fi sau nu utilizat în reducerea acestor concentrații la valorile maxime admise de legislația în vigoare.



**Figura 5.** Influența concentrațiilor inițiale a ionilor de Cd (II) asupra capacității de adsorbție utilizând fungii *Lactarius piperatus*; C<sub>i</sub> = 50-270 mg/L, 0.6 <d < 1.2 mm, 296 K, 5.72 pH, 700 rpm.



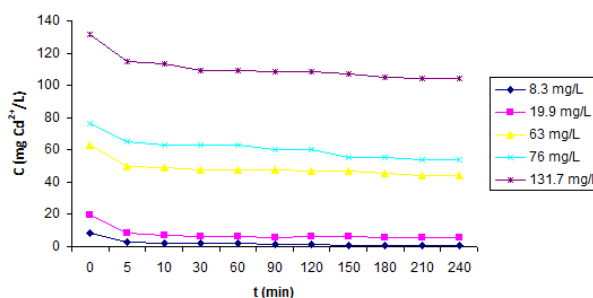
**Figura 6.** Influența concentrațiilor inițiale a ionilor de Cd (II) asupra capacității de adsorbție și a randamentului de eliminare utilizand rumegus (*Abies alba*) tratat cu NaOH ;  $C_i = 50-365$  mg/L, 5g,  $d = 0.4-0.6$  mm, 296 K, pH 5.5, 700 rpm.

Experimentele au demonstrat o creștere a capacității de adsorbție odată cu creșterea concentrației până la atingerea unui maxim, care a fost urmată de o scădere a eficienței de eliminare.

La concentrații mai mici, creșterea concentrației intensifică procesele de transfer și adsorbție. La concentrații mai mari are loc o saturație a suprafețelor active cu ionii de metal greu, care micșorează capacitatea de adsorbție.

## Timpul de contact

A fost investigată influența timpului de contact asupra evoluției procesului. Biosorbția s-a urmărit până la stabilirea echilibrului de adsorbție privind adsorbția ionilor de Cd (II) și Zn (II) pentru biomasele studiate.



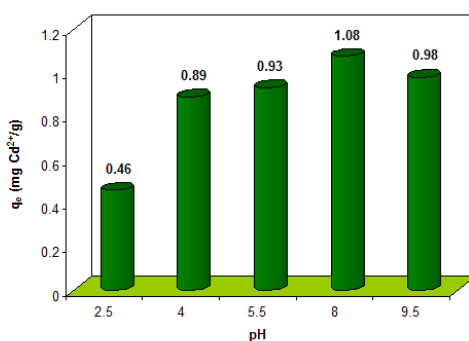
**Figure 7.** Influența timpului de contact și a concentrației inițiale a biomasei RBW în reținerea ionilor de Cd (II);  $23 \pm 2$  ° C, pH = 6.5, 150 rpm.

Din Fig. 7., se poate observa că capacitatea de adsorbție și eficiența îndepărtării crește rapid (în primele 80-100 min) datorită abundenței locurilor de legare active pe adsorbant și ocuparea treptată a acestor locuri. Prin urmare creșterea suplimentară a timpului de contact nu aduce o creștere a capacității de biosorbție, astfel încât timpul de 240 min a fost selectat pentru toate experimentele studiate.

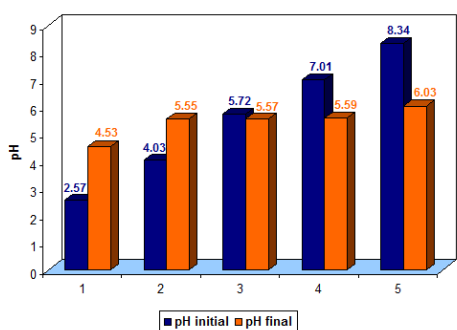
## Influența pH-ului inițial a soluției

În procesul de biosorbție, pH-ul inițial al soluției are un rol important asupra eficienței biosorbției. Concentrația ionilor de hidrogen, concurează cu ionii de metal și influențează grupurile funcționale ale biomasei. Ionii de hidrogen au un efect în complexarea metalelor, deoarece acestea au o afinitate mare privind siturile complexe și schimbarea ionilor. Experimentele s-au realizat variind pH inițial al soluției între 2-9.5 și au fost efectuate la concentrația inițială a ionilor metalici de Cd (II) și Zn (II) de 50 mg/L la temperatura camerei de 23°C, și a cantității de biomasă 5 g/100 mL și 2 g/100 mL (pentru experimentele de imobilizare).

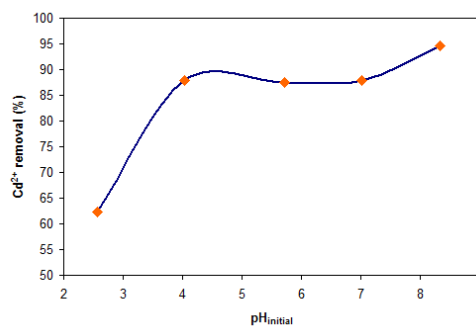
Rezultatele obținute pentru rumegușul de brad netratat (*Abies alba*) și funghiile *Lactarius piperatus* sunt reprezentate în Fig. 8 și 9.



**Figura 8.** Influența pH-ului inițial asupra capacității de adsorbție a ionului de Cd (II) pe rumegușul de brad (*Abies Alba*) la  $C_i = 60$  mg Cd (II)/ L, 5g biosorbent, 296 K, 5.5 pH.



(a)



(b)

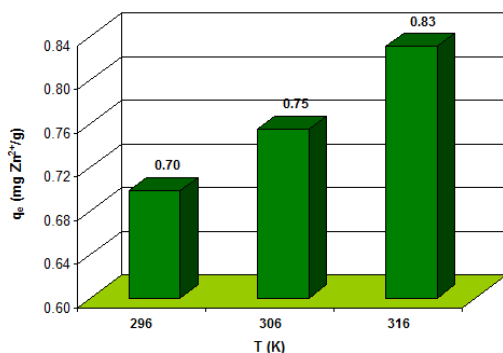
**Figura 9.** (a) Valorile de pH inițiale și finale și (b) efectul valorilor inițiale de pH asupra reținerii ionilor de Cd (II) utilizând fungile *Lactarius piperatus*;  $C_i = 50$  mg/L,  $0.6 < d < 1.2$  mm, 296 K, 700 rpm.

În studiile de pH s-au observat modificări interesante la pH inițial a soluțiilor de metale grele. Astfel, s-a constatat că indiferent de pH-ul inițial în timpul procesului de biosorbție se stabilește un pH ușor acid (după aproximativ 80 min), iar aceasta valoare este menținută până la stabilirea echilibrului. Aceste rezultate s-au explicat prin participarea concentrației de pH la stabilirea echilibrului. Odată cu creșterea pH-ului inițial suprafața de adsorbție devine mai puțin pozitivă, prin urmare atracția electrostatică dintre ioni de metal și suprafața rumegușului este în tendință de creștere. pH-ul optim stabilit experimental, care a asigurat un maxim de îndepărtare a ionilor de Cd(II) a fost 8. Rezultate asemănătoare au fost raportate în literatură utilizând rumegușul din lemn indian la un pH de 6.7 a procesului (Rahman and Islam, 2009).

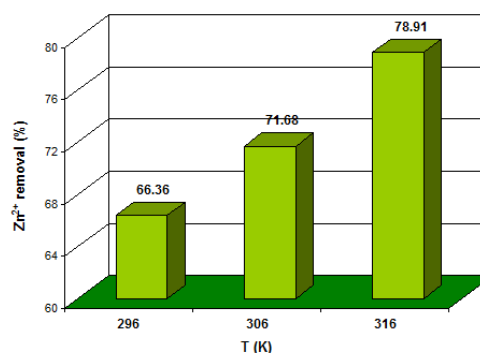
La valori mai mari de pH de (9.5), intervine precipitarea ionilor de Cd (II) ce influențează în mod negativ studiile de biosorbție.

### Influența temperaturii

Efectul temperaturii asupra biosorbției ionilor de Cd (II) și Zn (II) utilizând biomasa *L. piperatus* au fost realizate la diferite temperaturi (23°C, 33°C, 43°C) cu o concentrație inițială de metal de 50 mg /L Cd (II) și Zn (II), la pH-ul inițial al soluției (5.8 și 5.6 pH) și o cantitate de 5 g/100 mL soluție (Fig. 10).



(a)



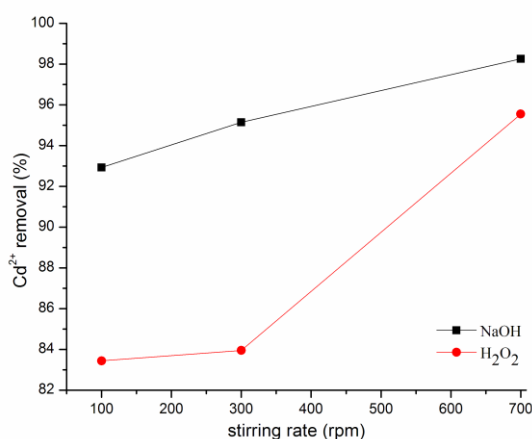
(b)

**Figura 10.** Influența temperaturii asupra (a) capacității de adsorbție și (b) eficienței de îndepărtare a ionilor de Zn (II) utilizând biomasa *Lactarius piperatus*,  $C_i = 50 \text{ mg / l}$ ,  $0,6 < d < 1,2 \text{ mm}$ ,  $5,49 \text{ pH}$ ,  $700 \text{ rpm}$ .

În cazul studiilor de temperatură, procesul de biosorbție nu s-a studiat peste  $50^\circ\text{C}$ , deoarece studiilor preliminare au arătat că la o temperatură mai mare de  $50^\circ\text{C}$  intervine procesul de desorbție. În concluzie, temperatura camerei pentru procesele de biosorbție, sunt cele mai avantajoase.

### Influența sistemului de amestecare

Sistemul de amestecare, vitezei de agitare este un parametru important, deoarece afectează capacitatea de adsorbție și influențează eficiența îndepărtării metalului. Experimentele au fost efectuate la un maximum de  $700 \text{ rpm}$ . În Fig. 7 este reprezentată influența vitezei de agitare în îndepărtarea ionilor de Cd (II) pe rumegușul de brad tratat (*Abies alba*) folosind ca biosorbent rumegușul de brad tratat cu NaOH și  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La o agitare de  $700 \text{ rpm}$  se poate obține un randament de eliminare de  $98,26$  respectiv  $95,55\%$ .



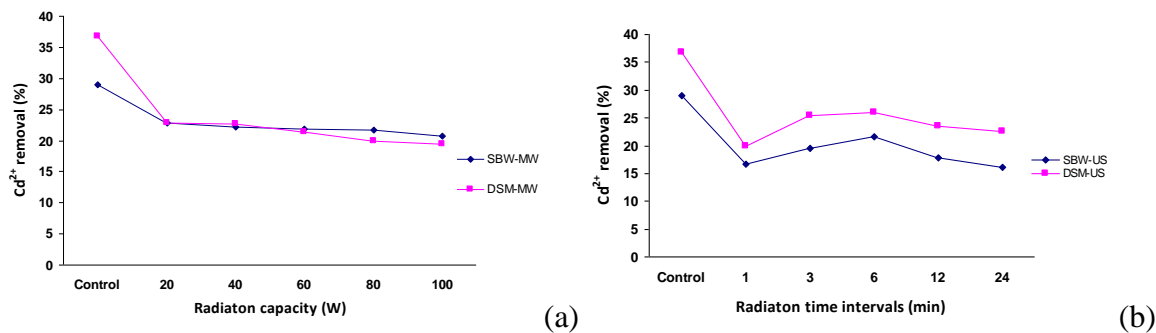
**Figura 11.** Influența vitezei de agitare asupra îndepărtării ionului de Cd (II) pe rumegușul de brad tratat (*Abies alba*) folosind o concentrație de  $C_i = 50 \text{ mg/L}$ , biomasă de  $5 \text{ g}$ ,  $d = 0.4-0.6 \text{ mm}$ ,  $296 \text{ K}$  și pH-ul de  $5.5$ .

Viteza mare de agitare asigură disponibilitatea tuturor situsurilor de pe suprafața biomasei în timp ce vitezele mici implică dispersia inefficientă a particulelor de biomasă.



## Efectul iradierii cu ultrasunete și microunde

În scopul de a urmări eficiența de biosorbție a celor două tipuri de drojdii menționate acestea au fost supuse la radiații cu ultrasunete și microunde. Capacitatea de reținere a ionilor de Cd (II) scade odată cu creșterea timpului de contact în comparație cu proba martor.



**Figura 12.** Influența efectului de iradiere cu microunde (a) și ultrasunetelor (b) asupra randamentului de eliminare a ionilor de Cd(II) utilizând biomasa RBW și DSM;  $C_i = 8-132$  mg/L  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 6.5$ , 150 rpm.

Prin creșterea timpului de iradiere cu ultrasunete (12-24 min), s-a observat o scădere majoră în reținerea a ionului de cadmiu. Acest fapt poate fi explicat prin procesele de cavitație care afectează în mod direct peretele celular a drojdiei.

Prin iradiere cu microunde și ultrasunete a biomaselor de drojdii RBW și DSM în suspensie s-a observat o scădere a capacității de adsorbție și a randamentelor de eliminare. Aceste modificări s-au explicat prin schimbările produse pe suprafața drojdiilor, cu efect negativ asupra centrelor de legare a metalelor grele Fig. 12.

### 1.5. Modelarea la echilibru a procesului de biosorbție

În cercetările efectuate, pentru caracterizarea echilibrelor de adsorbție s-au utilizat două izoterme, Langmuir și Freundlich (coeficientului de corelație,  $R^2$ ) pentru a descrie procesul de biosorbție a Cd (II) și Zn (II) pe rumegușul netratat și tratat chimic. Coeficienții celor două izoterme oferă oportunitatea de a compara capacitățile de adsorbție a biomaselor folosite.

Izoterma Langmuir este frecvent utilizată pentru a descrie procesul de adsorbție a metalelor, coloranților etc. (Garg et al., 2007; Yang and Al-Duri, 2005) și pornește de la ipoteza că adsorbția are loc în strat monomolecular, pe centre specifice de adsorbție (Langmuir, 1918).

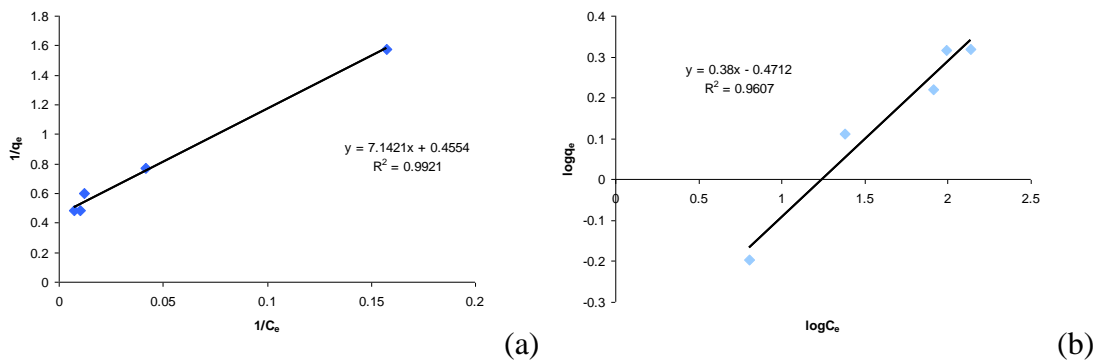
Izoterma Freundlich este un model empiric și se bazează pe ipoteza că suprafața adsorbantului este eterogenă (Freundlich, 1918).

**Tabelul 1.** Coeficienții Langmuir și Freundlich pentru Cd (II) adsorbit pe rumegușul (*Abies alba*) netratat și tratat chimic.

	Coeficienții Langmuir			Coeficienții Freundlich		
	$K_L$ (L/mg)	$q_{max}$ (mg/g)	$R^2$	$n$	$K_f$ ( $mg^{(1-1/n)}L^{1/n}/g$ )	$R^2$
<b>netratat</b>	3.25	2.20	0.9921	2.6315	0.31	0.9607
<b>NaOH</b>	0.096	8.84	0.9999	1.73	1.21	0.9443
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	0.35	2.67	0.9971	4.15	1.01	0.9218

Capacitatea maximă de adsorbție a ionilor de Cd (II) pe rumegușul netratat a fost de 2.20 mg/g. Pe rumegușul tratat chimic s-au obținut capacități de adsorbție mai mari 8.84 mg/g pe rumegușul tratat cu NaOH și 2.67 mg/g pe cel tratat cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Coeficienții Langmuir și Freundlich, calculați folosind regresia liniară (pentru rumegușul netratat și tratat), sunt prezentați în Tabelul 1.

În Fig. 13 se pot observa formele liniarizate a celor două izoterme pentru Cd (II) adsorbit pe rumeguș netratat.



**Figura 13.** Izotermele Langmuir and Freundlich pentru echilibrile de adsorbție a ionilor de Cd (II) utilizând ca și adsorbant pe rumegușul de brad (*Abies Alba*).

Din liniaritatea celor două reprezentări grafice s-au calculat coeficienții izotermelor (Tabelul 1), se poate observa că reprezentarea grafică a izotermei Langmuir este mai apropiată de liniaritate (valori ridicate a  $R^2$ ), atât în cazul biosorbției ionilor pe rumegușul netratat cât și pe cel tratat. Acesta se poate datora a distribuției omogene a siturilor active a celor două biomase.

### 1.6. Modelarea neliniară la echilibru a procesului de biosorbție

Folosind izoterme cu două sau mai mulți parametrii, se pot calcula capacitățile de adsorbție la echilibru,  $q_e$ , determinate experimental, în funcție de concentrație,  $C_e$ . Scopul este identificarea parametrilor modelului, care dau diferențele minime între valorile  $q_e$  măsurate și calculate. Modul tradițional de a realiza estimarea parametrilor este liniarizarea și regresia liniară a izotermelor sau tehnici de regresie neliniară.

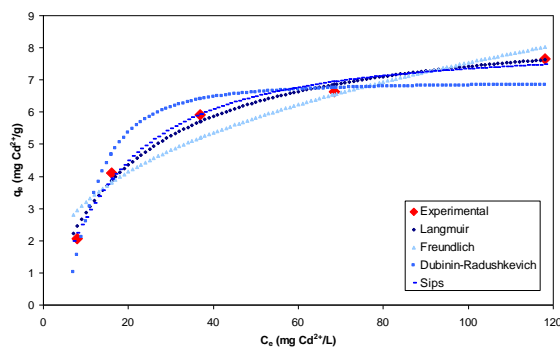
Regeresia neliniară poate fi obținută în diferite moduri. În acest caz a fost necesară o optimizare folosind algoritmul CMA-ES (Covariance Matrix Adaptation Evolution Strategy) (Hansen et al., 2003).

Rezultatele obținute pentru biosorbția ionilor de Cd (II) pe *Lactarius piperatus*, în cazul aplicării regresiei neliniare sunt prezentate în Tabelul 2 (coeficienții izotermelor, deviația standard și abaterea medie pătratică).

**Tabelul 2.** Izotermele de adsorbție și coeficienții calculați folosind regresia neliniară pentru biosorbția Cd (II) pe *Lactarius piperatus*.

Izoterma	Coeficienții calculați			S <sub>D</sub>	R <sup>2</sup>
Langmuir	q <sub>max</sub> = 9.0066	K <sub>L</sub> = 0.0468	-	0.2471	0.9845
Freundlich	K <sub>F</sub> = 1.357	n = 2.6848	-	0.5491	0.9232
Dubinin-Radushkevich	q <sub>s</sub> = 6.9031	k <sub>ad</sub> = 1.807×10 <sup>-5</sup>	-	0.5458	0.9241
Tempkin	b <sub>T</sub> = 1206.18	A <sub>T</sub> = 0.4161	-	0.2909	0.9785
Hill	q <sub>sH</sub> = 7.9316	n <sub>H</sub> = 4.5484	K <sub>D</sub> = 6.4492	0.1987	0.9900
Redlich-Peterson	K <sub>R</sub> = 0.3761	a <sub>R</sub> = 0.0282	g = 1.0812	0.2333	0.9862
<b>Sips</b>	<b>K<sub>s</sub> = 0.2087</b>	<b>β = 1.2949</b>	<b>a<sub>s</sub> = 0.0259</b>	<b>0.1955</b>	<b>0.9903</b>
Toth	K <sub>T</sub> = 15.397	a <sub>T</sub> = 27.804	t = 0.9086	0.2389	0.9855
Khan	q <sub>s</sub> = 11.0202	b <sub>K</sub> = 0.0360	a <sub>K</sub> = 1.1006	0.2389	0.9855
Radke-Prausnitz	a <sub>RP</sub> = 0.4215	r <sub>R</sub> = 9.007	β <sub>r</sub> = 0	0.2471	0.9862

În urma comparării valorilor deviației standard pentru fiecare izotermă s-a dedus următoare serie: Sips (cea mai bună fitare) > Hill > Redlich-Peterson > Toth = Khan > Langmuir = Radke-Prausnitz > Tempkin > Dubinin-Radushkevich > Freundlich (Fig. 14).



**Figura 14.** Formele neliniarizate a izotermelor Langmuir, Freundlich, Dubinin-Radushkevich și obținute pentru biosorbția ionilor de Cd (II) pe fungile *Lactarius piperatus*;  $C_i = 50-270$  mg/L,  $0.6 < d < 1.2$  mm, 296 K, 5.72 pH, 700 rpm.

Mai mult decât atât, comparând abaterea medie pătratică pentru fiecare izotermă luată în considerare, s-a dedus o serie similară cu cea prezentată mai sus: Sips (cea mai bună fitare) > Hill > Redlich-Peterson = Radke-Prausnitz > Toth = Khan > Langmuir > Tempkin > Dubinin-Radushkevich > Freundlich.

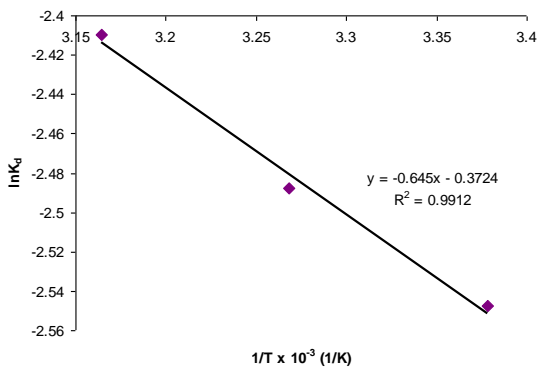
### 1.7. Determinarea parametrilor termodinamici

Pentru a descrie comportamentul termodinamic al sistemului, au fost calculați parametrii termodinamici. Coeficienții termodinamici calculați pentru rumegușul netratat și tratat (*Abies alba*) și fungile *Agaricus bisporus* sunt prezentați în Tabelul 3.

**Tabelul 3.** Coeficienții termodinamici pentru biosorbția ionilor de Cd (II) pe rumeguș (*Abies Alba*) la diferite temperaturi.

Tipul de biomasă	$\Delta S^\circ$ (kJ/K·mol)	$\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	$\Delta G^\circ$ , (kJ/mol)		
			296 K	306 K	316 K
Untreated	$-3.10 \times 10^{-3}$	5.36	6.28	6.31	6.34
NaOH	$-3.4 \times 10^{-3}$	-10.21	-0.146	0.194	0.534
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$6.4 \times 10^{-3}$	19.87	0.926	0.286	-0.354

Valorile pozitive ale entalpiei (5.36 kJ/mol) indică un proces endotermic de biosorbție (Fig. 15), temperaturile ridicate favorizând procesul de adsorbție.



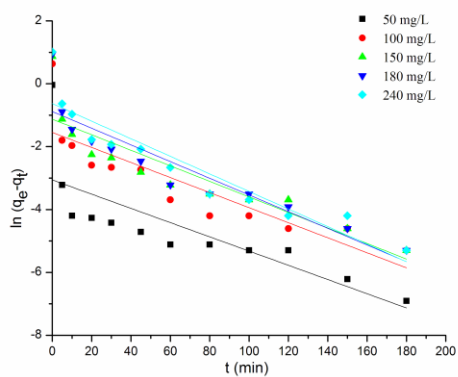
**Figura 15.** Reprezentarea grafică a  $\ln K_d$  în funcție de  $1/T$  în vederea estimării coeficienților termodinamici pentru biosorbția ionilor de Cd (II) pe rumeguș (*Abies Alba*).

### 1.8. Modelarea cinetică a procesului de biosorbție

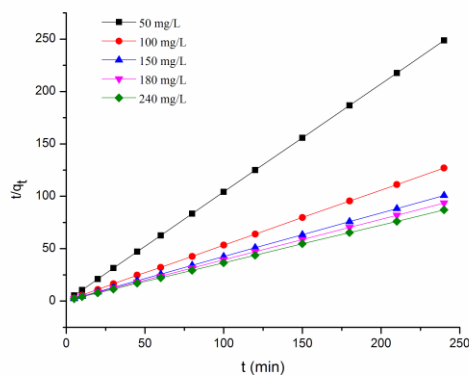
Pentru optimizarea procesului s-au luat în considerare modelele pseudo-ordin 1, pseudo-ordin 2, difuzia internă și externă. Regresia liniară a fost folosită pentru a determina modelul ce descrie cel mai bine procesul prin intermediul coeficienților de corelație.

Valorile obținute pentru modelul pseudo-ordin 1 a capacității de adsorbție calculate ( $q_e$ ) sunt mult mai mari în comparație cu cele experimentale ( $q_{exp}$ ) și valorile  $R^2$  (abaterea medie pătratică) sugerează că acest model nu descrie procesul de adsorbție pentru biomasele studiate.

Reprezentarea grafică a modelului pseudo-ordin 2 pentru biosorbția Cd (II) pe rumegușul tratat este prezentată în Tabelul 4 și Fig. 16.



(a)



(b)

**Figura 16.** Reprezentare grafică a modelului pseudo-ordin 1 (a) și pseudo-ordin 2 (b) pentru biosorbția ionilor de Cd (II) pe rumeguș (*Abies alba*) tratat cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; C<sub>i</sub> = 50-240 mg/L, 5 g, d = 0.4-0.6 mm, 296 K, pH 5.5, 700 rpm.

**Tabelul 4.** Constantele de viteză pseudo-ordin 1 și pseudo-ordin 2, valorile  $q_e$  calculate și experimentale pentru biosorbția ionilor de Cd (II) pe rumeguș tratat (*Abies alba*) la diferite concentrații.

C (mg/L)	$q_e$ (exp) (mg/g)	Pseudo - ordin 1			Pseudo - ordin 2		
		$k_1$ (1/min)	$q_e$ (calc) (mg/g)	$R^2$	$k_2$ (g/mg·min)	$q_e$ (calc) (mg/g)	$R^2$
<b>NaOH</b>							
50	0.903	$1.95 \times 10^{-2}$	0.03	0.5011	$358.25 \times 10^{-2}$	0.903	1
100	2.21	$1.5 \times 10^{-2}$	0.19	0.5353	$38.88 \times 10^{-2}$	2.21	0.9999
175	3.40	$2.33 \times 10^{-2}$	0.15	0.6205	$88.35 \times 10^{-2}$	3.40	1
200	3.93	$2.26 \times 10^{-2}$	0.20	0.6437	$58.37 \times 10^{-2}$	3.93	1
365	6.75	$2.97 \times 10^{-2}$	0.60	0.8048	$24.03 \times 10^{-2}$	6.77	1
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>							
50	0.965	$2.26 \times 10^{-2}$	0.05	0.6211	$256.19 \times 10^{-2}$	0.966	1
100	1.89	$2.39 \times 10^{-2}$	0.21	0.7623	$50.22 \times 10^{-2}$	1.90	0.9999
150	2.38	$2.47 \times 10^{-2}$	0.32	0.8046	$34.35 \times 10^{-2}$	2.39	1
200	2.57	$2.65 \times 10^{-2}$	0.41	0.8486	$27.31 \times 10^{-2}$	2.58	0.9999
250	2.76	$2.79 \times 10^{-2}$	0.53	0.8727	$20.89 \times 10^{-2}$	2.78	1

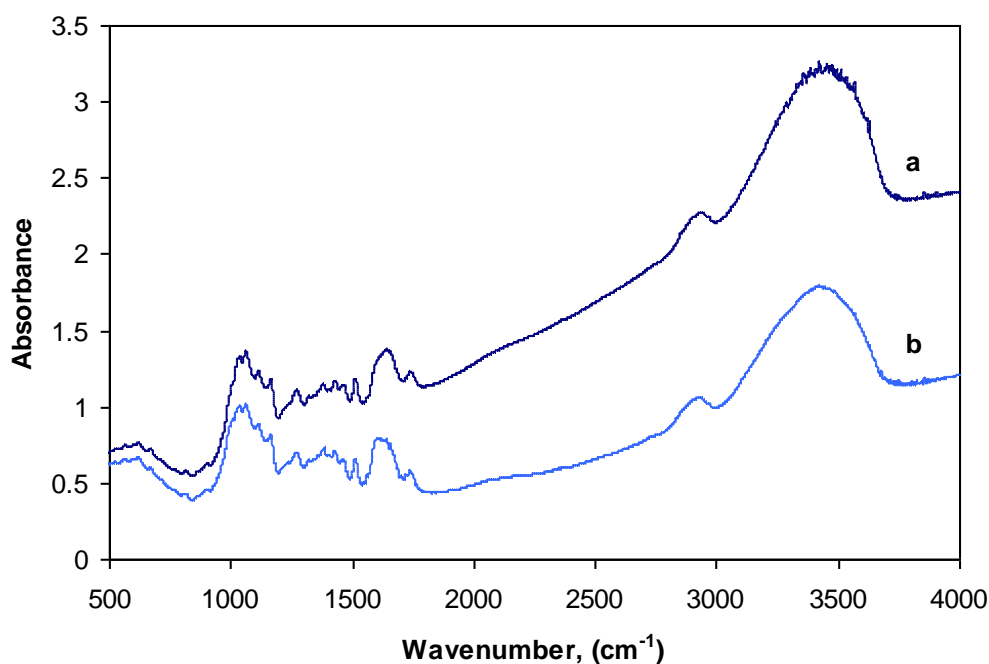


În cazul modelului pseudo-ordin 2 valorilor  $R^2$  (0.995 - 1) obținute sunt mult mai apropiate de unu decât cele în cazul modelului cinetic pseudo-ordin 1 (0.5011-0.8727). Valorile  $q_e$  (cal) sunt aproape similare cu valorile  $q_e$  (exp), prin urmare propunem pentru sistemul considerat modelul cinetic pseudo-ordin 2.

Aceste studii de cinetică s-au extins pentru toate tipurile de biosorbanți și s-a constatat ca modelul cinetic pseudo-ordin 2 descrie cel mai bine procesul de adsorbție în toate cazurile.

### 1.9. Caracterizarea biomaselor prin metode spectrale

Analiza spectrală prin infraroșu permite identificarea grupurilor funcționale organice din biomasa și face posibil identificarea celor implicate în procesele de biosorbție. Pentru a determina grupările funcționale implicate în procesul de biosorbție a ionilor de Cd (II) pe biomasa de rumeguș, s-au analizat comparativ spectrele FTIR înainte și după procesul de biosorbție (Fig. 17).



**Figura 17.** Analiza spectrală FTIR a rumegușului de brad (*Abies alba*) (a) înainte și (b) după biosorbția ionilor de Cd (II).

S-au analizat spectrele obținute și s-au identificat benzile de vibrație a grupărilor implicate în procesul de biosorbție. O schimbare majoră s-a observat la benzile

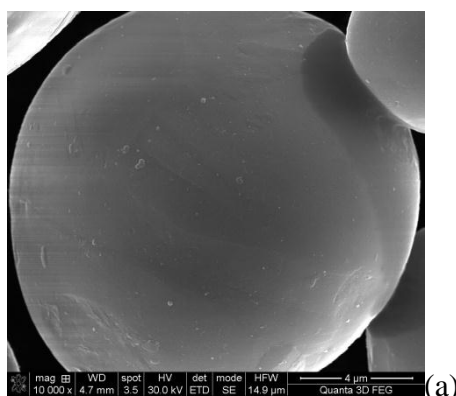
corespunzătoare vibrațiilor de valență O-H a grupării hidroxil din celuloză și lignină, înregistrată la valorile  $3421\text{ cm}^{-1}$  (netratat) respectiv  $3416\text{ cm}^{-1}$  (după contaminare cu ioni de Cd). O altă schimbare s-a putut observa la valorile  $2937\text{ cm}^{-1}$  (vibrația de valență C-H) care este deplasată la valoarea de  $2924\text{ cm}^{-1}$  indicând un proces de schimb de protoni în timpul adsorbției.

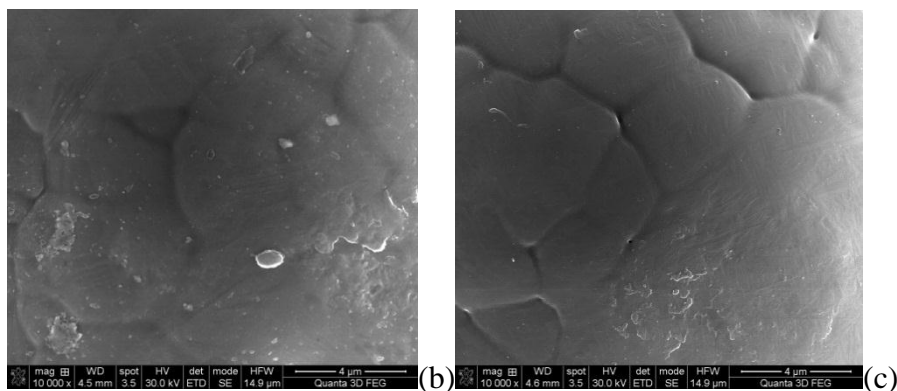
Au fost identificate schimbări intense la benzile  $1635\text{ cm}^{-1}$  (netratat) și  $1604\text{ cm}^{-1}$  (după contaminare cu ioni de Cd (II)) ce au fost atribuite vibrațiilor de valență N-H din grupările amide. În regiunea  $1500\text{ cm}^{-1}$ , a fost observată o deplasare a valorilor de la  $1512\text{ cm}^{-1}$  și  $1508\text{ cm}^{-1}$ , banda atribuită grupărilor nitro.

Studiile FTIR au arătat că mai multe grupări funcționale prezente în rumegușul de brad joacă un rol important în reținerea ionilor de Cd (II).

### Microscopia electronică

Microscopia electronică a fost utilizată pentru caracterizarea microstructurilor de suprafață, porozitatea și proprietățile fundamentale fizice a adsorbantilor studiați. S-a caracterizat morfologia suprafețelor de rumeguș de brad și a fungiiilor *Agaricus bisporus* și *Lactarius piperatus* netratate și după contaminare cu ioni de Cd (II) și Zn (II) Analizele SEM s-au realizat cu ajutorul unui microscop de scanare electronică JEOL JSM 5510 LV (Jeol, Japonia).

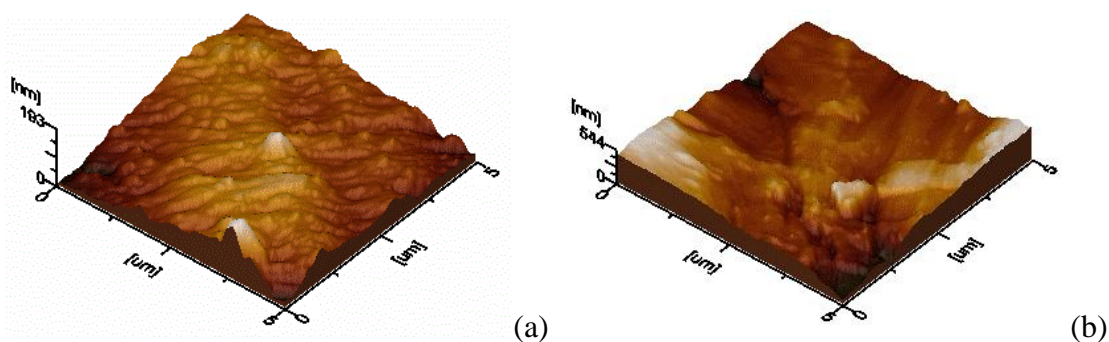




**Figura 18.** Imaginistica SEM a biomasei *Agaricus bisporus* (a) netrată (neîncărcată), (b) încărcată cu ionii de Cd (II) și Zn (II).

În cazul studiilor de AFM s-au analizat pe lângă schimbările apărute în suprafața biosorbantului datorate contaminării cu metale grele și efectul produs de tratamentele chimice aplicate (hidroxid și peroxid). Tehnicile AFM prezintă sensibilitate ridicată la variațiile mici în înălțime pe suprafața filmului.

Topografia de suprafață tridimensională obținut la rumegușul netratat și tratat cu NaOH este prezentat în figura 19.



**Figura 19.** Imaginistica AFM a rumegușului de brad (a) netratat și (b) și după tratarea cu NaOH, obținut prin răspândirea pulbelelor uscate pe o bandă adezivă de plastic, topografie 3D, zona scanată: 5 μm x 5 μm

Urmărind imaginistica rumegușului de brad netratat (a) putem observa că nanoparticulele de rumeguș sunt agregate în particule foarte mari și domenii lamelare foarte mici similare cu cea a fibrelor sau fibrelor.

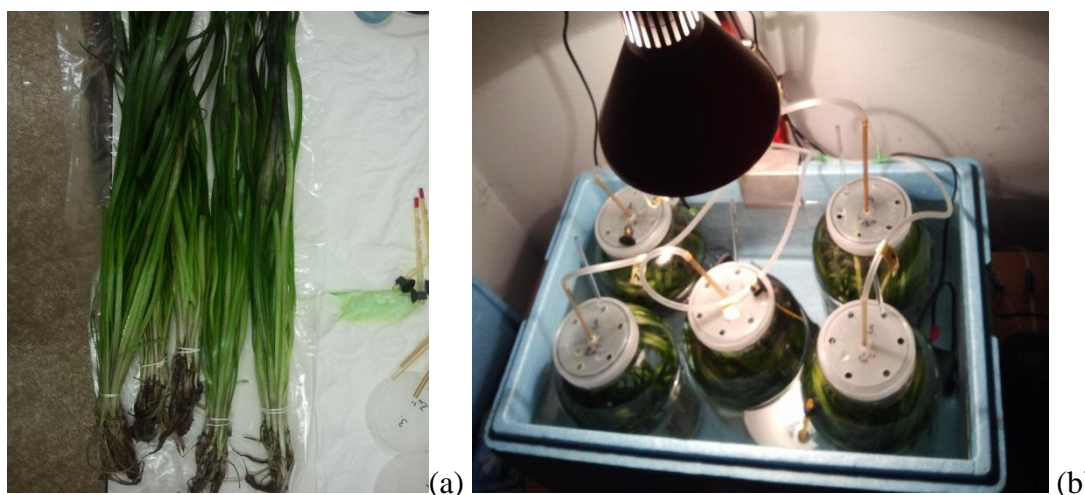
Pe de altă parte, după tratarea cu NaOH (b) se poate observa o modificare importantă pe suprafața rumegușului în reducerea dimensiunii agregatelor și printr-o creștere în

rugozitate. Această creștere indică rolul rugozității în îmbunătățirea capacității de adsorbție a rumegușului tratat cu NaOH la reținerea ionilor de Cd (II).

## 2. Fitoextracția

Cercetările de fitoextracție s-au axat pe studiul capacității de acumulare a metalelor grele utilizând planta acvatică *Vallisneria spiralis* și răspunsurile biochimice la efectul toxic al acestora.

*Vallisneria spiralis* este o plantă acvatică scufundătoare de apă dulce, cunoscută și sub numele de iarba de bandă (Tape grass) și iarba rezervelor de anghilă care face parte din familia *Hydrocharitaceae*. Planta este alcătuită din frunze înguste, liniare, care variază de la culoare palid-verde la roșu având o lungime între 30-60 cm și largi aproximativ de 0.75 inci (Roe and Colin, 1967).



**Figura 20.** (a) planta acvatică *Vallisneria spiralis* (b) plantele expuse contaminării cu metale grele.

### 2.2. Rezultate experimentale obținute în studii de fitoextracție

Experimentele au fost efectuate utilizând plantă acvatică comercială și s-a utilizat o soluție nutritivă modificată Hoegland. Soluția nutritivă utilizată a avut următoarea compoziție: următoarele concentrații: 1mM KNO<sub>3</sub>; 1 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 1mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1mM MgSO<sub>4</sub>; 25 mM KCl; 12.5 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 1mM MnSO<sub>4</sub>; 1 mM ZnSO<sub>4</sub>; 0.25 mM CuSO<sub>4</sub>; 0.25 mM H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (85 % MoO<sub>3</sub>) cu citrate de Fe (III) ca sursă de fier (Taiz and Zeiger, 2002).

Experiențele preliminare au demonstrat., că este necesar o aclimatizare de 4 zile, înaintea contaminării. Contaminarea cu metale grele s-a efectuat cu o soluție conținând: 157

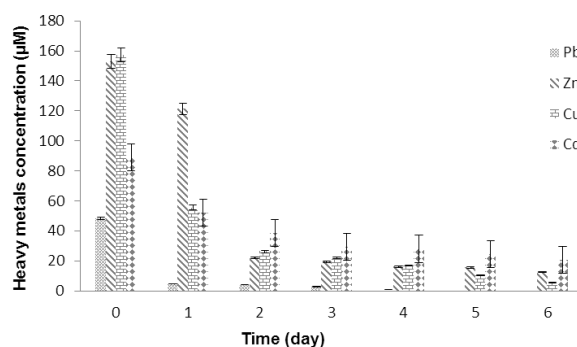
$\mu\text{m Cu}^{2+}$  (10 mg/L),  $48 \mu\text{m Pb}^{2+}$  (10 mg/L),  $89 \mu\text{m Cd}^{2+}$  (10 mg/L) și  $152 \mu\text{m Zn}^{2+}$  (10 mg/L). Experimentele s-au efectuat comparativ, planta de control au fost păstrată într-o soluție Hoegland fără metale grele. Experimentele au fost urmărite timp de 6 zile.

Concentrațiile de metale grele s-a urmărit prin colectarea probelor de 1-2 mL și s-a analizat cu ajutorul spectroscopiei de adsorbție atomică (Perkin-Elmer 2380 AAS). De asemenea pe parcursul experimentelor au fost colectate 1-2 probe din frunză la intervale de timp (24 h). Frunzele au fost clătite cu apă distilată, înghețate în azot lichid și depozitate la o temperatură de  $-20^{\circ}\text{C}$ . După 6 zile de expunere, s-au observat schimbări vizibile în structura plantei prin fragmentarea frunzelor și simptome necrotice.

S-au utilizat reactivi de puritate analitica. Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### 2.3. Capacitatea de acumulare a metalelor grele prin fitoextracție

Studiile de contaminarea cu metale grele (Cu, Pb, Cd și Zn), ca factori de stres s-au efectuat cu planta acvatică *Vallisneria spiralis*, experimentele de fitoextracție au fost efectuate la o temperatură constantă de  $26^{\circ}\text{C}$  pe o perioada de 6 zile. S-a urmărit procesul de fitoextracție în condiții de expunere în sistem monometal. Modificarea concentrației din soluția apoasă pe timpul expunerii plantei este prezentată în Fig. 21.



**Figura. 21.** Variațiile concentrațiilor de metal greu a soluției în funcție de perioada expunerii (în total 6 zile) *Vallisneria spiralis*, pH 6.5, T=  $26^{\circ}\text{C}$ , timp de 6 zile. S-au reprezentat valorile medii determinate (n=3).

Accumularea cea mai semnificativă a avut loc în cazul Cu (II), în acest caz după prima zi, concentrația a scăzut de la 157 la  $55.4 \mu\text{M}$  ce reprezintă o acumulare de 70%. În

următoarele 5 zile o scădere treptată a fost observată, concentrația ionilor de Cu (II) neajungând la echilibru.

Accumularea ionilor de Pb a arătat o tendință similară precum acumularea ionilor de Cu, după prima zi de expunere concentrația a scăzut de la 48 la 4.6  $\mu\text{M}$ . În următoarele zile de expunere acest metal nu a s-a regăsit în soluția apoasă fiind absorbit în totalitate de plantă.

Concentrația a ionilor de Cd (II) a scăzut semnificativ în primele două zile, s-a constatat o scădere de 50%. În perioada următoare de șase zile s-a ajuns la un echilibru (s-a ajuns la o valoare constantă a concentrației.).

Concentrația de zinc din soluția apoasă a scăzut ușor încă din prima zi după expunere, urmând cu o scădere semnificativă în a doua zi. Nu s-au observat modificări semnificative în concentrație în ultimele 4 zile de experiment ceea ce arată stabilirea unui echilibru.

Schimbări clorotice au fost vizibile începând din cea a doua zi de experiment, acesta au fost urmate de o îngălbenire a frunzelor în cazul metalelor (Cd (II) și Zn (II)), și fragmentarea frunzelor în cazul contaminării cu Pb (II) iar într-un final a apărut necroza pentru metalele Cu (II) și Pb (II). În cazul experimentelor de referință nu s-au sesizat aceste schimbări.

Rezultatele sunt în concordanță cu alte observații aflate în literatura de specialitate, privind acumularea metalelor grele de alte plante acvatice. unde, plantele acvatice utilizate au dovedit de a avea capacități mari în acumularea metalelor grele (Schiewer and Voleskey, 2000; El-Khatib et al., 2011, Singh et al., 2010).

## **2.4. Rezultatele analizei proteomice**

În scopul determinării schimbărilor apărute în urma efectului toxic în timpul fitoextractiei metalelor grele s-au analizat schimbările apărute în analiza profilului proteic. Analizele s-au efectuat prin electroforeză pe microchip, după elaborarea unui procedeu de extracție, care a permis punerea în evidență a schimbărilor proteice. S-au observat apariții/dispariții și modificări cantitative în profilul proteomic, aceste schimbări s-au corelat cu rezultatele privind acumularea metalelor grele și au fost urmărite în timp. Compararea electroferogramelor obținute, a permis analiza schimbărilor apărute și în funcție de metal contaminat. În urma expunerii plantelor la contaminare, au apărut următoarele proteine noi: în cazul Cu (II) proteinele cu masele moleculare de 11.2; 30.8; 60; 85; 127 kDa, pentru Pb (II) 30.8; 60; 95.5 kDa și proteina 30.8 kDa în cazul Cd (II). Grupurile proteinice având masă moleculară de 9.5, 12.4, 15, 25, 37 și 47 kDa s-au detectat atât în planta martor, cât și din cea

supusă contaminării. Apariția și dispariția acestor proteine pentru fiecare zi al expunerii sunt prezentate în Tabelul 5.

Efectul metalelor grele asupra profilurilor proteomice a dus la apariția unor proteine noi, a cărei mase moleculare sunt de 11.2 kDa, 30.8 kDa, 60 kDa, 85 kDa, 95.5 kDa, și 127 kDa, în timp ce aceste proteine nu au fost detectabile în plantele de control.

În urma expunerii plantelor la diferite metale grele, au apărut următoarele proteine noi: în cazul Cu (II) proteinele cu masele moleculare de 11.2; 30.8; 60; 85; 127 kDa, Pb (II) 30.8; 60; 95.5 kDa și proteina 30.8 kDa în cazul Cd (II).

Pe de altă parte, a fost observată dispariția proteinelor având masă moleculară de 13.4 kDa și 55.5 kDa în cazul Cu (II) și proteinei de 18.6 kDa în cazul tratamentului cu Pb. Aceste proteine nu au fost detectate după cea de-a treia și a patra zi a expunerii. Cd (II) nu a provocat schimbări de acest tip.

Ionii de Zn (II) au provocat numai schimbări cantitative în profilul proteomic în urma expunerii plantei pe întreaga durată a experimentului.

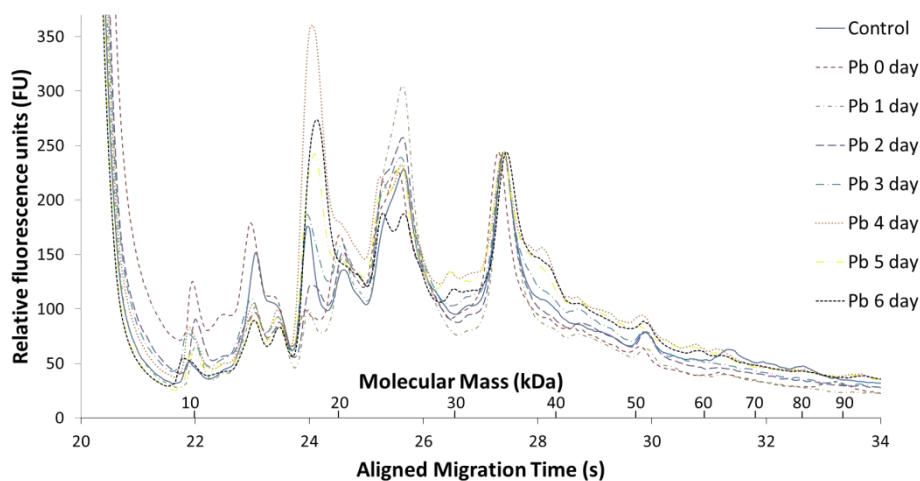
**Tabelul 5.** Profilul proteinelor din plantele control și celor individuale expuse la diferite metale grele din planta acvatică *Vallisneria spiralis*.

	9.5 kDa	11.2 kDa	12.4 kDa	13.4 kDa	15 kDa	18.6 kDa	25 kDa	30.8 kDa	37 kDa	47 kDa	55.5 kDa	60 kDa	67 kDa	85 kDa	95.5 kDa	127 kDa
Cu	+	↑ <sup>2,3</sup>	+	↓ <sup>1-3</sup>	+	+	+	↑ <sup>2,3</sup>	+	+	↓ <sup>1-3</sup>	↑ <sup>2,3</sup>	-	↑ <sup>2,3</sup>	-	↑ <sup>2,3</sup>
Pb	+	-	+	+	+	↓ <sup>1-3</sup>	+	↑ <sup>2-4</sup>	+	+	+	↑ <sup>2-4</sup>	+	-	↑ <sup>2-4</sup>	-
Cd	+	-	+	+	+	+	+	↑ <sup>3,4</sup>	+	+	+	-	↑ <sup>3,4</sup>	↑ <sup>3,4</sup>	-	-
Zn	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Control	+	!	+	+	+	+	+	!	+	+	+	!	+	!	!	!

Simboluri: + prezente în control plantele și cele tratate cu metale grele; ! Nu sunt prezente în plantele control; - nu sunt valori, ↓<sup>1-3</sup>dispar după 1-3 zi de expunere; ↑<sup>2,4</sup> apar în urma expunerii



S-au observat modificări calitative și cantitative în profilul proteinic, pentru fiecare metal, în sistem de fitoextracție monometalic. S-au observat nu numai modificări calitative (dispariția sau apariția a unor proteine), dar și cantitative la grupările de proteine având masa moleculară de 9.5, 12.4, 15, 25, 37 și 47, care au fost prezente atât în plantele expuse dar și în cele de control pe durata experimentelor. Modificările cantitative au fost urmărite pentru fiecare metal în parte, dar cele mai importante schimbări au apărut din urma contaminării cu Pb. Modificările electroferogramelor in cazul ionilor Pb, în funcție de zilele de expunere sunt prezentate în Fig. 22.



**Figura 22.** Electroferogramele normalizate pentru expunerea cu ionii de Pb, în funcție de timpul de expunere. Condiții de fitoextracție: *Vallisneria spiralis*, concentrație inițială de Pb de 48  $\mu\text{M}$ . Condițiile experimentale a electroforezei HSP 250 proteine Chip; SLB tampon (Tris-HCl pH 8,5), de detecție fluorescentă cu 630 excitație nm și lungimea de undă de emisie 650, injecție, 80 s la 1000 V; substanțele migrează spre anod.

Modificările cantitative a proteinelor cu masa moleculară 15 kDa, 18.6 kDa, 25 kDa și 37 kDa au fost observate pe toată durata celor 6 zile de tratament.

### 3. Concluzii generale

Prezenta teză de doctorat prezintă rezultatele obținute în studiile de *bioremediere* a unor metale grele din soluții apoase prin tehnici de biosorbție și fitoextracție.

Pe parcursul procesului de biosorbție s-a urmărit, adsorbția metalelor grele (Cd (II) și Zn (II)) din soluții apoase, folosind noi tipuri de biomateriale ca și biosorbbanți: rumegușul de brad (*Abies alba*), ciuperci cultivate *Agaricus bisporus* și cele naturale (de pădure) *Lactarius piperatus* cât și drojdia de bere epuizată *Saccharomyces cerevisie* din fabricile de bere. S-au elaborat metode de îmbunătățire a capacității de adsorbție pentru biosorbbanții studiați, metode de tratamente chimice sau de imobilizare.

Procesele de biosorbție s-au optimizat urmărind influența a diferiților parametri: (cantitatea de biomasă, efectul concentrației inițiale a ionilor de metal, timpul de contact, influența agitării, pH-ul inițial al soluției și temperatura), în funcție de capacitatea de adsorbție obținută și randamentele de eliminare a metalelor grele.

Echilibrele de adsorbție s-au caracterizat prin determinarea izotermelor lineare și non-lineare S-au determinat izotermele Langmuir și Freundlich, prin ecuații lineare și la alte tipuri de izoterme prin regresie non-liniară (în total zece modele de izoterme). Pentru optimizarea non-liniară s-a utilizat algoritmul Covariance Matrix Adaptation Evolution Strategy. În urma modelelor obținute s-a ajuns la concluzia că modelul Sips descrie cel mai bine procesul de biosorbție în cazul utilizării biomasei de funghi.

Pentru determinarea aspectelor cinetice a procesului de biosorbție s-au luat în considerare modelele pseudo-ordin 1, pseudo-ordin 2, difuzia internă și externă. Compararea modelelor cu rezultatele experimentale au demonstrat că procesul de biosorbție este descris cel mai bine de modelul pseudo-ordin 2 în toate cazurile.

În scopul studiului mecanismului de adsorbție suprafața adsorbbanților s-a caracterizat prin analize FTIR, SEM și AFM . Prin studii comparative s-a reușit determinarea grupărilor cu rol important în legarea metalelor grele.

În a doua parte a tezei s-a studiat procesul de fitoextracție cu planta acvatică *Vallisneria spiralis*, folosind metale grele ca și contaminanți Cu, Pb, Cd și Zn . Rezultatele obținute au demonstrat capacitatea plantei de a acumula metalele grele în condițiile experimentelor de fitoextracție în sistem monometalic.

În scopul elucidării mecanismului de fitoextracție s-au urmărit răspunsurile biochimice a plantei la efectul toxic al metalelor. Modificările profilului proteic din plantă au fost monitorizate și determinate prin electroforeză pe microchip combinat prin scanare de fluorescență indusă (LIF).

Rezultatele originale obținute prin compararea rezultatelor cu acumularea metalelor au demonstrat schimbări calitative și cantitative în profilul proteic.

Tehnicile de bioremediere investigate, biosorbția folosind noi biomateriale și, fitoextracția cu plante acvatice pot fi un punct de pornire privind aplicarea practică a acestor metode în eliminarea metalelor grele din soluții apoase.

## **Bibliografie**

- Adesodun, J.K., Atayese, M.O., Agbaje, T., et al., 2010. Phytoremediation potentials of sunflowers (*Tithonia diversifolia* and *Helianthus annuus*) for metals in soils contaminated with zinc and lead nitrates. *Water Air Soil Pollut.*, 207, 195-201.
- Ahalya, N., Ramachandra, T.V. Kanamadi, R.D., 2003. Biosorption of Heavy Metals. *Res. J. Chem. Environ.*, 7(4).
- El-Khatib, A.A., Hegazy, A.K., Abo-El-Kassem, A., 2011. Cadmium-induced response of protein and antioxidant enzymes in aquatic macrophytes *Myriophyllum spicatum* and *Ceratophyllum demersum*. *J. Environ. St.*, 7, 17-23.
- Freundlich. H.M.F., 1906. Über die adsorption in losungen, *Zeitschrift für Physicalische Chemie* (Leipzig), 57 A, 385-470.
- Garg, U.K., Kaur, M.P., Garg, V.K., Sud, D., 2007. Removal of hexavalent chromium from aqueous solution by agricultural waste biomass, *J. Hazard. Mater.*, 140, 60-68.

- Hansen, N., Mueller, S.D., Koumoutsakos, P., 2003. Reducing the Time Complexity of the Derandomized Evolution Strategy with Covariance Matrix Adaptation (CMA-ES). *Evol. Comput.*, 11, 1-18.
- Langmuir, I., 1918. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum, *J. Am. Chem. Soc.*, 40, 1361-1367.
- Mehmet, E.A., Sukru, D., Celalettin, O., Mustafa, K., 2007. Heavy metal adsorption by modified oak sawdust: Thermodynamics and kinetics. *J. Hazard. Mater.* 141, 77-85.
- Nagy, B., Maicaneanu, A., Indolean, C., Manzatu, C., Silaghi-Dumitrescu, L., Majdik, C., 2013b. Comparative study of Cd (II) biosorption on cultivated *Agaricus bisporus* and wild *Lactarius piperatus* based biocomposites. Linear and nonlinear equilibrium modeling and kinetics. *J. Taiwan. Inst. Chem. E.*, 10.1016/j.jtice.2013.08.013.
- Rahman, M.S., Islam, M.R., 2009. Effect of pH on isotherms modeling for Cu(II) ions adsorption using maple wood sawdust, *Chem. Eng. J.*, 149, 273-280.
- Roe, Colin, D., 1967. A manual of aquarium plants. Shirley Aquatics Ltd., Solihull, Eng.
- Sakakibara, M., Ohmori, Y., Ha, N.T.H., et al., 2011. Phytoremediation of heavy metal contaminated water and sediment by *Eleocharis acicularis*. *Clean: Soil, Air, Water* 39, 735-741.
- Schiewer, S., Volesky, B., Loveley, D.R., (Ed.). 2000. Environmental Microbe-Metal Interactions, Washington DC: ASM Press; p. 329-362.
- Singh, R., Tripathi, R.D., Dwivedi, S. et al., 2010. Cadmium-induced biochemical responses of *Vallinneria spiralis*. *Protaplasma*. 245, 97-103.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2002, *Plant Physiology*, Third ed., Sinauer Associates, Inc Chapter 35, 68-72.
- Vidali, M., Bioremediation. An Overview. 2001. *Pure Appl. Chem.*, 73 (7), 1163-1172.

Yang, X., Al-Duri, B., 2005. Kinetic modeling of liquid-phase adsorption of reactive dyes on activated carbon, *J. Colloid Interface Sci.*, 287, 25-34.

Zhao, M., Duncan, J.R., 1997. Use of formaldehyde cross-linked *Saccharomyces cerevisiae* in column bioreactors for removal of metals from aqueous solutions. *Biotech.Lett.*, 19, 953-955.

### **Lucrări științifice publicate**

**Nagy, B.**, Maicaneanu, A., Indolean, C., Burca, S., Silaghi-Dumitrescu, L., Majdik, C., **2013a.** Cadmium (II) ions removal from aqueous solutions using Romanian untreated fir tree sawdust- a green biosorbent. *Acta Chim.Slov.* 60, 263-273.

**Nagy, B.**, Maicaneanu, A., Indolean, C., Manzatu, C., Silaghi-Dumitrescu, L., Majdik, C., **2013b.** Comparative study of Cd (II) biosorption on cultivated *Agaricus bisporus* and wild *Lactarius piperatus* based biocomposites. Linear and nonlinear equilibrium modeling and kinetics. *J. Taiwan. Inst. Chem. E.*, 10.1016/j.jtice.2013.08.013.

**Nagy, B.**, Tonk, Sz., Indolean, C., Maicaneanu, A., Majdik, C., **2013c.** Biosorption of Cd (II) ions by unmodified, microwave and ultrasound modified brewery and pure strain yeast biomass. *Am. J. Anal. Chem.*, 4, 63-71.

### **Lucrări științifice trimise spre publicare**

**Nagy, B.**, Török, A., Makszin, L., Majdik, C., Valasek, A., Kerepesi, I., Kilár\*, F., Heavy metal induced protein profile changes in aquatic plant *Vallisneria spiralis*. *Send to South Afr. J. Bot.* 2013.

**Nagy, B.**, Szilágyi, B., Majdik, C., Katona, G., Indolean\*, C., Măicăneanu\*, A., Metal ions biosorption on *Lactarius piperatus* macrofungus. Linear and nonlinear equilibrium modelling and kinetics. Under Revision, *Environ. Prog. Sust. Energ.*, 2013.

**Nagy, B.**, Mânzatu, C., Măicăneanu, A., Indolean, C., Barbu-Tudorean, L., Majdik\*, C., Linear and nonlinear regression analysis for heavy metals removal using *Agaricus bisporus* macrofungus. *Send to Arab. J. Chem.*, 2013.

Nagy, B., Mânzatu, C., Măicăneanu, A., Indolean, C., Silaghi-Dumitrescu, L., Majdik\*, C.,  
Effect of alkaline and oxidative treatment on sawdust capacity to remove Cd (II) from  
aqueous solutions. FTIR an AFM study. Send to J. Wood Chem. Technol., 2013.

## **Mulțumiri**

Această lucrare a fost posibilă prin sprijinul financiar oferit prin Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013, cofinanțat prin Fondul Social European, în cadrul proiectului POSDRU/107/1.5/S/76841, cu titlul „Studii doctorale moderne: internaționalizare și interdisciplinaritate”.