



UNIVERSITATEA BABES-BOLYAI CLUJ
FACULTATEA DE CHIMIE SI INGINERIE CHIMICA



Studii de fitoextracție cu plante acvatice

Teză de doctorat

Rezumat

Conducător științific:

Prof. dr. Luminița Silaghi-Dumitrescu

Student–doctorand:

Török Anamaria Iulia (Msc.)

Cluj-Napoca

2015

Această lucrare a fost posibilă prin sprijinul financiar oferit de Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013, cofinanțat prin Fondul Social European, în cadrul proiectului POSDRU/159/1.5/S/132400, cu titlul „Tineri cercetători de succes – dezvoltare profesională în context interdisciplinar și internațional”

Cuprins

1.	Introducere generală	4
2.	Introducere	6
	2.1. Fitoremediere	6
	2.2. Pollutanți anorganici și organici	8
	2.3. Răspunsul plantelor la toxicitate	12
3.	Obiective generale	15
4.	Parte experimentală	16
	4.1. Selecția poluanți anorganici și a plantelor acvatice pentru studii de fitoextracție	16
	4.1.1. Metale grele	16
	4.1.2. Plantele acvatice	18
	4.2. Fitoextracția a metalelor grele din soluți apoase	20
	4.2.1. Materiale și metode experimentale	20
	4.2.2. Rezultatele obținute în sisteme monometalice	21
	4.2.3. Rezultatele obținute în sisteme multimetalice	24
	4.3. Răspunsul plantelor la stresul abiotic	27
	4.3.1. Analiza pigmentilor fotosintetici	27
	4.3.2. Analiza proteinelor totale	29
	4.3.3. Antioxidanți indicatorii biochimici la stresul abiotic	30

4.3.4.	Analiza acidului ascorbic	32
4.3.5.	Analiza compușilor tiolici	34
4.4.	Selecția poluanților organici pentru studii de fitoextracție	44
4.4.1.	Coloranți trifenilmetanici	44
4.4.2.	Materiale și metode experimentale	46
4.4.3.	Influența parametrilor experimentali	47
4.5.	Analize spectrale	57
4.5.1.	Infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)	57
4.5.2.	Spectroscopie de raze X cu energie dispersivă (EDS)	60
4.5.3.	Microscopia electronică de baleiaj (SEM)	63
4.5.4.	Spectroscopie UV-Vis	64
4.5.5.	Caracterizarea procesului de fitodergaradare	65
4.5.6.	Analiza pigmentilor fotosintetici	66
4.6.	Caracterizarea procesului de fitoextracție	70
4.6.1.	Studiul cinetic al procesului de adsorbție	70
4.6.2.	Modelul izotermelor de adsorbție	73
4.6.3.	Modelul de rețea neuronală artificială (ANN)	79
5.	Concluzii generale	82
6.	Perspectivile cecretării	87

7. Publicații proprii în tematica tezei	88
8. Bibliografie	89
9. Anexe	112

2. Introducere

Impactul poluării și protecția mediului a devenit una din cele mai dezbătute probleme ale contemporaneității. Odata cu creșterea populației și a activităților antropice din secolul al XX-lea, a crescut și prezența deșeurilor solide și lichide din mediu [1]. Cea mai mare parte a deșeurilor prezente în ecosistemele naturale sunt sub formă de produse chimice. [2].

În ultimele decenii cercetările se axează pe dezvoltarea unor noi tehnologii, care pot elimina diferitele forme de poluanți chimici. Bioremediere este o metodă alternativă pentru îndepărtarea, adsorbția și anihilarea unei mare varietăți de poluanți, utilizând diferite tipuri de biomateriale și celule vii în condiții controlate. Prin alegerea condițiilor optime bioremedierea poate deveni o strategie promițătoară din punct de vedere economic și ecologic, față de tehnicile de epurare fizice (filtrare prin membrane, flotația, etc.) și chimice (precipitare chimică, coagulare, schimbul ionic, electroliza, extracție cu solvenți, etc.) cunoscute [3].

Avantajul tehnicilor de bioremediere este posibilitatea utilizării procesului ex-situ sau in-situ în mediul poluat. Procesul include mai multe categorii cum ar fi biosorbția, bioacumularea, bioprecipitarea, bioreducerea, biodegradarea, fitoextracția, fitostabilizarea, fitofiltratrea, fitovolatilizarea sau fitodegradarea a poluanților toxici [3].

Fitoremedierea este o tehnologie alternativă care utilizează plante vii pentru a reduce, elimina, degrada, sau imobiliza poluanți din mediu [4]. Termenul de fitoremediere a fost folosit pentru prima dată în 1980 pentru a exprima utilizarea și recuperarea unei zone poluate.

Fitoextracția este subprocesul fitoremedierii, bazată pe cultura plantelor având caracteristici de toleranța și de acumulare a poluanților în organele vegetative ale plantei: rădăcină, frunză.

Două tipuri de fitoextracție sunt cunoscute; fitoextracția continuă (naturală) și indusă (asistată de agenți chelatori). Fitoextracția continuă prezintă utilizarea plantelor în mod "natural" pentru acumularea a unor cantități importante de metale grele pe parcursul unor cicluri de creștere și dezvoltare completă. Fitoextracția indusă constă în intensificarea solubilității, mobilității și acumulării ionilor de metale grele datorită formării unor sisteme de chelați. Ior astfel devenind mai ușor asimilabilă de către organele plantelor. Tehnica de fitoextracție este în

general aplicată pentru îndepărtarea metalelor grele, de asemenea fiind utilizată și pentru a anihila compuși organici [5].

Plantele utilizate pentru fitoremediere trebuie să îndeplinească 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 [5]. Speciile de plante care acumulează cantități mari de metale grele sunt cunoscute și denumite ca plante hiperacumulatoare [6]. De exemplu: specia *Noccaea caerulescens* este capabilă de a acumula până la 40.000 mg kg⁻¹ de Zn și 18.000 mg kg⁻¹ a Cd (biomasa uscată) fără nici un simptom toxic [7].

Plantele acvatice joacă un rol important din punct de vedere structural cât și funcțional pentru ecosistemele acvatice. Au rol ca sursă de hrană și adăpost pentru pești și nevertebrate acvatice. Plantele acvatice au capacitatea de a modifica calitățile apei prin reglementarea echilibrului de oxigen, prin ciclul de nutrienți, precum și prin acumularea metalelor grele [8]. Plantele acvatice stuf și papură (*Phragmites australis*, *Typha latifolia*) au potențialul de a tolera și de acumula o gamă largă de poluanți anorganici [9-13]. Utilizarea plantelor acvatice pentru restabilirea resurselor acvatice poluate este o tehnică promițătoare pentru viitor privind fitoremedierea.

3. Obiective generale

Scopul principal al cercetărilor constă în studiul și dezvoltarea unei metode, alternative biologice pentru îndepărtarea metalelor grele și a unor coloranți trifenilmetanici prin contribuția unor plante acvatice și determinarea răspunsurilor biochimice a plantelor produs la efectul toxic al poluanților.

Pentru atingerea scopului propus, în cadrul cercetărilor la scară de laborator s-au avut în vedere următoarele aspecte:

- Selectarea plantelor acvatice, precum și a poluanților organici și anorganici pentru studiile de fitoremediere.
- Optimizarea parametrilor experimentali de fitoremediere (cantitatea de biomasă, concentrația inițială a poluantului, pH inițial și temperatura mediului) în funcție de capacitatea și eficiența de fitoextracție a plantelor selectate.
- Studiul mecanismelor de fitoremediere realizate prin tehnici instrumentale de spectrometrie : în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR), spectrometrie de absorbție moleculară UV-Vis (UV-Vis), spectroscopie de absorbție atomică (AAS) precum și metode cromatografice în strat subțire (TLC), cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC), microscopia electronică de baleiaj (SEM) și spectroscopie de raze X cu energie dispersivă (EDS).
- Răspunsul plantei la stresul abiotic prin analiza diverselor indicatori biochimici de stres (cuantificarea pigmentilor fotosintetici: clorofilei *a*, *b* și carotenoizi, dozarea proteinelor totale, antioxidanți (acidul ascorbic, glutatation), compuși thiolici și fitochelatine).
- Analiza datelor experimentale obținute la echilibru conform modelelor de izoterme (Langmuir, Freundlich, Dubinin-Radushkevich și Temkin) și studiul cinetic al procesului de adsorbție (pseudo-cinetică de ordinul I, pseudo-cinetică de ordinul II).
- Dezvoltarea unui model de rețea neuronală artificială (ANN) pentru a prezice și a oferi estimări cantitative privind capacitatea fitoremedierii și eficiența plantelor acvatice.

4. Partea experimentală

4.1. Selecția poluanți anorganici și a plantelor acvatice pentru studii de fitoextracție

Metale grele Cu, Zn și Cd au fost selectate ca poluanți anorganici conform caracteristicilor toxice, de mobilitate și a efectelor negative asupra organismului viu. Cinci plante acvatice au fost selectate pentru studiile de fitoremediere datorită caracteristicilor lor morfologice și a proprietăților fiziologice. Plantele acvatice alese sunt specii submerse și plutitoare: *Elodea canadensis* Mich. (*Elodea canadensis*), *Eichhornia crassipes* Mart (*crassipes Eichhornia*), *Salvinia natans* Kunth (*Salvinia natans*), *Lemna minor* L. (*Lemna minor*), *Pistia Stratiotes* L. (*Pistia stratiotes*).

4.2.1. Materiale și metode experimentale

Materialul vegetal și condițiile de creștere

Plante acvatice selectate au fost crescute în seră (sera de la Universitatea de Științe agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca, România) cu adaos de îngrășământ (Complex 3, 0,5%). Plantele în vârstă de 40-60 zile au fost selectate pentru experimentele de fitoremediere. Plantele acvatice au fost păstrate în condiții controlate (la temperatura camerei, fotoperioadă 14/10 h lumină/întuneric) în soluție nutritivă modificată Hoagland. Compoziția mediului de cultură modificată Hoagland conține următoarele macro- și micro elemente: 1.25 mM KNO₃, 1.25 mM Ca(NO₃)₂, 0.5 mM MgSO₄·7H₂O, 0.25 mM KH₂PO₄, 11.6 μM H₃BO₃, 4.5 μM MnCl₂·4H₂O, 10 μM Fe(III)EDTA, 0.19 μM ZnSO₄·7H₂O, 0.12 μM Na₂MoO₄·2H₂O, și 0.08 μM CuSO₄·5H₂O. Toate substanțele chimice utilizate au fost de calitate analitică (achiziționate de la Merck Germania).

Fitoremedierea metalelor grele

După perioada de aclimatizare (3 zile), în soluție s-au adăugat sărurile metalelor grele din soluțiile stoc preparate din Cd(NO₃)₂, ZnSO₄ × 7H₂O și CuSO₄ × 5H₂O în concentrații controlate. Concentrațiile inițiale au fost verificate prin analize spectroscopice de absorbție atomică (GBC SensAA dual Australia) utilizând lampă Photron P410 HCl D2 (la lungimi de undă: 228,8 nm (Cu), 213.9 nm (Zn) și 324.7nm (Cd)).

Experimentele s-au efectuat în condiții de mono- sau multimetale și s-au urmărit schimbările în concentrația metalelor în soluție precum și în plantele utilizate.

Plantele acvatice după experimentele de fitoextracție au fost uscate (în etuvă la 70 °C timp de 24 ore) măcinate și digerate cu acid azotic concentrat pentru a determina cantitățile de Cu, Zn și Cd acumulate în plante prin metodă de spectrofotometrie de absorbție atomică

Analize statistice

Datele experimentale au fost prelucrate statistic inclusiv prin metode standard (calcularea valorilor medii, erorile standard) utilizând aplicația Microsoft Excell. Astfel în figuri și tabele sunt prezentate valorile medii și diferențele semnificative dintre tratamente și martori au fost calculate prin testul Student (notând diferențele la valori $P < 0,05$).

4.2.1. Rezultatele obținute în sisteme monometalice

Plante acvatice selectate s-au utilizat la studii de fitoextracție prin expunere la tratamente monometalice de Cu, Zn și Cd. Rezultatele obținute s-au prezentat în două grupe, luând în considerare caracteristicile morfologice ale plantelor,:

1.) plante acvatice cu caracteristic morfologic voluminos, *Eichhornia crassipes* și *Pistia stratiotes*, unde s-a analizat acumularea și distribuția metalelor grele în organele vegetative (rădăcini și frunze);

2.) plante hidrofite cu caracteristic morfologic mic *Eloдея canadensis*, *Salvinia natans* și *Lemna minor*, în cazul în care acumularea metalelor grele au fost determinate din întreaga plantă.

Rezultatele obținute în urma experimentelor sunt prezentate sistematizat în Tabelul 1 și 2.

În Tabelul 1 se observă distribuția specifică în rădăcină/frunză în funcție de natura metalului. Metalele grele Zn și Cd s-au acumulat în cantități mai mare în rădăcină, iar ionul de Cu s-a bioacumulat în concentrații mai mari în frunze în cazul plantei *Pistia stratiotes* (de 1,9 ori mai mari cantități decât în rădăcină).

Comparând eficiența de bioacumularea în frunza a celor doua plante acvatice se poate observa ca metalul Cu se acumuleaza de 6,8 ori în cantitate mai mare în *Pistia stratiotes* decât în *Eichhornia crassipes*. Aceste rezultate pot fi explicate prin natura plantei *Pistia stratiotes*, având o afinitate mai mare de transport și de legare a ionilor de Cu. S-a demonstrat din literatura de specialitate că diferitele specii au un comportamente unic ecofiziologice, având diferite capacității de acumulare de metale grele care sunt sechestrate și depozitate eficient în peretele celular, în vacuole sau în alte subcompartimente specifice de citosol în scopul de a le ține departe de site-urile metabolice active în plante [14].

Rezultatele obținute cu plantele acvatice din a doua grupa morfologică demonstrează că *Salvinia natans* are cea mai mare capacitate de a bioconcentra metalele grele (valori cu aprox. 4-5 ori mai mari decât în cazul *Elodea canadensis* sau *Lemna minor*). Aceste rezultate sunt în concordanță cu rezultatele lui Dhir și colab., raportând că *Salvinia natans* este o plantă hiperacumulatoare având capacitatea de a tolera și bioconcentra cantități mari de metale cum ar fi Fe, Cr și Ni [15].

Tabel 1. Variația concentrațiilor acumulate și distribuția metalelor grele în *Eichhornia crassipes* și *Pistia stratiotes* expuse la experiențele de fitoextracție în sistem monometalic. (Cu, Zn, Cd C_i = 10 mg/L, t = 24 - 27 °C, pH = 5.6, literele reprezintă diferențele semnificante la valori de p ≤ 0.05)

Species	Heavy metals	Concentration in control sample leaves (mg/g)	Concentration in control sample roots (mg/g)	Accumulated concentration in root (mg/g)	Accumulated concentration in leaves (mg/g)
<i>Eichhornia crassipes</i>	Cu	0.005	0.003	1.468 ^b ±0.3	0.365 ^d ±0.02
	Zn	0.075	0.041	0.817 ^c ±0.07	0.322 ^d ±0.03
	Cd	0	0	1.728 ^a ±0.2	0.139 ^d ±0.01
<i>Pistia stratiotes</i>	Cu	0.009	0.004	1.334 ^b ±0.2	2.496 ^a ±0.6
	Zn	0.033	0.013	1.118 ^b ±0.4	0.951 ^b ±0.01
	Cd	0	0	1.428 ^b ±0.3	0.276 ^c ±0.04

Tabel 2. Variația concentrațiilor acumulate a metalelor grele după experimentele de fitoextracție în sistem monometalic. (Cu, Zn, Cd $C_i = 10 \text{ mg/L}$, $t = 24 - 27 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5.6$, literele reprezintă diferențele semnificante la valori de $p \leq 0.05$)

Species	Heavy metals	Concentration in control sample leaves (mg/g)	Accumulated concentration in leaves (mg/g)
<i>Elodea canadensis</i>	Cu	0.044	1.340 ^a ±0.1
	Zn	0.086	0.583 ^b ±0.02
	Cd	0	0.444 ^b ±0.01
<i>Lemna minor</i>	Cu	0.0034	1.558 ^c ±0.6
	Zn	0.044	0.447 ^c ±0.01
	Cd	0	0.62 ^{NS} ±0.06
<i>Salvinia natans</i>	Cu	0.0074	4.719 ^a ±0.5
	Zn	0.003	2.236 ^c ±0.6
	Cd	0	1.90 ^c ±0.2

4.2.3. Rezultatele obținute în sisteme multimetalice

Capacitatea de fitoextracție (fitoacumulare) a plantelor acvatice s-au studiat și în condiții multimetalice, prin prezența simultană a ionilor de Cu, Zn și Cd, un sistem mai apropiat de condițiile existente în cazul apelor reziduale. Rezultatele obținute sunt prezentate sistematic după caracteristicile morfologice a plantelor, conform grupelor prezentate (Tabel 3 și 4).

Prezența celor trei metale grele simultan în sistemele apoase influențează capacitatea de fitoacumulare a plantelor (Tabel 3). Concentrația de ioni Cu și Zn acumulată de specia *Eichhornia crassipes* a fost de 4,1 ori mai mare decât rezultatele obținute în sistem monometalic. În cazul *Pistia stratiotes* o acumulare mai bună a fost observată în cazul ionului de Cd care a fost de 3 ori mai mare decât în cazul tratamentului monometalic (Tabel 3).

În cazul plantelor acvatice din grupa morfologic mai mică s-a constatat o creștere majoră a capacității de fitoacumulare în cazul plantei *Lemna minor*. Prezența celor trei ioni metalici din soluție apoasă a avut un efect pozitiv asupra fitoextracției ionilor de Cu, Zn și Cd, astfel s-au acumulat cantități cu 7 ori mai mare în cazul ionului de Cu, cu 11 ori mai mare în cazul ionului de Zn și cu 4 ori mai mare în cazul ionului de Cd. S-a observat că în cazul plantei *Elodea*

canadensis numai ioni de Cd iar în cazul *Salvinia natans* numai ioni de Zn au fost acumulate în cantități mai mari după fitoextracția soluțiilor multimetalice (Table 4). Aceste rezultate se pot explica prin competiția metalelor pentru situsurile de legare de metale.

Asimilarea metalelor grele are loc prin rădăcina plantei și/sau în anumite cazuri prin frunze, cum ar fi cazul plantelor submerse. Mecanismul de absorbție a metalelor poate fi explicata printr-o absorbție extracelulară rapidă, urmată de absorbție intracelulară care este un proces mai lent. Etapele rapide au loc atât prin sorbție de natură fizică și chimică, precum și prin procesele de schimb ionic. În stagiul lent se desfășoară transportul și acumularea intracelulară a metalelor grele [16].

Două interacțiuni controversate sunt cunoscute la expunerea plantelor la soluții conținând mai multe metale: o acțiune sinergică sau una antagonistică, care pot fi explicate prin asocierea și prin competiția pentru locurile de legare pe transportatori de membrană, metalo-enzime, metalotinoide sau molecule de țintă cu sensibilități metalice [17].

Rezultatele obținute din teza de doctorat demonstrează creșterea capacității plantelor acvatică în fitoextracția în condiții multimetalice, arătând efect sinergic asupra absorbției de metale grele. Trebuie să menționăm că la diferite specii de plante aceste efecte sinergice sau antagonice se pot fi diferențiate. Rezultatele tezei obținute sunt în concordanță cu concluziile lui Israr și colab., raportând o creștere în capacitatea de bioconcentrare a metalului greu Pb în organele vegetative (rădăcină și tulpină) în prezența Cu, Ni, și Zn la specia *Sesbania drummondii* [18].

Tabel 3. Variația concentrațiilor acumulate în *Eichhornia crassipes* și *Pistia stratiotes* expuse la experimentele de fitoextracție în sistem multimetalic (Cu, Zn, Cd $C_i = 10$ mg/L, $t = 24 - 27$ °C, pH = 5.6, literele reprezintă diferențele semnificante la valori de $p \leq 0.05$)

Species	Heavy metals	Concentration in control sample leaves (mg/g)	Concentration in control sample roots (mg/g)	Accumulated concentration in root (mg/g)	Accumulated concentration in leaves (mg/g)
<i>Eichhornia crassipes</i>	Cu	0.004	0.005	5.841 ^a ± 0.4	1.769 ^c ± 0.6
	Zn	0.029	0.0063	3.032 ^b ± 0.2	1.736 ^c ± 0.8
	Cd	0	0	3.585 ^b ± 0.5	0.391 ^d ± 0.3
<i>Pistia stratiotes</i>	Cu	0.0033	0.0079	2.989 ^b ± 0.7	3.646 ^b ± 0.06
	Zn	0.013	0.047	4.899 ^a ± 1.1	3.178 ^b ± 0.3
	Cd	0	0	3.290 ^b ± 0.4	0.889 ^c ± 0.02

Tabel 4. Variația concentrațiilor acumulate în plante acvatice *Elodea canadensis*, *Lemna minor* și *Salvinia natans* expuse la experimentele de fitoextracție în sistem multimetalic (Cu, Zn, Cd $C_i = 10$ mg/L, $t = 24 - 27$ °C, pH = 5.6, literele reprezintă diferențele semnificante la valori de $p \leq 0.05$)

Species	Heavy metals	Concentration in control sample leaves (mg/g)	Accumulated concentration in leaves (mg/g)
<i>Elodea canadensis</i>	Cu	0.036	0.482 ^b ± 0.01
	Zn	0.089	0.594 ^b ± 0.03
	Cd	0	1.516 ^a ± 0.2
<i>Lemna minor</i>	Cu	0.003	10.810 ^a ± 1.3
	Zn	0.046	4.891 ^b ± 1.2
	Cd	0	2.784 ^c ± 0.9
<i>Salvinia natans</i>	Cu	0.0067	3.564 ^b ± 0.1
	Zn	0.0026	4.472 ^b ± 0.3
	Cd	0	1.094 ^d ± 0.4

4.3. Răspunsul plantelor la stresul abiotic

Plantele posedă un sistem complex de apărare împotriva factorilor de stres abiotic (prezența metalelor grele Cu, Zn, și Cd) care pot apărea în mod variat prin schimbări majore sau minore în cazul proceselor biochimice, fiziologice și morfologice ale plantei.

În cadrul acestui subcapitol al tezei de doctorat se prezintă studiul răspunsilor plantelor acvatice efectuate prin analiza indicatorilor biochimici de stres: pigmenții fotosintetici (clorofila *a*, clorofila *b* și carotenoizilor), proteine sumare, antioxidanți (acidul ascorbic, glutationul) și a compuși tiolici.

4.3.1. Analiza pigmenților fotosintetici

Pigmenții fotosintetici clorofila *a* (Chl_a), clorofila *b* (Chl_b) și carotenoizii totali (Car_{x+c} : xantofile și caroteni) au un rol constitutiv în metabolismul plantelor în absorbția energiei luminoasă și transformarea ei în energie chimică. Efectele stresului indus de metalele grele în procesul de fitoextracție au fost caracterizate prin variația pigmenților fotosintetici ale plantelor acvatice: *Elodea canadensis*, *Eichhornia crassipes*, *Lemna minor*, *Pistia stratiotes* și *Salvinia natans* în comparație cu plantele netratate (martori). Dozarea pigmenți fotosintetici a plantelor acvatice s-a determinat spectrofotometric, conform recomandărilor lui Lichtenthaler [16], detaliate de Lichtenthaler și Buschman [17]. Rezultatele obținute sunt prezentate în Fig. 3.

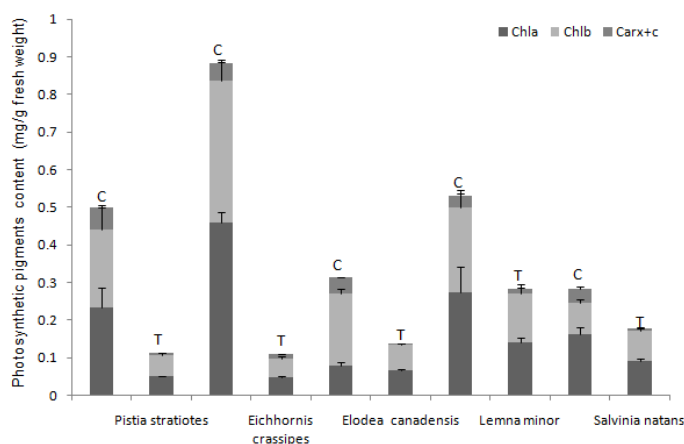


Fig. 3. Variația pigmenților fotosintetici (Chl_a , Chl_b , Car_{x+c}) din plantele martor (C) și a plantelor acvatice după experimentele de fitoextracție în soluții multimetale (T).

Plantele acvatice după experimentele de fitoextracție prezintă o variație negativă în concentrația pigmentilor Chl_a , Chl_b și al Car_{x+c} . Cea mai mare descreștere cantitativă a pigmentilor fotosintetici s-a constatat în cazul speciilor *Eichhornia crassipes* (Chl_a 89%, Chl_b 86%, Car_{x+c} 72%) și *Pistia stratiotes* (Chl_a 77%, Chl_b 73%, Car_{x+c} 89%). O explicație posibilă pentru declinul abrupt al cantității pigmentilor fotosintetici este legat de natura plantelor și toleranța asupra metalelor grele de Cu, Zn și Cd, care influențează cantitatea acumulată. Astfel descreșterea cantităților de pigmenți fotosintetici ale *Eichhornia crassipes* și *Pistia stratiotes* pot fi corelate cu cantitățile acumulate de metale grele provocând efecte inhibitoare în fotosinteza plantelor.

În cazul *Elodea canadensis*, *Salvinia natans* și *Lemna minor* s-a observat o tendință mai mică de descreștere a conținutului de Chl_a , Chl_b și al Car_{x+c} (*Elodea canadensis*: Chl_a 16%, Chl_b 63%, Car_{x+c} 96%, *Salvinia natans* Chl_a 43%, Chl_b 4,6%, Car_{x+c} 83%, *Lemna minor* Chl_a , 48%, Chl_b 42% Car_{x+c} 56%). Aceste rezultate sugerează că aceste specii acvatice sunt mai puțin afectate de toxicitatea metalelor grele.

Rezultatele obținute sunt în concordanță cu cele din literatură de specialitate. S-a observat manifestări de fitotoxicitate la planta acvatice *Lemna gibba* prin decolorarea frunzelor și prin scădere semnificativă a pigmentilor fotosintetici în timpul bioacumulării metalelor Cu și Zn [18].

Conform rezultatelor obținute și a caracteristicilor fiziologice/morfologice, *Elodea canadensis*, *Salvinia natans* și *Lemna minor* au fost selectate pentru evaluarea răspunsul biochimic a plantelor la toxicitatea de Cd din soluții mono- și multimetali, prin analize a proteinelor totale, a acidului ascorbic și al compușilor tiolici (glutacionă, fitochelatină și produșii lor de degradare)

4.3.2. Analiza proteinelor totale

Proteinele sumare au fost izolate din plantele acvatice (*Elodea canadensis*, *Salvinia natans* și *Lemna minor*) după procesul de fitoextracție a metalului de Cd (în sisteme mono- și sisteme multimetali: Cu, Zn și Cd, având concentrația inițială de metale grele de 65 $\mu\text{M/L}$). Proteinele au fost izolate și determinate conform recomandările lui Wang și colab. [19, 20].și Bradford și colab.[21] folosind ca standard albumină serică bovină.

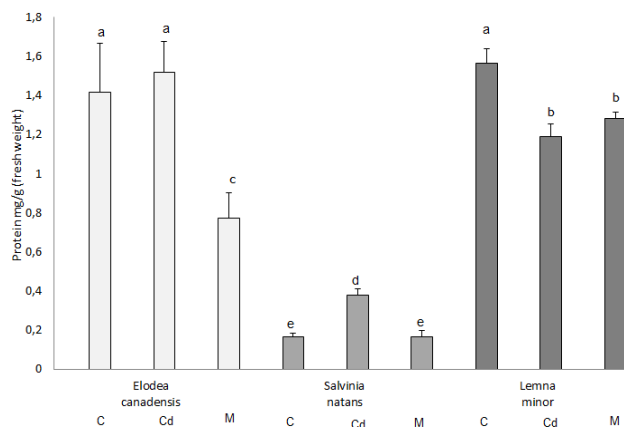


Fig. 4. Variația proteinelor totale din plantele martor și după fitoextracție în sistem mono- și multimetalic (C- martor, Cd- sistem monometalic, M- sistem multimetalic conținând: Cu, Zn și Cd). Literele reprezintă diferențele semnificante la valori de $P \leq 0.05$

Plantele acvatice s-au caracterizat prin dozarea proteinelor totale după experimentele de fitoextracție. Comparând rezultatele obținute dintre cele trei specii, se remarcă o creștere cantitativă a proteinelor totale după tratamentul monometalic de Cd în speciile *Elodea canadensis* și *Salvinia natans* (Fig. 4). În cazul sistemelor multimetalice, se pot observa diminuări a conținutului de proteine totale în speciile *Elodea canadensis* și *Lemna minor* (micșorare cu 45,4% și cu 18% față de martori). Rezultatele controversate demonstrează schimbări în metabolismul plantelor (indusă de stresul abiotic) care pot fi explicate prin două modalități: 1. sinteza unor noi proteine care ar reprezenta o modalitate de adaptare sau supraviețuire la condițiile de stres; 2. degradarea proteinelor existente care reprezintă efectul negativ al metalelor grele și inhibarea proceselor vitale. Rezultatele sunt în concordanță cu alte rapoarte apărute în literatura de specialitate [22], [23] [24, 25].

4.3.3. Antioxidanți indicatorii biochimici la stresul abiotic

Stresul abiotic generează variația și sinteza a mai multor antioxidanți (non-enzimatici și antioxidanți enzimatici) în plante [26]. Acidul ascorbic (ASA) și glutathionul (GSH) sunt antioxidanți cunoscuți având rol esențial în mecanismele de apărare asupra stresului abiotic, prin ciclul ascorbat-glutathion în reglarea echilibrului redox al celulelor vegetale. Conform unor date

din literatură, diverse sisteme antioxidante cum ar fi acidul ascorbic, compuși tiolici pot lega și ajuta la neutralizarea radicalilor liberi apăruiți în timpul stresului cu metale grele [27].

Astfel, GSH împreună cu oligomeri glutatonei ($[\gamma\text{-Glu-Cys}] \text{ Gly}$), numite fitochelatine, participă la sistemul de apărare a plantelor prin detoxifierea metalelor grele și prin menținerea homeostaziei metalice prin complexarea transportarea, și depozitarea metalelor grele în vacuolele celulelor [28] [29].

4.3.4. Analiza acidului ascorbic

Pentru a evalua răspunsurile plantelor la stresul abiotic, s-au efectuat analize cantitative a acidului ascorbic. Acid ascorbic (AsA) și acidul dehidroascorbic (DHA) din plantele acvatice au fost izolate conform metodei descrise anterior de Szalai și colab. [30] și s-au determinat prin analize cromatografice de înaltă performanță (HPLC). Raportul formelor oxidative și reductive a acidului ascorbic au fost caracterizate prin determinarea potențialul redox utilizând ecuația lui Nernst. Rezultatele obținute sunt prezentate în Fig. 5.

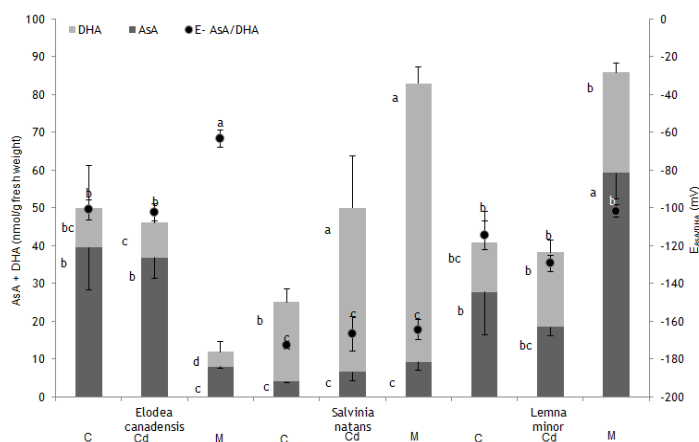


Fig. 5. Variația acidului ascorbic (forma oxidativă/ DHA și reductivă/AsA) din plante acvatice după fitoremediere în soluții mono- (Cd) și multimetalice (M) și la plante martor (C)

S-a observat o creștere semnificativă a acidului ascorbic și a acidului dehidroascorbic (AsA+DHA) în speciile *Salvinia natans* și *Lemna minor* față de martori, după experimentele de

fitoextracție în soluții multimetalice. Datele experimentale obținute reflectă o creștere de 133% pentru AsA și 250% pentru DHA în *Salvinia natans* și o creștere de 114% pentru AsA și 102% pentru DHA în cazul *Lemna minor*. Aceste rezultate sugerează activarea proceselor de apărare ale plantelor, ceea ce este în concordanță cu capacitatea lor de acumulare a metale grele Cu, Zn sau Cd. S-a demonstrat din experimentele noastre anterioare (Buta și colab. [31]) că plantele *Salvinia natans* și *Lemna minor* au capacități remarcabile pentru acumularea metalelor grele din soluții mono-, precum și din soluții multimetalice.

În paralel, s-a constatat un efect de diminuare a acidului ascorbic în *Elodea canadensis* (cu scadere de 80% pentru AsA și 62% pentru DHA față de martor) după experimentele de fitoextracție. În contextul celor prezentate putem concluziona faptul că activitatea procesului metabolic de apărare al *Elodea canadensis* este inhibat de prezența metalelor grele. În literatura de specialitate s-a raportat în cazul unei specii de orz sensibilitatea și intoleranța plantei la stresul indus care a fost colerată cu concentrația scăzută de AsA în timpul tratamentului de Cd [34].

4.3.5. Analiza compușilor tiolici

Un alt aspect important pentru a determina efectul metalelor grele, a fost analiza compușilor tiolici: cisteină (Cys), cistin (cystine), cisteinil-glicină (Cys-Gly), γ -glutamil-cisteină (γ -Glu-Cys); glutation (GSH), bisulfură de glutation (GSSG), bis- γ -glutamil-cisteină (bis- γ -Glu-Cys), cistinil-bis-glicină (Cys-bis-Gly), și dozarea fitochelatinei (PCs) și determinarea activității fitochelatinelor (PCS). Compușii tiolici au fost determinați prin analize HPLC conform recomandărilor din literatura de specialitate [32, 33] [34, 35]. Rezultatele obținute sunt reprezentate în Fig. 6.

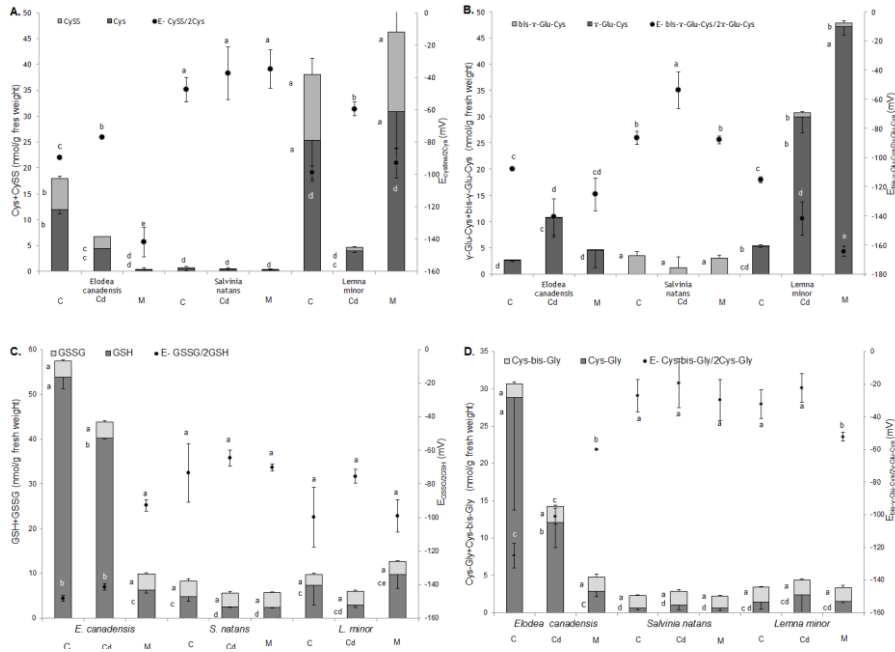


Fig. 6. Variația compușilor tiolici după experimentele de fitoremediere în comparare cu proba martor: A. cistein/cisteină (Cys/CySS); B. cisteinil-glicin/cisteinilbisglicin (CG/C-bic-G), C. Gamma-glutamylcistein/bis-gama–glutamilcistein (γ -GC/bis- γ -GC), D. Glutation/ bisulfura de glutation-(GSH/GSSG) (C = planta martor, Cd = sistem monometalic, M = sistem multimetalic)

În urma expunerii la soluții monometalnice, s-a detectat o descreștere de Cys și CySS în plantele acvatice *Lemna minor* și *Elodea canadensis*. Cu toate acestea în , s-a remarcat o tendință de creștere ai Cys, cistine , γ -glutamylcisteină (γ -Glu-Cys) și ai GSH, prezentând concentrații mai mari de 1.21, 1.2, 9.15 și de 1.32 ori comparând cu martori la specia *Lemna minor* după fitoextracția sistemului multimetalic. Astfel, s-a observat, că specia *Salvinia natans* conține un nivel mai scăzut de compuși tiolici în comparație cu celelalte specii

Fitochelatinele (PC) sunt sintetizate din GSH și sinteza de PC este catalizată de enzima γ -Glu-Cys dipeptidil transpeptidaza (CE 2.3.3.15), numit fitochelatin sintază (PCS). Pentru a analiza în continuare adaptarea plantelor la stresul indus, cantitățile de PC și ai enzimei PCS s-au determinat prin analiza HPLC.

În figura Fig.7 și Tabelul 6. sunt prezentate rezultatul obținut ai plantelor acvatice în urma experimentelor de fitoextracție (experimnte mono și multimetalic, folosind o concentrație inițială de 65 $\mu\text{M/L}$ de metale grele).

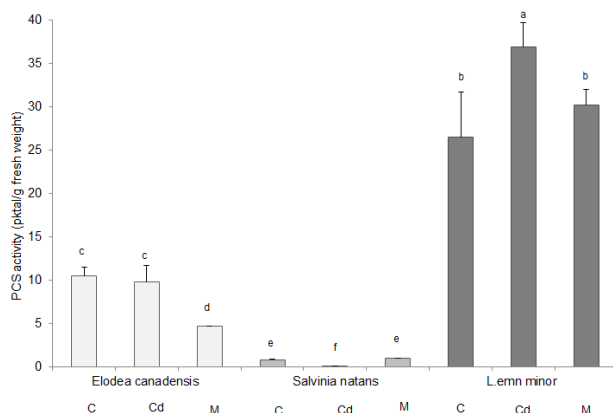


Fig. 7. Variația PCS din plante acvatice după experimentele de fitoextracția a soluțiilor monometalic de Cd și multimetalice de Cu, Zn și Cd în comparaie cu valorile plantei martor. (literele reprezintă diferențele semnificante la valori de $P \leq 0.05$)

În urma rezultatelor obținute, au fost identificate două tipuri de fitochelatine: PC_2 și PC_3 din speciile *Salvinia natans* și *Eldoea canadensis*. Pe de altă parte, s-a constatat apariția unor noi PC-urile cu grad mai ridicat de polimerizare în cazul plantei acvatice *Lemna minor* după experimentele de fitoextracția din soluții mono- și multimetilce. Prezența acestor noi fitochelatine: PC_4 , PC_6 și PC_7 au fost atribuite ca si raspuns la efectului toxic de Cd. Rezultatele sunt în concordanță cu alte observații aflate din literatura de specialitate, raportând că în alge verzi *Micrasterias* ionii de Cd pot induce sinteza fitochelatinelor PC_n , cu grad mai ridicat de polimerizare în intervalul de $n = 2 - 5$.

În contextul celor prezentate, putem concluziona că cercetările efectuate pun în evidență în primul rând capacitatea remarcabilă de fitoextracție ai plantei *Lemna minor* și răspunsurile biochimice corespunzătoare la stresul abiotic prin sinteza și apariția PC-urile cu grad mai ridicat de polimerizare. În general fitochelatinele sunt cunoscute ca chelatori de metale grele având rol important în complexarea, transportarea și depozitarea metalelor grele în celule vegetale.

Table 6. Variația PC din plantele acvatice după experimentele de fitoremediere în soluții mono- și multimetalice în comparație cu matori (steluța * reprezintă diferențele semnificative la valori de $p \leq 0.05$)

Species	PCs	PCs (nmol/g fresh weight)		
		C	Cd	M
<i>Elodea canadensis</i>	PC ₂	1.88 ±0.42	1.34* ±0.43	1.36* ±0.2
	PC ₃	15.96 ±1.7	13.38 ±2.1	15.94 ±1
	Total	17.84±1.0	14.72±1.3	17.32±0.9
<i>Salvinia natans</i>	PC ₂	2.19 ±0.073	1.51* ±0.5	0.70* ±0.05
	PC ₃	16.30 ±1.3	16.42*±0.3	12.16*±1.4
	Total	18.49±1.1	17.93±0.4	12.86*±0.8
<i>Lemna minor</i>	PC ₂	0.96 ±0.13	1.32* ±0.46	1.23 ±0.26
	PC ₃	9.87 ±0.7	12.61* ±1	14.36* ±1.1
	PC ₄	0	4.07±0.7	8.86 ±0.9
	PC ₆	0	42.22±0.57	51.30 ±0.4
	PC ₇	0	44.31±0.5	33.89 ±0.7
	Total	10.83±0.8	119.25*±1	109.64*±0.7

4.4. Selecția poluanților organici pentru studii de fitoextracție

4.4.1. Coloranți trifenilmetanici

Doi coloranți trifenilmetanici: cristal violet (CV = crystal violet) și verde malachit (MG = malachite green) au fost selectați ca și poluanți organici pentru experimentele de fitoextracție folosind diferite plante acvatice. Coloranții trifenilmetanici au fost aleși pentru studii de fitoremediere datorită efectelor toxici, efecte mutagene și cancerigene [39]. [40].

4.4.2. Materiale și metode experimentale

Material vegetal și condițiile de creștere

Plantele acvatice plutitoare: *Lemna minor*, *Salvinia natans* și planta acvatică submersă: *Elodea canadensis* au fost selectate pentru experimente de fitoextracție datorită proprietăților fizice și biologice corespunzătoare cât și toleranța lor ridicată la stresul abiotic. Plantele au fost crescute în sera Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca, România, cu adaos de Complexul III îngrășământ (0,5%). După perioada de creștere (30 zile), au fost utilizate pentru experimente de fitoextracție.

Metode analitice pentru dozarea coloranților trifenilmetanici

Soluțiile de lucru au fost preparate prin diluarea soluțiilor stoc CV și MG (1 g/L) cu o soluție nutritivă Hoagland.[36]. Concentrația coloranților CV and MG din soluțiile apoase au fost determinate prin metode spectrofotometrice (CV $\lambda_{max} = 590$ nm și MG $\lambda_{max} = 618$ nm) folosind un spectrofotometru UV-vis cu dublu fascicul (UV-Vis: GBC Cintra 202). Procesul de fitoextracție a fost caracterizat prin determinarea eficienței și capacității de fitoextracție.

Eficiența de îndepărtare a coloranților s-a obținut prin intermediul ecuației (2), unde E (%) este eficiența eliminării de colorant, C_i este concentrația inițială de colorant și C_f este concentrația colorantului finală din soluțiile apoase (mg / L).

$$E(\%) = \frac{C_i - C_f}{C_i} \cdot 100 \quad (2)$$

Capacitatea de fitoextracție a plantelor acvatice au fost calculate după formula (3), unde q_{max} este capacitatea de absorbție ai plantei (mg/g), C_i este concentrația inițială de CV sau MG

(mg /L), C_f este concentrația finală de colorant (mg / L), V este volumul soluției (L), iar m este cantitatea de plante (g).

$$q_{\max} = (C_i - C_f) \cdot \frac{V}{m} \quad (3)$$

4.4.3. Influența parametrilor experimentali asupra procesului de fitoremediere a coloranților

În vederea stabilirii condițiilor experimentale optime de fitoextracție s-a studiat influența următorilor parametri: efectul cantității de plante; efectul concentrațiilor inițiale ai coloranților; efectul pH-ului inițial și efectul temperaturii.

Influența cantității de biomasă

Pentru a studia influența cantității de biomasă asupra procesului de fitoextracție, au fost testate diverse cantități de plante între 1 și 5 g, material vegetal proaspăt (FW). Rezultatele experimentale obținute în urma studiului de fitoextracție, sunt prezentate în Fig. 9 în cazul plantei acvatice *Salvinia natans*.

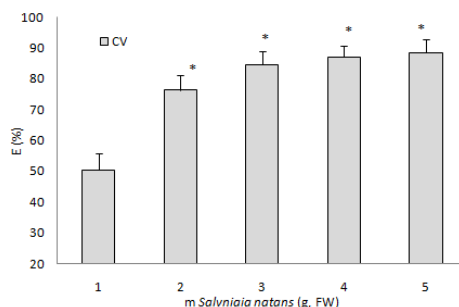


Fig. 9. Variația eficienței (E%) de fitoremediere în funcție de cantitatea de biomasă (*Salvinia natans* m=1-5 g (FW), $C_i = 50$ mg/L, V = 0.2 L, t = 23 ±2 °C. Steluța * reprezintă diferențele semnificante la valori de $p \leq 0.05$)

Analizând rezultatele obținute se poate observa că procesul de fitoremediere este influențat de cantitățile de biomasă utilizate. S-a observat că odată cu creșterea cantității de plante crește și eficiența de eliminare (E, %) a coloranților. Acest rezultat poate fi explicat prin

faptul că odată cu creșterea cantității de planta crește și numărul centrilor activi (grupările funcționale) de pe suprafața biomasei prin care este reținut poluantul organic din soluții apoase (fitosorpția), oferind și posibilitatea de a crește capacitatea de asimilare (fitoextracția-fitoaccumularea) a colorantului prin părțile vegetative.

Cea mai mare eficiența de îndepărtare s-a obținut la 5 g de biomasa (în stare proaspătă, FW) în cazul colorantului CV utilizând specia *Salvinia natans* (Fig. 9.). Analizând valorile a eficiențelor de îndepărtare la cantități de 3, 4 și 5 g de planta (FW) se poate observa că diferențele nu sunt considerabile, astfel cantitatea de 4 g s-a ales ca o cantitate de biomasa optimă pentru experimente ulterioare de fitoremediere.

Influența concentrațiilor initiale de coloranți

Concentrația inițială de colorant este un factor important în procesul de fitoremediere. Eficiența și capacitatea de reținere a plantelor acvatice în funcție de concentrația inițială a colorantului CV și MG au fost studiate într-un domeniu de concentrație între 20-90 mg/L utilizând *Elodea canadensis*, în intervalul de 20-150 mg/L la *Salvinia natans* precum și între 40-300 mg/L în cazul *Lemna minor*. Rezultatele obținute în cazul experimentelor cu specia *Elodea canadensis* sunt prezentate în Fig. 13. Conform rezultatelor obținute, se poate observa că eficiența de fitoremediere a plantelor acvatice a fost atinsă cu cea mai mare eficiență la concentrații inițiale mai mici.

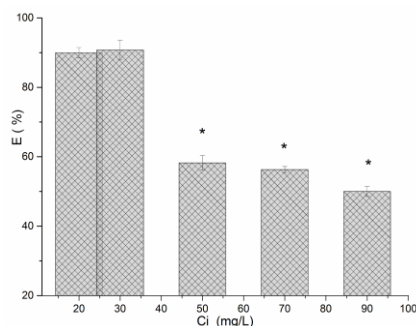


Fig. 13. Variația eficienței de fitoextracție a colorantului CV cu planta acvatică *Elodea canadensis* în funcție de concentrația inițială ($C_i = 20 - 90$ mg/L, $m_{\text{plant}} = 4$ g (FW), $V = 0.2$ L, $t = 23 \pm 2$ °C. Steluța * reprezintă diferențele semnificante la valori de $p \leq 0.05$)

Datele experimentale reflectă, că plantele acvatice au capacitatea de a tolera și de a îndepărta concentrații mari de coloranți ($C_i > 70 \text{ mg/L}$). Astfel odată cu scăderea eficienței de reținere o tendință de creștere are loc în capacitate de fitoextracție a plantelor acvatice. În contextul celor prezentate, putem conchide că plantele acvatice pot suferi de o saturație în timpul experimentelor la concentrații mai mari. In acest caz majoritatea grupărilor funcționale de pe suprafața și în interiorul plantelor sunt ocupate, limitând fitoextracția. Concentrația inițială a colorantului este o importantă forță motrică pentru a depăși rezistențele de transfer de masă între colorant și a suprafața de adsorbție în fază apoasă [45].

Influența pH-lui inițial

În general, pH-ul mediului are o influență majoră în mod direct asupra sistemelor vii afectând funcțiile lor biologice și biochimice, mobilitatea și disponibilitatea poluanților cât și asimilarea unor nutrienți esențiali [37, 38]. Eficiența procesului de fitoextracție a coloranților de CV și MG au fost studiate la diferite pH-uri inițiale în intervalul de pH între 2-9 în cazul CV și între valori de 2-7 în cazul MG. Rezultatele obținute ai plantei acvatice *Lemna minor* sunt prezentate în Tabelul 9.

Cea mai mare eficiență de îndepărtare a fost măsurată la valoarea pH-lui inițial de 8 în cazul colorant de CV și la pH inițial 7 în cazul colorantului de MG (Table 9). Astfel s-a observat că în urma determinărilor experimentale de fitoextracție, pH final al soluțiilor apoase este echilibrată la valoarea de pH 7 ($\pm 0,56$). Această comportare poate fi atribuită reacțiilor metabolice ale plantelor care implică consumul, producția sau transferul de protoni sau eliminări a unor produși de excreție ca și acizii oxalici, acetici, fumarici, citrici, acizii uronici și polizaharide în timpul proceselor de fitoremediere. Transportul activ sau pasiv a ionilor de H^+ , difuzarea acizilor slabi sau a bazelor slabe, schimbările de ioni și răspunsurile biochimice conduc la modificări de pH (pe ambele părți ale membranei celulare, extra- sau intracelular) [39] [40].

Tabel 9. Variația eficienței de fitoremediere în funcție de pH-ul inițial, în cazul plantei *Salvinia natans* (*Salvinia natans* $m_{\text{plant}} = 4$ g (FW), $C_i = 50$ mg/L, $V = 0.2$ L, $t = 23 \pm 2$ °C).

Dye	The initial pH of the dye solutions	The final pH of the dye solutions	Dye removal efficiency (E = %)
CV	3.09	6.52	68.054
	5.1	7.1	88.432
	7.02	7.33	88.316
	8.5	7.49	88.4737
	9.9	8.33	88.155
MG	3.06	3.8	28.84±5.6
	4	5.98	45.99 ±4.76
	5	6.63	69.03 ±3.69
	6	6.84	81.85±3.70
	7	7.26	85.28±2.61

Influența temperaturii

Influența temperaturii asupra procesului de fitoextracție a coloranților CV și MG folosind plante acvatice, au fost studiate la trei valori diferite de temperatură, în intervalul 5 - 40 °C, rezultatele obținute sunt prezentate în Fig. 15 în cazul speciei *Elodea canadensis*.

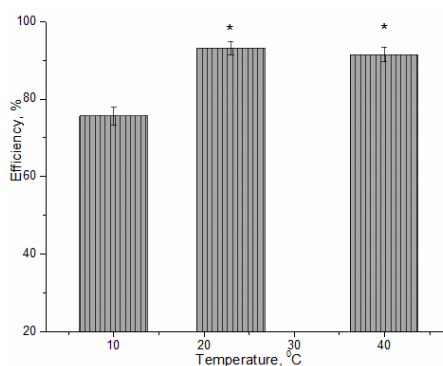


Fig. 15. Variația eficienței de fitoextracție a colorantului CV cu planta acvatică *Elodea canadensis* în funcție de temperatură ($m_{\text{plant}} = 4$ g (FW), $C_i = 30$ mg/L CV dye, $V = 0.2$ L).

Steluța * reprezintă diferențele semnificante la valori de $P \leq 0.05$)

Analizând rezultatele obținute se remarcă o tendință de micșorare nesemnificativă în eficiența procesului de fitoextracție, comparând cu rezultatul de la temperatura camerei. În cazul macrofitei submerse compoziția membranelor de plasmă se schimbă la temperaturi scăzută influentand permeabilitatea și asimilarea nutrienților sau al poluanților organici prin membrană. Așa cum era de așteptat, datele experimentale obținute reflectă că reținerea colorantului CV de plantele acvatice este optima la temperatura mediului ambiant (23°C). Aceste informații pot fi avantajoase din punct de vedere economic în vederea aplicării metodei la ape uzate industrial.

4.5. Analize spectrale

4.5.1. Studii spectroscopice FTIR

Rezultatele analizei spectrale de absorbție în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) s-au analizat prin comparare între spectrele plantelor martori și a celor tratate cu coloranți. Fig. 16. a. prezintă rezultatele obținute în cazul plantei *Lemna minor* cu colorantul CV.

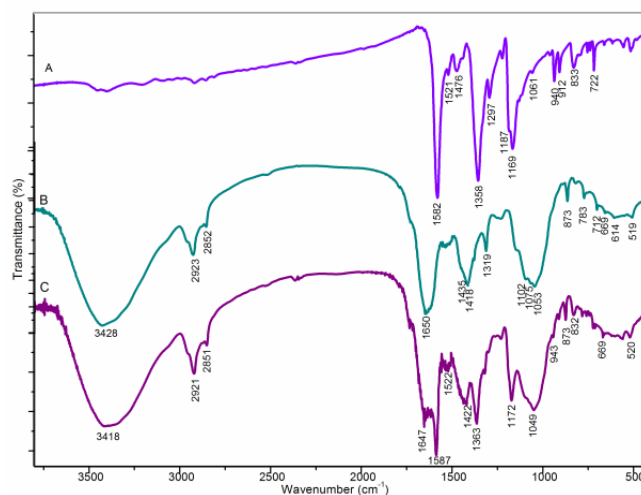


Fig.16. a). Analiza spectrală FTIR a bioaccumularii de CV în *Lemna minor*: CVmartor (A); *Lemna minor* martor (B); spectrul înregistrat din biomasa după experimentele de fitoextracție (C).

Analiza spectrelor a pus în evidență schimbările majore în cazul spectrul înregistrat din biomasa după experimentele de fitoextracție și s-a observat apariția unor noi benzi de vibrație la 1587, 1363 și 1172 cm⁻¹. Prezența noilor benzi de absorbție de la 1587 și 1363 cm⁻¹ sunt atribuite

benzilor de vibrație specifice al benzenului mono-substituit și para-disubstituit din structura colorantului. Banda de la numărul de undă de 1172 cm^{-1} indică vibrația de alungire a grupării C-N din structura aromatică. Apariția benzilor caracteristice a colorantului în spectrele pentru *Lemna minor* după experimentele de fitoextracție indică în mod clar fitoextracția și bioaccumularea colorantului din soluțiile apoase în plantă.

4.5.2. Spectroscopie de raze X cu energie dispersivă (EDS)

Spectroscopia cu energia dispersivă cu raze X (EDS- Jeol JEM 5510LV, Japonia) s-a folosit pentru analiza cantitativă relativă de elemente specifice din plantele acvatice în urma fitoextracției în comparație cu planta martor.

Din Tabel 11 se observă o variație în compoziția elementelor specifice a plantei acvatice după expunerea la soluția cu coloranți trifenilmetanici. S-a constatat o tendință de scădere semnificativă a ionilor de Na, Si, P, S, Cl, K, Fe și Cu după experimentele efectuate cu colorantul MG, și a ionilor Si și P în cazul tratamentelor cu CV. Aceste scăderi simultane de elemente ar putea sugera efectul stresului indus de coloranții trifenilmetanici în metabolismul plantei acvatice *Salvinia natans*.

Elementele P, S și K au un rol deosebit de important în metabolismul celulei vii cum ar fi activarea enzimelor, sinteza proteinelor, fotosinteza sau transferul de energie astfel având rol de contribuție în sistemele de apărare împotriva stresului biotic și abiotic [41-44]. Deficiența elementelor menționate pot avea efecte inhibitoare în creștere și pot induce scăderea activității fotosintetice în plante. [45]. Astfel, deficiența elementelor din plante acvatice pot fi explicate prin schimbările permeabilității membranelor celulei (eliberarea unor elemente în soluțiile apoase) și prin descompunerea țesuturilor moarte a plantei.

În contextul celor prezentate putem conchide că plantele acvatice aflate sub stresul abiotic indus de coloranți trifenilmetanici, prezintă o asimilare dezechilibrată a elementelor esențiale, provocând tulburări în distribuție și transportul intern a poluanților și mineralelor esențiale.

Table 11. Valorile cantitativă a elementelor specific din planta *Salvinia natans* martor în comparație cu valorile din planta după experimentele de fitoextracție a coloranșilor CV și MG. ($C_i = 100 \text{ mg/L}$, $V = 250 \text{ mL}$, $T = 23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, perioadă de fitoextracție 12 zile; steluța * reprezintă diferențele semnificante ai valori, $p \leq 0.05$).

Nr.	Elements	Wt (%) Content of the control plant	Wt (%) Content of the plant after the phytoextraction of MG	Wt (%) Content of the plant after the phytoextraction of CV
1	C	52.98 \pm 1.42	46.63 \pm 3.66	53.25 \pm 5.73
2	N	4.33 \pm 0.41	4.72 \pm 0.73	5.92 \pm 0.55*
3	O	28.31 \pm 1.79	32.23 \pm 1.85	25.21 \pm 2.04
4	Na	0.83 \pm 0.15	0.08 \pm 0.01*	0.37 \pm 0.07
5	Al	0.16 \pm 0.02	0.94 \pm 0.27	0.13 \pm 0.03
6	Si	2.44 \pm 0.67	7.17 \pm 0.65*	0.18 \pm 0.13*
7	P	1.90 \pm 0.17	0.45 \pm 0.11*	0.74 \pm 0.25*
8	S	1.40 \pm 0.26	0.24 \pm 0.11*	0.92 \pm 0.27
9	Cl	1.19 \pm 0.11	0.08 \pm 0.14*	4.5 \pm 2.16
10	K	3.07 \pm 0.52	0.23 \pm 0.07*	6.61 \pm 3.17
11	Ca	2.75 \pm 0.8	5.73 \pm 0.9	1.50 \pm 0.67
12	Fe	0.41 \pm 0.21	1.23 \pm 0.35*	0.43 \pm 0.31
13	Cu	0.26 \pm 0.11	0*	0.16 \pm 0.04

4.5.3 Microscopie electronică de baleiaj (SEM)

Suprafața plantei acvatice, *Salvinia natans* fost studiată pe baza unui microscop electronic de baleiaj (JEOL (USA) JSM 5510 LV SEM). Rezultatele obținute în cazul experimentelor de fitoextracție a colorantului MG folosind planta *Salvinia natans* este prezentată în Fig.19. S-a constatat că planta acvatică are o suprafață aspră, poroasă cu o structură fibroasă și eterogenă, care după procesul de fitoremediere devine saturată de moleculele colorantului MG.

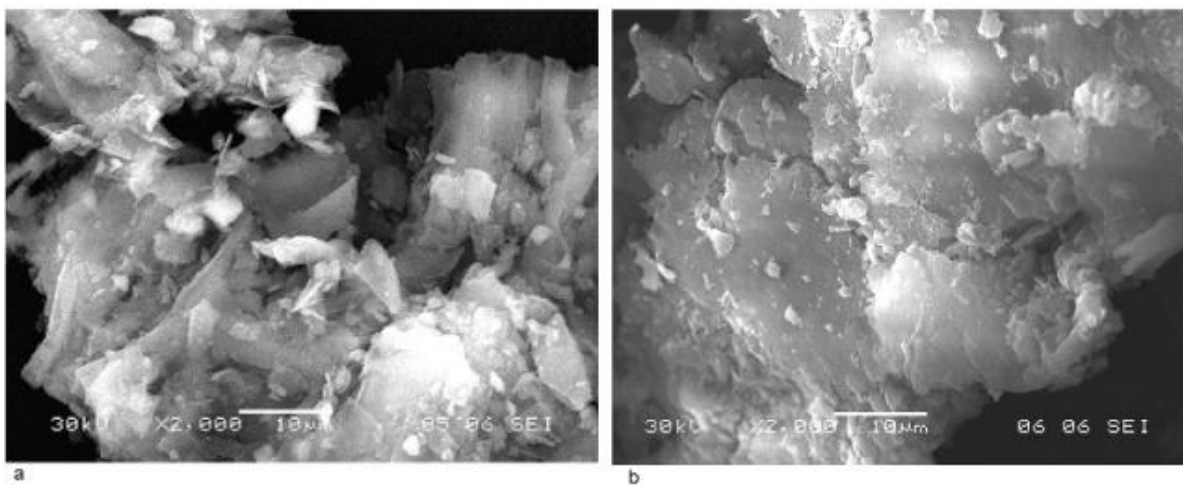


Fig. 19. Imaginistica SEM pentru *Salvinia natans*(a) martor și după experimentele de fitoextracție a colorantului de MG.

4.5.4. Spectroscopie UV-Vis

Pentru a analiza coloranții trifenilmetanici acumulați în plantele acvatice, acestea au fost „re-extrase” din plantele acvatice după experimentele de fitoextracție. Rezultatele sunt prezentate în Fig. 20. Rezultatele demonstrează că celulele plantei conțin coloranți într-o formă intactă, fără degradare. Benzile de absorbție la lungimile de undă specifice coloranților CV și MG sunt similare cu benzile ai coloranților martori.

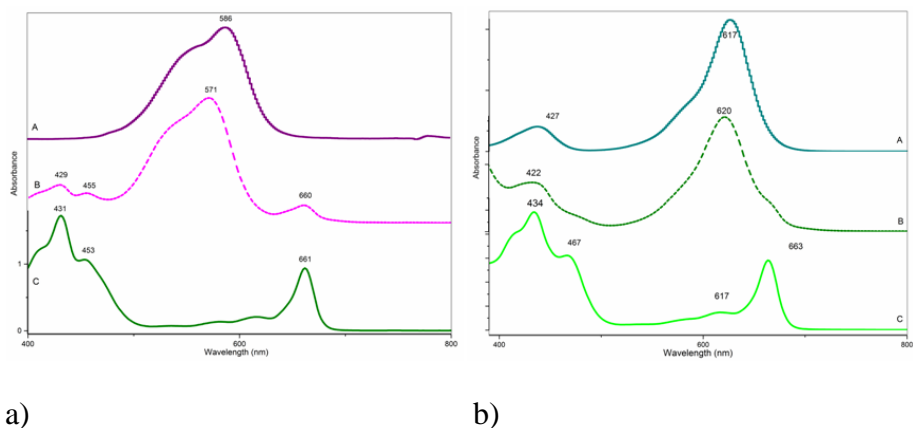


Fig. 20. Spectrele UV-Vis a coloranților CV a) și MG b) martori(A), coloranți fitoacumulate in Lemna minor (B), spectrul pentru planta acvatică martor (C)

4.5.5. Caracterizarea procesului de fitodegradare

Metoda de cromatografie în strat subțire (TLC) s-a folosit pentru a analiza producția de fitodegradare în timpul procesului de fitoextracție ai coloranților trifenilmetanici din soluții apoase. Rezultatele obținute sunt prezentate în Fig. 22 în cazul plantei acvatice *Salvinia natans*. Astfel rezultatele indică posibilitatea de fitodegradare ai coloranților trifenilmetanici.

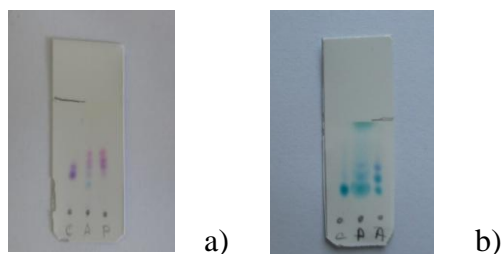


Fig. 22. Analiza TLC a coloranților matori (CV și MG) și a metabolizilor pron degradarea coloranților CV (a) și MG (b) după experimentele de fitoextracție, folosind planta *Salvinia natans*

4.5.6. Analiza pigmentilor fotosintetici

Efectele stresului indus de coloranți trifenilmetanici au fost caracterizați prin variația pigmentilor fotosintetici: clorofila a (Chl_a) și clorofila b (Chl_b), precum și a carotenoizilor totali (Car_{x+c} : xantofile și carotenoizi) ale plantelor acvatice. Rezultatele obținute sunt prezentate în

cazul plantei *Elodea canadensis* după experimentele de fitoextracție a colorantului CV (Fig. 24). Analizând rezultatele obținute se poate observa că concentrația pigmentilor fotosintetici se micșorează și sunt influențate negativ de concentrația inițială a colorantului CV utilizat, având o decesere semnificantă de 66% și 72% în cazul $C_i = 70$ mg/L și $C_i = 90$ mg/L.

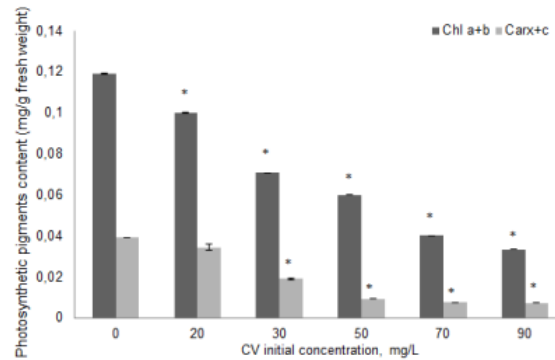


Fig. 24. Analiza cantitativă a pigmentilor fotosintetici după experimentele de fitoextracție a colorantului CV ($C_i = 20-90$ mg/L) în comparație cu planta martor (0).

5. Concluzii generale

Studii de fitoextracție a metalelor grele Cu, Zn, și Cd

S-a demonstrat posibilitatea de utilizare a următoarelor plante acvatice *Elodea canadensis*, *Eichhornia crassipes*, *Salvinia natans*, *Lemna minor*, și *Pistia stratiotes* în eliminarea metalelor grele Cu, Zn și Cd din soluții apoase mono și multimetalice prin metoda de fitoextracție.

- În sistemele monometalice cea mai mare capacitate de acumulare a metalelor grele s-a constatat la specia *Salvinia natans* (4.719 mg/g DW Cu, 2.236 mg/g DW Zn, și 1.901 mg/g DW Cd) și *Pistia stratiotes* (3,83 mg/g DW de Cu , 2.069 mg/g DW Zn și 1.704 mg/g DW Cd). Rezultatele au demonstrat că natura plantei acvatice joacă un rol important în procesul de fitoacumulare a metalelor grele.

- În cazul sistemelor multimetalice s-au observat efecte sinergetice în acumularea metalelor grele. S-a constatat o tendință de creștere în capacitatea de fitoacumulare a cadmiului la speciile *Eichhornia crassipes* și *Pistia stratiotes* (3,97 mg/g DW, și 4,17 mg/g DW de Cd, care sunt de 2 ori și de 2.5 ori mai mari față de rezultatele în sisteme monometalice). *Lemna minor* a acumulat cu 7 ori mai mult Cu, de 11 ori mult Zn și de 4,5 ori mai mult Cd (10,81 mg/g DW la Cu, 4,89 mg/g DW la Zn, 2.784 mg/g DW la Cd), comparând cu rezultatele din sistemele monometalice. În cazul *Salvinia natans* și *Elodea canadensis* acumularea metalelor în sistem multimetalic nu a prezentat aceeași tendință de creștere, numai acumularea de Zn în cazul *Elodea canadensis* și de Cd a crescut în timpul acestor tratamente.

- Rezultatele obținute demonstrează că bioacumularea metalelor grele nu e repartizată proportional în părțile vegetative, metalele grele sunt fitoacumulate în concentrații mai mari în rădăcini (70%). O excepție sunt ioni de Cu, care au fost acumulați în concentrații mai mari în frunzele din planta *Pistia stratiotes* (valoare cu 46.5% mai mare decât concentrațiile din rădăcini).

- S-a demonstrat că acumularea metalelor grele activează diverse mecanisme de protecție în plantele acvatice. Plantele reacționează la efectul stresului indus prin mai multe procese biochimice care sunt considerate "indicatori" a stresului abiotic.

- Metalele grele au o influență negativă asupra cantității pigmentilor fotosintetici (clorofila a, b și carotenoidelor). După experimentele de fitoextracție în sisteme multimetalice s-a constatat o tendință de deșcreștere în cazul speciilor *Pistia stratiotes* și *Eichhornia crasipes* (descreștere cu 84.3% în Chl_a, 75.2% în Chl_b, 92% Car_{x+c} la *Pistias stratiotes* iar cu 89.6% în Chl_a, 87.% în Chl_b, 39.9% în Car_{x+c} în cazul *Eichhornia crassipes*).
- Acumularea metalelor grele din soluții mono- precum și multimetalice conduc la schimbări de concentrație a proteinelor totale din plantele acvatice. Astfel s-a constatat două tipuri de răspunsuri ale plantelor acvatice: sinteza unor noi proteine, care ar reprezenta o modalitate de adaptare sau supraviețuire la condițiile de stres la speciile *Salvinia natans* și *Lemna minor*; sau degradarea proteinelor existente care reprezintă efectul negativ al metalelor grele și inhibarea proceselor vitale la specia *Elodea canadensis*.
- Rezultatele obținute în cazul dozării acidului ascorbic și al acidului dehidroascorbic (AsA și DHA) din plantele acvatice, prezintă o tendință de creștere al AsA și DHA după experimentele de fitoextracție la *Salvinia natans* și *Lemna minor*, indicând astfel activarea proceselor de apărare la stresul oxidativ pentru aceste specii.
- Un alt aspect important pentru a determina efectul metalelor grele, a fost analiza compușilor tiolici: cisteină (Cys), cistin (cystine), cisteinil-glicină (Cys-Gly), γ -glutamil-cisteină (γ -Glu-Cys); glutation (GSH), bisulfură de glutation/disulfid glutation (GSSG), bis- γ -glutamil-cisteină (bis- γ -Glu-Cys), cistinil-bis-glicină (Cys-bis-Gly), și dozarea fitochelatinei (PCs) și determinarea activității enzimelor fitochelatinice (PCS). S-a observat în cazul *Lemna minor* o tendință de creștere în cistină, Cys, și GSSG care a fost atribuită mecanismului de apărare a plantei la stresul abiotic.
- Rezultate remarcabile au fost obținute în cazul analizei cantitative a fitochelatinelor (PC). Au fost identificate două tipuri de fitochelatine: PC₂ și PC₃ din speciile *Salvinia natans* și *Elodea canadensis*. Pe de o altă parte, s-a constatat apariția unor noi PC-urile cu grad mai ridicat de polimerizare în cazul plantei acvatice *Lemna minor* după experimentele de fitoextracție ale soluțiilor mono- și multimetalice. Prezența acestor noi fitochelatine: PC₄, PC₆ și PC₇ au fost atribuite efectului toxic al cadmiului, fitochelatinele sunt cunoscute ca chelatori de metale grele având rol important în complexarea, transportarea și depozitarea metalelor grele în celule vegetale.

Studii de fitoremediere a coloranților trifenilmetanici

Plantele acvatice *Elodea canadensis*, *Salvinia natans* și *Lemna minor* au fost selectate pentru studiile de fitoextracție a coloranților cristal violet (CV) și verde malachit (MG) din soluții apoase. Procesul de fitoextracție a fost caracterizat prin determinarea eficienței și capacității procesului.

- S-au obținut condițiile optime de fitoextracție, prin studiul influenței următorilor parametri: efectul biomasei; efectul concentrațiilor inițiale ai coloranților; efectul pH-lui inițial și efectul temperaturii.
 - S-a constatat un efect benefic asupra eficienței de îndepărtare prin creșterea cantității de plantă: cea mai mare eficiență de îndepărtare a fost obținută la 3 și 4 g de plante în stare proaspătă (folosind $C_i = 100$ mg/L al coloranților CV și MG la *Lemna minor*; $C_i = 50$ mg/L de coloranți în cazul *Salvinia natans*, și $C_i = 30$ mg/L de coloranți la *Elodea canadensis*).
 - Cea mai mare capacitate de reținere a fost atinsă la concentrații inițiale mai mari (la $C_i = 90$ mg/L, folosind *Elodea canadensis*, $C_i = 120$ mg/L folosind *Salvinia natans*, și la $C_i = 300$ mg/L folosind *Lemna minor*).
 - Rezultatele prezentate subliniază faptul că natura plantelor acvatice au un rol important în fitoremediere, având diferite capacități și eficiență de reținere asupra coloranților trifenilmetanici. Astfel, s-a observat că specia *Lemna minor* este mai potrivită pentru îndepărtarea coloranților trifenilmetanici din soluții apoase, ceea ce s-a explicat prin proprietățile morfologice și fiziologice a plantei.
 - Eficiența procesului de fitoextracție a coloranților de CV și MG au fost studiate la diferite pH-uri inițiale în intervalul de 2 - 9 în cazul CV și între valori de 2 - 7 în cazul MG. Astfel s-a observat că în urma determinărilor experimentale de fitoextracție pH final al soluțiilor apoase este echilibrat la valoarea de pH 7. Această comportare poate fi explicată prin reacții metabolice ale plantelor și anume consumul, producția sau transferul de protoni sau eliminări produsilor de excreție în soluțiile apoase.
 - S-a constatat la studiul influenței de temperatură că procesul de fitoextracție cu cea mai mare eficiență de îndepărtare a coloranților trifenilmetanici au fost efectuate la temperaturile camerei (23 ± 3 °C).

Analize spectrale

- Rezultatele analizei FTIR indică în mod direct bioacumularea coloranților trifenilmetanici a plantelor acvatice. Apariția noilor benzi de absorbție apărute în spectrele plantelor după fitoextracție sunt atribuite benzilor specifice a coloranților CV și MG în domeniul $2000 - 1000 \text{ cm}^{-1}$.
- Rezultatele analizelor spectroscopice UV-Vis și FTIR indică că plantele acvatice au capacitatea de fitoacumulare a moleculelor de CV și MG în formă intactă. Analiza TLC sugerează posibilitatea de degradare a coloranților trifenilmetanici în rizosferă în timpul fitoremedierii.
- Analizele EDS precum și dozarea pigmentilor fotosintetici reflectă schimbări majore în compoziția elementală și în conținutul de Chl_a , Chl_b precum și în Car_{x+c} indicând impactul stresului abiotic. Astfel capacitatea de reținere a plantelor acvatice sunt asociate cu efectele negative asupra proceselor biochimice are loc dereglarea proceselor metabolice.
- Suprafața plantelor acvatice au fost caracterizate prin tehnici microscopice electronice avansate (SEM). Rezultatele prezintă că suprafața plantelor suferă modificări morfologice în cursul experimentelor de fitoextracție.

Modele ale izotermelor de adsorbție și studii cinetice pentru descrierea procesului de fitoextracție

- Pentru modelarea cinetică a procesului de fitoextracție a colorantului CV și MG din soluții apoase folosind plantele acvatice *Elodea canadensis* și *Salvinia natans*, s-au utilizat modelele cinetice: modelul cinetic de ordin pseudo-unu și modelul cinetic de ordin pseudo-doi. S-a constatat că în ambele cazuri procesul de reținere a coloranților CV și MG este descris de modelul cinetic de ordin pseudo-doi, demonstrând că procesul de fitoextracție se desfășoară prin interacție chimică.
- Modelarea izotermelor de adsorbție obținute experimental după fitoextracția colorantului CV folosind planta *Elodea canadensis* și a colorantului MG utilizând specia *Salvinia natans*, s-a făcut cu ajutorul modelelor Freundlich, Langmuir, Dubinin-Radushkevich și Temkin. Rezultatele obținute au arătat că în cazul speciilor *Salvinia natans* și *Elodea*

canadensis toate cele trei modele sunt adecvate pentru descrierea procesului de fitoextracție pentru ambii coloranți trifenilmetanici.

- S-a constatat după modelul Dubinin-Radushkevich că experimentele de fitoextracție a colorantului CV are loc predominant prin interacțiuni chimice între ionii pozitivi și grupările funcționale disociate de pe suprafața plantelor acvatice.

Rezultatele obținute în teza de doctorat demonstrează ca plantele acvatice sunt biofiltre promițătoare pentru reținerea metalelor grele și pot fi utilizate în viitor în procesele de tratare a apelor uzate. Analiza stresului abiotic indus a arătat schimbările cantitative a unor indicatori biochimici importanți, care oferă informații importante despre modul de adaptare și apărare plantelor.

Bibliografie (selectată)

- [1] Maystre JSaLY. ENVIRONMENTAL POLLUTION CONTROL AND PREVENTION. In: Edition F, editor. Encyclopaedia of Occupational Health and Safety.
- [2] Das S, Dash HR. Microbial Bioremediation. 2014:1-21.
- [3] Gouma S, Fragoeiro S, Bastos AC, Magan N. Bacterial and Fungal Bioremediation Strategies. 2014:301-23.
- [4] Poonam, Bhardwaj R, Sharma R, Handa N, Kaur H, Kaur R, et al. Prospects of Field Crops for Phytoremediation of Contaminants. 2014:449-70.
- [5] Ali H, Khan E, Sajad MA. Phytoremediation of heavy metals--concepts and applications. Chemosphere 2013;91:869-81.
- [6] Dinh NT, Vu DT, Mulligan D, Nguyen AV. Accumulation and distribution of zinc in the leaves and roots of the hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*. Environmental and Experimental Botany 2015;110:85-95.
- [7] Saison C, Schwartz C, Morel JL. Hyperaccumulation of metals by *Thlaspi caerulescens* as affected by root development and Cd-Zn/Ca-Mg interactions. International journal of phytoremediation 2004;6:49-61.
- [8] Sood A, Uniyal PL, Prasanna R, Ahluwalia AS. Phytoremediation potential of aquatic macrophyte, *Azolla*. Ambio 2012;41:122-37.
- [9] Rocha AC, Almeida CM, Basto MC, Vasconcelos MT. Antioxidant response of *Phragmites australis* to Cu and Cd contamination. Ecotoxicology and environmental safety 2014;109:152-60.
- [10] Ye ZH, Baker AJM, Wong MH, Willis AJ. Copper tolerance, uptake and accumulation by *Phragmites australis*. Chemosphere 2003;50:795-800.
- [11] Bragato C, Schiavon M, Polese R, Ertani A, Pittarello M, Malagoli M. Seasonal variations of Cu, Zn, Ni and Cr concentration in *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex steudel in a constructed wetland of North Italy. Desalination 2009;246:35-44.
- [12] Klink A, Macioł A, Wisłocka M, Krawczyk J. Metal accumulation and distribution in the organs of *Typha latifolia* L. (cattail) and their potential use in bioindication. Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters 2013;43:164-8.

- [13] Sasmaz A, Obek E, Hasar H. The accumulation of heavy metals in *Typha latifolia* L. grown in a stream carrying secondary effluent. *Ecological Engineering* 2008;33:278-84.
- [14] Memon AR, Schroder P. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environmental science and pollution research international* 2009;16:162-75.
- [15] Dhir B, Srivastava S. Heavy metal tolerance in metal hyperaccumulator plant, *Salvinia natans*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 2013;90:720-4.
- [16] Lichtenthaler HK. [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. 1987;148:350-82.
- [17] Lichtenthaler HK, Buschmann, Claus Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by Uv-VIS spectroscopy In: Wrolstad RE AT, An H, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Sporns P, editor. *Current protocols in food analytical chemistry (CPFA)*. New York: John Wiley& Sons; 2001. p. p. F4.3.1-F4.3.8.
- [18] Hegazy AK, Kabil HF, Fawzy M. Duckweed as heavy metal accumulator and pollution indicator in industrial wastewater ponds. *Desalination and Water Treatment* 2012;12:400-6.
- [19] Kieffer P, Dommes J, Hoffmann L, Hausman JF, Renaut J. Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *Proteomics* 2008;8:2514-30.
- [20] Wang W, Vignani R, Scali M, Cresti M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis* 2006;27:2782-6.
- [21] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-54.
- [22] Horvat T, Vidakovic-Cifrek Z, Orescanin V, Tkalec M, Pevalek-Kozlina B. Toxicity assessment of heavy metal mixtures by *Lemna minor* L. *The Science of the total environment* 2007;384:229-38.
- [23] Larras F, Regier N, Planchon S, Pote J, Renaut J, Cosio C. Physiological and proteomic changes suggest an important role of cell walls in the high tolerance to metals of *Elodea nuttallii*. *Journal of hazardous materials* 2013;263 Pt 2:575-83.
- [24] Malec P, Maleva M, Prasad MN, Strzalka K. Copper toxicity in leaves of *Elodea canadensis* Michx. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 2009;82:627-32.

- [25] Wu FB, Chen F, Wei K, Zhang GP. Effect of cadmium on free amino acid, glutathione and ascorbic acid concentrations in two barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.) differing in cadmium tolerance. *Chemosphere* 2004;57:447-54.
- [26] Waškiewicz A, Beszterda M, Goliński P. Nonenzymatic Antioxidants in Plants. 2014:201-34.
- [27] Jozefczak M, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *International journal of molecular sciences* 2012;13:3145-75.
- [28] Waškiewicz A, Gładysz O, Szentner K, Goliński P. Role of Glutathione in Abiotic Stress Tolerance. 2014:149-81.
- [29] Liu X, Zhang S, Whitworth RJ, Stuart JJ, Chen MS. Unbalanced Activation of Glutathione Metabolic Pathways Suggests Potential Involvement in Plant Defense against the Gall Midge *Mayetiola destructor* in Wheat. *Scientific reports* 2015;5:8092.
- [30] Szalai G, Janda T, Pal M. Routine sample preparation and HPLC analysis for ascorbic acid (vitamin C) determination in wheat plants and *Arabidopsis* leaf tissues. *Acta biologica Hungarica* 2014;65:205-17.
- [31] Buta E, Török A, Zongo B, Cantor M, Buta M, Majdik C. Comparative Studies of the Phytoextraction Capacity of Five Aquatic Plants in Heavy Metal Contaminated Water. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 2014;42.
- [32] Kranner I, Grill D. Determination of Glutathione and Glutathione Disulphide in Lichens: a Comparison of Frequently Used Methods. *Phytochemical Analysis* 1996;7:24-8.
- [33] Kocsy G, Szalai G, Vagujfalvi A, Stehli L, Orosz G, Galiba G. Genetic study of glutathione accumulation during cold hardening in wheat. *Planta* 2000;210:295-301.
- [34] Chen JJ, Zhou JM, Goldsbrough PB. Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiol Plantarum* 1997;101:165-72.
- [35] Szalai G. Influence of salicylic acid on phytochelatin synthesis in maize during Cd stress. *Turkish Journal of Botany* 2013.

- [36] Csog A, Mihucz VG, Tatar E, Fodor F, Virag I, Majdik C, et al. Accumulation and distribution of iron, cadmium, lead and nickel in cucumber plants grown in hydroponics containing two different chelated iron supplies. *Journal of plant physiology* 2011;168:1038-44.
- [37] Vafaei F, Movafeghi A, Khataee A. Evaluation of antioxidant enzymes activities and identification of intermediate products during phytoremediation of an anionic dye (C.I. Acid Blue 92) by pennywort (*Hydrocotyle vulgaris*). *Journal of Environmental Sciences* 2013;25:2214-22.
- [38] Owen HR, Wengerd D, Miller AR. Culture-Medium Ph Is Influenced by Basal Medium, Carbohydrate Source, Gelling Agent, Activated-Charcoal, and Medium Storage Method. *Plant Cell Reports* 1991;10:583-6.
- [39] Bligny R, Gout E, Kaiser W, Heber U, Walker D, Douce R. pH regulation in acid-stressed leaves of pea plants grown in the presence of nitrate or ammonium salts: studies involving ³¹P-NMR spectroscopy and chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1997;1320:142-52.
- [40] Felle HH. pH regulation in anoxic plants. *Annals of botany* 2005;96:519-32.
- [41] Amtmann A, Troufflard S, Armengaud P. The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiologia plantarum* 2008;133:682-91.
- [42] Wang M, Zheng Q, Shen Q, Guo S. The critical role of potassium in plant stress response. *International journal of molecular sciences* 2013;14:7370-90.
- [43] Wang M, Shen Q, Xu G, Guo S. New insight into the strategy for nitrogen metabolism in plant cells. *International review of cell and molecular biology* 2014;310:1-37.
- [44] Li Y, Zhang J, Zhang X, Fan H, Gu M, Qu H, et al. Phosphate transporter OsPht1;8 in rice plays an important role in phosphorus redistribution from source to sink organs and allocation between embryo and endosperm of seeds. *Plant Science* 2015;230:23-32.
- [45] Zhao D, Reddy KR, Kakani VG, Reddy VR. Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis, and hyperspectral reflectance properties of sorghum. *European Journal of Agronomy* 2005;22:391-403.