

UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI”
DIN CLUJ-NAPOCA

Facultatea de Știința și Ingineria Mediului

**CONTRIBUȚII PRIVIND INFLUENȚA
ANTIBIOTICELOR ASUPRA UNOR
FACTORI DE MEDIU**

- REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT -

Conducător de doctorat:

Prof. Univ. Dr. Dumitru Ristoiu

Doctorand:

Ocsana-Ileana Axuc (Opriș)

CLUJ-NAPOCA - 2012



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMFOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRU



UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI"
DIN IASI



UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI”
DIN CLUJ-NAPOCA

Facultatea de Știința și Ingineria Mediului



CONTRIBUȚII PRIVIND INFLUENȚA ANTIBIOTICELOR ASUPRA UNOR FACTORI DE MEDIU

- REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT -

Conducător de doctorat:

Prof. Univ. Dr. Dumitru Ristoiu

Doctorand:

Ocsana-Ileana Axuc (Opriș)

CLUJ-NAPOCA - 2012



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI"
DIN IAȘI

Teza de doctorat a fost realizată cu sprijinul financiar al proiectului „Burse Doctorale pentru Performanța în Cercetare la Nivel European (EURODOC)”.

Proiectul „Burse Doctorale pentru Performanța în Cercetare la Nivel European (EURODOC)”, POSDRU/88/1.5/S/59410, ID 59410, este un proiect strategic care are ca obiectiv general „Dezvoltarea capitalului uman pentru cercetare prin programe doctorale pentru îmbunătățirea participării, creșterii atractivității și motivației pentru cercetare. Dezvoltarea la nivel european a tinerilor cercetători care să adopte o abordare interdisciplinară în domeniul cercetării, dezvoltării și inovării”.

Proiect finanțat în perioada 2009 - 2012.

Finanțare proiect: 18.943.804,97 RON

Beneficiar: Universitatea Tehnică “Gheorghe Asachi” din Iași

Partener: Universitatea „Babeș Bolyai” din Cluj-Napoca

Director proiect: Prof. univ. dr. ing. Mihaela-Luminița LUPU

Responsabil proiect partener: Prof. univ. dr. ing. Alexandru OZUNU



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRU



UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI"
DIN IAȘI

Mulțumiri

Adresez mulțumiri domnului Prof. Dr. Dumitru Ristoiu, conducătorul științific al tezei de doctorat, pentru competența, îndrumarea științifică, observațiile și sprijinul acordat pe tot parcursul pregătirii acesteia.

Sincere mulțumiri și deosebită recunoștință adresez doamnei Dr. Virginia Coman de la Institutul de Cercetări în Chimie „Raluca Ripan” pentru discuțiile utile și încurajările acordate pe tot parcursul pregătirii tezei de doctorat, precum și pentru asigurarea materialelor și a dispozitivelor necesare pentru buna desfășurare a cercetărilor din cadrul prezentului studiu.

Mulțumesc domnilor Dr. Lucian Copolovici și Prof. Dr. Ülo Niinemets de la Estonian University of Life Sciences, Institute of Agricultural and Environmental Sciences, Tartu, Estonia, pentru sprijinul și îndrumările științifice acordate pe perioada stagiului extern de cercetare realizat în cadrul acestui institut.

Mulțumesc doamnelor Dr. Mihaela Vlassa, Dr. Miuța Filip și domnului Dr. Ștefan Kreibik (Institutul de Cercetări în Chimie „Raluca Ripan”), doamnelor Dr. Loredana Soran și Codruța Varodi (Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Tehnologii Izotopice și Moleculare), Dr. Dorina Podar (Facultatea de Biologie și Geologie), Dr. Carmen Roba (Facultatea de Știința și Ingineria Mediului) pentru îndrumarea de specialitate în domeniile de cercetare care au fost abordate în prezenta teză.

Adresez mulțumiri domnului Lect. Dr. Simion Beldean-Galea de la Facultatea de Știința și Ingineria Mediului pentru discuțiile și furnizarea de informații utile pe perioada studiului de doctorat.

Mulțumesc tuturor colegilor de la Facultatea de Știința și Ingineria Mediului pentru încurajările și sfaturile colegiale acordate pe parcursul elaborării tezei de doctorat.

Mulțumesc echipei manageriale care a realizat Proiectul EURODOC „Burse doctorale pentru performanță de cercetare la nivel european”, ID 59410, proiect finanțat de Fondul Social European al cărui beneficiar am fost în perioada elaborării prezentei teze de doctorat.

Nu în ultimul rând mulțumesc familiei mele și îndeosebi soțului meu pentru răbdarea, înțelegerea și susținerea acordate pe toată perioada studiului de doctorat.

Noiembrie, 2012

CUPRINS

INTRODUCERE. IMPORTANȚA ȘI ACTUALITATEA SUBIECTULUI ABORDAT 1

PARTEA I. NOȚIUNI TEORETICE

Capitolul 1. Antibioticele	5
1.1. Generalități despre antibiotice	5
1.1.1. Definiția antibioticelor	5
1.1.2. Clasificările antibioticelor	6
1.1.3. Utilizările antibioticelor	10
1.2. Antibioticele și mediul înconjurător	11
1.2.1. Principalele surse de poluare ale mediului înconjurător cu antibiotice	11
1.2.2. Măsuri de prevenire a contaminării mediului înconjurător cu antibiotice	14
Capitolul 2. Tehnici de pregătire și analiză utilizate pentru determinarea conținutului de antibiotice din diferite probe	15
2.1. Prelevarea, conservarea și stocarea probelor de apă	16
2.2. Parametrii fizico-chimici ai probelor de apă	18
2.3. Tehnici de extracție utilizate pentru izolarea/concentrarea antibioticelor din diferite probe	19
2.3.1. Extracția pe fază solidă	20
2.4. Tehnici de analiză utilizate pentru determinarea conținutului de antibiotice din diferite probe	23
2.4.1. Cromatografia. Generalități	24
2.4.1.1. Cromatografia pe strat subțire	29
2.4.1.2. Cromatografia de lichide de înaltă performanță	32
Capitolul 3. Ecotoxicologia antibioticelor	41
3.1. Influența antibioticelor asupra algelor	42
3.2. Influența antibioticelor asupra plantelor	43

PARTEA A II-A. CONTRIBUȚII ORIGINALE

Capitolul 4. Cercetări privind elaborarea de proceduri pentru determinarea conținutului de antibiotice din probe de apă de suprafață și probe de apă reziduală	47
4.1. Antibioticele luate în studiu și principalele caracteristici	48
4.2. Analiza antibioticelor din probe de apă de suprafață utilizând tehnica cromatografiei pe strat subțire de înaltă performanță (HPTLC)	53
4.2.1. Izolarea/concentrarea antibioticelor din matrici lichide utilizând tehnica extracției pe fază solidă (SPE)	53
4.2.2. Analiza calitativă și cantitativă a antibioticelor utilizând tehnica HPTLC	56
4.2.3. Studii privind validarea procedurii SPE-HPTLC	58
4.2.4. Determinarea conținutului de antibiotice din probe de apă de suprafață utilizând procedura SPE-HPTLC	69
4.2.5. Concluzii privind analiza antibioticelor din probe de apă de suprafață utilizând procedura SPE-HPTLC	71
4.3. Caracterizarea fizico-chimică a unor probe de apă reziduală. Analiza conținutului de antibiotice utilizând tehnica cromatografiei de lichide de înaltă performanță (HPLC)	72

4.3.1. Caracterizarea fizico-chimică a unor probe de apă reziduală	72
4.3.1.1. Determinarea parametrilor fizico-chimici ai unor probe de apă reziduală. Modul de lucru	73
4.3.1.2. Rezultate și discuții privind parametrii fizico-chimici ai unor probe de apă reziduală	74
4.3.1.3. Concluzii privind parametrii fizico-chimici ai unor probe de apă reziduală	84
4.3.2. Analiza antibioticelor din probe de apă reziduală utilizând tehnica cromatografiei de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrofotometria cu serie de fotodiode cu baleiaj complet și cu spectrometria de masă (HPLC-DAD/MS)	85
4.3.2.1. Izolarea/concentrarea antibioticelor din matrici lichide utilizând tehnica SPE	85
4.3.2.2. Analiza calitativă și cantitativă a antibioticelor utilizând tehnica HPLC-DAD/MS	87
4.3.2.3. Studii privind liniaritatea, limitele de detecție și de cuantificare, precizia și acuratețea procedurii SPE-HPLC-DAD/MS	92
4.3.2.4. Determinarea conținutului de antibiotice din probe de apă reziduală utilizând procedura SPE-HPLC-DAD/MS	99
4.3.2.5. Concluzii privind analiza antibioticelor din probe de apă reziduală utilizând procedura SPE-HPLC-DAD/MS	103
Capitolul 5. Cercetări privind influența antibioticelor asupra algelor verzi (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> L.) și asupra plantelor de grâu (<i>Triticum aestivum</i> L.)	105
5.1. Antibioticele luate în studiu și principalele caracteristici	105
5.2. Cercetări privind influența antibioticelor asupra densității celulare a algelor verzi (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> L.)	107
5.2.1. Algele verzi (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> L.), condițiile de creștere și tratamentele cu antibiotice. Modul de lucru	107
5.2.2. Rezultate și discuții privind influența antibioticelor asupra densității celulare a algelor	112
5.2.3. Concluzii privind influența antibioticelor asupra densității celulare a algelor	117
5.3. Cercetări privind influența antibioticelor asupra plantelor de grâu (<i>Triticum aestivum</i> L.)	117
5.3.1. Plantele de grâu (<i>Triticum aestivum</i> L.), condițiile de creștere și stresul abiotic indus de antibiotice. Modul de lucru	118
5.3.2. Influența antibioticelor asupra parametrilor fotosintetici ai plantelor de grâu	120
5.3.2.1. Determinarea parametrilor fotosintetici ai plantelor de grâu. Modul de lucru	120
5.3.2.2. Rezultate și discuții privind influența antibioticelor asupra parametrilor fotosintetici ai plantelor de grâu	121
5.3.2.3. Concluzii privind influența antibioticelor asupra parametrilor fotosintetici ai plantelor de grâu	124
5.3.3. Emisiile de compuși organici volatili din plantele de grâu tratate cu antibiotice	124
5.3.3.1. Captarea și analiza compușilor organici volatili emiși de plantele de grâu. Modul de lucru	125
5.3.3.2. Rezultate și discuții privind emisiile de compuși organici volatili din plantele de grâu tratate cu antibiotice	127
5.3.3.3. Concluzii privind emisiile de compuși organici volatili din plantele de grâu tratate cu antibiotice	130

5.3.4. Influența antibioticelor asupra pigmentilor asimilatori din plantele de grâu	130
5.3.4.1. Extracția și analiza pigmentilor asimilatori din plantele de grâu. Modul de lucru ..	130
5.3.4.2. Rezultate și discuții privind influența antibioticelor asupra pigmentilor asimilatori din plantele de grâu	133
5.3.4.3. Concluzii privind influența antibioticelor asupra pigmentilor asimilatori din plantele de grâu	138
5.3.5. Influența antibioticelor asupra conținutului total de flavonoide din plantele de grâu	139
5.3.5.1. Optimizarea metodei de extracție și analiza conținutului total de flavonoide din plantele de grâu. Modul de lucru	139
5.3.5.2. Rezultate și discuții privind influența antibioticelor asupra conținutului total de flavonoide din plantele de grâu	143
5.3.5.3. Concluzii privind influența antibioticelor asupra conținutului total de flavonoide din plantele de grâu	144
CONCLUZII	145
BIBLIOGRAFIE	149
ANEXA I. ABREVIERI	167
ANEXA II. LISTA PUBLICAȚIILOR REZULTATE ÎN URMA TEZEI	169

În rezumatul tezei de doctorat sunt prezentate o parte din rezultatele cercetărilor experimentale proprii, concluziile și bibliografia selectivă. La redactarea rezumatului au fost păstrate aceleași notații pentru capitole, figuri și tabele utilizate în textul tezei de doctorat.

CUVINTE CHEIE: *antibiotice, extracție pe fază solidă, cromatografie de lichide, Pseudokirchneriella subcapitata L., densitate celulară, Triticum aestivum L., parametri fotosintetici, pigmenți asimilatori, compuși organici volatili, flavonoide.*

INTRODUCERE

IMPORTANȚA ȘI ACTUALITATEA SUBIECTULUI ABORDAT

Compușii de interes din cadrul studiului de doctorat sunt antibioticele, medicamente care sunt extrem de utilizate atât în medicină cât și în domeniile conexe. Din punct de vedere chimic, antibioticele sunt substanțe organice foarte variate, care sunt produse de microorganisme sau sunt obținute prin sinteză și semisinteză. În doze foarte mici, antibioticele inhibă dezvoltarea microorganismelor patogene sau pot conduce chiar la distrugerea lor (Choma, 2004; Oniscu, 1988).

Antibioticele au fost detectate în diverse compartimente ale mediului înconjurător precum ape de suprafață, ape subterane, ape potabile, soluri și ape reziduale (Seifrtová et al., 2009). Datorită ineficienței proceselor de epurare, stațiile de epurare ale apelor reziduale și apele reziduale generate de spitale contribuie major la prezența produselor farmaceutice în mediul înconjurător. Astfel, aceste categorii de ape reziduale pot ajunge mai departe în apele subterane și de suprafață, conducând la potențiale riscuri pentru organismele acvatice. Interesul pentru persistența și evoluția antibioticelor în mediul înconjurător este datorat faptului că acestea pot favoriza creșterea rezistenței bacteriilor patogene. Administrarea antibioticelor la animale (drept promotori de creștere) a fost asociată cu creșterea îngrijorătoare a rezistenței la antibiotice, care poate conduce la un potențial impact și asupra sănătății umane, precum și la adsorbția lor pe sedimente și sol (Seifrtová et al., 2009).

Pentru prevenirea rezistenței la antibiotice sunt necesare atât un control riguros al consumului acestora, cât și monitorizarea, evoluția și eliminarea din mediul înconjurător. Datorită rezistenței tot mai crescute a organismului uman la tratamentele cu antibiotice, a multiplelor efecte adverse pe care le pot cauza, precum și a faptului că la nivel național sunt puține studii care vizează acest subiect, problematica antibioticelor este de mare actualitate. Astfel, importanța temei alese „*Contribuții privind influența antibioticelor asupra unor factori de mediu*” este evidentă, deoarece în cantități mici și prin aport îndelungat, antibioticele pot avea efecte negative atât asupra mediului înconjurător, cât și asupra omului.

Datorită aspectelor menționate, prin acest studiu de doctorat s-a urmărit aducerea de contribuții privind elaborarea de proceduri pentru determinarea antibioticelor din probe de apă de suprafață și probe de apă reziduală, precum și evidențierea influențelor negative ale acestora asupra algelor verzi (*Pseudokirchneriella subcapitata* L.) și asupra plantelor de grâu (*Triticum aestivum* L.). Pentru realizarea acestor cercetări au fost selectate nouă antibiotice care aparțin la cinci clase diferite: peniciline (amoxicilină, ampicilină și penicilină G), cefalosporine (ceftazidimă și ceftriaxonă), tetraciclone (tetraciclina și doxiciclina), fluorochinolone (ciprofloxacina) și macrolide (eritromicina).

Prezenta teză de doctorat conține introducere, cinci capitole structurate în două părți (noțiuni teoretice și contribuții originale), urmate de concluzii, bibliografie și două anexe.

Astfel, partea întâi cuprinde trei capitole în care sunt tratate aspecte generale referitoare la antibiotice, principalele surse de poluare ale mediului înconjurător cu antibiotice, măsurile de prevenire a contaminării mediului înconjurător cu antibiotice, precum și aspecte privind ecotoxicologia acestora. De asemenea, partea întâi a tezei oferă o imagine de ansamblu referitoare la cele mai adecvate și utilizate tehnici pentru izolarea/concentrarea, identificarea și cuantificarea antibioticelor din probe de apă reziduală și probe de mediu.

Contribuțiile originale (modul de lucru și interpretarea rezultatelor experimentale) sunt prezentate în cea de a doua parte a tezei de doctorat. Capitolul 4 cuprinde prezentarea a două proceduri care au fost elaborate în scopul determinării antibioticelor din probe de apă de suprafață (râul Someșul Mic, Cluj-

Napoca) și apă reziduală (colectate de la un spital clinic și de la o stație de epurare a apelor reziduale). Izolarea/concentrarea antibioticelor din probele de apă investigate a fost realizată utilizând tehnica extracției pe fază solidă (SPE), iar identificarea și cuantificarea antibioticelor utilizând două tehnici, corespunzătoare fiecărei proceduri elaborate: cromatografia pe strat subțire de înaltă performanță (HPTLC) și cromatografia de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrofotometria cu serie de fotodiode cu baleiaj complet (DAD) și cuplată cu spectrometria de masă (MS). Pentru validarea procedurilor elaborate, SPE-HPTLC și SPE-HPLC-DAD/MS, au fost determinate selectivitatea, liniaritatea, limitele de detecție și de cuantificare, precizia și acuratețea. De asemenea, în Capitolul 4 sunt prezentate caracteristicile fizico-chimice ale probelor de apă reziduală investigate, determinări care au fost realizate în special pentru compararea celor două tipuri de apă reziduală din punctul de vedere al încărcăturii cu poluanți organici proveniți din cele două surse.

Ultimul capitol al tezei de doctorat cuprinde rezultatele experimentale obținute în urma cercetărilor efectuate privind influențele antibioticelor asupra densității celulare a algelor verzi (*Pseudokirchneriella subcapitata* L.) și asupra plantelor de grâu (*Triticum aestivum* L.). Deoarece algele reprezintă baza lanțului trofic, iar scăderi ușoare în populația de alge pot afecta echilibrul într-un sistem acvatic, în cadrul acestor cercetări, influența antibioticelor asupra algelor nu a putut fi exclusă.

În cazul testelor pe plantele de grâu (*Triticum aestivum* L.), s-a urmărit obținerea unei perspective referitoare la efectele negative ale antibioticelor, precum și identificarea celor mai potrivite caracteristici pentru o evaluare rapidă a toxicității acestora. Astfel, sunt prezentate efectele antibioticelor asupra parametrilor fotosintetici (transportul de electroni, viteza netă de asimilație a CO₂, conductanța stomatală de vaporizare a apei), compușilor organici volatili (monoterpene și produși de oxidare sub acțiunea lipoxigenazei), pigmentilor asimilatori (clorofilieni și carotenoizi) și asupra conținutului total de flavonoide din plantele de grâu.

Rezultatele obținute în urma cercetărilor realizate în cadrul studiului de doctorat au fost comunicate la manifestări științifice și de asemenea publicate/acceptate/trimise spre publicare în reviste de specialitate (ANEXA II).

Având în vedere faptul că reziduurile de antibiotice din mediul înconjurător sunt suspecte de a induce rezistență tulpinilor bacteriene, provocând astfel o amenințare gravă pentru sănătatea publică (organismul uman, respectiv cel animal, își crează rezistență la anumite tipuri de antibiotice), dezvoltarea de proceduri pentru determinarea conținutului de antibiotice din probe de mediu, precum și evaluarea impactului antibioticelor și a metaboliților acestora asupra mediului înconjurător reprezintă o necesitate.

PARTEA A II-A. CONTRIBUȚII ORIGINALE

Capitolul 4. Cercetări privind elaborarea de proceduri pentru determinarea conținutului de antibiotice din probe de apă de suprafață și probe de apă reziduală

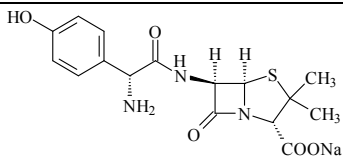
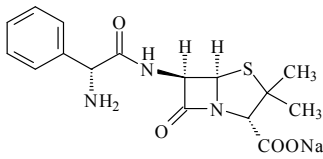
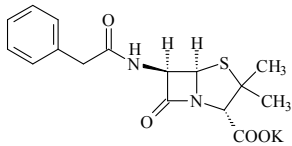
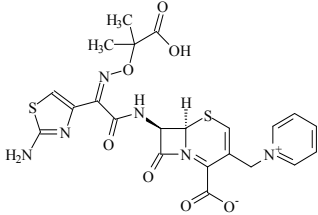
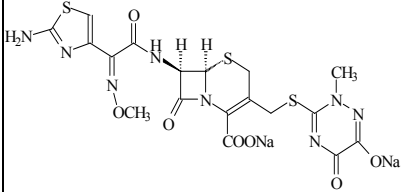
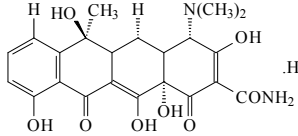
Conform literaturii de specialitate, pentru extracția antibioticelor din diferite probe este utilizată tehnica extracției pe fază solidă (Ašperger et al., 2006; Feitosa-Felizzola et al., 2007; Kasprzyk-Hordern et al., 2008; Mutavdžić et al., 2006) urmată de identificarea și cuantificarea acestora utilizând diferite tehnici precum electroforeza capilară (Ašperger et al., 2006; García-Campaña et al., 2009), cromatografia pe strat subțire (Ašperger et al., 2006; Joshi et al., 2009; Mutavdžić et al., 2006) și cromatografia de lichide de înaltă performanță (Benito-Peña et al., 2006; Feitosa-Felizzola et al., 2007; García-Galán et al., 2010).

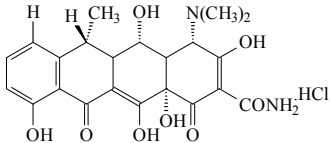
În cadrul studiului de doctorat au fost elaborate două proceduri care au avut drept scop determinarea conținutului de antibiotice din probe de apă de suprafață și apă reziduală, utilizând tehnica cromatografiei de lichide.

4.1. Antibioticele luate în studiu și principalele caracteristici

În funcție de clasele de antibiotice care au fost determinate în probe de mediu și raportate în literatura de specialitate, în cazul nostru, au fost selectate pentru a fi studiate șapte dintre antibioticele cel mai frecvent utilizate pentru tratarea sau prevenirea diferitelor afecțiuni. Aceste antibiotice au fost achiziționate de la diferiți producători, în diferite moduri de prezentare (pulbere injectabilă, capsule sau comprimate). În toate experimentele care au fost realizate pe perioada studiului de doctorat, aceste antibiotice au fost considerate drept referințe. Tabelul 4.2 conține principalele caracteristici (formula chimică, masa moleculară, formula structurală și modul de acțiune) ale antibioticelor studiate.

Tabel 4.2. Formula chimică, masa moleculară, formula structurală și modul de acțiune ale antibioticelor studiate.

Antibiotic	Formula chimică	Masa moleculară (g mol ⁻¹)	Formula structurală	Modul de acțiune ¹⁾
AMOX	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₅ SNa	387,39		Bactericid
AMP	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₄ SNa	371,39		Bactericid
PENG	C ₁₆ H ₁₇ N ₂ O ₄ SK	372,48		Bactericid
CFZ	C ₂₂ H ₂₂ N ₆ O ₇ S ₂	546,58		Bactericid
CFX	C ₁₈ H ₁₆ N ₈ O ₇ S ₃ Na ₂	598,54		Bactericid
TET	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ .HCl	480,89		Bacteriostatic

DOXI	$C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$	480,89		Bacteriostatic
-------------	--------------------------------	--------	--	----------------

¹⁾Antibioticele bactericide cum sunt β -lactamele (penicilinele și cefalosporinele) acționează la nivelul peretelui celular bacterian, inhibând sinteza peptidoglicanului, un constituent esențial al peretelui celular. Antibioticele bacteriostatice precum tetraciclinele inhibă sinteza proteică, astfel blocând introducerea de noi aminoacizi în lanțul polipeptidic (Dahl et al., 2006; Matinca, 2002).

4.2. Analiza antibioticelor din probe de apă de suprafață utilizând tehnica cromatografiei pe strat subțire de înaltă performanță (HPTLC)

Când într-o matrice sunt prezenți mai mult decât un antibiotic este necesară separarea lor înainte de a fi determinați. Tehnica cromatografiei pe strat subțire este o tehnică ideală pentru determinarea unei game variate de antibiotice deoarece este o tehnică necostisitoare, rapidă, ușor de utilizat, nu implică o mentenanță complicată și oferă posibilitatea analizei simultane a mai multor probe (Husain et al., 2004). De aceea, în cazul nostru a fost utilizată această tehnică de analiză pentru determinarea unor antibiotice (Tabel 4.2) din probe de apă de suprafață.

4.2.1. Izolarea/concentrarea antibioticelor din matrici lichide utilizând tehnica extracției pe fază solidă (SPE)

Modul de lucru

Soluția stoc de antibiotice studiate (5 mg mL^{-1} de AMOX, AMP și PENG; 1 mg mL^{-1} de CFZ, CFX, TET și DOXI) a fost preparată în metanol (MeOH), într-un balon cotat de 5 mL. Soluțiile de lucru au fost preparate prin diluția soluției stoc. Pentru a preveni fotodegradarea, soluțiile de antibiotice proaspăt preparate au fost depozitate în recipiente de culoare închisă.

Pentru prepararea probelor și a fazei mobile s-a folosit MeOH ($\geq 99,9\%$, HPLC), acetat de etil achiziționate de la Merck (Germania) și acetonă de la Microchim (România). Sarea disodică a acidului etilendiamino-tetraacetic ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, *notat* cu EDTA) a fost achiziționată de la Fluka (Germania). Pentru ajustarea pH-ului probelor s-a utilizat acidul clorhidric (HCl) achiziționat de la Poch (Polonia) și hidroxidul de sodiu (NaOH) de la Merck (Germania). Apa ultrapură utilizată în toate experimentele a fost preparată folosind un sistem de purificare Milli-Q (Millipore, SUA).

Pentru extracția simultană a antibioticelor studiate din matrici lichide, au fost selectate cartușele polimerice SPE Oasis HLB (hydrophilic lipophilic balance, 6 mL, 200 mg) cu caracteristici hidrofile și lipofile, achiziționate de la Waters (SUA). Stratul de adsorbant are la bază doi monomeri, unul hidrofilic N-vinilpirolidonă și unul lipofilic divinilbenzen. Acest tip de cartuș este adecvat pentru a extrage o gamă variată de antibiotice, deoarece nu conține grupări silanol libere cu care compușii de interes să interacționeze direct sau să formeze complecși metalici (Feitosa-Felizzola et al., 2007). Un alt avantaj al acestei faze staționare este că are proprietăți excelente de umezire datorate monomerului hidrofil N-vinilpirolidonă (Gómez et al., 2006). Capacitatea mare de retenție și gradele de recuperare mari ale unui spectru larg de analiți sunt menținute chiar dacă se întâmplă, în unele situații, ca faza staționară a cartușului să rămână uscată pe parcursul extracției SPE.

Protocolul de lucru urmat în vederea extracției antibioticelor de interes din matrici lichide a constat în mai multe etape:

- **condiționarea fazei staționare** cu 10 mL MeOH și 10 mL apă ultrapură;
- **trecerea unui volum** de 100 mL **de probă** prin cartușul de extracție; debitul volumului de probă care a fost trecut prin cartuș a fost de 1,2 mL min⁻¹.
- **eluția** antibioticelor reținute pe faza staționară a fost realizată cu 6 mL MeOH.

Înainte de trecerea probei prin cartuș, probele au fost prelucrate. Această etapă a constat în adăugarea a 1 mL soluție apoasă de EDTA 5% în volumul de probă de 100 mL luat în lucru. Adăugarea de EDTA a avut drept scop complexarea metalelor reziduale din apă (Feitosa-Felizzola et al., 2007). De asemenea pH-ul probei a fost ajustat la valoarea 3 cu HCl 0,5 N.

Extractele astfel obținute, au fost evaporate până la sec la temperatura de 40°C cu ajutorul unui rotaevaporator (Laborata 4000, Heidolph, Germania) și apoi reluate în 0,5 mL MeOH. Toate extracțiile au fost efectuate de trei ori și au fost evaluate utilizând tehnica HPTLC.

Rezultate și discuții

Valorile gradelor de recuperare care au fost obținute sunt peste 80%, cu excepția AMP (64,5%) (Oprîș et al., 2012a). Conform studiului realizat de către Granados et al., 2005, adăugarea de EDTA în matricea lichidă îmbunătățește gradele de recuperare ale tetraciclinelor. În cazul nostru, pentru TET și DOXI au fost obținute grade de recuperare de 90,9%, respectiv 99,5% (Figura 4.3).

Ajustarea pH-ului probelor sub valorile constantei de aciditate (pK_a) ale antibioticelor studiate îmbunătățește gradul de recuperare pe acest tip de cratuș, Oasis HLB (Yang et al., 2005). Valorile pK_a ale antibioticelor studiate conform datelor din literatură sunt: peniciline $pK_{a1} \approx 2-3$ și $pK_{a2} \approx 7$ (Benito-Peña et al., 2006); CFZ $pK_{a1} = 1,9$; $pK_{a2} = 2,7$ și $pK_{a3} \approx 4,1$ (Abounassif et al., 1990); CFX $pK_{a1} = 1,7$; 3,1 și $pK_{a2} = pK_{a3} \approx 4,3$ (Nakai et al., 2010); tetraciline $pK_{a1} \approx 3$, $pK_{a2} \approx 7$, $pK_{a3} \approx 9$ (Batt și Aga, 2005; Seifrtová et al., 2009). Astfel, pentru a îmbunătăți extracția antibioticelor studiate din probe de apă de suprafață, pH-ul probelor a fost ajustat la valoarea 3.

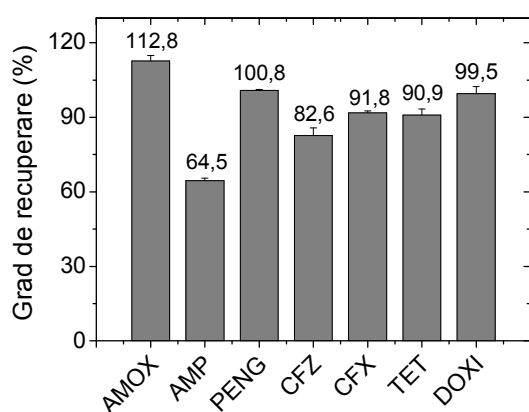


Figura 4.3. Mediile gradelor de recuperare (\pm RSD, %, trei determinări) ale antibioticelor studiate din matrice lichide obținute cu cartușele de extracție Oasis HLB, pH 3.

4.2.2. Analiza calitativă și cantitativă a antibioticelor utilizând tehnica HPTLC

Modul de lucru

Separarea cromatografică a fost realizată pe plăci Alugram SIL G/UV₂₅₄ (10 × 20 cm) prevăzute cu un strat de 0,20 mm silica gel 60 cu indicator de fluorescență (Macherey-Nagel, Germania). Înainte de aplicarea probelor sub formă de bandă, plăcile cromatografice au fost introduse în soluție EDTA 10%, care a fost ajustată în prealabil la valoarea de pH 7,5 cu o soluție NaOH 1N. Această etapă este necesară pentru a evita formarea complexilor ioni de metal/tetraciline (Meisen et al., 2010). Uscarea plăcilor a

avut loc la o temperatură de 125°C timp de 30 min, într-o etuvă Memmert (Germania). Cu ajutorul aplicatorului Desaga AS 30 (Germania), pe plăci au fost spotate benzi a câte 2 μ L și lățime 5 mm din fiecare soluție de antibiotic și de asemenea din extractele obținute cu metoda SPE. Developarea plăcilor a avut loc într-o cameră de developare dublu compartimentată Desaga (Germania), într-un timp de 25 min, iar distanța de migrare a fazei mobile a fost de 8,5 cm. În prealabil, camera de developare a fost saturată cu un amestec cuaternar de fază mobilă compus din acetat de etil - metanol - acetonă-apă 5 : 2,5 : 2,5 : 1,5 (v/v), timp de 30 min, la temperatura camerei de 23°C. După developare, plăcile au fost uscate la temperatura camerei, sub nișă. Utilizând densitometrul Desaga CD-60 (Germania) plăcile developate au fost scanate în modulul de absorbție sub lumină UV, la lungimea de undă de 254 nm (Opriș et al., 2012a).

Rezultate și discuții

Antibioticele luate în studiu au fost foarte bine separate în urma utilizării metodei HPTLC propuse (Figura 4.6). Acest lucru este confirmat de rezoluția cromatografică (R_s) care oferă informații cu privire la separarea compușilor de interes. Valoarea R_s a două benzi spotate una în apropierea celeilalte a fost determinată prin calculul raportului dintre distanța între maximele benzilor și media lățimii benzilor la bază (Fried și Sherma, 2005). În cazul antibioticelor studiate, valorile R_s obținute au fost cuprinse între 2,00-8,59 (R_s CFZ-CFX = 4,10; R_s CFX-TET = 3,79; R_s TET-AMOX = 2,56; R_s AMOX-DOXI = 2,84; R_s DOXI-AMP = 2,00; R_s AMP-PENG = 8,59) (Opriș et al., 2012a). Conform noțiunilor teoretice, pentru a putea analiza un component în bune condiții, acesta trebuie să fie separat de restul componentelor cu o rezoluție $R_s \geq 2$ (Gocan, 2002).

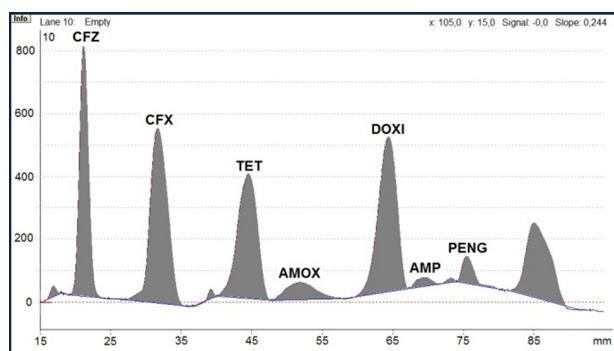


Figura 4.6. Densitograma amestecului celor șapte antibiotice studiate.

4.2.3. Studii privind validarea procedurii SPE-HPTLC

În prezentul studiu, antibioticele considerate drept referințe au fost medicamente conținând substanța activă (antibiotic) și excipienți (Tabel 4.1). În acest sens, pentru fiecare antibiotic, cu ajutorul cromatografului de lichide HPLC-DAD/MS (Shimadzu, Japonia) au fost înregistrate spectrele de masă cu modulul de ionizare pozitivă prin electropulverizare. Tensiunea capilară a fost setată la 1,5 kV, curba liniei de desolvatare și temperatura interfaței au fost setate la temperatura de 250°C. Rezultatele experimentelor HPLC-DAD/MS în ceea ce privește ionul molecular (m/z) au fost în concordanță cu datele raportate în literatură: 366 pentru AMOX (Lindberg et al., 2004), 350 pentru AMP (Li et al., 2009; Lindberg et al., 2004; Pozo et al., 2006), 335 pentru PENG (Xu et al., 2010), 547 pentru CFZ (Abounassif et al., 1990), 555 pentru CFX (Kato et al., 2008), 445 pentru TET (Feitosa-Felizzola et al., 2007; Hu et al., 2010; Li et al., 2009), 445 pentru DOXI (Grujić et al., 2009). Spectrele de masă sunt prezentate în

Subcapitolul 4.3.2 în care este descrisă o altă procedură elaborată pentru determinarea antibioticelor, dar din probe de apă reziduală.

Pentru determinarea antibioticelor de interes din probe de apă de râu, procedura SPE-HPTLC elaborată a fost validată. Datele experimentale demonstrează că procedura SPE-HPTLC propusă este selectivă și prezintă liniaritate, precizie și acuratețe foarte bune. De asemenea, în cadrul acestui studiu au fost determinate limitele de detecție și de cuantificare.

4.2.4. Determinarea conținutului de antibiotice din probe de apă de suprafață utilizând procedura SPE-HPTLC

Modul de lucru

Probele de apă de suprafață au fost colectate în recipiente curate din polietilenă, din râul Someșul Mic care traversează orașul Cluj-Napoca. În râul Someșul Mic sunt deversate o varietate de reziduuri organice provenite din diferite industrii, ape menajere și efluenți reziduali municipali. Probele au fost colectate pe perioada unei săptămâni și analizate în mai puțin de 24 de ore de la prelevare.

Rezultate și discuții

În Figura 4.12 este prezentată o placă HPTLC pe care au fost spotate câteva extracte de apă de râu în vederea determinării conținutului de antibiotice. Această placă a fost spotată cu cele șapte antibiotice individuale considerate drept referință (pozițiile 1-7), antibioticele referință în amestec (pozițiile 8 și 17), probe de apă de râu (pozițiile 9-12) și probe de apă de râu cu adaos cunoscut de antibiotice (pozițiile 13-16) (Opriș et al., 2012a).

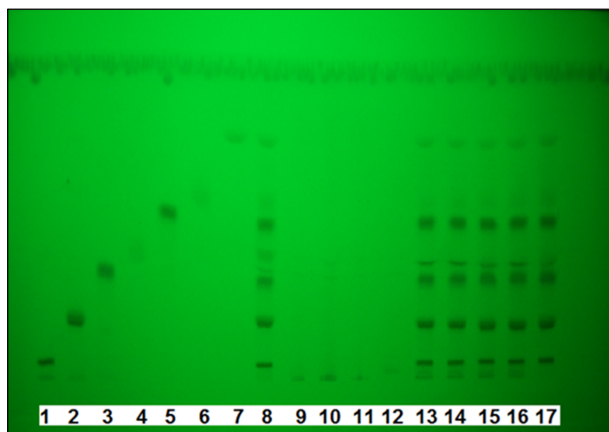


Figura 4.12. Placa cromatografică HPTLC a antibioticelor studiate. Pozițiile 1-7 reprezintă referințele individuale antibiotice studiate: 1-CFZ, 2-CFX, 3-TET, 4-AMOX, 5-DOXI, 6-AMP, 7-PENG; Pozițiile 8 și 17 reprezintă amestecul de antibiotice referință; Pozițiile 9-12 reprezintă extracte de apă de râu, iar pozițiile 13-16 sunt reprezentate de extractele de probe de râu cu adaos cunoscut de antibiobiotice.

Densitogramele suprapuse corespunzătoare amestecului de antibiotice referință (17) și probei de apă de suprafață (14) sunt prezentate în Figura 4.13.

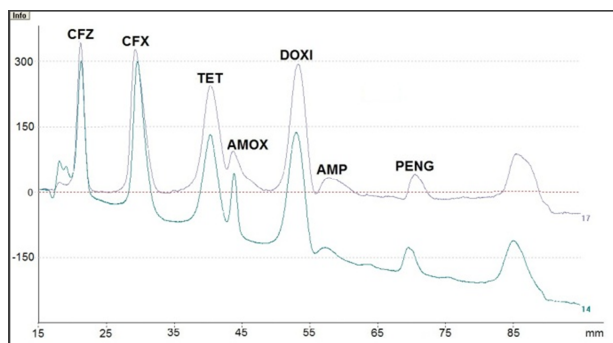


Figura 4.13. Densitogramele suprapuse corespunzătoare amestecului de antibiotice referințe (17) și unei probe de apă de suprafață cu adaos cunoscut de antibiotice (14).

În Tabelul 4.7 sunt prezentate valorile concentrațiilor de antibiotice care au fost determinate în probele de apă de râu. În aceste probe au fost determinate două dintre antibioticele studiate, AMOX și TET, în concentrații cuprinse între 2115-2249 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectiv 55-78 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Opriș et al., 2012a).

Tabel 4.7. Cantitățile ($\mu\text{g L}^{-1}$) de antibiotice care au fost determinate în probele de apă de suprafață prelevate din râul Someșul Mic, Cluj-Napoca.

Nr. probă	Cantitatea ($\mu\text{g L}^{-1}$)						
	AMOX	AMP	PENG	CFZ	CFX	TET	DOXI
1	2201	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2	nd ¹⁾	nd	nd	nd	nd	59	nd
3	nd	nd	nd	nd	nd	68	nd
4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5	2115	nd	nd	nd	nd	55	nd
6	2176	nd	nd	nd	nd	78	nd
7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8	2249	nd	nd	nd	nd	64	nd
9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

¹⁾nd - nu a fost detectat.

4.3. Caracterizarea fizico-chimică a unor probe de apă reziduală. Analiza conținutului de antibiotice utilizând tehnica cromatografiei de lichide de înaltă performanță (HPLC)

În cadrul Subcapitolului 4.3.1 este prezentată caracterizarea fizico-chimică a probelor de apă reziduală generată de un spital clinic care este evacuată în rețeaua de canalizare, precum și calitatea apelor reziduale (influent și efluent) de la o stație de epurare colectoare de ape reziduale orașenești. De regulă, în cazul acestor două tipuri de ape reziduale valorile parametrilor fizico-chimici nu sunt diferite (Abd El-Gawad și Aly, 2011). Apele reziduale generate de spitale prezintă o încărcătură cu substanțe poluante la fel de mare ca în cazul celor din cadrul stațiilor de epurare. Din acest motiv am urmărit compararea indicatorilor de calitate a celor două tipuri de ape reziduale. În cazul nostru, indicatorii de calitate analizați nu au variat foarte mult în funcție de natura probelor de apă reziduală (colectate de la un spital clinic și de la o stație de epurare). Acest aspect a fost observat în cazul indicatorilor de calitate consum chimic și biochimic de oxigen (CCO-Cr și CBO₅) și totalul de materii solide în suspensie (TMS).

4.3.2. Analiza antibioticelor din probe de apă reziduală utilizând tehnica cromatografiei de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrofotometria cu serie de fotodiode cu baleiaj complet și cu spectrometria de masă (HPLC-DAD/MS)

În cadrul Subcapitolului 4.3.2 este prezentată o procedură SPE-HPLC-DAD/MS care a fost elaborată pentru determinarea simultană a șapte antibiotice din probe de apă reziduală colectate de la un spital clinic și de la o stație de epurare. S-a urmărit determinarea conținutului de antibiotice din probe de apă reziduală generată de spitalul clinic, deoarece spitalele se numără printre principalele surse de poluare ale mediului înconjurător cu antibiotice (Duong et al., 2008). Deoarece apele reziduale colectate de la o stație de epurare ar putea să conțină cantități mai mici sau mai mari de antibiotice, în funcție de sursele de la care provin, a fost urmărită prezența acestor antibiotice și în apele care intră, respectiv care ies din stația de epurare. Pentru realizarea acestui studiu, antibioticele selectate au fost AMOX, AMP, PENG CFZ, CFX, TET și DOXI (Subcapitolul 4.1).

4.3.2.1. Izolarea/concentrarea antibioticelor din matrici lichide utilizând tehnica SPE

Modul de lucru

Soluțiile stoc ale antibioticelor referință au fost preparate în apă ultrapură. Acetonitrilul de puritate HPLC a fost achiziționat de la Sigma-Aldrich (Germania), iar acidul formic de la Cristal R Chim (Romania). Pentru metoda SPE, metanolul (MeOH) a fost achiziționat de la Merck (Germania), amoniacul de la Primexchim (Romania) și acidul clorhidric (HCl) de la Poch (Polonia). Sarea disodică a acidului etilendiamino-tetraacetic ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, *notat cu EDTA*) a fost achiziționată de la Fluka (Germania). Apa ultrapură utilizată în toate experimentele a fost preparată cu ajutorul unui sistem de purificare Millipore, SUA. Extracțiile SPE din cadrul acestui experiment au fost realizate cu ajutorul cartușelor Oasis HLB (6 mL, 200 mg, Waters, SUA) și utilizând un sistem cu vacuum model Supelco (Sigma-Aldrich, Germania).

Principalele etape SPE au constat în:

- **condiționarea** cartușului Oasis HLB cu 10 mL MeOH și 10 mL apă ultrapură;
- **introducerea unui volum de** 100 mL **probă** de apă reziduală preparată anterior extracției prin adăugarea de EDTA 5% pentru complexarea metalelor reziduale (Feitosa-Felizzola et al., 2007);
- **eluția** antibioticelor reținute pe faza staționară a fost realizată cu 6 mL MeOH.

În vederea alegerii unei valori optime de pH pentru proba reală, antibioticele studiate au fost extrase din 100 mL apă ultrapură cu conținut de 120 μg din fiecare antibiotic, la diferite valori ale pH-ului (2, 3, 7 și 9). pH-ul probelor a fost ajustat cu HCl 0,5 N, respectiv cu NH_4OH 5%.

Debitul de trecere a probei prin cartuș a fost de 1,2 mL min^{-1} . Extractele astfel obținute au fost evaporate până la sec la temperatura de 40°C și reluate apoi în 2 mL apă ultrapură. Toate extracțiile au fost realizate de trei ori și analizate cu metoda HPLC-DAD/MS descrisă în Subcapitolul 4.3.2.2.

Rezultate și discuții

Dintre valorile de pH testate, cele mai bune grade de recuperare au fost obținute la pH 3 pentru antibioticele CFZ, CFX, TET și la pH 7 pentru celelalte antibiotic studiate AMP, PENG și DOXI. În cazul antibioticului AMOX, a fost obținut un grad de recuperare mai mic de 50% pentru ambele valori ale

pH-ului (3 și 7). În Figura 4.23 se observă efectul pH-ului asupra eficienței extracției SPE a antibioticelor studiate.

La pH 3 au fost obținute valori ale gradelor de recuperare relativ bune pentru antibioticele CFZ de 68,7%, CFX de 110,1% și TET 102,6%. La pH 7, valorile gradelor de recuperare au fost mai mari pentru celelalte antibiotic studiate AMP 88,8%, PENG 98,7%, TET 114,6 % și DOXI 84,4%, cu excepția AMOX (42,9% la pH 3 și 31,7% la pH 7) (Tabel 4.9). Deoarece cele mai bune grade de recuperare ale antibioticelor referință extrase din apă ultrapură au fost obținute la valorile de pH 3 și 7, aceste valori ale pH-ului au fost aplicate în cazul tuturor probelor de apă reziduală care au fost analizate în cadrul acestui studiu.

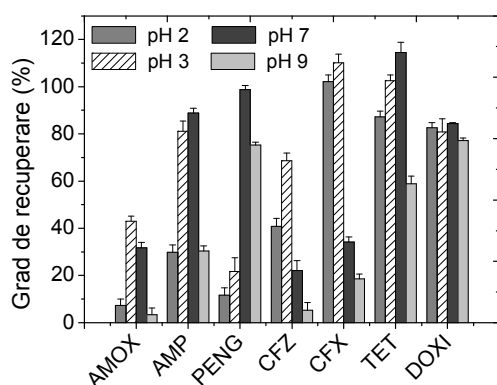


Figura 4.23. Gradele de recuperare ale antibioticelor studiate extrase din apă ultrapură, la valori ale pH-ului 2, 3, 7, 9, obținute cu cartușele de extracție Oasis HLB.

4.3.2.2. Analiza calitativă și cantitativă a antibioticelor utilizând tehnica HPLC-DAD/MS

Modul de lucru

Analizele au fost realizate cu ajutorul unui cromatograf de lichide de înaltă performanță HPLC Shimadzu prevăzut cu doi detectori: DAD și MS. Sistemul utilizat pentru analiza antibioticelor luate în studiu este prevăzut cu un generator de azot.

Separarea cromatografică a fost realizată pe coloană C18 Grace Alltima (100 × 3 mm, 3 μm) termostată la 26°C. Faza mobilă utilizată a fost apă ultrapură cu acid formic la pH 3 (A) și acetonitril (B). Eluția compușilor de interes a fost realizată cu gradientul de eluție prezentat în Tabelul 4.10, la un debit 0,5 mL min⁻¹. Timpul de echilibrare al coloanei a fost de 5 min, iar volumul de injecție utilizat a fost de 20 μL.

Tabel 4.10. Programul de gradient utilizat pentru separarea cromatografică a antibioticelor studiate. Faza mobilă: apă ultrapură cu acid formic la pH 3 (A) și acetonitril (B).

Timp (min)	A (%)	B (%)
0:00	90	10
6:00	30	70
10:00	20	20
10:01	90	10
15:00	Stop	Stop

Rezultate și discuții

Toate antibioticele luate în studiu au fost separate și eluate într-un timp foarte scurt, de 7,5 min. Picurile corespunzătoare antibioticelor studiate au prezentat un maximum de absorbție, în domeniul UV-

Vis, după cum urmează: AMOX, AMP, PENG, CFZ și CFX la 197 nm, TET și DOXI la 272 nm. Parametrii pentru detecția MS au fost: 1,5 kV tensiunea capilară, 250°C temperatura de desolvatare și 250°C temperatura interfetei. Pentru înregistrarea spectrelor de masă a fost utilizat modulul de ionizare pozitivă, prin electropulverizare (ESI - electrospray ionization). Toți compușii de interes au fost confirmați pe baza timpului de retenție și pe baza ionilor moleculari (m/z) din spectrele de masă obținute. Rezultatele obținute în ceea ce privește ionul molecular (m/z) sunt în concordanță cu cele raportate în literatură (vezi Subcapitolul 4.2.3). În Tabelul 4.11 sunt prezentați timpii de retenție corespunzători fiecărui antibiotic studiat. Datorită diferenței dintre timpii de retenție, se poate observa că separarea antibioticelor studiate este bună. De asemenea, conform spectrelor de masă înregistrate, Tabelul 4.11 conține raportul m/z și intensitatea relativă corespunzătoare fiecărui antibiotic studiat.

Tabel 4.11. Parametrii HPLC-MS corespunzători antibioticelor studiate.

Antibiotic	Timp de retenție (min)	Ionul molecular (m/z)	Intensitatea relativă (%)
AMOX	1,78	366	28
AMP	4,34	350	100
PENG	7,11	335	<10
CFZ	3,96	547	81
CFX	4,76	555	100
TET	5,39	445	100
DOXI	6,08	445	100

4.3.2.3. Studii privind liniaritatea, limitele de detecție și de cuantificare, precizia și acuratețea procedurii SPE-HPLC-DAD/MS

Pentru a realiza cuantificarea antibioticelor studiate în probe de apă reziduală cu ajutorul procedurii SPE-HPLC-DAD/MS propuse, au fost elaborate studii de liniaritate și au fost determinate limitele de detecție și de cuantificare, precizie și acuratețe.

4.3.2.4. Determinarea conținutului de antibiotice din probe de apă reziduală utilizând procedura SPE-HPLC-DAD/MS

Modul de lucru

Probele au fost filtrate cu ajutorul unor filtre din hârtie Macherey-Nagel (MN 640 d·ø 125 mm) și depozitate în întuneric la temperatura de 4°C. Pentru a diminua degradarea antibioticelor, probele de apă reziduală au fost supuse extracției SPE în mai puțin de 24 h de la prelevare. Probele de apă reziduală au fost colectate în perioada februarie-septembrie 2011: proba nr. 1 a fost colectată în luna februarie, proba nr. 2 în luna martie 2011, proba nr. 3 în luna mai 2011, proba nr. 4 în luna iunie, proba nr. 5 în luna august 2011, iar probele cu nr. 6 și 7 în luna septembrie 2011.

Rezultate și discuții

a). Conținutul de antibiotice din probe de apă reziduală colectate de la un spital clinic

În probele de apă reziduală colectate de la spitalul clinic au fost detectate trei dintre antibioticele studiate CFZ, TET și DOXI în cantități cuprinse între 83-164 $\mu\text{g L}^{-1}$, 152-789 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectiv 285-544 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabel 4.15).

Tabel 4.15. Cantitățile ($\mu\text{g L}^{-1}$) de antibiotice determinate în probele de apă reziduală colectate de la un spital clinic.

Nr. probă	Cantitatea ($\mu\text{g L}^{-1}$)						
	AMOX	AMP	PENG	CFZ	CFX	TET	DOXI
1	nd ¹⁾	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2	nd	nd	nd	nd	nd	152	nd
3	nd	nd	nd	83	nd	nd	nd
4	nd	nd	nd	nd	nd	546	285
5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7	nd	nd	nd	164	nd	789	544

¹⁾nd - nu a fost detectat.

Una dintre metodele cele mai simple de identificare a unor componenți se numără compararea cromatogramei etaloanelor cu cromatograma probelor (Gocan, 2002). Un astfel de exemplu este prezentat în Figura 4.28 unde sunt suprapuse cromatograma înregistrată pentru o probă de apă reziduală în care au fost detectate trei dintre antibioticele studiate (CFZ, TET și DOXI) și cromatograma înregistrată pentru antibioticele referință studiate. De asemenea, au fost comparate și spectrele de masă ale antibioticelor referință cu cele ale antibioticelor din probele de apă reziduală, confirmându-se încă o dată prezența lor în probele de apă reziduală colectate de la spital.

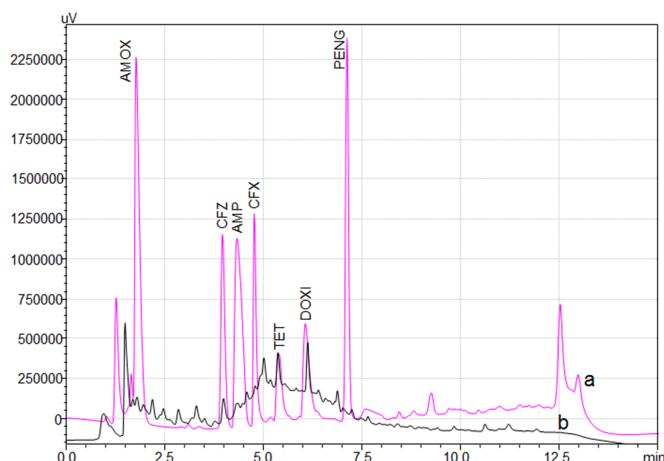


Figura 4.28. Cromatogramele HPLC-DAD suprapuse corespunzătoare amestecului de antibiotice referință (a) și a unei probe de apă reziduală colectată de la un spital clinic (b).

b). Conținutul de antibiotice din probe de apă reziduală colectate de la o stație de epurare

În probele de apă reziduală colectate de la stația de epurare au fost determinate antibiotice care aparțin aceluiași clase (cefalosporine și tetracicline), la fel ca în cazul probelor de apă colectate de la un spital clinic. Din clasa tetraciclinelor, au fost determinate atât TET, cât și DOXI. Persistența lor poate fi datorată și altor ape reziduale care sunt colectate în cadrul acestei stații de epurare, de la alte spitale, și datorită faptului că sunt cele mai importante și utilizate antibiotice (Hernández et al., 2003; Kim et al., 2005). Spre deosebire de probele de apă colectate de la spitalul clinic în care a fost determinat antibioticul CFZ, în probele de apă de la stația de epurare a fost determinat antibioticul CFX. Cantitățile de antibiotice determinate în probele de apă reziduală colectate de la stația de epurare sunt: $245 \mu\text{g L}^{-1}$ CFX, $263\text{-}388 \mu\text{g L}^{-1}$ TET și $83 \mu\text{g L}^{-1}$ DOXI.

De asemenea au mai fost colectate probe de apă reziduală de la stația de epurare, pe parcursul unei zile, la ore diferite. Astfel au fost colectate trei probe de influent la orele 9, 12, 15 și efluenții corespunzători acestora la orele 16, 19 și 22. În probele de influent au fost detectate doar trei antibiotice din cele șapte studiate, cu niveluri de concentrații diferite: 334 $\mu\text{g L}^{-1}$ CFX, 146 $\mu\text{g L}^{-1}$ TET și 110 $\mu\text{g L}^{-1}$ DOXI (Tabel 4.17).

În efluenții investigați nu a fost detectat nici un antibiotic din cele șapte studiate în cadrul acestor cercetări sau au fost prezente în cantități mici, sub limita de detecție a procedurii propuse. Acest lucru sugerează faptul că procesul de epurare al apelor reziduale este eficient.

Tabel 4.16. Cantitățile ($\mu\text{g L}^{-1}$) de antibiotice determinate în probele de apă reziduală prelevate de la o stație de epurare.

Nr probă	Cantitatea ($\mu\text{g L}^{-1}$)													
	AMOX		AMP		PENG		CFZ		CFX		TET		DOXI	
	influent	efluent	influent	efluent	influent	efluent	influent	efluent	influent	efluent	influent	efluent	influent	efluent
1	nd ¹⁾	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	245	nd	nd	nd	nd	nd
4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	263	nd	nd	nd
5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	388	nd	83	nd

¹⁾nd - nu a fost detectat.

Tabel 4.17. Cantitățile ($\mu\text{g L}^{-1}$) de antibiotice determinate în probele de apă reziduală colectate de la stația de epurare în aceeași zi, la intervale orare diferite.

Ora prelevării	Apa reziduală	Cantitatea ($\mu\text{g L}^{-1}$)						
		AMOX	AMP	PENG	CFZ	CFX	TET	DOXI
9	Influent	nd ¹⁾	nd	nd	nd	nd	146	110
12	Influent	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
15	Influent	nd	nd	nd	nd	334	nd	nd
16	Efluent	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
19	Efluent	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
22	Efluent	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

¹⁾nd - nu a fost detectat.

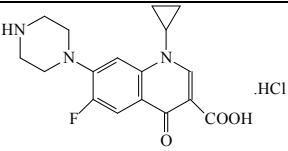
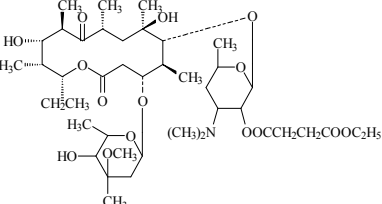
Capitolul 5. Cercetări privind influența antibioticelor asupra algelor verzi (*Pseudokirchneriella subcapitata* L.) și asupra plantelor de grâu (*Triticum aestivum* L.)

Monitorizarea și realizarea de studii de toxicitate ale produselor farmaceutice sunt necesare pentru a evalua impactul lor asupra mediului înconjurător (Choma, 2004). În prezenta teză de doctorat, au fost realizate studii privind influența antibioticelor asupra algelor verzi de apă dulce (*Pseudokirchneriella subcapitata* L.) (Subcapitolul 5.2) și asupra plantelor de grâu (*Triticum aestivum* L.) (Subcapitolul 5.3). În Subcapitolul 5.1 sunt prezentate antibioticele care au fost luate în studiu în cadrul acestor cercetări.

5.1. Antibioticele luate în studiu și principalele caracteristici

În experimentele ce au avut drept scop influența antibioticelor asupra algelor (*Pseudokirchneriella subcapitata* L.) (Subcapitolul 5.2), au fost luate în studiu trei antibiotice care aparțin la două clase diferite: peniciline (AMP, PENG) și tetraciclone (DOXI) (vezi Subcapitol 4.1). În cadrul studiilor privind influența antibioticelor asupra plantelor de grâu (*Triticum aestivum* L.) (Subcapitolul 5.2), au fost luate în studiu nouă antibiotice (AMOX, AMP, PENG, CFZ, CFX, TET, DOXI, ciprofloxacina - CIP și eritromicina - ERI). Cu excepția CIP și ERI, caracteristicile tuturor antibioticelor menționate anterior sunt prezentate în cadrul Subcapitolului 4.1. Caracteristicile antibioticelor CIP și ERI sunt prezentate în Tabelul 5.2.

Tabel 5.2. Formula chimică, masa moleculară, formula structurală și modul de acțiune ale antibioticelor ciprofloxacina și eritromicina.

Antibiotic	Formula chimică	Masa moleculară (g mol ⁻¹)	Formula structurală	Modul de acțiune ¹⁾
CIP	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃ .HCl	367,80		Bactericid
ERI	C ₄₃ H ₇₅ NO ₁₆	862,05		Bacteriostatic

¹⁾ Antibioticele bactericide precum fluorochinolonele inhibă sinteza ADN-ului și sinteza proteică. Antibioticele bacteriostatice precum macrolidele inhibă sinteza proteică, împiedicând alungirea lanțului polipeptidic (Dahl et al., 2006; Matinca, 2002).

5.2. Cercetări privind influența antibioticelor asupra densității celulare a algelor verzi (*Pseudokirchneriella subcapitata* L.)

De regulă, testele de toxicitate privind inhibarea creșterii unor organisme vii se aplică pentru determinarea prezenței unor substanțe toxice ce se găsesc în mediul înconjurător. Algele verzi sunt utilizate cu succes la determinarea efectelor toxice sau mutagene ale unor substanțe chimice, metale grele,

pesticide sau ale apelor reziduale generate de diferite industrii. Algele au un rol foarte important în structura și funcționarea întregului ecosistem acvatic (Yang et al., 2008).

5.2.1. Algele verzi (*Pseudokirchneriella subcapitata* L.), condițiile de creștere și tratamentele cu antibiotice. Modul de lucru

Pentru a contura și motiva cercetările următoare privind influența antibioticelor asupra plantelor de grâu (*Triticum aestivum* L.), au fost realizate studii privind influența antibioticelor asupra algelor verzi. Testele au fost realizate pe algele de apă dulce *Pseudokirchneriella subcapitata* L., acestea fiind considerate bioindicatori în evaluarea toxicității unor substanțe chimice care se găsesc în mediul înconjurător.

Astfel, evaluarea rapidă privind influențele negative ale celor trei antibiotice luate în studiu (AMP, PENG și DOXI, vezi Subcapitolul 4.1) asupra algelor, a fost realizată prin determinarea densității celulare. Mediile nutritive de creștere ale algelor utilizate în cadrul acestui studiu au fost: mediu nutritiv necesar creșterii algelor în condiții normale (alge de referință sau control), mediu nutritiv de creștere a algelor în prezența soluțiilor de antibiotice (AMP, PENG și DOXI) de concentrație $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, precum și mediu nutritiv de creștere a algelor în prezență de bicromat de potasiu ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) de concentrație $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ utilizat de asemenea drept referință pentru detectarea eventualelor condiții de testare nesatisfăcătoare (Halling-Sørensen, 2000). Concentrația de antibiotice selectată pentru acest studiu este intermediară concentrațiilor care sunt raportate în literatura de specialitate (Qin et al., 2012; van der Grinten et al., 2010; Yang et al, 2008).

Densitatea celulară a algelor a fost determinată cu ajutorul unui microscop optic (CETI, Anglia) și a camerelor de numărare Neubauer (Weber Scientific International, Anglia). Numărarea celulelor algelor a fost realizată utilizând obiectivul de mărire de 40 de ori al microscopului optic, iar camerele de măsurare Neubauer au avut următoarele caracteristici: adâncime 0,1 mm, dimensiune $1 \times 4000 \text{ mm}^2$. În camerele de măsurare Neubauer, au fost introduse câte 20 μL de suspensie algală, corespunzătoare fiecărui test inclus în cadrul acestui experiment. Rețeaua de numărare a camerei Neubauer a fost alcătuită din 9 câmpuri de măsurare (pătrate mari, $1 \times 1 \text{ mm}$), fiecare fiind împărțit la rândul său în 16 pătrate mici. Pentru a evita numărarea celulelor de două sau mai multe ori și în scopul obținerii unor cifre precise, numărarea celulelor a fost realizată în trei câmpuri diferite, care au fost selectate astfel încât dispunerea lor să fie pe diagonală. Aceste măsurători au fost efectuate de trei ori și apoi a fost calculată media celor trei determinări. Măsurarea densității celulare a algelor care au fost crescute în cele cinci medii diferite, a fost realizată la trei intervale de timp: 24 h, 48 h și 72 h (EN ISO 8692:2004).

5.2.2. Rezultate și discuții privind influența antibioticelor asupra densității celulare a algelor

La 24 h după începerea experimentului numărul de celule mL^{-1} a scăzut semnificativ din punct de vedere statistic, în cazul tuturor celor trei teste cu antibiotice (AMOX, PENG și DOXI). Față de control, scăderea numărului de celule mL^{-1} a algelor care au fost crescute în mediul nutritiv cu conținut de antibiotice a fost cuprinsă între 38,6-50,8%. Cea mai mare cantitate de celule mL^{-1} a fost inhibată de antibioticul DOXI (50,8%).

În cadrul acestui studiu, al doilea set de măsurători a fost realizat la 48 h de la începerea experimentului. Densitatea celulară în cazul algelor din mediul nutritiv cu conținut de DOXI $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ a scăzut cu 74,2% față de densitatea celulară a algelor control. Antibioticul PENG a contribuit de asemenea

la modificări în densitatea celulară, aceasta crescând semnificativ (31,8%) față de algele control. A fost observată o scădere în densitatea celulară a algelor crescute în prezența antibioticului AMP, dar această scădere este nesemnificativă din punct de vedere statistic.

Influența antibioticului DOXI asupra densității celulare a algelor *Pseudokirchneriella subcapitata* L., a fost observată și la 72 h de la începerea experimentului. Densitatea celulară a scăzut față de control cu 66,9%. În cazul testului cu antibioticul AMP, scăderea densității celulare a algelor nu a fost atât de mare ca în cazul testului cu DOXI, această scădere fiind de 24,3% față de algele control. Testul în care algele au fost crescute în prezența antibioticului PENG a păstrat aceeași creștere în ceea ce privește numărul celulelor de alge, la fel ca în cazul măsurătorilor efectuate la 48 h de la începerea experimentului. La 72 h, numărul celulelor de alge crescute în prezența PENG a crescut cu 50% față de control.

Testul în care a fost adăugată soluție de $K_2Cr_2O_7$ în mediul nutritiv de creștere, pentru detectarea eventualelor condiții de testare nesatisfăcătoare, nu a fost diferit față de control, în ceea ce privește numărul de celule mL^{-1} (24 h, 48 h, 72 h).

De asemenea au fost calculate și vitezele de creștere (μ_i) a celulelor algelor *Pseudokirchneriella subcapitata* L., precum și procente de inhibare a creșterii celulare ($I\mu_i$) pentru fiecare test realizat în cadrul acestui studiu (EN ISO 8692:2004). Valorile vitezelor de creștere celulară a variat între 0,054-0,085 celule $mL^{-1} h^{-1}$, cea mai mică valoare fiind în cazul testului cu antibioticul DOXI. Procentul de inhibare celulară a variat între 24,1-35,1%.

5.3. Cercetări privind influența antibioticelor asupra plantelor de grâu (*Triticum aestivum* L.)

Până în prezent, înțelegerea efectelor antibioticelor asupra proceselor fiziologice ce au loc în plante este încă limitată. Astfel, pentru a obține o perspectivă referitoare la aceste efecte negative și pentru a identifica cele mai bune caracteristici pentru o evaluare rapidă a toxicității lor, în cadrul acestui Subcapitol sunt prezentate influențele a nouă antibiotice (AMOX, AMP, PENG, CFZ, CFX, TET, DOXI, CIP și ERI, prezentate în Subcapitolele 4.1 și 5.1) de concentrații 0,5 $mg L^{-1}$ și 1,5 $mg L^{-1}$ asupra parametrilor fotosintetici, compușilor organici volatili, pigmentilor asimilatori și asupra conținutului total de flavonoide din plantele de grâu (*Triticum aestivum* L. soiul „Lovrin”). Fotosinteza este considerată ca fiind procesul biologic fundamental în creșterea plantelor, asimilarea nutrienților și care oferă rezistență plantelor în condiții de stres biotic și abiotic. În general, se cunoaște faptul că plantele emit compuși organici volatili în diferite condiții de stres biotic și abiotic (Loreto și Schnitzler, 2010; Niinemets, 2010). În acest sens, în urma acestui studiu considerăm că emisia de compuși organici volatili este în strânsă legătură cu stresul indus de antibiotice.

5.3.1. Plantele de grâu (*Triticum aestivum* L.), condițiile de creștere și stresul abiotic indus de antibiotice. Modul de lucru

Semințele de grâu (*Triticum aestivum* L. soiul „Lovrin”, Fundulea, România) au fost plantate în recipiente din plastic (1 L, 10 × 10 × 10 cm), conținând sol de grădină comercial care a fost fertilizat în prealabil cu microelemente (Bioland, Finlanda). Plantele au fost crescute într-o cameră specială de creștere numită fitotron (model Percival LT36VL, SUA), în condiții controlate de lumină (1000 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$, timp de 12 ore) și temperatură (zi/noapte - 25/18 °C).

Stresul abiotic la care au fost supuse plantele de grâu a constat în udarea lor zilnică cu câte un volum de 71 mL soluții apoase de antibiotice de concentrații 0,5 ± 0,03 $mg L^{-1}$ și 1,5 ± 0,08 $mg L^{-1}$. De asemenea, au fost crescute și plante control (netratate cu antibiotice) care au fost udate cu același volum,

dar de apă distilată. Măsurătorile experimentale au fost efectuate după ce plantele au fost udate cu volume totale de 0,5 L (după o săptămână) și 1 L (după două săptămâni) soluții de antibiotice (Oprîș et al., 2012b).

În cazul nostru, dozele de antibiotice administrate plantelor de grâu au fost mai scăzute comparativ cu cele utilizate în alte studii, dar au avut un timp de expunere mai îndelungat (Pan et al., 2008; Xie et al., 2011). Astfel, aceste tratamente au o reflecție mai bună asupra răspunsului plantelor la reziduurile de antibiotice ce se găsesc în mediul înconjurător. Numeroase studii au demonstrat că expunerea prelungită a unui număr de soluții de antibiotice de concentrații asemănătoare cu cele utilizate în cadrul acestui studiu, conduce la inhibarea semnificativă a creșterii plantelor (Brain et al., 2004, 2005, 2008; Hillis et al., 2011; Liu et al., 2009; Pomati et al., 2004).

5.3.2. Influența antibioticelor asupra parametrilor fotosintetici ai plantelor de grâu

Fotosinteza este considerată ca fiind cel mai amplu proces de sinteză de pe suprafața terestră. O definiție generală a fotosintezei ar fi că prin acest proces plantele verzi în prezența luminii preiau CO₂ din atmosferă și îl transformă în substanțe organice cu degajare de O₂ (Dobrotă, 2010). Astfel, în condiții de stres, acest proces poate fi afectat, conducând la o inhibare a dezvoltării plantelor. În ceea ce privește studiul efectelor antibioticelor asupra fotosintezei, s-a urmărit analiza a trei parametri fotosintetici: viteza transportului de electroni (J_{ETR} - electron transport rate), conductanța stomatală de vaporizare a apei (g_s - stomatal conductance to water vapor) și viteza netă de asimilație a CO₂ (A - assimilation rate). Acești trei parametri sunt deosebit de importanți în procesul de fotosinteză. Transportul de electroni are rol în formarea agentului reducător nicotinamidă adenzină dinucleotidă fosfat oxidază (NADPH) și a moleculelor energetice de adenzină trifosfat (ATP) care sunt utilizate în etapa de fixare și reducere a CO₂ (Dobrotă, 2010). În plante, asimilația de CO₂ are loc concomitent cu eliminarea apei stomatale.

5.3.2.1. Determinarea parametrilor fotosintetici ai plantelor de grâu. Modul de lucru

Determinarea parametrilor fotosintetici a fost realizată cu ajutorul unui sistem portabil schimbător de gaze GFS-3000 (Waltz, Germania). Acest sistem este prevăzut cu o cuvetă care are o fereastră cu aria de 8 cm² și posibilitatea iluminării fluorimetrice a frunzei în vederea efectuării măsurătorilor de fluorescență clorofiliană. Parametrii care au fost setați pentru efectuarea tuturor măsurătorilor sunt: 385 μmol mol⁻¹ CO₂, 1000 μmol m⁻² s⁻¹ intensitate luminoasă, temperatură 25°C și 70% umiditate. Plantele au fost introduse în cuvetă astfel încât toată suprafața ferestrei cuvetei să fie acoperită. După închiderea cuvetei, frunzele au fost supuse intensității luminoase, iar într-un interval de timp de 20-30 min a avut loc deschidere stomatei, obținându-se valori stabile ale conductanței stomatale de vaporizare a apei și ale vitezei nete de asimilație a CO₂. De asemenea, au fost înregistrate și valori ale fluorescenței inițiale (F - fluorescence yield) și fluorescenței maxime (F_m - maximum fluorescence yield) obținute la intensitatea luminoasă de 4500 μmol m⁻² s⁻¹, într-un timp de 1 s, necesare pentru calculul vitezei transportului de electroni.

Valorile conductanței stomatale de vaporizare a apei și ale vitezei nete de asimilație a CO₂ au fost calculate conform ecuațiilor propuse de către von Caemmerer și Farquhar (1981). Viteza transportului de electroni a fost calculată din măsurătorile de fluorescență clorofiliană, conform ecuațiilor propuse de către Genty et al. (1989). Pentru calculul acestui parametru a fost utilizată constanta de absorbție a frunzei de 0,85 și s-a presupus faptul că lumina a fost distribuită egal între cele două fotosisteme (Niinemets et al,

2010a) PS I și PS II. În procesul de fotosinteză este implicată interacțiunea dintre două reacții de lumină PS I și PS II, care acționează în serie pentru a produce oxigenul molecular pentru formarea NADPH și pentru sinteza de ATP (Bercea, 2008).

5.3.2.2. Rezultate și discuții privind influența antibioticelor asupra parametrilor fotosintetici ai plantelor de grâu

În Figura 5.12.a și b se observă o scădere a vitezei transportului de electroni, mai ales în cazul concentrației mari a soluției de antibiotice ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) utilizate pentru udarea plantelor de grâu. Excepțiile au fost doar în cazul tratamentelor cu CIP și ERI (Figura 5.12.b). Plantele de grâu tratate cu AMP influențează negativ viteza transportului de electroni, acestea scăzând în cazul ambelor concentrații ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$ și $1,5 \text{ mg L}^{-1}$) de soluții de antibiotice utilizate pentru udarea plantelor (Figura 5.12.a și b) (Opriș et al., 2012b).

În general, în comparație cu plantele control, cele mai mici valori ale vitezei transportului de electroni (aproximativ cu 16% mai mici) au fost observate în cazul tratamentului cu antibioticul CFX la concentrația de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$. Efectele antibioticelor din clasa penicilinelor și a tetraciclinelor asupra valorilor vitezei transportului de electroni (Figura 5.12.a și b) sunt asociate cu scăderea conținutului de clorofile din plante (Figura 5.20). În cadrul acestui studiu, efectul antibioticului AMOX, la concentrația cea mai mare, obținut asupra valorilor vitezei transportului de electroni este în concordanță cu efectul de inhibare a acestuia asupra PS II (Opriș et al., 2012b). Acest aspect a fost constatat și de către alți cercetători (Pan et al., 2008), dar la concentrații ale antibioticului AMOX relativ mai mari.

Valorile celui de-al doilea parametru fotosintetic analizat, conductanța stomatală de vaporizare a apei, au crescut în cazul tratamentelor în care au fost utilizate soluții de antibiotice de concentrație de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 5.12.c), cu excepția tratamentelor cu TET și ERI. În aceste ultime trei cazuri, plantele nu au fost afectate la utilizarea a nici unuia dintre volumele de soluții de antibiotice utilizate ($0,5 \text{ L}$ și 1 L). În cazul celei de a doua concentrații de soluții de antibiotice ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) din clasele cefalosporinelor (CFZ, CFX) și tetraciclinelor (TET) ($0,5 \text{ L}$ și 1 L) utilizate, valorile conductanței stomatale de vaporizare a apei, au scăzut cu aproximativ 10-30% (Figura 5.12.d). De asemenea, au fost observate scăderi ale conductanței stomatale de vaporizare a apei și în cazul plantelor tratate cu tetraciclina DOXI și fluorochinolona CIP, dar doar după ce plantele au fost udate cu un volum de 1 L soluție de antibiotice (Figura 5.12.d) (Opriș et al., 2012b).

Valorile conductanței stomatale de vaporizare a apei fluctuează în cazul anumitor antibiotice luate în studiu (la concentrația de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ soluții de antibiotice). În cazul tratamentului cu antibioticul AMP, acest efect este asociat cu conținutul de zeaxantină (Figura 5.21) care se presupune a fi un precursor în sinteza acidului abscisic (ABA), hormon responsabil pentru închiderea stomatei (Milborrow, 2001). ABA este un reglator de bază al răspunsului plantelor la factorii de stres, creștere și dezvoltare (Delian, 2006). Cu toate acestea, doar o mică parte din carotenoide sunt implicate în sinteza ABA, iar modificările în conținutul de pigmenți carotenoizi nu poate fi asociat cu reducerea conductanței stomatale de vaporizare a apei, la concentrația cea mai mare de soluții de antibiotice utilizate în acest experiment.

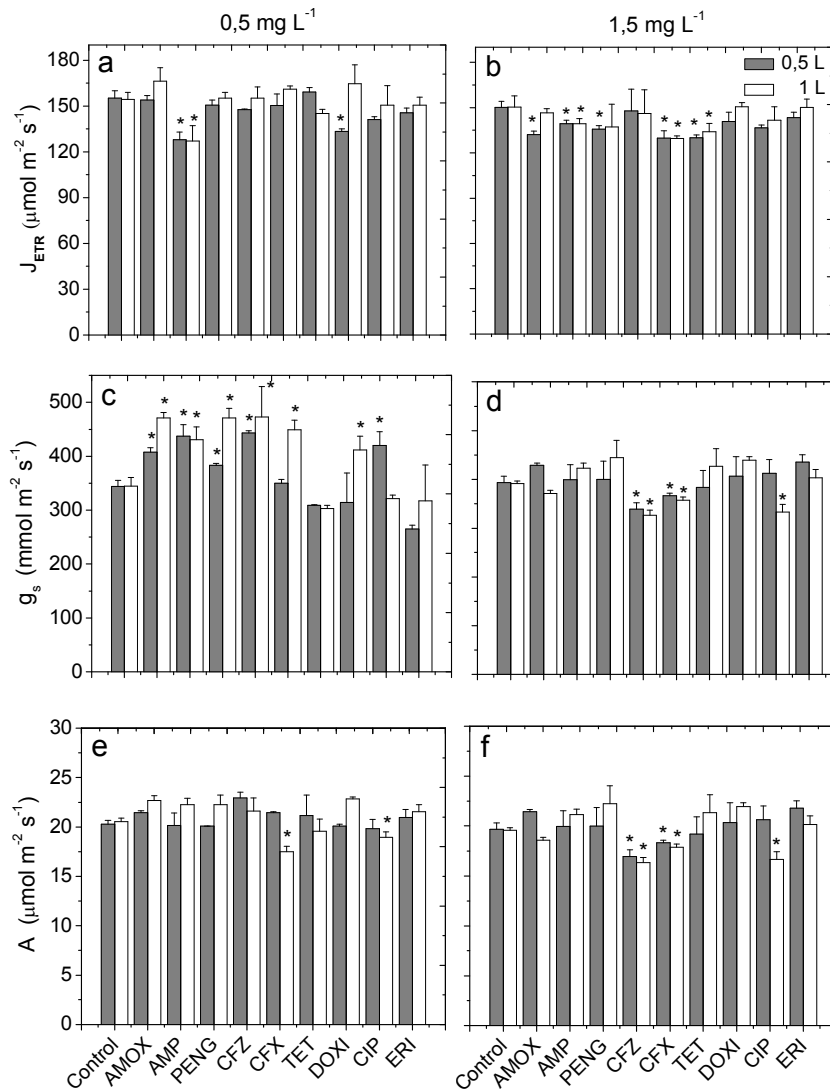


Figura 5.12. Modificări ale vitezei transportului de electroni (J_{ETR} , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (a și b), ale conductanței stomatale de vaporizare a apei (g_s , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (c și d) și ale vitezei nete de asimilație a CO₂ (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (e și f) în plantele de *Triticum aestivum* L. soiul „Lovrin” tratate cu soluțiile a nouă antibiotice de concentrații diferite 0,5 mg L⁻¹ (a, c și e) și 1,5 mg L⁻¹ (b, d și f). Măsurătorile au fost efectuate după ce plantele au fost udate cu volume totale de soluții de antibiotice de 0,5 L (după o săptămână) și 1 L (după două săptămâni). Fiecare coloană reprezintă media (\pm SE) a trei măsurători independente cu plante diferite crescute în aceleași condiții. Simbolul „*” reprezintă diferențe semnificative din punct de vedere statistic între o plantă tratată cu antibiotic și o plantă control ($P < 0,05$).

De asemenea, au fost observate scăderi ale valorilor vitezei nete de asimilație a CO₂ în cazul tratamentelor în care au fost utilizate soluții de antibiotice din clasa cefalosporinelor (CFX) și fluorochinolonele (CIP), de concentrație de 0,5 mg L⁻¹. Acest efect a fost observat doar după ce plantele au fost udate cu un volum total de 1 L soluție de antibiotice (Figura 5.12.e). Utilizarea soluțiilor de antibiotice de concentrație mai mare (1,5 mg L⁻¹) a condus la scăderi mai pronunțate ale valorilor vitezei nete de asimilație a CO₂, chiar și la volumul de 0,5 L soluție de antibiotice utilizată. Aceste scăderi au fost observate tot în cazul tratării plantelor cu soluții de antibiotice din clasa cefalosporinelor (Figura 5.12.f).

Efectul antibioticului CIP asupra plantelor a fost mai evident după ce plantele au fost udate cu un volum de 1 L de soluție (Figura 5.12.f) (Oprîș et al., 2012b). Efectele cauzate de antibioticul CIP sunt în

concordanță cu studiul lui Aristilde et al. (2010) care demonstrează că structura antibioticului CIP este similară cu cea a inhibitorilor care au rol oxidativ în PS II. Scăderea valorilor vitezei nete de asimilație a CO₂ în plantele tratate cu antibioticele din clasa cefalosporinelor pot avea aceeași explicație, inhibarea activității catalitice ale PS II putând fi asociată cu gruparea NH₂ din structura cefalosporinelor (Opriș et al., 2012b).

Scăderea valorilor vitezei nete de asimilație a CO₂ în cazul tratamentelor cu soluții de antibiotice de concentrație 1,5 mg L⁻¹ este asociată cu scăderea valorilor conductanței stomatale de vaporizare a apei (Figura 5.12.d) și cu modificări nesemnificative din punct de vedere statistic în cazul vitezei transportului de electroni, pentru tratamentele cu antibioticele CFZ și CIP (Figura 5.12.b). Astfel, cel puțin pentru aceste două tratamente, reducerea intensității fotosintezei nu a fost asociată cu inhibarea activității PS II, ci mai degrabă reflectă viteza de asimilație a CO₂ în frunze (Opriș et al., 2012b). Același comportament a fost observat pentru o varietate de plante de grâu ca răspuns la un tratament cu 80 μM oxitetracilină (Li et al., 2011).

În general, scăderea valorilor vitezei nete de asimilație a CO₂ a fost moderată (au scăzut cu 10-17% comparativ cu plantele de grâu utilizate drept control). Aceste efecte au crescut cu creșterea dozei de antibiotic administrate plantelor de grâu (Opriș et al., 2012b).

5.3.3. Emisiile de compuși organici volatili din plantele de grâu tratate cu antibiotice

O gamă foarte variată de compuși organici volatili (VOC - volatile organic compounds) este emisă de plantele care sunt supuse unor varietăți de stres de natură biotică sau abiotică (Copolovici et al., 2012). De aceea, pentru a obține o perspectivă cât mai completă referitoare la efectele antibioticelor asupra plantelor, au fost analizate și emisiile de VOC. În cadrul studiului nostru, dintre VOC emiși de plantele de grâu au fost analizați produșii de oxidare sub acțiunea lipoxigenazei (LOX - lipoxygenase pathway products) și monoterpenele. Produșii LOX sunt formați în urma oxidării acizilor grași din plante, sub acțiunea enzimei lipoxigenază. Cantitatea emisiilor de LOX este în concordanță cu răspunsul plantei la o varietate de condiții de stres și constituie primul răspuns al plantei în condiții de stres (Liavonchanka și Fuessner, 2006). Monoterpenele sunt compuși ai metabolismului secundar din plante, sunt insolubile în apă și derivă din acetil coenzima A sau alți intermediari ai glicolizei. Multe dintre monoterpene și derivații lor sunt foarte importanți agenți toxici împotriva insectelor (Dobrotă, 2005). Grâul, în condiții normale nu este considerat un emițător de monoterpene. Cu toate acestea, emisiile de monoterpene sunt de obicei induse de răspunsul stresului biotic sau abiotic, la fel ca în cazul produșilor LOX care sunt emiși de cele mai multe specii de plante (Copolovici et al., 2012; Niinemets, 2010; Niinemets et al., 2010b, 2010c).

5.3.3.1. Captarea și analiza compușilor organici volatili emiși de plantele de grâu. Modul de lucru

Prelevarea de VOC a fost realizată utilizând același sistem portabil ca și în cazul măsurătorilor parametrilor fotosintetici. După ce au fost obținute valori stabile ale parametrilor fotosintetici, din cuveta aparatului, un volum de aer de 3 L a fost prelevat în cartușe de oțel (10,5 × 3 cm, Supelco, SUA) cu conținut de cărbune activ numit strat adsorbant Carbopack (C 20/40 mesh, C 40/60 mesh, and X 20/40 mesh) optimizat pentru analiza cantitativă a LOX și a monoterpenelor (Copolovici et al., 2009, 2011; Niinemets et al., 2010a). Aerul a fost prelevat cu ajutorul unei pompe 1003-SKC (SKC Inc., SUA) cu un debit de 200 mL min⁻¹ într-un timp de 15 min, la temperatura camerei. Înainte și după captarea de VOC

emiși de plantele de grâu tratate cu antibiotice, au fost prelevate și probe de aer control, din cuveta sistemului schimbător de gaze în care nu s-a introdus plantă de grâu.

Pentru analiza VOC a fost utilizat un sistem alcătuit dintr-un dispozitiv prevăzut cu termo-desorbție (Shimadzu TD20, Japonia) și un cromatograf de gaze cuplat cu spectrometru de masă (Shimadzu QP2010 Plus GC-MS, Japonia). Metoda utilizată pentru analiza de VOC a fost conform unei metode descrise detaliat de către Copolovici et al. (2009) și Toome et al. (2010). Compușii analizați au fost identificați comparând spectrele de masă ale compușilor individuali cu spectrele standardelor analizate (de puritate GC, Sigma-Aldrich, SUA) și cu spectrele de masă din baza de date NIST de spectre. De asemenea, identificarea compușilor a fost realizată și pe baza timpilor de retenție.

În cadrul acestui studiu au fost determinate vitezele de emisie ale compușilor lipoxigenați (Φ_{LOX}), însumând vitezele de emisie pentru 1-hexanol, (Z)-3-hexenol, (Z)-2-hexenal și (Z)-3-hexenil acetat. A doua categorie de VOC analizată a fost monoterpenele. Datele experimentale obținute din analiza monoterpenelelor au fost interpretate ca viteză de emisie a monoterpenelelor ($\Phi_{\text{MONOTERPENE}}$), însumând vitezele de emisie pentru α -pinen, β -pinen, camfen, limonen, 3-careen, *p*-cimen și β -felandren (Opriș et al., 2012b).

5.3.3.2. Rezultate și discuții privind emisiile de compuși organici volatili din plantele de grâu tratate cu antibiotice

Atât vitezele de emisie ale compușilor lipoxigenați (Φ_{LOX}) cât și vitezele de emisie ale monoterpenelelor ($\Phi_{\text{MONOTERPENE}}$) au fost foarte scăzute în cazul plantelor control. Această scădere se poate observa în Figura 5.16 (reprezentarea grafică a vitezelor de emisie a VOC analizați în cadrul acestui studiu). Creșterea de Φ_{LOX} a fost observată chiar și la concentrația de 0,5 mg L⁻¹, 1 L soluție de AMP, PENG, CFX, DOXI și CIP (Figura 5.16.a). La o concentrație mai mare de soluție de antibiotice utilizată pentru udarea plantelor 1,5 mg L⁻¹ și volum de 1 L, Φ_{LOX} a crescut în cazul tuturor tratamentelor cu antibiotice, mai puțin în cazul tratamentului cu AMP (Figura 5.16.b). De asemenea, în acest caz, comparativ cu plantele control, Φ_{LOX} a crescut de patru ori mai mult. În general, făcând o comparație între cele două concentrații de soluții de antibiotice utilizate la udarea plantelor, Φ_{LOX} a crescut cu peste 100% în cazul concentrației de 1,5 mg L⁻¹, decât în cazul concentrației de 0,5 mg L⁻¹. Plantele care au fost tratate cu antibioticele AMP și CIP au făcut excepție de la această constatare generală (Opriș et al., 2012b).

În cazul tuturor celor nouă antibiotice utilizate pentru tratamentul plantelor de grâu a fost observată o creștere a Φ_{LOX} care este dependentă de creșterea concentrației soluțiilor de antibiotice și de volumul utilizat pentru udarea plantelor de grâu (Figura 5.16.a și b). Concordanțe semnificative între Φ_{LOX} și severitatea stresului au fost demonstrate pentru alte tipuri de stres indus plantelor: ozonul (Beauchamp et al., 2005), temperatura (Copolovici et al., 2012) și excesul de apă (Copolovici și Niinemets, 2010). Din studiul de față, se poate concluziona faptul că LOX constituie un indicator sensibil al răspunsului plantelor la condiții de stres induse de antibiotice.

$\Phi_{\text{MONOTERPENE}}$ a crescut în cazul ambelor concentrații de soluții de antibiotice utilizate în cadrul acestui studiu (Figura 5.16.c și d). În general, aceste efecte au fost mai pronunțate în cazul în care a fost utilizat pentru udarea plantelor un volum de 1 L, decât în cazul unui volum de 0,5 L de soluții de antibiotice. Diferențe semnificative din punct de vedere statistic nu au fost observate între concentrațiile soluțiilor de antibiotice utilizate, decât doar în cazul plantelor tratate cu ERI (Figura 5.16.c și d) (Opriș et al., 2012b).

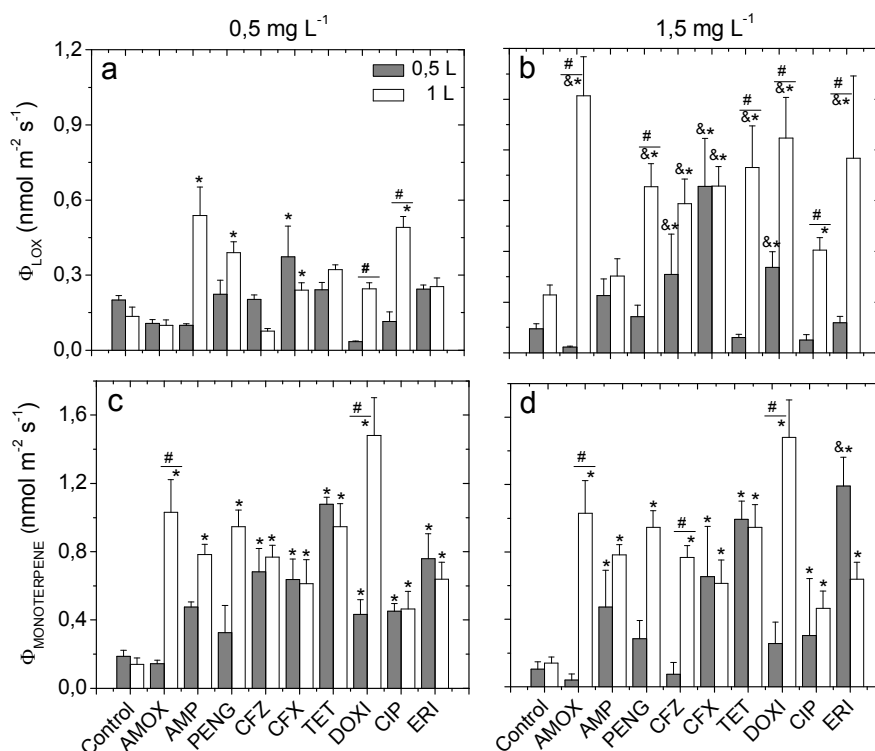


Figura 5.16. Vitezele de emisie ale produșilor de oxidare sub acțiunea lipoxigenazei (Φ_{LOX} , $\text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (a și b) și ale monoterpenelor ($\Phi_{\text{MONOTERPENE}}$, $\text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (c și d) din plantele de *Triticum aestivum* L. soiul „Lovrin” tratate cu soluțiile a nouă antibiotice. Măsurătorile au fost efectuate după ce plantele au fost udate cu diferite volume de soluții de antibiotice 0,5 L și 1 L de concentrații 0,5 mg L^{-1} (a și c) și 1,5 mg L^{-1} (b și d). Φ_{LOX} reprezintă suma vitezelor de emisie pentru 1-hexanol, (Z)-3-hexenol, (Z)-2-hexenal și (Z)-3-hexenil acetat, iar $\Phi_{\text{MONOTERPENE}}$ reprezintă suma vitezelor de emisie pentru α -pinen, β -pinen, camfen, limonen, 3-careen, *p*-cimen și β -felandren. Fiecare coloană reprezintă media (\pm SE) a trei măsurători independente cu plante diferite crescute în aceleași condiții, iar simbolurile situate deasupra coloanelor reprezintă diferențe semnificative din punct de vedere statistic ($P < 0,05$). „*” - diferențe statistice între o plantă tratată cu antibiotic și o plantă control, „#” - diferențe statistice între volumele de soluții de antibiotice (0,5 L și 1 L) de aceeași concentrație (0,5 mg L^{-1} sau 1,5 mg L^{-1}) utilizate pentru udarea plantelor, „&*” - diferențe statistice între două concentrații ale aceluiași antibiotic (0,5 mg L^{-1} și 1,5 mg L^{-1}) pentru același volum de soluție (0,5 L sau 1 L) utilizat pentru udarea plantelor.

Cele mai mari cantități de monoterpeni au fost emise de plantele tratate cu soluții de TET și DOXI (Figura 5.16.c și d) și au fost asociate cu scăderea cantității de carotenoide (Figurile 5.21.c și 5.22.d) (Oprîș et al., 2012b). În cazul plantelor tratate cu TET există posibilitatea de activare sau dezactivare a unor gene, procese ce au loc oricând în timpul anumitor infecții patogene a plantelor (Zarnack et al., 2006).

5.3.4. Influența antibioticelor asupra pigmentilor asimilatori din plantele de grâu

În studiul nostru, pigmentii asimilatori care au fost determinați din plantele de grâu, fac parte din categoria pigmentilor clorofilieni (clorofila *a* și clorofila *b*) și a celor carotenoizi (β -caroten, zeaxantina, luteina, neoxantina și violaxantina). Pigmenții zeaxantină, luteină, neoxantină și violaxantină sunt

carotenoide sub formă de xantofile, pigmenți în care radicalii liberi ai lanțului de carbon sunt reprezentați de grupări hidroxil -OH (Dobrotă, 2010).

Clorofilele au rol deosebit de important în absorbția luminii, în procesul de fotosinteză. Clorofila *a* se găsește în toate plantele verzi care prin fotosinteză elimină O₂, iar clorofila *b* însoțește clorofila *a* în toate plantele superioare, alge verzi și flagelate (Dobrotă, 2010).

Pigmenții carotenoizi din plante sunt antioxidanți lipo-solubili (Havaux, 1998; Havaux et al., 1998), iar rolul lor fotoprotector poate fi privit ca o valvă de siguranță ce permite disiparea energiei în exces înainte de apariția daunelor la nivelul celulei (Dobrotă, 2010). Carotenoidele din plantele supuse unor condiții severe de stres sunt foarte rapid distruse și ca urmare nu mai au rol de protecție împotriva distrugerii prin oxidare (Munné-Bosch și Alegre, 2000).

5.3.4.1. Extracția și analiza pigmentilor asimilatori din plantele de grâu. Modul de lucru

Pentru determinarea conținutului de pigmenți clorofilieni și carotenoizi din plantele de grâu au fost luate probe de frunze cu aria totală de 4 cm², imediat după ce au fost efectuate măsurătorile parametrilor fotosintetici și apoi au fost înghețate imediat în azot lichid. Pigmenții au fost extrași în 100% acetonă cu carbonat de calciu (ambele achiziționate de la Sigma-Aldrich, Germania). Suspensiile astfel obținute au fost mojarate și apoi centrifugate cu ajutorul dispozitivului Hettich 320 R Universal (Hettich GmbH, Germania) la 0°C și 9500 g, timp de 3 min. Supernatantul a fost decantat, iar aceste etape ale extracției au fost repetate de cel puțin trei ori, în cantități foarte mici de acetonă, până când supernatantul a rămas incolor. Extractele au fost aduse într-un volum final de 1 mL acetonă și apoi filtrate cu ajutorul unor filtre de teflon (0,45 μm, VWR International, SUA) (Oprîș et al., 2012b).

Extractele astfel obținute au fost analizate cu ajutorul unui cromatograf de lichide de înaltă performanță (HPLC, Agilent Technologies 1200, SUA) prevăzut cu detector cu serie fotodiode cu baleiaj complet (DAD). Metoda care a fost utilizată este o metodă puțin modificată față de metoda descrisă de către Niinemets et al. (1998), în cazul nostru fiind utilizată o coloană cu fază inversă Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 × 150 mm, 5 μm, Agilent Technologies, SUA). Temperatura coloanei de separare a fost menținută la 10°C, iar debitul fazei mobile a fost de 1,5 ml min⁻¹. Faza mobilă utilizată pentru eluția cromatografică a fost compusă din apă ultrapură cu HEPES [acid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetsulfonic] 0,1 M, pH 8 (A) și acetonă (B) de puritate HPLC, ambele fiind achiziționate de la Sigma-Aldrich (Germania). Programul de gradient utilizat pentru separarea pigmentilor asimilatori a fost: 7,5 min 25% A și 75% B, 5 min 0% A și 100% B, raport de solvenți care a fost menținut timp de 3 min. Etapa următoare a constat în revenirea la compoziția inițială a fazei mobile 25% A și 75% B în 2 min. Calibrarea a fost realizată utilizând pigmenți comerciali: clorofila *a*, clorofila *b* și β-caroten care au fost achiziționați de la Sigma-Aldrich (Germania), iar zeaxantina și luteina de la Fluka (Germania).

Unii cercetători (Niinemets et al., 1998; Pocock et al., 2004; Polle et al., 2001) au obținut referințele (standardele) pigmentilor de interes prin extracția lor din plante sau alge urmată de o purificare pe plăci cromatografice TLC. După separare, compușii de interes sunt reluați de pe plăcile TLC în diferiți solvenți, iar concentrația lor este determinată din calculul coeficientului de extincție, din măsurători spectrofotometrice. În cazul nostru, pigmenții carotenoizi neoxantină și violaxantină au fost extrași din frunze proaspete de *Primula vulgaris* L. care au fost mărunțite cu azot lichid. Acești doi pigmenți au fost extrași în etanol 100% (Sigma-Aldrich, Germania). Separarea lor a fost realizată cu ajutorul tehnicii cromatografice prin utilizarea de plăci TLC preparative de silicagel (20 × 20, 500 μm, Analtech, SUA).

Spotarea extractelor pe plăcile TLC a fost realizată în bandă cu ajutorul unei microseringi Hamilton model 705 RN SYR (50 μ L, Germania). Developarea plăcilor TLC a fost realizată cu un amestec de solvent care a fost compus din 400 mL eter de petrol (Sigma-Aldrich, Germania), 44 mL 2-propanol (Romil Ltd.,UK) și 20 μ L apă ultrapură (aceeași componenți ai fazei mobile utilizați ca în cazul studiului realizat de către Pocock et al., 2004, dar în raport diferit). Plăcile TLC au fost developate într-o cameră de developare într-un timp de 15 min, iar distanța de migrare a fazei mobile a fost de aproximativ 10 cm. Uscarea plăcilor developate a fost realizată la temperatura camerei. Placa cromatografică TLC obținută în urma separării pigmentilor de interes este prezentată în Figura 5.18.

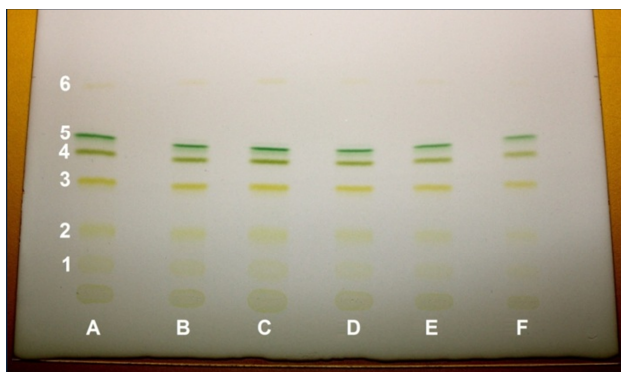


Figura 5.18. Placa cromatografică TLC obținută la separarea pigmentilor asimilatori extrași din frunze de *Primula vulgaris* L. Pozițiile A-F reprezintă spotarea în bandă a extractelor obținute, iar pozițiile 1-6 pigmentii: 1-neoxantina, 2-violaxantina, 3-luteina, 4-clorofilă *b*, 5-clorofilă *a* și 6- β -caroten.

Cu metoda TLC prezentată anterior, pe lângă separarea pigmentilor neoxantină și violaxantină, au fost separați și pigmentii luteină, clorofilă *b*, clorofilă *a* și β -caroten, aceștia din urmă nefiind purificați și cuantificați astfel, deoarece au fost folosite standarde comerciale. Reluarea pigmentilor violaxantină și neoxantină de pe plăcile TLC a fost realizată în 100% acetonă, iar concentrația lor a fost calculată din măsurătorile spectrofotometrice utilizând lungimi de undă corespunzătoare coeficienților de extincție pentru carotenoide (Davies, 1976). Pentru determinările cantitative ulterioare ale neoxantinei și violaxantinei din plantele de grâu tratate cu antibiotice, referințele astfel obținute au fost analizate cu sistemul HPLC-DAD obținând un semnal corespunzător concentrației obținute din calculele coeficienților de extincție, din măsurătorile spectrofotometrice.

Din analiza HPLC-DAD a pigmentilor de interes, picurile au prezentat o intensitate maximă a semnalului la următoarele lungimi de undă: 430 nm pentru clorofila *a*, 450 nm pentru neoxantină și violaxantină și 455 nm pentru restul pigmentilor, clorofilă *b*, β -caroten, zeaxantină și luteină (Oprîș et al., 2012b).

5.3.4.2. Rezultate și discuții privind influența antibioticelor asupra pigmentilor asimilatori din plantele de grâu

Separarea tuturor pigmentilor asimilatori de interes a fost realizată într-un timp maxim de 19 min. La concentrația de 0,5 mg L⁻¹ (0,5 L și 1 L) conținutul total de clorofilă *a* scăzut doar în cazul tratamentului cu CFX, iar în cazul tratamentului cu CIP doar după un volum de 1 L soluție de antibiotic (Figura 5.20.a). Tratamentele cu 1,5 mg L⁻¹ soluție de antibiotice AMOX, TET DOXI, CIP și ERI au redus conținutul total de clorofile (Figura 5.20.b). Efectele tratamentelor cu antibiotice au fost similare pentru clorofila *a* și *b*, în special la tratamentele în care a fost utilizată concentrația de 1,5 mg L⁻¹ (Figura 5.20.c și d). Raportul dintre clorofile (clorofila *a/b*) a fost crescut pentru tratamentele cu AMOX, CFX

(0,5 mg L⁻¹, 0,5 L) și CFX (0,5 mg L⁻¹, 1L), dar redus pentru tratamentul cu CIP (0,5 mg L⁻¹, 1 L, vezi Figura 5.20.c) (Opriș et al., 2012b).

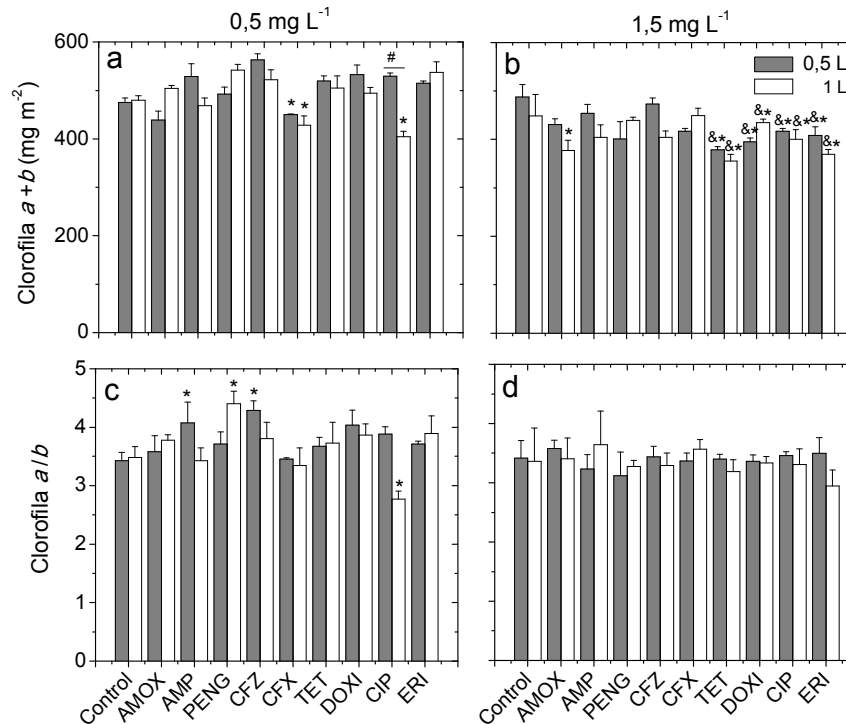


Figura 5.20. Modificări ale conținutului total de clorofile $a+b$ (mg m⁻²) (a și b) și raportului acestora a/b (c și d) în plantele de *Triticum aestivum* L. soiul „Lovrin” tratate cu nouă antibiotice. Măsurătorile au fost efectuate după ce plantele au fost udate cu diferite volume de soluții de antibiotice 0,5 L și 1 L de concentrații 0,5 mg L⁻¹ (a și c) și 1,5 mg L⁻¹ (b și d). Semnificația statistică este aceeași ca în legenda Figurii 5.16.

În general, scăderea conținutului de clorofile este dată de răspunsul plantelor la condițiile de stres, fapt ce conduce la reducerea absorbției luminii (Munné-Bosch și Alegre, 2000). În cazul nostru efectele antibioticelor TET, CIP și ERI au fost mai pronunțate la concentrația cea mai mare de soluție de antibiotice utilizată pentru udarea plantelor de grâu. Acest lucru este în concordanță cu reducerea conținutului de clorofilă demonstrat de către Li et al. (2011), în cazul plantelor de grâu tratate cu oxitetraciclină și de asemenea, cu inhibarea sintezei clorofilene în cazul plantelor tratate cu antibioticul TET (Bradel et al., 2000). Brain et al. (2004) au ajuns la concluzia că din cele 25 de antibiotice studiate, tetraciclinele au avut cea mai mare influență asupra conținutului de clorofilă din plantele acvatice precum sunt *Lemna gibba* L.

Referitor la studiul nostru, în cele mai multe dintre cazuri o parte din peniciline și cefalosporine reduc conținutul de clorofile din plante (Figura 5.20) (Opriș et al., 2012b). Acest fenomen poate fi asociat cu anumite efecte ce au loc asupra multiplicării cloroplastelor. O explicație mult mai adecvată în cazul de față este faptul că antibioticele utilizate în acest studiu afectează anumite procese ce au loc în fotosinteză (vezi Subcapitolul 5.3.2), rezultând condiții fotoinhibitoare care reduc secțiunea transversală a PS II (Osmond et al., 1999).

De asemenea, raportul de clorofilă a/b ce caracterizează distribuția pigmentilor între centrii de reacție și complecșii responsabili pentru absorbția luminii (Bassi și Caffari, 2000), crește destul de mult pentru plantele tratate cu o parte din peniciline și cefalosporine (Figura 5.20.c). Acest lucru sugerează

reducerea complexelor responsabili pentru absorbția luminii a PS II, în comparație cu centrul de reacție. Valorile normale ale raportului clorofila *a/b* sunt cuprinse între 2,5-3,5 (Bercea, 2008). A fost observat că în cazul plantelor tratate cu CIP, raportul clorofilă *a/b* a scăzut (Figura 5.20.c), ceea ce demonstrează că acest antibiotic are efect foarte puternic asupra numărului centrilor de reacție. În general scăderea conținutului de carotenoide datorită stresului indus de antibiotice este direct proporțional cu modificările ce au loc în conținutul de clorofile, cu precădere în cazul tratamentelor cu TET, DOXI, CIP și ERI la concentrația de 1,5 mg L⁻¹ (Figurile 5.20.b și 5.21.c) (Opriș et al., 2012b).

Conținutul de pigmenți carotenoizi (luteina, zeaxantina și β -caroten) din plante nu a fost afectat la concentrația de 0,5 mg L⁻¹, 0,5 L soluție de antibiotice (Figura 5.21.a). După udarea plantelor cu 1 L de soluții de antibiotice, a fost observată o scădere a conținutului de zeaxantină și β -caroten pentru plantele tratate cu CIP și de asemenea o scădere a conținutului de zeaxantină pentru plantele tratate cu AMP (Figura 5.21.b) (Opriș et al., 2012b).

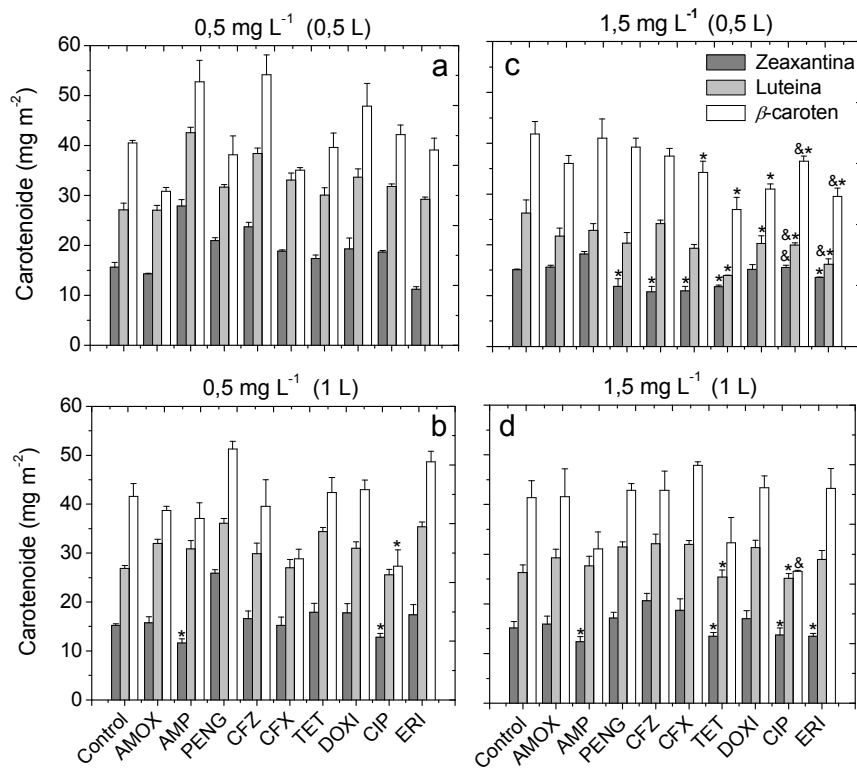


Figura 5.21. Modificări ale conținutului de zeaxantină, luteină și β -caroten (mg m^{-2}) în plantele de *Triticum aestivum* L. soiul „Lovrin” la răspunsul tratamentelor cu nouă antibiotice după ce acestea au fost udate cu volume totale de 0,5 L și 1 L soluție de antibiotice de concentrații 0,5 mg L⁻¹ (a și b) și 1,5 mg L⁻¹ (c și d). Semnificația statistică este aceeași ca în legenda Figurii 5.16.

La cea de a doua concentrație de soluții de antibiotice (1,5 mg L⁻¹) utilizate în cadrul acestui studiu, conținutul de zeaxantină a scăzut în aproape toate tratamentele, atât la volumul de soluție de antibiotice de 0,5 L cât și la volumul de 1 L, cu excepția tratamentului cu AMOX (Figura 5.21.c și d). β -carotenul și luteina au fost influențate doar în cazul anumitor tratamente cu antibiotice, iar în cazul plantelor tratate cu peniciline și cefalosporine nu a fost observată nici o influență semnificativă din punct de vedere statistic (Opriș et al., 2012b).

Totuși scăderi semnificative în conținutul de zeaxantină au fost observate în cazul tratamentelor cu AMP (Figura 5.21.b și d), PENG și CFX, CFZ (Figura 5.21.c) (Opriș et al., 2012). Spre deosebire de β -caroten și luteină, o cantitate importantă de zeaxantină poate fi prezentă în membranele tilacoide și de asemenea în membranele ne-fotosintetice (Havaux și Niyogi, 1999; Müller-Moulé et al., 2003). Formarea zeaxantinei este corelată cu disiparea excesului de energie absorbită sub formă de căldură, cu de-epoxidarea ciclului xantofilic și cu atenuarea fluorescenței clorofilene ne-fotochimice (Demmig-Adams și Adams, 2006; Munné-Bosch și Alegre, 2000). Astfel, reducerea conținutului de zeaxantină poate conduce la reducerea capacității de disipare a energiei în exces, fapt care poate fi o explicație mecanică pentru reducerea vitezei transportului de electroni în cazul plantelor tratate cu antibioticele luate în studiu (Figura 5.12.a și b) (Opriș et al., 2012b).

În Figura 5.22 sunt prezentate cantitățile de neoxantină și violaxantină care au fost determinate în cadrul acestui studiu. Scăderi semnificative din punct de vedere statistic au fost observate chiar și la concentrația de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, $0,5 \text{ L}$, dar în cazul violaxantinei.

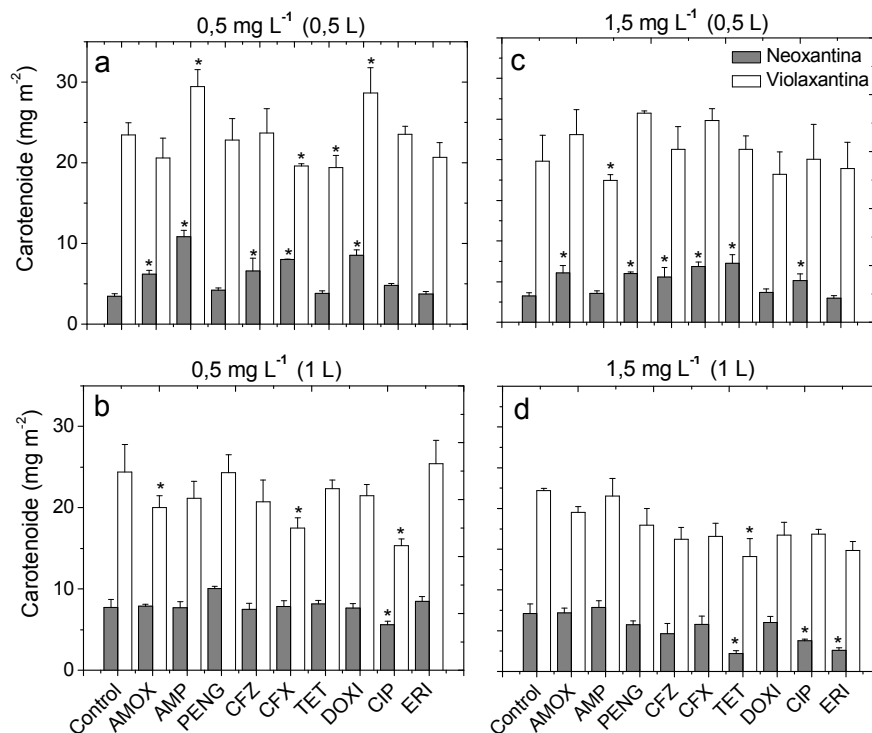


Figura 5.22. Modificări ale conținutului de neoxantină și violaxantină (mg m^{-2}) în plantele de *Triticum aestivum* L. soiul „Lovrin” la răspunsul tratamentelor cu nouă antibiotice după ce acestea au fost udate cu volume totale de $0,5 \text{ L}$ și 1 L soluție de antibiotice de concentrații $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (a și b) și $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ (c și d). Semnificația statistică este aceeași ca în legenda Figurii 5.16.

Aceste scăderi au fost observate la plantele de grâu care au fost tratate cu antibioticele din clasa cefalosporinelor (CFX) și a tetraciclinelor (TET) (Figura 5.22.a). În cazul tratamentului cu CFX, această scădere a conținutului de violaxantină a fost observată și după ce plantele au fost udate cu un volum mai mare de soluție de antibiotic (1L, Figura 5.22.b). Cel mai mic conținut de violaxantină care a fost obținut la concentrația de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, 1 L , a fost în cazul antibioticului CIP ($15,32 \text{ mg m}^{-2}$). La cea de a doua concentrație de soluție de antibiotice utilizată pentru udarea plantelor ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$), a fost observat că odată cu creșterea volumului de soluție de antibiotice utilizat pentru udarea plantelor, conținutul de

violaxantină scade (Figura 5.22.c și d). Astfel, față de control, cel mai mic conținut al violaxantinei a fost obținut în cazul tratamentului cu TET (14,11 mg m⁻², Figura 5.22.d). În ceea ce privește conținutul de neoxantină, acesta a variat în cele mai multe dintre cazuri, dar scăderi semnificative din punct de vedere statistic au fost obținute în cazul tratamentelor cu TET, CIP și ERI (Figura 5.22.d). Conținutul de neoxantină și violaxantină scade cu creșterea concentrațiilor și volumelor de soluții de antibiotice utilizate pentru udarea plantelor de grâu.

5.3.5. Influența antibioticelor asupra conținutului total de flavonoide din plantele de grâu

Flavonoidele sunt compuși fenolici formați în ciclul acidului șikimic care are loc în cloroplaste. Această clasă de compuși are rol de protecție împotriva multiplelor condiții de stres biotic și abiotic (Samanta et al., 2011). De aceea în cadrul studiului evaluării efectelor antibioticelor asupra plantelor, pe lângă analiza parametrilor fotosintetici, a compușilor organici volatili și a pigmentilor asimilatori, a fost analizat și conținutul total de flavonoide din plantele de grâu *Triticum aestivum* L.

5.3.5.1. Optimizarea metodei de extracție și analiza conținutului total de flavonoide din plantele de grâu. Modul de lucru

Prima etapă efectuată în cadrul determinării conținutului total de flavonoide din plante, a fost optimizarea metodei de extracție. Înainte de aplicarea metodei de extracție pe plantele de grâu tratate cu cele nouă antibiotice luate în studiu, au fost realizate teste de extracție care au fost aplicate doar pe plante de grâu control. Acestea au fost crescute la temperatura camerei (22°C), iar sursa de lumină a fost lumina naturală. Astfel, în vederea extracției flavonoidelor totale din plante de grâu control, au fost testate trei tehnici de extracție: prin macerare, cu ultrasunete și cu microunde (Soran et al., 2012). În cazul fiecărei tehnici de extracție utilizate pentru extracția flavonoidelor totale din plantele de grâu au fost utilizate mai multe rapoarte de solvent de extracție etanol : apă (v/v), după cum urmează: A (100 : 0), B (80 : 20), C (70 : 30), D (60 : 40), E (50 : 50) și F (40 : 60).

Cantitatea totală de flavonoide din extractele astfel obținute a fost determinată spectrofotometric (spectrofotometru UV-Vis 1800, Shimadzu, Japonia) cu clorură de aluminiu (AlCl₃), la lungimea de undă de 420 nm și exprimată în cantitate de rutin (Farmacopeea Română, 1993). Făcând o comparație între cele trei tehnici testate pentru extracția flavonoidelor totale din plantele de grâu (Figura 5.26) se observă că cea mai mare cantitate de flavonoide totale extrasă din plantele de grâu a fost obținută, în urma utilizării tehnicii cu ultrasunete (Soran et al., 2012; Opreș et al., 2011).

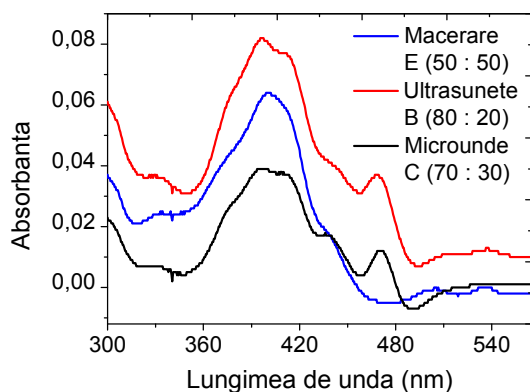


Figura 5.26. Spectrele UV-Vis ale extractelor de flavonoide totale din plantele de grâu, obținute cu cele mai potrivite rapoarte de solvent de extracție etanol : apă, v/v, corespunzătoare celor trei tehnici de extracție testate.

Această tehnică, spre deosebire de tehnicile prin macerare și cu microunde, este mult mai rapidă, are o aplicabilitate mult mai simplă și nu este costisitoare. În urma stabilirii celei mai bune tehnici de extracție a și a celui mai bun raport de solvent de extracție pentru extracția flavonoidelor totale din plantele de grâu (tehnica de extracție cu ultrasunete, raport solvent de extracție etanol : apă, 80 : 20, v/v), au fost realizate studii privind influența celor nouă antibiotice luate în studiu asupra plantelor de grâu.

5.3.5.2. Rezultate și discuții privind influența antibioticelor asupra conținutului total de flavonoide din plantele de grâu

Creșterea conținutului de flavonoide în plante este cauzată de prezența permanentă a unui factor de stres exterior precum sunt refrigerarea (Havaux și Kloppstech, 2001), radiațiile ultra-violete (Lavola, 1998) și vizibile (Havaux și Kloppstech, 2001) foarte puternice. Rolul conținutului de flavonoide mult prea crescut în plantele supuse unor factori de stres încă nu este complet înțeles, dar a fost demonstrat că flavonoidele au atât rol fotoprotector cât și rol antioxidant (Havaux și Kloppstech, 2001; Neill et al., 2002). Astfel, în cadrul evaluării efectelor antibioticelor asupra plantelor *Triticum aestivum* L., utilizarea unui volum de 0,5 L, 1,5 mg L⁻¹ soluției de PENG, CFX, TET și DOXI (Figura 5.27) poate indica o creștere a capacității antioxidante în aceste condiții de stres. Contrar, la volumul de 1 L soluție de antibiotice de concentrație 1,5 mg L⁻¹ (Figura 5.27), a fost observată o reducere a acestei capacități antioxidante.

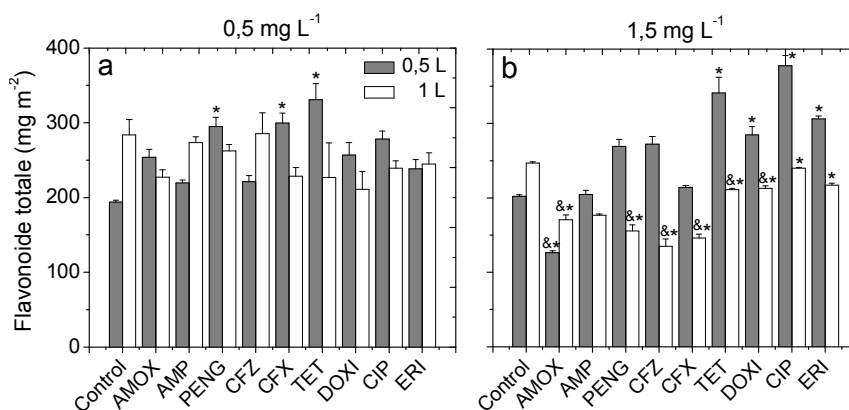


Figura 5.27. Modificarea conținutului total de flavonoide (mg m⁻²) în plantele de *Triticum aestivum* L. soiul „Lovrin” la răspunsul tratamentelor cu nouă antibiotice după ce acestea au fost udate cu volume totale de 0,5 L și 1 L soluție de antibiotice de concentrații 0,5 mg L⁻¹ (a) și 1,5 mg L⁻¹ (b). Semnificația statistică este aceeași ca în legenda Figurii 5.16.

CONCLUZII

Utilizarea excesivă a antibioticelor conduce la prezența lor în mediul înconjurător. În ciuda proprietăților benefice și a efectelor dorite în timpul aplicațiilor terapeutice, aceleași proprietăți ale antibioticelor pot fi dezavantajoase pentru mediul înconjurător, cauzând efecte negative asupra microorganismelor, plantelor, precum și potențiale riscuri asupra sănătății umane.

Datorită acestor aspecte, prin prezentul studiu de doctorat s-a urmărit aducerea de contribuții privind elaborarea de proceduri pentru determinarea antibioticelor din probe de apă de suprafață și probe de apă reziduală, precum și evidențierea influențelor negative ale acestora asupra algelor verzi (*Pseudokirchneriella subcapitata* L.) și plantelor de grâu (*Triticum aestivum* L.). În cadrul acestor

cercetări au fost selectate nouă antibiotice care aparțin la cinci clase diferite: peniciline (amoxicilină, ampicilină și penicilină G), cefalosporine (ceftazidimă și ceftriaxonă), tetraciclone (tetraciclină și doxiciclină), fluorochinolone (ciprofloxacină) și macrolide (eritromicină).

Au fost elaborate două proceduri de determinare a șapte antibiotice (amoxicilină, ampicilină, penicilină G, ceftazidimă, ceftriaxonă tetraciclină și doxiciclină) din probe de apă de suprafață și probe de apă reziduală. În cazul ambelor proceduri izolarea/concentrarea antibioticelor din diferite probe a fost realizată utilizând tehnica extracției pe fază solidă (SPE). Metodele SPE au fost realizate cu ajutorul unor cartușe cu fază staționară echilibrată hidrofilic-lipofilic, Oasis HLB, care au condus la grade de recuperare bune.

Prima procedură, SPE-HPTLC, a fost elaborată pentru determinarea conținutului de antibiotice din probe de apă de suprafață (Someșul Mic, Cluj-Napoca).

- Datele experimentale obținute în urma validării procedurii SPE-HPTLC propuse au demonstrat că aceasta este selectivă și prezintă liniaritate, precizie și acuratețe foarte bune.

În probele de apă de suprafață investigate au fost determinate două dintre antibioticele studiate în concentrații relativ mari, peste $2115 \mu\text{g L}^{-1}$ amoxicilină și peste $55 \mu\text{g L}^{-1}$ și tetraciclină.

În cazul probelor de apă reziduală (colectate de la un spital clinic și de la o stație de epurare: influenți și efluenți), pe lângă determinarea conținutului de antibiotice, a fost realizată și o caracterizare fizico-chimică a acestora. Determinarea conținutului de antibiotice a fost realizat utilizând cea de a doua procedură elaborată (SPE-HPLC-DAD/MS) în cadrul studiului de doctorat. Concluziile desprinse în urma acestor cercetări sunt:

- Parametrii fizico-chimici analizați nu au variat foarte mult în funcție de natura probelor de apă reziduală (colectate de la un spital clinic și de la o stație de epurare). Acest aspect a fost observat în cazul următorilor indicatori de calitate ai apei: consumul chimic de oxigen, consumul biochimic de oxigen și totalul de materii solide în suspensie.
- Raportul consum chimic/biochimic de oxigen luat drept index al biodegradabilității pentru apele reziduale colectate de la spitalul clinic, arată că aceste ape pot fi considerate la limita biodegradabilității datorită consumului mare de medicamente și al produselor de curățare utilizate în cadrul spitalului.
- Majoritatea parametrilor fizico-chimici determinați în probele de apă reziduală (efluent) colectate de la stația de epurare, s-au încadrat în limitele maxime admise prevăzute în Anexa nr.1 NTPA 011/2005 din cadrul H.G. 352/11.05.2005, excepție făcând conținutul de azot total.
- Procedura SPE-HPLC-DAD/MS utilizată pentru determinarea conținutului de antibiotice din probele de apă reziduală prezintă liniaritate, limite de detecție și de cuantificare, precizie și acuratețe bune.
- Utilizând procedura SPE-HPLC-DAD/MS, în probele de apă reziduală colectate de la spitalul clinic au fost determinate trei dintre antibioticele studiate (ceftazidimă, tetraciclină și doxiciclină).
- În probele de apă reziduală (influent) colectate de la stația de epurare, antibioticele ceftriaxonă, tetraciclină și doxiciclină au fost determinate utilizând aceeași procedură SPE-HPLC-DAD/MS.
- Antibioticele determinate în probele de apă reziduală investigate aparțin claselor de antibiotice (cefalosporine și tetraciclone) cel mai frecvent utilizate în medicină și domeniile conexe.

- În efluenții corespunzătoare influențelor colectați de la stația de epurare nu a fost detectat nici un antibiotic din cele șapte studiate în cadrul acestor cercetări. Acest lucru demonstrează faptul că procesul de epurare al apelor reziduale este eficient în ceea ce privește antibioticele studiate sau sunt în cantități mici care sunt sub limita de detecție a procedurii propuse.

Prezența antibioticelor în probe de apă reziduală (influent și efluent) este o problemă de mediu în continuă dezvoltare, chiar dacă în cazul nostru specific, prezența antibioticelor în probele de efluent nu a fost detectată. Astfel, apele reziduale investigate în cazul nostru nu prezintă un pericol pentru mediul acvatic, din punct de vedere al conținutului de antibiotice.

Cercetările privind influența a trei antibiotice (ampicilină, penicilină G și doxiciclină) asupra densității celulare a algelor *Pseudokirchneriella subcapitata* L., au condus la următoarele concluzii:

- În cazul celor trei teste cu antibiotice a fost observată o scădere cu până la 35,1% față de control în densitatea celulară a algelor, la 24 h de la începerea experimentelor.
- Antibioticul din clasa tetraciclinelor (doxiciclina) a avut cel mai pronunțat efect privind inhibarea densității celulare a algelor.
- În cazul testului cu antibioticul ampicilină au existat inhibări ale densității celulare a algelor, dar nesemnificative din punct de vedere statistic.

Un studiu mult mai complex privind toxicitatea antibioticelor, a fost realizat pe plantele de grâu (*Triticum aestivum* L.). În cadrul acestor cercetări s-a urmărit influența celor nouă antibiotice selectate asupra parametrilor fotosintetici (transportul de electroni, viteza netă de asimilație a CO₂ și conductanța stomatală de vaporizare a apei), asupra pigmentilor asimilatori (clorofilieni și carotenoizi), asupra compușilor organici volatili (monoterpene și produși de oxidare sub acțiunea lipoxigenazei), precum și asupra conținutului total de flavonoide din plante. În urma analizei datelor experimentale au fost constatate următoarele:

- În comparație cu plantele control, cele mai mici valori ale vitezei transportului de electroni (aproximativ cu 16% mai mici) au fost observate în cazul tratamentului cu antibioticul ceftriaxonă.
- Efectele antibioticelor asupra fotosintezei plantelor au fost moderate și indirecte, fiind reprezentate de modificări ale valorilor conductanței stomatale de vaporizare a apei și inhibări ale proceselor de asimilație a luminii. Aceste situații au fost observate în cazul plantelor care au fost tratate cu tetraciline, peniciline și cu cefalosporina ceftriaxonă.
- Efectele negative ale antibioticelor asupra parametrilor fotosintetici au crescut cu creșterea dozei de antibiotice administrată plantelor de grâu.
- Emisiile de monoterpene au crescut în cazul ambelor concentrații de soluții de antibiotice utilizate în cadrul acestui studiu.
- În cazul tuturor celor nouă antibiotice utilizate pentru tratarea plantelor de grâu a fost observată o creștere a emisiilor de produși de oxidare sub acțiunea lipoxigenazei, care este dependentă de concentrația și volumul soluțiilor de antibiotice utilizate pentru udarea plantelor de grâu.
- Compușii organici volatili au fost cel mai sensibil indicator de toxicitate pentru plantele de grâu care au fost tratate cu antibiotice.
- Conținutul de clorofile din plantele de grâu tratate cu antibiotice a scăzut cu până la 10% față de plantele control. Această scădere poate fi asociată cu răspunsul plantelor la condițiile de stres și cu reducerea absorbției luminii.

- Conținutul de carotenoide (zeaxantină, luteină, β -caroten) a scăzut cu până la 3-4%, față de plantele control.
- Cele mai semnificative scăderi (cu până la 69%) ale conținutului de neoxantină și violaxantină au fost obținute în cazul tratamentului cu tetraciclină, scăderi care pot fi asociate cu reducerea capacității fotoprotectoare a plantelor.
- În cazul plantelor tratate cu antibioticele studiate, conținutul total de flavonoide a scăzut semnificativ, efect asociat cu scăderea capacității antioxidante a plantelor.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Abd El-Gawad H.A., Aly A.M., **2011**. Assessment of aquatic environmental for wastewater management quality in the hospitals: a case study. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5, 474-782.
2. Abounassif A.M., Mian N.A.A., Mian M.S., **1990**. Analytical profile of ceftazidime, în *Analytical profile of drug substances*, Vol. 19, editat de către Florey K., Academic Press Inc., San Diego, California. p. 95-121.
3. Aristilde L., Melis A., Sposito G., **2010**. Inhibition of photosynthesis by a fluoroquinolone antibiotic. *Environmental Science & Technology* 44, 1444-1450.
4. Ašperger D., Mutavdžić D., Babić S., Horvat A.J.M., Kaštelan-Macan M., **2006**. Solid-phase extraction and TLC quantification of enrofloxacin, oxytetracycline, and trimethoprim in wastewater. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC* 19, 129-134.
5. Bassi R., Caffarri S., **2000**. Lhc proteins and the regulation of photosynthetic light harvesting function by xanthophylls. *Photosynthesis Research* 64, 243-256.
6. Batt A.L., Aga D.S., **2005**. Simultaneous analysis of multiple classes of antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contamination. *Analytical Chemistry* 77, 2940-2947.
7. Beauchamp J., Wisthaler A., Hansel A., Kleist E., Miebach M., Niinemets Ü., Schurr U., Wildt J., **2005**. Ozone induced emissions of biogenic VOC from tobacco: relationships between ozone uptake and emission of LOX products. *Plant, Cell & Environment* 28, 1334-1343.
8. Benito-Peña E., Partal-Rodera A.I., León-González M.E., Moreno-Bondi M.C., **2006**. Evaluation of mixed mode solid phase extraction cartridges for the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using liquid chromatography with UV-DAD detection. *Analytica Chimica Acta* 556, 415-422.
9. Bercea V., **2008**. *Fotosinteza. Fotoreglare și fotoprotecție*. Ed. Todesco, Cluj-Napoca. p. 36-49.
10. Bradel B.G., Preil W., Jeske H., **2000**. Remission of the free-branching pattern of *Euphorbia pulcherrima* by tetracycline treatment. *Journal of Phytopathology* 148, 587-590.
11. Brain R.A., Johnson D.J., Richards S.M., Sanderson H., Sibley P.K., Solomon K.R., **2004**. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 371-382.
12. Brain R.A., Wilson C.J., Johnson D.J., Sanderson H., Bestari K.J., Hanson M.L., Sibley P.K., Solomon K.R., **2005**. Effects of a mixture of tetracyclines to *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum* evaluated in aquatic microcosms. *Environmental Pollution* 138, 425-442.

13. Brain R.A., Hanson M.L., Solomon K.R., Brooks B.W., **2008**. Aquatic plants exposed to pharmaceuticals: effects and risks. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology* 192, 67-115.
14. Choma I., **2004**. Antibiotics: Analysis by TLC, în *Encyclopedia of chromatography*, Update Supplement, editat de către Cazes J., Marcel Dekker Inc., New York. p. 1-3.
15. Copolovici L., Kännaste A., Niinemets Ü., **2009**. Gas chromatography-mass spectrometry method for determination of monoterpene and sesquiterpene emissions from stressed plants. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Chemia* 54, 329-339.
16. Copolovici L., Niinemets Ü., **2010**. Flooding induced emissions of volatile signalling compounds in three tree species with differing waterlogging tolerance. *Plant, Cell & Environment* 33, 1582-1594.
17. Copolovici L., Kännaste A., Remmel T., Vislap V., Niinemets Ü., **2011**. Volatile emissions from *Alnus glutinosa* induced by herbivory are quantitatively related to the extent of damage. *Journal of Chemical Ecology* 37, 18-28.
18. Copolovici L., Kännaste A., Pazouki L., Niinemets Ü., **2012**. Emissions of green leaf volatiles and terpenoids from *Solanum lycopersicum* are quantitatively related to the severity of cold and heat shock treatments. *Journal of Plant Physiology* 169, 664-672.
19. Dahl E.L., Shock J.L., Shenai B.R., Gut J., DeRisi J.L., Rosenthal P.J., **2006**. Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 3124-3131.
20. Davies, B.H., **1976**. Carotenoids, în *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. Vol. I, 2nd edition, editat de către Goodwin T.W., Academic Press, New York. p. 38-165.
21. Delian E., 2006. *Fiziologia stresului biotic la plante*. Ed. Cartea Universitară, București. p. 272-274.
22. Demmig-Adams B., Adams W.W., **2006**. III. Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation: Tansley review. *The New Phytologist* 172, 11-21.
23. Dobrotă C., **2005**. *Fiziologia plantelor*. Ministerul Educației și Cercetării - proiectul pentru învățământul rural. p. 138-142.
24. Dobrotă C., **2010**. *Fiziologia plantelor*. Vol. I. Ed. Risoprint, Cluj-Napoca. p.195-215.
25. Duong H.A., Pham N.H., Nguyen H.T., Hoang T.T., Pham H.V., Pham V.C., Berg M., Giger W., Alder A.C., **2008**. Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. *Chemosphere* 72, 968-973.
26. EN ISO 8692:2004. Water quality. Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae.
27. Farmacopeea Română, **1993**. Ediția a X-a. Ed. Medicală, București.
28. Feitosa-Felizzola J., Temime B., Chiron S., **2007**. Evaluating on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-ion trap mass spectrometry for reliable quantification and confirmation of several classes of antibiotics in urban wastewaters. *Journal of Chromatography A* 1164, 95-104.
29. Fried B., Sherma J., **2005**. *Thin layer chromatography*. Fourth Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker Inc., New York. Cap. 2, p. 8-21.
30. García-Campaña A.M., Gámiz-Gracia L., Lara F.J., del Olmo Iruela M., Cruces-Blanco C., **2009**. Applications of capillary electrophoresis to the determination of antibiotics in food and environmental samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395, 967-986.

31. García-Galán M.J., Díaz-Cruz M.S., Barceló D., **2010**. Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS). *Talanta* 81, 355-366.
32. Genty B., Briantais J.M., Baker N.R., **1989**. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990, 87-92.
33. Gocan S., **2002**. *Cromatografie de înaltă performanță, partea a II-a, Cromatografia de lichide pe coloană*. Ed. Risoprint, Cluj-Napoca. p. 41-73, 281-298.
34. Gómez M.J., Petrović M., Fernández-Alba A.R., Barceló D., **2006**. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography A* 1114, 224-233.
35. Granados M., Encabo M., Campañó R., Prat M.D., **2005**. Determination of tetracyclines in water samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. *Chromatographia* 61, 471-477.
36. Grujić S., Vasiljević T., Laušević M., **2009**. Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 4989-5000.
37. Halling-Sørensen B., **2000**. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere* 40, 731-739.
38. Havaux M., **1998**. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science* 3, 147-151.
39. Havaux M., Tardy F., Lemoine Y., **1998**. Photosynthetic light-harvesting function of carotenoids in higher-plant leaves exposed to high light irradiances. *Planta* 205, 242-250.
40. Havaux M., Niyogi K.K., **1999**. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proceeding of the National Academy Science of the United States of America* 96, 8762-8767.
41. Havaux M., Kloppstech K., **2001**. The protective functions of carotenoid and flavonoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis* npq and tt mutants. *Planta* 213, 953-966.
42. Hernández F., Borrull F., Calull M., **2003**. Analysis of antibiotics in biological samples by capillary electrophoresis. *Trends in Analytical Chemistry* 22, 416-427.
43. Hillis D.G., Fletcher J., Solomon K.R., Sibley P.K., **2011**. Effects of ten antibiotics on seed germination and root elongation in three plant species. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60, 220-232.
44. Hu X., Luo Y., Zhou Q., **2010**. Simultaneous analysis of selected typical antibiotics in manure by microwave-assisted extraction and LC-MSⁿ. *Chromatographia* 71, 217-223.
45. Husain S.W., Ghoulipour V., Sepahrian H., **2004**. Chromatographic behaviour of antibiotics on thin layers of an inorganic ion-exchanger. *Acta Chromatographica* 14, 102-109.
46. Joshi S., Sharma A., Rawat M.S.M., Dhiman C., **2009**. Development of conditions for rapid thin-layer chromatography of β -lactam antibiotics. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC* 22, 435-437.
47. Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale R.M., Guwy A.J., **2008**. The effect of signal suppression and mobile phase composition on the simultaneous analysis of multiple classes of acidic/neutral pharmaceuticals

- and personal care products in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-negative electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta* 74, 1299-1312.
48. Kato Y., Takahara S., Kato S., Kubo Y., Sai Y., Tamai I., Yabuuchi H., Tsuji A., **2008**. Involvement of multidrug resistance-associated protein 2 (Abcc2) in molecular weight-dependent biliary excretion of β -lactam antibiotics. *Drug Metabolism and Disposition* 36, 1088-1096.
 49. Kim S., Eichhorn P., Jensen J.N., Weber A.S., Aga D.S., **2005**. Removal of antibiotics in wastewater: effect of hydraulic and solid retention times on the fate of tetracycline in the activated sludge process. *Environmental Science & Technology* 39, 5816-5823.
 50. Li B., Zhang T., Xu Z., Fang H.H.P., **2009**. Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 645, 64-72.
 51. Li Z.J., Xie X.Y., Zhang S.Q., Liang Y.C., **2011**. Wheat growth and photosynthesis as affected by oxytetracycline as a soil contaminant. *Pedosphere* 21, 244-250.
 52. Liavonchanka A., Feussner N., **2006**. Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology* 163, 348-357.
 53. Lindberg R., Jarnheimer P.Å., Olsen B., Johansson M., Tysklind M., **2004**. Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere* 57, 1479-1488.
 54. Liu F., Ying G.G., Tao R., Zhao J.L., Yang J.F., Zhao L.F., **2009**. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environmental Pollution* 157, 1636-1642.
 55. Loreto F., Schnitzler J.P., **2010**. Abiotic stresses and induced BVOCs. *Trends in Plant Science* 15, 154-166.
 56. Matinca D., **2002**. *Antibiotice*. Ed. Medicală Universitară „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca. p. 5-19, 61-67, 71-80, 94-104.
 57. Meisen I., Wisholzer S., Soltwisch J., Dreisewerd K., Mormann M., Müthing J., Karch H., Friedrich A.W., **2010**. Normal silica gel and reversed phase thin-layer chromatography coupled with UV spectroscopy and IR-MALDI-o-TOF-MS for the detection of tetracycline antibiotics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398, 2821-2831.
 58. Milborrow B.V., **2001**. The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 52, 1145-1164.
 59. Müller-Moulé P., Havaux M., Niyogi K.K., **2003**. Zeaxanthin deficiency enhances the high light sensitivity of an ascorbate-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133, 748-760.
 60. Munné-Bosch S., Alegre L., **2000**. Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarin officinalis* plants. *Planta* 210, 925-931.
 61. Mutavdžić D., Babić S., Ašperger D., Horvat A.J.M., Kaštelan-Macan M., **2006**. Comparison of different solid-phase extraction materials for sample preparation in the analysis of veterinary drugs in water samples. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC* 19, 454-462.
 62. Nakai Y., Tokuyama E., Yoshida M., Uchida T., **2010**. Prediction of incompatibility of ceftriaxone sodium with calcium ions using the ionic product. *Yakugaku Zasshi* 130, 95-102.

63. Neill S.O., Gould K.S., Kilmartin P.A., Mitchell K.A., Markham K.R., **2002**. Antioxidant activities of red versus green leaves in *Elatostema rugosum*. *Plant, Cell & Environment* 25, 539-547.
64. Niinemets Ü., Bilger W., Kull O., Tenhunen J.D., **1998**. Acclimation to high irradiance in temperate deciduous trees in the field: changes in xanthophyll cycle pool size and in photosynthetic capacity along a canopy light gradient. *Plant, Cell & Environment* 21, 1205-1218.
65. Niinemets Ü., **2010**, Mild versus severe stress and BVOCs: thresholds, priming and consequences. *Trends in Plant Science* 15, 145-153.
66. Niinemets Ü., Copolovici L., Hüve K., **2010a**. High within-canopy variation in isoprene emission potentials in temperate trees: Implications for predicting canopy-scale isoprene fluxes. *Journal of Geophysical Research* 115, G0429, 19 pp., doi: 10.1029/2010JG001436.
67. Niinemets Ü., Arneth A., Kuhn U., Monson R.K., Peñuelas J., Staudt M., **2010b**. The emission factor of volatile isoprenoids: stress, acclimation, and developmental responses. *Biogeosciences* 7, 2203-2223.
68. Niinemets Ü., Monson R.K., Arneth A., Ciccioli P., Kesselmeier J., Kuhn U., Noe S.M., Peñuelas J., Staudt M., **2010c**. The leaf-level emission factor of volatile isoprenoids: caveats, model algorithms, response shapes and scaling. *Biogeosciences* 27, 1809-1832.
69. Oniscu C., **1988**. *Chimia și tehnologia medicamentelor*. Ed. Tehnică, București. p. 80.
70. **Opriș O.**, Copaciu F., Coman V., Ristoiu D., **2011**. UV-VIS study regarding the influence of two potential environmental pollutants on the total flavonoid content in *Triticum aestivum* L. and *Secale cereale* L., *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Chemia* 56, 17-25.
71. **Opriș O.**, Coman V., Copaciu F., Vlăsa M., **2012a**. Solid phase extraction and high performance thin layer chromatography quantification of some antibiotics from surface waters. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC* 25 (6), 516-522. Lucrare sub tipar - DOI: 10.1556/JPC.25.2012.6.0.
72. **Opriș O.**, Copaciu F., Soran L.M., Ristoiu D., Niinemets Ü., Copolovici L., **2012b**. Influence of nine antibiotics on key secondary metabolites and physiological characteristics in *Triticum aestivum*: leaf volatiles as a promising tool to assess toxicity, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Lucrare sub tipar - DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.09.019.
73. Osmond C.B., Anderson J.M., Ball M.C., Egerton J.G., **1999**. Compromising efficiency: the molecular ecology of light-resource utilization in plants, în Volumul Simpozionului *The 39th Symposium of the British Ecological Society* (New York, 1998), edite par Press M.C., Scholes J.D., Barker M.G., Blackwell Science, Oxford. p. 1-24.
74. Pan X., Deng C., Zhang D., Wang J., Mu G., Chen Y., **2008**. Toxic effects of amoxicillin on the photosystem II of *Synechocystis sp.* characterized by a variety of in vivo chlorophyll fluorescence tests. *Aquatic Toxicology* 89, 207-213.
75. Pocock T., Król M., Huner N.P.A., **2004**. The determination and quantification of photosynthetic pigments by reverse phase high-performance liquid chromatography, thin-layer chromatography, and spectrophotometry, în *Methods in molecular biology*. Vol. 274: *Photosynthesis Research Protocols*, editat de către Carpentier R., Ed. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey. p. 137-148.
76. Polle J.E.W., Niyogi K.K., Melis A., **2001**. Absence of the pigments lutein, violaxanthin and neoxanthin affects the functional chlorophyll antenna size of photosystem-II but not that of photosystem-I in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant & Cell Physiology* 42, 482-491.
77. Pomati F., Netting A.G., Calamari D., Neilan B.A., **2004**. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis sp.* and *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology* 67, 387-396.

78. Pozo O.J., Guerrero C., Sancho J.V., Ibáñez M., Pitarch E., Hogendoorn E., Hernández F., **2006**. Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1103 83-93.
79. Qin H., Chen L., Lu N., Zhao Y., Yuan X., **2012**. Toxic effects of enrofloxacin on *Scenedesmus obliquus*. *Frontiers of Environmental Science & Engineering* 6, 107-116.
80. Samanta A., Das G., Das S.K., **2011**. Roles of flavonoids in plants. *International Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 6, 12-35.
81. Seifrtová M., Nováková L., Lino C., Pena A., Solich P., **2009**. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Analytica Chimica Acta* 649, 158-179.
82. Soran L.M., **Opriș O.**, Copaciu F., Varodi C., **2012**. Determination of flavonoids in *Triticum aestivum* L. treated with ampicillin. Proceeding în „Processes in isotopes and molecules (PIM 2011)”, editat de către Lazar M.D. American Institute of Physics, Melville, New York. *AIP Conference Proceedings* 1425, 47-49.
83. Toome M., Randjärv P., Copolovici L., Niinemets Ü., Heinsoo K., Luik A., Noe S.M., **2010**. Leaf rust induced volatile organic compounds signalling in willow during the infection. *Planta* 232, 235-243.
84. van der Grinten E., Pikkemaat M.G., van den Brandhof E.J., Stroomberg G.J., Kraak M.H.S., **2010**. Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics. *Chemosphere* 80, 1-6.
85. von Caemmerer S., Farquhar G.D., **1981**. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153, 376-387.
86. Xie X., Zhou Q., Lin D., Guo J., Bao Y., **2011**. Toxic effect of tetracycline exposure on growth, antioxidative and genetic indices of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environmental Science and Pollution Research* 18, 566-575.
87. Xu Z., Wang H.Y., Huang S.X., Wei Y.L., Yao S.J., Guo Y.L., **2010**. Determination of beta-lactamase residues in milk using matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 82, 2113-2118.
88. Yang S., Cha J., Carlson K., **2005**. Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1097, 40-53.
89. Yang L.H., Ying G.G., Su H.G., Stauber J.L., Adams M.S., Binet M.T., **2008**. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1201-1208.
90. Zarnack K., Maurer S., Kaffarnik F., Ladendorf O., Brachmann A., Kaemper J., Feldbruegge M., **2006**. Tetracycline-regulated gene expression in the pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology* 43, 727-738.

ANEXA I. ABREVIERI

- A** - net asimilation rate - viteză netă de asimilație a CO₂
- ABA** - acid abscisic
- ADN** - acid deoxiribonucleic
- AMOX** - amoxicilină
- AMP** - ampicilină
- ATP** - adenzină trifosfat
- CBO** - consum biochimic de oxigen
- CCO** - consum chimic de oxigen
- CFX** - ceftriaxonă
- CFZ** - ceftazidimă
- CIP** - ciprofloxacina
- DAD** - diode array detector - detector cu serie de fotodiode cu baleiaj complet
- DCI** - denumire comună internațională
- DOXI** - doxiciclină
- EC₅₀** - effective concentration - concentrație inhibitoare efectivă
- EDTA** - acid etilendiamino-tetraacetic
- ERI** - eritromicină
- ESI** - electrospray ionization - ionizare prin electropulverizare
- ETR** - electron transport rate - viteza transportului de electroni
- g_s** - stomatal conductance to water vapor - conductanță stomatală de vaporizare a apei
- HLB** - hydrophilic lipophilic balanced - echilibrat hidrofilic lipofilic
- HPLC** - high performance liquid chromatography - cromatografie de lichide de înaltă performanță
- HPTLC** - high performance thin layer chromatography - cromatografie pe strat subțire de înaltă performanță
- LC** - liquid chromatography - cromatografie de lichide
- LOD** - limit of detection - limita de detecție
- LOQ** - limit of quantification - limita de cuantificare
- LOX** - lipoxygenase pathway products - produși de oxidare sub acțiunea lipoxigenazei
- MS** - mass spectrometry - spectrometrie de masă
- NADPH** - nicotinamidă adenzină dinucleotidă fosfat oxidază
- PENG** - penicilină G
- PS I** - photosystem I - fotosistem I
- PS II** - photosystem II - fotosistem II
- RSD** - relative standard deviation - deviație standard relativă
- SD** - standard deviation - deviație standard
- SE** - standard error - eroare standard
- SPE** - solid phase extraction - extracție pe fază solidă
- TET** - tetraciclină
- TLC** - thin layer chromatography - cromatografie pe strat subțire
- TMS** - total de materii solide în suspensie
- UV-Vis** - ultraviolet vizibil

VOC - volatile organic compounds - compuși organici volatili

ANEXA II. LISTA PUBLICAȚIILOR REZULTATE ÎN URMA TEZEI

1. **Ocsana Opris**, Florina Copaciu, Maria Loredana Soran, Dumitru Ristoiu, Ülo Niinemets, Lucian Copolovici, **2012**. Influence of nine antibiotics on key secondary metabolites and physiological characteristics in *Triticum aestivum*: leaf volatiles as a promising tool to assess toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Lucrare sub tipar - DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.09.019. *Factor de impact (2011)*: 2,294.
2. **Ocsana Opris**, Virginia Coman, Florina Copaciu, Mihaela Vlassa, **2012**. Solid phase extraction and high performance thin layer chromatography quantification of some antibiotics from surface waters. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC* 25 (6), 516-522. Lucrare sub tipar - DOI: 10.1556/JPC.25.2012.6.0. *Factor de impact (2011)*: 0,767.
3. Loredana Maria Soran, **Ocsana Opris**, Florina Copaciu, Codruța Varodi, **2012**. Determination of flavonoids in *Triticum aestivum* L. treated with ampicillin. Proceeding în „Processes in isotopes and molecules (PIM 2011)”, editat de către Lazar M.D. American Institute of Physics, Melville, New York. *AIP Conference Proceedings* 1425, 47-49. *Baze de date ISI*.
4. **Ocsana Opris**, Florina Copaciu, Virginia Coman, Dumitru Ristoiu, **2011**. UV-VIS study regarding the influence of two potential environmental pollutants on the total flavonoid content in *Triticum aestivum* L. and *Secale cereale* L. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai Chemia* 56 (4), 17-25. *Factor de impact (2011)*: 0,129.
5. **Ocsana Opris**, Carmen Roba, Florina Copaciu. Quality assessment of waste waters generated by some important hospitals from Cluj County. *Environmental Engineering and Management Journal*. Lucrare trimisă spre publicare. *Factor de impact (2011)*: 1,004.
6. **Ocsana Opris**, Maria-Loredana Soran, Virginia Coman, Florina Copaciu, Dumitru Ristoiu. Determination of some frequently used antibiotics in waste waters using solid phase extraction followed by high performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometry detection. *Environmental Science: Processes & Impacts*. Lucrare trimisă spre publicare. *Factor de impact (2011)*: 1,991.