

**UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI
FACULTATEA DE BIOLOGIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE**

Rezumatul tezei de doctorat

**Conducător de doctorat:
Profesor dr. emerit
Maria-Magdalena ZAMFIRACHE**

**Student-doctorand:
Ștefan Mihăiță OLARU**

**Iași
2025**

**UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI
FACULTATEA DE BIOLOGIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE**

**CERCETĂRI PRIVIND BIOLOGIA UNOR TAXONI DIN
FAMILIA ARACEAE CULTIVAȚI ÎN CONDIȚII
EXPERIMENTALE PE MEDII CU ADAOS DE
NANOMATERIALE SINTETICE**

**Conducător de doctorat:
Profesor dr. emerit
Maria-Magdalena ZAMFIRACHE**

**Student-doctorand:
Ștefan Mihăiță OLARU**

**Iași
2025**

Cuprins

Listă de abrevieri.....	5
Introducere.....	6
Scop și obiective	11
Partea I - Stadiul actual al cunoașterii	12
Capitol I – Nanomateriale pe bază de carbon	12
<i>I.1 Nanotehnologia</i>	<i>12</i>
I.1.1 Nanomaterialele pe bază de carbon și descoperirea proprietăților și aplicațiilor lor speciale.	13
I.1.2 Efecte ale nanomaterialelor pe bază de carbon (NMC) asupra plantelor	14
<i>I.2 Nanotuburile de carbon multistratificate – utilizări și efecte biologice.....</i>	<i>18</i>
I.2.1 Nanotuburile de carbon multistratificate funcționalizate...	21
I.2.2 Efecte biologice.....	22
<i>I.3 Fulerenele și funinginea de fulerene – utilizări și efecte biologice</i>	<i>26</i>
I.3.2 Efecte biologice.....	28
Capitol II – Subfamilia Lemnoideae	30
<i>II.1 Familia Araceae.....</i>	<i>30</i>
<i>II.2 Subfamilia Lemnoideae.....</i>	<i>30</i>
II.2.1 Descriere	30
II.2.3 Distribuția lemnameelor în mediu.....	31
II.2.5 Utilizări ale lemnameelor pentru depoluarea apei	34
<i>II.3 Specii test</i>	<i>36</i>
II.3.1 <i>Lemna minor</i> L.....	36
II.3.2 <i>Lemna minuta</i> Kunth.....	41

Partea a II-a – Contribuții personale	44
Capitol III – Material și metode.....	44
<i>III.1 Specii test.....</i>	<i>44</i>
<i>III.2 Nanomateriale.....</i>	<i>45</i>
<i>III.3 Protocol experimental.....</i>	<i>46</i>
III.3.1 Design experimental	46
Capitol IV – Rezultate și discuții	48
<i>IV.1 Interacțiuni ale plantelor aparținând speciei Lemna minor L. cu nanomateriale sintetice pe bază de carbon.....</i>	<i>48</i>
IV.1.1 Reacții morfologice și micromorfologice.....	48
IV.1.5 Reacții fiziologice	48
IV.1.6 Reacții biochimice	52
IV.1.7 Evaluarea expresiei genelor.....	57
<i>IV.2 Interacțiuni ale unor plante aparținând speciei Lemna minuta Kunth cu nanomateriale sintetice pe bază de carbon.....</i>	<i>62</i>
IV.2.1 Dezvoltarea culturilor de Lemna minuta Kunth în condiții experimentale de cultivare	62
IV.2.2 Reacții fiziologice	63
IV.2.3 Reacții biochimice	67
Considerații finale.....	73

Listă de abrevieri

ABA – acid abscisic

ADN - acid dezoxiribonucleic

ARN - acid ribonucleic

β -ACT – beta-actină (utilizată ca genă de referință)

CNP – nanoparticule de carbon (carbon nanoparticles)

CNT – nanotuburi de carbon (carbon nanotubes)

-COOH – grupă funcțională carboxil

CPD – uscare la punct critic (critical point drying)

DAD1 - Defender Against Apoptotic Death (genă implicată în reglarea apoptozei)

DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

MWCNT – nanotuburi de carbon multistratificate (multi-walled carbon nanotubes)

MWCNT-COOH – nanotuburi de carbon multistratificate carboxilate

NBT – nitro blue tetrazoliu

NCED9 - 9-cis-epoxicarotenoid dioxigenază (genă asociată cu metabolismul hormonal)

NMC – nanomateriale de carbon

NP - nanoparticule

-OH – grupă funcțională hidroxil

PCR - reacție în lanț a polimerazei (polymerase chain reaction)

POD - peroxidază

PSII – eficiența cuantică a fotosistemului II

RBSC – RuBisCO (genă marker pentru activitatea fotosintetică)

ROS – specii reactive de oxigen

RT-qPCR - PCR cantitativ în timp real

SEM – microscop electronic cu scanare (baleiaj)

SOD – superoxid dismutază

SWCNT – nanotuburi de carbon unistratificate (single-walled carbon nanotubes)

Introducere

Nanotehnologia, nou domeniu al științei care dezvoltă cercetări avansate pentru producerea nanomaterialelor proiectate precum nanotuburile de carbon, ar putea deschide noi aplicații în domeniul biotehnologiei, agriculturii și industriei (Fang et al., 2017; Patel et al., 2020; Mathew și Victório, 2022). Dezvoltarea remarcabilă din ultimii ani a domeniului nanotehnologiilor a permis proiectarea de aplicații specifice ale nanomaterialelor pe bază de carbon în sectorul agricol, industrial, biomedical și de mediu.

Datorită proprietăților lor fizico-chimice distincte, nanotuburile de carbon (CNT) au fost utilizate pe scară largă în experimente de laborator ca promotor al creșterii, utilizarea acestora constituind un posibil avantaj pentru sporirea biomasei produselor agricole; cercetările efectuate în acest sens sugerează că CNT ajută la creșterea capacității plantelor de a absorbi apa și nutrienții esențiali, îmbunătățindu-le astfel creșterea. În același timp CNT au fost testate în vederea utilizării lor în ingineria genetică pentru administrarea de gene, proteine sau medicamente, unele cercetări dezvăluind, totuși, chiar efecte mixte ale expunerii CNT asupra plantelor, cum ar fi inducerea stresului oxidativ prin generarea de specii reactive de oxigen (ROS) (Tan et al., 2009; Jordan et al., 2020).

Remarcabile prin caracteristicile lor unice precum dimensiune, structură și topologie, CNT constituie astăzi unul dintre cele mai studiate și exploatate tipuri de nanomateriale proiectate, caracterizate prin proprietăți electrice, mecanice, optice și structurale specifice. Utilizarea acestora include numeroase domenii aplicative, între care biomedicina, nanoelectronica, bioingineria și ingineria mecanică. Utilizarea CNT în prezent continuă să se extindă în medicină și agricultură pentru îmbunătățirea calității vieții, considerându-se astăzi că nanotuburile de carbon pot fi utilizate și în rezolvarea problemelor de mediu precum poluarea aerului, apei și

solului, domenii în care tehnologiile de remediere deja consacrate sunt limitate (Mittler, 2002; Ren et al., 2021).

În contextul celor prezentate anterior, cercetările referitoare la interacțiunea CNT cu sistemele vegetale se află, conform informațiilor prezentate la momentul actual de literatura de specialitate, într-un stadiu incipient, sugerând necesitatea realizării de investigații suplimentare pentru cunoașterea și înțelegerea mecanismelor care determină apariția efectelor mai mult sau mai puțin toxice ale acestor particule asupra plantelor, cu repercusiuni nefavorabile / favorabile asupra creșterii și dezvoltării lor.

Plantele, organisme cu cea mai mare pondere între producătorii primari și-au dezvoltat, de-a lungul evoluției, structuri ce le-au permis adaptarea la medii acvatice și terestre, reușind astfel să ocupe toată suprafața planetei.

Acestea reprezintă sursa de hrană pentru numeroase specii de animale, o sursă importantă de fibre și uleiuri obținute prin diferite procedee industriale, precum și materia primă de extracție a numeroase substanțe cu rol important în industria farmaceutică.

Datorită impactului antropic asupra mediului natural la momentul actual, ecosistemele terestre și acvatice sunt, din păcate, profund afectate de diverși poluanți rezultați în procesele industriale, în activitățile agricole, în sistemul de trafic naval, aerian și terestru, poluanții astfel generați având efecte nefavorabile asupra organismelor vii la mai multe niveluri. Între acești poluanți o categorie nouă de posibili poluanți ai mediului se consideră a fi nanotuburile de carbon, particule cu aplicații în diverse domenii, a căror folosire pe scară industrială poate conduce, în mod inevitabil, la o largă răspândire în natură (Jackson et al., 2013).

În efortul de cunoaștere a mecanismelor de acțiune a diverșilor poluanți asupra plantelor se poate realiza, ca primă etapă de investigare, o evaluare a modificărilor suferite de acestea din punct de vedere morfologic și anatomic, activitate ce nu necesită un consum

mare de resurse și poate indica, în același timp starea și gradul de afectare al organismelor investigate datorat poluării.

Forțate să se adapteze unor condiții nefavorabile de mediu, multe organisme vegetale reușesc azi să supraviețuiască în natură în condiții neprielnice. Se cunoaște astfel că acestea manifestă, în urma acțiunii anumitor poluanți, modificări anatomice și funcționale, realitate constatată și la specii acvatice.

Un exemplu de grup care a făcut subiectul multor studii de toxicitate acvatică este subfamilia Lemnoideae, familie ce cuprinde plante răspândite în multe ecosisteme acvatice pe glob, care pot asimila anumite substanțe poluante (Nasu și Kugimoto, 1981; Bokhari et al., 2016; Lanthemann și van Moorsel, 2022).

În numeroase cazuri mediile acvatice sunt poluate cu diverse categorii de poluanți: metale grele, pesticide, îngrășăminte chimice, coloranți textili etc., printre aceste categorii de poluanți existând posibilitatea de a fi incluse și nanomaterialele pe bază de carbon, a căror toxicitate a fost testată pe microorganisme, protozoare și alge, dar nu și pe plante superioare acvatice, motiv pentru care prin lucrarea de față ne propunem să cunoaștem câteva din efectele acestei categorii de particule posibil să apară accidental în medii acvatice asupra unor exemplare de *Lemna minor* L. și *Lemna minuta* Kunth cultivate în condiții experimentale de laborator.

Speciile de *Lemna*, în particular *Lemna minor*, constituie materialul vegetal preferat în studii ce urmăresc remediarea apelor uzate, în studii fiziologie, ecologie, precum și de prefigurare a unor biotehnologii acvatice, fiind adesea considerate organisme standardizate indicatoare de ecotoxicitate. Atuurile acestor specii sunt numeroase, ceea ce le conferă unicitate în studiile de ecologie acvatică: se înmulțesc vegetativ, au o producție ridicată de biomasă, au dovedit capacitate extremă de a absorbi și metaboliza cantități mari de compuși organici toxici (fitotransformare) și de a imobiliza metalele grele prin precipitare, reducere sau absorbție prin intermediul rădăcinilor (rizofiltrare).

În majoritatea lucrărilor de specialitate pe care am avut posibilitatea să le consultăm și care au avut ca subiect relativ comun reacțiile posibile de răspuns ale speciilor de *Lemna* la interacțiunea cu microplastice găsim aproape invariabil aceleași concluzii: creșterea coloniilor la contactul cu microplasticele nu a fost afectată semnificativ; în general a fost afectată lungimea rădăcinii; bioaderența microplasticelelor poate fi afectată de microorganisme acvatice care pot forma pe acestea un biofilm ce le atenuează efectele asupra organismelor vegetale superioare (exemplarele de *Lemna*).

Un număr restrâns de studii arată faptul că *Lemna* sp. nu procesează și nu metabolizează poluanții, fiind de fapt specii colectoare; deci, înseamnă că atunci când plantele mor, vor elibera contaminanții înapoi în mediul acvatic. Prin urmare, pentru a fi eficientă în tratarea apelor uzate, *Lemna* trebuie îndepărtată și eliminată în mod corespunzător din aceste medii, după epurarea lor.

Nanomaterialele sintetice pe bază de carbon (CNT) sunt studiate în prezent cu speranțe ce pot contribui la rezolvarea unor probleme de mediu în domenii în care alte tehnologii și-au demonstrat deja limitele. Aici, literatura de specialitate și rezultatele existente sunt încă în stadii incipiente ca răspunsuri, mai cu seamă că aceste nanomateriale s-au dovedit a fi în același timp și salvatoare, dar și noi surse de poluare, fapt ce complică situația.

În acest context al cunoștințelor existente, prezenta teză urmărește să aducă informații noi, inedite, unele dintre ele fără posibilitate, deocamdată, de comparație cu informații similare incluse în alte studii. Și aici ne referim la studiile noastre experimentale care au urmărit interacțiunea dintre indivizii de *Lemna minor* L. și *Lemna minuta* Kunth. cu diverse categorii de nanomateriale prin investigarea posibilelor reacții de răspuns ale suprafețelor lor foliare, morfologiei, structurii și mecanismelor fiziologice, biochimice și genetice ale acestora.

Pornind de la certitudinea că ambele entități (una vie, cealaltă nevie) sunt implicate prin mecanisme particulare în reducerea

toxicității acvatic, modelele experimentale utilizate au urmărit reacțiile indivizilor de *Lemna* atunci când se află împreună, în același spațiu acvatic, cu nanomateriale alese spre studiu. Și nu vorbim despre colonii de *Lemna* aflate în grade diferite de dezvoltare, care au interacționat la un moment dat cu nanomaterialele, ci vorbim despre indivizi de *Lemna* care au dezvoltat colonii în prezența nanomaterialelor și au interacționat deci cu acestea din faza cu unu sau doi indivizi, acest aspect particularizând cercetările astfel desfășurate și conferindu-le unicitate.

O serie de întrebări la care am încercat să răspundem prin experimentele astfel derulate sunt: cele două entități ar lucra împreună? reacționează entitatea vie la prezența entității nevie? pe cine ar trebui să preferăm în procesele de ecoremediere acvatică? pot fi răspunsurile cuticulare și morfo-anatomice foliare, alături de reacțiile fiziologice și biochimice teste bioindicatoare?

Scop și obiective

Scop:

Evaluarea efectelor nanomaterialelor sintetice pe bază de carbon asupra biologiei speciilor *Lemna minor* L. și *Lemna minuta* Kunth, cultivate în condiții experimentale de laborator.

Obiective

O1 - Analiza posibilelor efecte ale nanomaterialelor sintetice pe bază de carbon asupra proceselor de creștere a exemplarelor de *Lemna minor* L. și *Lemna minuta* Kunth cultivate în condiții experimentale.

O2 - Cercetarea modificărilor morfologice și anatomice induse la exemplare de *Lemna minor* L., de prezența nanomaterialelor sintetice pe bază de carbon în mediul de cultivare.

O3 - Cercetarea reacțiilor morfologice la exemplare de *Lemna minuta* Kunth ca efect al interacțiunii lor cu nanomateriale sintetice pe bază de carbon din mediul de cultivare.

O4 - Cercetarea influenței nanomaterialelor sintetice pe bază de carbon asupra funcționării aparatului fotosintetic al exemplarelor de *Lemna minor* L. și *Lemna minuta* Kunth cultivate în condiții experimentale.

O5 - Cercetarea influenței nanomaterialelor sintetice pe bază de carbon asupra biosintezei și funcționării unor compuși ai metabolismului secundar implicați în protecția exemplarelor de *Lemna minor* L. și *Lemna minuta* Kunth față de stresul abiotic indus de prezența respectivelor particule în mediul de cultivare.

O6 - Cuantificarea expresiei unor gene implicate în procese fiziologice și celulare esențiale la indivizii aparținând speciei *Lemna minor* L. cultivați în prezența nanomaterialelor sintetice pe bază de carbon în condiții experimentale.

Partea I - Stadiul actual al cunoașterii

Capitol I – Nanomateriale pe bază de carbon

1.1 Nanotehnologia

Nanotehnologia implică manipularea materialelor la o scară de 1 până la 100 nanometri (nm) în scopul creării de materiale funcționale, senzori și dispozitive. La o astfel de scară, nanomaterialele pe bază de carbon (NMC = nanomateriale de carbon) posedă noi proprietăți fizico-chimice, suprafață de contact mare, raportat la dimensiuni, reactivitate chimică crescută etc. Aceste proprietăți variază în funcție de gradul de aglomerare, de forma, structura suprafeței și de dimensiunea nanomaterialelor (Hussain, 2020). Proprietățile speciale ale NMC se datorează arhitecturii lor moleculare stabile și capacității de a se dispersa în mediul în care sunt introduse.

Diferite aplicații în nanofarmacologie și nanomedicină s-au dezvoltat prin explorarea NMC ca sisteme inteligente de livrare de medicamente în organismul uman (Chandra Kanth et al., 2020) NMC pot fi încărcate în mod convenabil cu o doză adecvată de medicamente sau alte substanțe active, pentru livrarea la anumite locuri țintă din celulă (He et al., 2013). Deși aceleași principii sunt aplicabile și sistemelor vegetale, aplicațiile nanotehnologiei în știința plantelor și în producția durabilă a culturilor (în special în sectorul agricol) nu au atras prea mult interes în rândul comunității științifice.

Astfel, efectele NMC asupra creșterii și dezvoltării plantelor sunt destul de puțin investigate și mai puțin înțelese, comparativ cu studiile efectuate pe animale (van der Zande et al., 2011; Hassan et al., 2020). Cu toate acestea, au început să apară recent rapoarte de cercetare cu privire la efectele NMC asupra diferitelor specii de plante. În ciuda acestor eforturi, efectele NMC asupra proceselor morfologice, anatomice, fiziologice, biochimice și moleculare și

mecanismele acestora în diferite sisteme vegetale nu sunt încă pe deplin înțelese și necesită investigații detaliate.

I.1.1 Nanomaterialele pe bază de carbon și descoperirea proprietăților și aplicațiilor lor speciale.

1. Nanotuburi de carbon cu pereți multipli (MWCNT)

Nanotuburile de carbon cu pereți multipli sunt compuse din mai multe foi de grafen înfășurate, care formează cilindri concentrici. MWCNT sunt alcătuite din mulți cilindri concentrici goi, cu o distanță între ei de 0,34 până la 0,39 nm (Ajayan și Ebbesen, 1997). Diametrul peretelui interior este independent de numărul pereților (de la 0,4 nm până la câțiva nm), în timp ce diametrul stratului exterior variază de la 2 la 30 nm. MWCNT în funcție de poziția atomilor de carbon sunt clasificate în diferite modele, cum ar fi modelul pergament și modelul păpușii rusești (Lehman et al., 2011; Eatemadi et al., 2014; European Commission. Joint Research Centre. Institute for Health and Consumer Protection., 2014).

2. Fulerene și funingine de fulerene

Fulerenele (cunoscute și sub denumirea de mingi Bucky) au fost descoperite în 1985 (Kroto et al., 1985) și sunt atomi de carbon alotropi modificați, care există ca C_{60} , C_{70} , C_{80} etc. (Ugarte, 1992; Wang et al., 2001). Acestea sunt solubile în lichide organice (de exemplu toluen) și fiecare tip conferă o culoare specială soluției (de exemplu soluția C_{60} este violet, iar soluția C_{70} este maroniu-roșcat) (Ramsden, 2011). Fulerenele au o largă aplicabilitate datorită structurii și caracteristicilor lor speciale, cum ar fi versatilitatea, afinitatea electronică, conductivitatea electrică ridicată și rezistența ridicată (Yadav și Kumar, 2008; Schwerdtfeger et al., 2015). Caracteristicile menționate anterior le fac potrivite pentru diverse aplicații medicale, electrice și industriale (Bakry et al., 2007).

Funinginea de fulerene, cunoscută și ca funingine de carbon, reprezintă un material carbonic complex, rezultat secundar al

proceselor de sinteză a fullerenelor, în special C_{60} și C_{70} , utilizând metode precum descărcarea în arc electric, ablația laser sau combustia controlată (Krätschmer et al., 1990; Keypour et al., 2013). Această substanță se prezintă, în general, sub formă de pulbere fină, de culoare neagră, alcătuită dintr-un amestec eterogen de forme de carbon nanostructurat, incluzând carbon amorf, fragmente grafitice și un conținut variabil de molecule de fulerene.

1.1.2 Efecte ale nanomaterialelor pe bază de carbon (NMC) asupra plantelor

Expunerea plantelor la nanomateriale de carbon și interacțiunile cu acestea determină mai multe modificări fiziologice, în funcție de proprietățile NMC, inclusiv tipul, dimensiunea, forma, compoziția chimică, reactivitatea și dozarea. Rezultatul (nul, benefic, advers) al interacțiunilor NMC-plantă variază de la plantă la plantă, fiind întotdeauna dependent de concentrația nanomaterialului utilizată.

1.1.2.1 Impactul nanoparticulelor de carbon (CNP) asupra plantelor

Nanoparticulele de carbon (CNP) posedă conductivitate electrică, termică și proprietăți mecanice excelente. CNP sunt compuse din carbon pur, prin urmare prezintă stabilitate ridicată, toxicitate scăzută și bună conductivitate (Yan et al., 2017).

Aceste nanoparticule se utilizează în multe aplicații din sectorul biomedical, cum ar fi introducerea de medicamente la nivel celular, transfer de gene și bio-imagistică (He et al., 2013).

Potrivit cercetărilor efectuate de către Khodakovskaya și colab. (2012), aplicarea CNP (concentrații variabile 0-125 mg/ghiveci) pe plantele de *Nicotiana tabacum* L. a dus atingerea unui ritm de creștere sporit al acestora în diferite etape, în comparație cu ritmul de creștere indus de aplicarea îngrășămintelor convenționale. Acești autori au raportat, de asemenea, că aplicarea CNP asupra

plantelor de *Nicotiana tabacum* L. a crescut conținutul de azot și potasiu din organele lor.

La rândul lor, Kumar și colab. (2018) au investigat efectele CNP asupra fotomorfogenezei și asupra timpului de înflorire la *Arabidopsis thaliana* L.. S-a observat astfel că CNP (într-o concentrație de 0-500 mg/l) au fost preluate de către plantă, au fost acumulate în țesuturile frunzelor și au indus înflorirea mai rapidă, prin modificarea atât a fitocromului b (PhyB), cât și a căilor dependente de fotoperioade, iar alte cercetări au dovedit că CNP (de dimensiune nespecificată) au promovat alungirea hipocotilului sub incidența luminii roșii sau a luminii roșii și albastre (Kumar și colab., 2018). Explorarea importanței CNP în plantele de cultură cultivate în condiții in vitro sau in vivo ar putea dezvolta o strategie inovatoare non-transgenică pentru îmbunătățirea culturilor importante din punct de vedere economic (Kumar și colab., 2018), observându-se că aplicarea CNP a crescut creșterea plantelor și a promovat absorbția și acumularea de micro-elemente, sporind astfel eficiența îngrășămintelor și îmbunătățind calitatea plantelor.

Recent, mai multe tipuri de NMC (fulerene, fuleroli, CNP și CNT) au câștigat importanță datorită utilizării lor potențiale în reglarea creșterii plantelor. În acest sens, rapoartele de cercetare au demonstrat, în cea mai mare parte, o influență benefică, dar și adversă asupra plantelor, în funcție de tipurile NMC, de concentrația aplicată, de timpul de expunere, precum și de speciile de plante suport pe care acestea sunt aplicate și de condițiile lor de cultivare.

În cazul experimentelor efectuate pe exemplare de *Phaseolus mungo* L. s-a constatat că semințele de fasole neagră germinează normal la concentrații de 10, 20 și 40 mg/l MWCNT în mediu, rezultate ce au indicat natura nepericuloasă a CNT (Ghodake et al., 2010). În același timp s-a dovedit că CNT solubile în apă susțin creșterea plantelor *Cicer arietinum* L. (năut) prin îmbunătățirea capacității lor de a absorbi apă (Tripathi et al., 2017). Nanotuburile de carbon au indus, de asemeni, la concentrația de 40 mg/l, efecte

benefice asupra germinării semințelor și creșterii plantelor de *Lycopersicum esculentum* M. (var. Arka Vikas) comparativ cu grupul martor (Verma et al., 2019). În plus, germinarea semințelor de *L. esculentum* M. în mediu MS (conținând MWCNT funcționalizate) și plantele cultivate în acesta s-au dovedit a asimila MWCNT și a le distribui în rădăcini, frunze și fructe (Alimohammadi et al., 2011). Un efect stimulat, predominant al MWCNT asupra germinării semințelor și / sau alungirii rădăcinilor răsadurilor a fost observat și la *Triticum aestivum* L. (Wang et al., 2012).

Activitatea genelor responsabile de reglarea canalelor de apă [acvaporină (LeAqp1)] a fost declanșată la plantele de tomate de către CNT activate cu mai multe grupuri [cum ar fi COOH- și polietilen glicol (PEG)], în comparație cu plantele netratate (Villagarcia et al., 2012), fiind bine cunoscut faptul că apa ajută la canalizarea proteinelor pentru dezvoltarea plantelor și este direct implicată în procesul de germinare a semințelor și de absorbție a apei de către indivizii astfel rezultați prin rădăcini (Maurel, 2007).

Khodakovskaya și colab. (2013) au demonstrat că expresia genei LeAqp2 (acvaporină) poate fi activată semnificativ în rădăcinile de roșii prin expunerea la CNT, comparativ cu grupul martor (fără CNT). De asemenea, generarea speciilor reactive de oxigen (ROS) evaluată prin testul diacetat de diclorodihidro-fluoresceină (DCFH-DA), detectarea peroxidului de hidrogen prin colorare cu diamino-benzidină (DAB) și nitroblue tetrazolium (NBT) au confirmat prezența ROS generată în frunzele spanacului roșu (*Amaranthus tricolor* L.) crescut cu MWCNT (Begum et al., 2011).

În cercetările lor asupra orezului (*Oryza sativa* L.), Jiang și colab. (2014) au constatat că CNT aplicate în concentrații de la 0 până la 100 mg/l au crescut lungimea tulpinii și a rădăcinii răsadurilor. Stimularea generală a creșterii plantelor în prezența CNT a fost atribuită creșterii absorbției de nutrienți printr-o livrare îmbunătățită a apei de către MWCNT. Continuând experimentele cu concentrații mai mari, s-a observat că în momentul în care concentrația de CNT aplicată

experimental a crescut la 150 mg/l, lungimea rădăcinii și lungimea tulpinii s-au redus, în comparație cu concentrația de 100 mg/l anterior experimentată. Astfel, rezultatele obținute au demonstrat că CNT ar putea promova germinarea semințelor de *O. sativa* L. și creșterea rădăcinilor la concentrații mai mici, dar ar putea avea efecte fitotoxice la concentrații mari.

Miralles și colab. (2012) au efectuat cercetări referitoare la germinarea cariopselor de *Triticum aestivum* L. și a semințelor de *Medicago sativa* L., pentru a investiga efectele MWCNT și a impurităților lor asupra procesului de germinare. Nanomaterialul a fost activat cu ajutorul nanoparticulelor de Fe_3O_4 , fiind detectată adsorbția CNT pe suprafețele rădăcinii, care a dus la o alungire substanțială a rădăcinii de lucernă și grâu.

În schimb, Khodakovskaya și colab. (2013) au raportat o sporire a creșterii plantelor de roșii prin utilizarea CNT. Cercetătorii amintiți au stabilit, folosind metode analitice, că CNT-urile (în concentrații de 10-40 mg/l) au reușit să pătrundă în tegumentul semințelor și să faciliteze intrarea apei în interiorul acestora, concluzionând că germinarea semințelor și creșterea răsadurilor de roșii au fost afectate de aplicarea respectivelor compuși.

S-a demonstrat astfel că doze mici de diferite tipuri de CNT pătrund în tegumentul semințelor și activează germinarea acestora și creșterea plantulelor (Lahiani et al., 2013).

Folosind analiza PCR, imuno-colorarea și microscopia electronică, Yan și colab. (2013) au confirmat că penetrarea și acumularea SWCNT în rădăcinile plantelor de *Zea mays* L. ar putea schimba expresia genelor care controlează rădăcina și creșterea perilor absorbantți.

La rândul lor, Serag și colab. (2013) au studiat efectul CNT la nivel molecular. Acești autori au arătat că lungimea și diametrul SWCNT sunt factorii limitativi pentru pătrunderea lor în pereții celulari ai plantelor. Nanotuburile mai mici pot difuza și pot pătrunde în celule, dar dacă sunt prea mari, pot rămâne în afara celulei și sunt

imobilizate, chiar dacă au reușit să pătrundă în peretele celular. S-a observat, de asemenea, că CNT pot facilita absorbția nutrienților și transportul acestora în țesuturile plantei. Cu toate acestea, substanțele nutritive care conțin sodiu ar putea fi împiedicate de către CNT să pătrundă în celulele plantei (Taha et al., 2016).

La plantele de grâu (*Triticum aestivum* L.) utilizarea MWCNT a avut ca rezultat creșterea dimensiunii xilemului, celulelor epidermice, densității stomatelor, a numărului de cariopse, a biomasei și a absorbției apei (Joshi et al., 2018).

Investigațiile privind efectele nanotuburilor de carbon asupra culturilor celulare de orez au relevat o înmulțire a speciilor reactive de oxigen, asociată cu viabilitatea celulară redusă (Tan et al., 2009). Capacitatea nanotuburilor simple de a penetra peretele celular și membrana celulară a celulelor vegetale intacte a fost examinată de Liu și colab. (2009).

Utilizând microscopia confocală, acești autori au obținut dovezi ale absorbției celulare atât a conjugatilor SWCNT-ADN, cât și a izotiocianatului SWCNT-fluoresceină, respectivele studii demonstrând că SWCNT au acționat ca nano-transportori celulari. Mai mult, pe baza acestor experimente autorii citați au emis ipoteza potrivit căreia nanotuburile de carbon unistratificate ar putea livra diferite încărcături în diferite organite ale celulei vegetale (Liu et al., 2009).

1.2 Nanotuburile de carbon multistratificate – utilizări și efecte biologice

În ultimele decenii nanomaterialele au atras din ce în ce mai mult atenția cercetătorilor, fiind propuse numeroase proiecte de cercetare la nivel internațional, care vizează atât evaluarea potențialului lor de inovare tehnologică, cât și înțelegerea posibilelor efecte adverse induse de acestea (Chen et al., 2018), astăzi considerându-se a fi de interes special să se identifice dacă forma nano a unui compus induce efecte adverse (efecte sau potențe diferite) comparativ cu formele non-nano ale acestuia.

În scopul cercetării nanosistemelor este de dorit a cunoaște disponibilitatea nanomaterialelor dintr-un singur lot, pentru a spori comparabilitatea rezultatelor între diferite laboratoare și proiecte de cercetare și pentru a depăși întrebarea dacă un nanomaterial testat într-un proiect este același sau similar cu un nanomaterial testat în alte proiecte.

Adresându-se acestei necesități și susținând programul de testare a unui set reprezentativ de nanomateriale fabricate de către Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică (OCDE), Centrul Comun de Cercetare al Comisiei Europene (JRC) a înființat un depozit cu materiale de testare reprezentative (RTM), care găzduiește diferite tipuri de nanomateriale, rolul materialelor de testare reprezentative fiind descris într-o publicație editată recent (Roebben et al., 2015).

Nanotuburile de carbon sunt cilindri de atomi de carbon care apar ca niște tuburi laminate de grafit formate în pachete mari de foi simple sau multiple de grafen, pentru a da nanotuburi de carbon unistratificate (SWCNT) și, respectiv, nanotuburi de carbon multistratificate (MWCNT). Practic vorbim despre o rețea de tip fagure rulată pe sine, cu lungimi variind de la câteva sute de nanometri la mai mulți micrometri și diametre de câțiva nanometri (SWCNT), până la zeci de nanometri (MWCNT) (Herrero-Latorre et al., 2015). Aceste structuri constituie un grup mare de nanomateriale pe bază de carbon de tip tub, care nu numai că diferă în ceea ce privește lungimea și numărul de straturi din care sunt constituite, dar variază și în ceea ce privește impuritățile incluse, conținutul și modificarea suprafeței.

Nanotuburile de carbon pot fi găsite în produse finite, cum ar fi polimerii conductori și compozite (automobile și electronice) componente structurale aerospațiale, articole sportive și senzori. Astfel de structuri polimerice grafitice cilindrice au proprietăți noi sau îmbunătățite, ce le fac potențial utile într-o gamă largă de aplicații în electronică, optică și în alte domenii ale științei materialelor. Nanotuburile de carbon se disting printr-un set remarcabil de

proprietăți fizice, incluzând conductivitate electrică și termică ridicată, precum și o rezistență mecanică, rigiditate și duritate specifică excepționale (OECD, 2009).

Mai mult, nanotuburile sunt polimeri de carbon pur și pot fi manipulați folosind chimia bogată a carbonului, care oferă posibilitatea de a li se modifica structura și de a li se optimiza solubilitatea și dispersia, permițând aplicații inovatoare în producția de materiale, electronică, prelucrare chimică și gestionarea energiei, pentru a numi doar câteva astfel de direcții aplicative. În concluzie, trei proprietăți ale acestor nanomateriale sunt interesante pentru industrie: conductivitatea electrică, rezistența mecanică (până la de 15 - 20 de ori mai mare decât a oțelului și conductivitatea termică (de peste cinci ori mai mare decât cea a cuprului). O combinație a acestor proprietăți impresionante permite dezvoltarea unei noi varietăți de aplicații utile și benefice ale acestui tip de compuși.

Un grup de nanomaterialele testate de către Grupul de lucru al OCDE privind nanomaterialele fabricate (OCDE WPMN) este reprezentat de nanotuburile de carbon multistratificate (MWCNT), ce constau din mai multe straturi de grafit suprapuse și laminate în ele însele, pentru a forma o formă tubulară, utilizate pe scară largă drept compozite structurale și, de asemenea, în aplicații energetice cum ar fi confecționarea bateriilor litiu-ion (Fig. I.2, Foto I.1).

Nanotuburile de carbon multistratificate (MWCNT) sunt utilizate în diverse produse finite, inclusiv polimeri conductori și materiale compozite destinate industriilor auto și electronice, componente structurale din domeniul aerospațial, echipamente sportive și senzori. Datorită configurației lor cilindrice și a structurii polimerice, aceste materiale prezintă proprietăți noi sau semnificativ îmbunătățite, care le conferă un potențial aplicativ extins în domenii precum electronică, optoelectronică și știința materialelor avansate (Myojo și Ono-Ogasawara, 2018).

I.2.1 Nanotuburile de carbon multistratificate funcționalizate

Funcționalizarea nanotuburilor multistratificate se efectuează în două etape.

În prima etapă MWCNT se tratează cu acid clorhidric, pentru a elimina impuritățile de pe suprafață. În acest scop se adaugă 2 g de nanotuburi uscate multistratificate (păstrate într-un cuptor la temperatura de 350°C timp de 4 ore) într-un balon cu fund rotund cu capacitatea de 500 ml conținând 400 ml acid clorhidric (6M). Amestecul de reacție se păstrează la temperatura de 120°C, sub agitare magnetică puternică, timp de 2 ore. Apoi, MWCNT purificate sunt centrifugate și spălate de mai multe ori cu apă distilată, până la obținerea unui pH neutru a apei de spălare. În cele din urmă, produsul obținut se usucă la temperatura de 90°C timp de 24 de ore și se păstrează în cuptor, sub vid, pentru aplicare ulterioară.

În cea de-a doua etapă se adaugă 1 g MWCNT purificate într-un balon cu fund rotund cu capacitatea de 500 ml conținând 200 ml acid azotic concentrat și amestec concentrat de acid sulfuric (1:3 v/v) și se dispersează, cu ajutorul ultrasunetelor, timp de o oră. Apoi se mărește temperatura amestecului de reacție la 75°C cu reflux sub agitare magnetică, timp de 12 ore. Odată ce reacția s-a terminat, se filtrează soluția, iar precipitatul obținut se spală de mai multe ori cu apă distilată. În cele din urmă, produsul finit se usucă într-un cuptor sub vid, la temperatura de 80°C timp de 24 ore (Foto I.2) (Gohari et al., 2020).

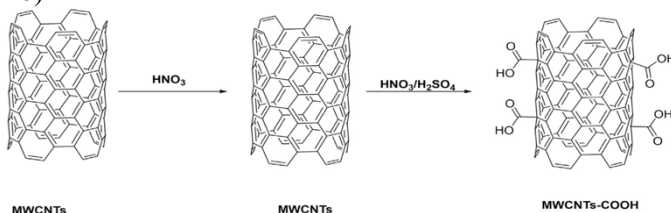


Fig. I.3 - Calea de sinteză a MWCNT-COOH (d. Gohari și colab., 2020)

I.2.2 Efecte biologice

Cunoștințele referitoare la proprietățile toxicologice ale nanomaterialelor de carbon în general și a nanotuburilor în special, evoluează pe măsura intensificării cercetărilor în domeniu. Informații privind toxicitatea nanotuburilor au apărut în literatura mondială de la începutul anilor 2000, iar cercetarea în acest domeniu este în curs de desfășurare (Gao et al., 2015). Nanotuburile de carbon sunt considerate mai degrabă toxice, datorită proprietăților lor mutagene, ca urmare a creșterii formării de specii reactive de oxigen și a capacității de a provoca apoptoza (Møller et al., 2015).

În ceea ce privește impactul asupra plantelor, datele experimentale din literatura de specialitate indică faptul că utilizarea nanotuburilor de carbon cu pereți multipli (MWCNT) sintetice a determinat o creștere a ratei de germinare a semințelor și o stimulare a dezvoltării plantulelor la speciile *Lupinus elegans* și *Eysenhardtia polystachya*, plante utilizate în programele de restaurare ecologică a ecosistemelor forestiere afectate de incendii în regiunea Mexicului. Cercetarea oferă dovezi care susțin posibilele funcții ecologice ale MWCNT în natură (Lara-Romero et al., 2017).

Mai mult, nanotuburile au fost descrise ca promotori ai creșterii plantelor, favorizând germinarea semințelor și o creștere a masei proaspete a plantelor de tomate (M.V. Khodakovskaya et al., 2013; L. Yang et al., 2017). Instrumentele de nanotehnologie au dezvoltat recent nanotuburi pentru aplicații potențiale în agricultură, inclusiv protecția culturilor, controlul poluării, managementul deșeurilor, detectarea pesticidelor, nanosensibilizare și nanofertilizatori (Gogos et al., 2012; De La Torre-Roche et al., 2013; M.V. Khodakovskaya et al., 2013).

În paralel cu diversificarea aplicațiilor benefice ale CNT au fost inițiate și cercetări privind posibilele efecte negative ale nanoparticulelor asupra plantelor comestibile (Miralles et al., 2012a) și s-a conturat astfel, la momentul actual, ideea conform căreia efectele

cunoscute ale MWCNT asupra plantelor, precum și răspunsurile ecosistemelor naturale și agricole la prezența acestora, introduse voit sau scăpate accidental în respectivele ecosisteme sunt încă limitate (J. Yang et al., 2017).

Într-un alt context au fost documentate efectele nanomaterialelor, cum ar fi nanotuburile de carbon, asupra creșterii și dezvoltării plantelor și s-a sugerat că efectele lor se datorează unor factori precum tipul și concentrația de nanoparticule aplicate, speciile de plante testate și condițiile experimentale utilizate, respectiv metoda de absorbție a nanoparticulelor (Tiwari et al., 2014), studiile raportate susținând că unele nanomateriale prezintă efecte toxice asupra mai multor modele de plante (Miralles, Church și Harris, 2012).

Astăzi se cunoaște faptul că nanotuburile produc fitotoxicitate speciilor *Arabidopsis thaliana* L. și *Oryza sativa* L., conducând la moartea a aproximativ 25% din culturile experimentale de protoplaști (celule fără perete celular) într-un interval de aproximativ 6 ore (Shen et al., 2010). În același context alți cercetători au raportat că plantele de spanac roșu (*Amaranthus tricolor* L.) și-au inhibat creșterea după două săptămâni de cultură hidroponică în prezență de MWCNT și au manifestat un fenomen de moarte celulară (Begum și Fugetsu, 2012), nanotuburile provocând efecte negative asupra morfologiei frunzelor și a rădăcinii plantelor aparținând acestei specii, condiții în care valorile biomarkerilor toxicității nanoparticulelor, speciile reactive de oxigen (ROS) și leziunile celulare din plantele de experiență, au fost semnificativ crescute pe parcursul celor două săptămâni de cultivare în prezența MWCNT. Aceste efecte dăunătoare au fost inversate cu succes atunci când MWCNT au fost suplimentate cu vitamina C, ca factor de protecție celulară împotriva speciilor reactive de oxigen, sugerând un rol al ROS în toxicitatea indusă de nanotuburi. S-a dedus astfel că mecanismul plauzibil al toxicității induse de MWCNT a fost stresul oxidativ la nivel celular (Begum și Fugetsu, 2012), deteriorarea membranei celulare și fenomenul de apoptoză la exemplarele de

Amaranthus dubius fiind atribuite pătrunderii MWCNT în celulele vegetale (Begum et al., 2012a).

Literatura de specialitate a descris mai multe mecanisme moleculare care ar sta la baza manifestării efectelor biologice ale nanotuburilor lor. Așa de exemplu, analizele genomice la indivizi de *Lycopersicon esculentum* L. au arătat că expunerea la MWCNT a modificat expresia genică a plantelor test, cu supra-activarea genelor legate de stres (Lahiani et al., 2016, 2015), în timp ce la indivizi de *Nicotiana tabacum* L. a determinat modificări totale ale expresiei genice, cu supra-activarea genelor legate de asamblarea peretelui celular/creșterea celulară, reglarea progresiei ciclului celular și producția de acvaporine (Miralles et al., 2012a; Lahiani et al., 2015; Mukherjee et al., 2016; J. Yang et al., 2017). Astfel s-a sugerat că mărimea, compoziția și caracteristicile specifice ale suprafeței nanomaterialelor proiectate pot juca rol important în toxicitatea lor (Hong et al., 2013; Mukherjee et al., 2016).

La ora actuală raportările privind fitotoxicitatea nanotuburilor de carbon multistratificate sunt oarecum contradictorii. Astfel, unii autori afirmă că nanotuburile au indus efecte pozitive asupra producției de proteine la plantele de roșii asupra activității fotosintetice a spanacului, precum și asupra creșterii rădăcinilor de grâu și de porumb.

În schimb, alți autori au observat o inhibare în creșterea rădăcinilor plantelor test, inducerea creșterii speciilor reactive de oxigen și apariția de aberații cromozomiale la expunerea plantelor de experiment la nanotuburi de carbon. Astăzi se consideră că mulți factori pot afecta creșterea plantelor în prezența MWCNT, inclusiv proprietățile fizico-chimice ale nanotuburilor, speciile de plante testate și condițiile experimentale de lucru (timpul de expunere, substratul, condițiile de creștere)(Zhao et al., 2017).

Studiul nanotuburilor de carbon funcționalizate (Fig. I.4) are o importanță foarte mare din punct de vedere a dispersiei acestora, a

compatibilității lor cu materialele compozite, a rezistenței interfațiale și a compatibilității cu materia biologică.

De exemplu, materialele polimerice îmbogățite cu nanotuburi multistratificate funcționalitate prezintă o mai bună rezistență de lipire interfațială și o suprafață mai fină, iar cantitatea de material necesară pentru producția de polimeri ar putea fi redusă mult dacă se folosesc nanotuburile funcționalizate. Astfel, nanotuburile de carbon funcționalizate pot fi mai potrivite pentru a dezvălui proprietățile deosebite ale nanotuburilor de carbon.

În cazul altor specii de plante (gullii - *Brassica oleracea* var. Italica) nanomaterialele aplicate în concentrații scăzute au avut un efect pozitiv asupra procesului de creștere. Aceste informații obținute experimental ar putea deschide noi perspective pentru procesul de conducere a culturilor agricole și horticole, mai ales în cazul în care plantele sunt cultivate în condiții de stres (Martínez-Ballesta et al., 2016).

Rapoartele altor cercetători au arătat că o concentrație de 50 mg/l MWCNT ar putea avea efecte pozitive (sporirea numărului perilor absorbanti, intensificarea fotosintezei), precum și efecte fitotoxice (scurtarea rădăcinii) în cazul aplicării lor ca tratamente specifice culturilor de *Arabidopsis thaliana* L. (Fan et al., 2018). În același timp, existența MWCNT în mai multe organe vegetale ale plantelor din toate culturile supuse contactului cu aceste nanoparticule studiate de Lahiani și colab. (2018) au scos în evidență importanța evaluării riscurilor apariției plantelor nanocontaminate în lanțul alimentar.

Alte rezultate au arătat că MWCNT au jucat un rol negativ asupra germinării semințelor de *Cucurbita pepo* L. și au întârziat creșterea răsadurilor (Hatami, 2017), iar la varza creastă (*Brassica oleracea* L.) Deng și colab. (2017) au constatat că într-un mediu hidroponic producția de biomasă a plantelor a fost dependentă de concentrația carbamazepinei, utilizată în acest studiu drept co-contaminant, în timp ce expunerea exemplarelor de *Brassica oleracea*

L. la MWCNT-COOH (concentrația de 50 mg/l) a îmbunătățit substanțial creșterea acestora (Deng și colab., 2017).

Pentru a studia efectele absorbției MWCNT în plantele de salată, Das și colab. (2018) au folosit atât nanotuburi multistratificate simple, cât și nanotuburi multistratificate carboxil-funcționalizate, în concentrație de 20 mg/l. Autorii menționați au dezvoltat și au folosit spectroscopia Raman pentru a detecta prezența MWCNT și au constatat că ambele tipuri de MWCNT erau prezente în țesuturile frunzelor, tulpinii și rădăcinii plantelor de salată tratate, confirmând absorbția și translocarea acestora în plantă.

Pentru a ajuta creșterea răsadurilor de *Oryza sativa* L., Zhang și colab. (2017) au emis ipoteza unei posibile legături între hormonii vegetali și ROS, sub tratamentul CNT.

În același timp expunerea la SWCNT și MWCNT a determinat apariția unui efect dăunător la plantele test de *Arabidopsis*, producând condensarea cromatinei, agregarea celulară, scăderea greutatei celulare uscate, acumularea de apă oxigenată, afectând viabilitatea celulară, activitatea superoxid dismutazei și valorile conținutului de clorofilă (Zaytseva și Neumann, 2016). Acest studiu a demonstrat că fitotoxicitatea indusă de nanoparticulele de carbon a fost datorată apariției stresului oxidativ (Smirnova et al., 2012).

Majoritatea studiilor prezentate anterior au constatat, în cazul folosirii de concentrații mai mici de nanotuburi îmbunătățirea germinării semințelor, accelerarea creșterii vegetative și îmbunătățirea randamentului de formare a fructelor / semințelor, iar în cazul aplicării de cantități mai mari de nanotuburi o diminuare a acestor parametri, subliniind importanța alegerii unei doze corecte de tratament, în derularea experimentelor.

1.3 Fulerenele și funinginea de fulerene – utilizări și efecte biologice

Fulerenele sunt un alotrop al carbonului, în care atomii de carbon sunt legați prin legături simple și duble, pentru a forma o

structură de tip cușcă închisă sau parțial închisă. Ele pot fi de diferite forme și dimensiuni, inclusiv sfere goale, elipsoide sau tuburi (Fig. I.5).

Producția de fulerene începe în general prin producerea de funingine bogată în fulerene. Metoda de producție presupune generarea unui curent electric puternic între doi electrozi de grafit, într-o atmosferă inertă. Arcul electric rezultat vaporizează carbonul într-o plasmă care se răcește apoi în reziduul de funingine.

Fulerenele există în două familii majore: buckyballs închise și nanotuburi de carbon cilindrice deschise. Între aceste două clase pot exista și structuri poliedrice (Fig. I.6) (Schwerdtfeger et al., 2015; Zaytseva și Neumann, 2016; Malhotra și Ali, 2018)

Fulerenele au proprietăți fizice și chimice unice. De exemplu, comportamentul și structura lor depind de temperatură; sunt stabile, dar nu total nereactive, iar în reacțiile chimice, pot acționa ca un electrophil când sunt dopate sau cristalizate cu metale alcaline sau alcalino-pământoase prezintă proprietăți de supraconductivitate.

Aceste substanțe au diverse utilizări, cu precădere în sfera medicală: sunt folosite ca agenți antimicrobieni activați de lumină și sunt de asemenea integrate în numeroase aplicații biomedicale, incluzând dezvoltarea de agenți de contrast pentru imagistica prin rezonanță magnetică de înaltă performanță, agenți de contrast pentru imagistica cu raze X, terapia fotodinamică, precum și pentru livrarea de medicamente și gene (Zaytseva și Neumann, 2016).

Funinginea de fulerene, este un material carbonic complex rezultat ca produs secundar în timpul sintezei fulerenelor, în special C_{60} și C_{70} , prin metode precum descărcarea în arc, ablația cu laser sau procese de combustie controlată (Krätschmer et al., 1990; Keypour et al., 2013). Acest material se prezintă sub forma unei pulberi fine, de culoare neagră, compusă dintr-un amestec eterogen de structuri nanocarbone, incluzând carbon amorf, fragmente grafitice și un conținut variabil de molecule de fulerene.

Cea mai utilizată metodă de obținere a funinginii este descărcarea în arc electric, în cadrul căreia electrozii de grafit sunt vaporizați într-o atmosferă inertă, de regulă heliu. În acest proces de înaltă energie, se produce condensarea fullerenele împreună cu alte forme de carbon, rezultând astfel formarea fumului (Iijima și Ichihashi, 1993). Compoziția în fulerene a fumului brut variază în mod obișnuit între 5–15% în greutate, în funcție de parametrii operaționali ai sintezei (Xihuang et al., 1994).

Din punct de vedere chimic, funinginea de fulerene este un material extrem de eterogen, conținând diverși alotropi ai carbonului, precum: fulerene simple și oxidate (de exemplu C_{60} , C_{70} , $C_{60}-O$), structuri multilamelare de tip „ceapă de carbon”, fragmente asemănătoare grafenului, hidrocarburi aromatice policiclice și carbon amorf rezidual. Această eterogenitate structurală conferă funinginii de fulerene o suprafață specifică ridicată și proprietăți fizico-chimice deosebite, cum ar fi hidrofobicitatea, activitatea redox și potențialul catalitic (Sano et al., 2001).

Deși funinginea de fulerene nu conține fulerene în formă purificată, ea poate fi utilizată direct în aplicații care nu necesită o puritate ridicată a materialului, precum remedierea mediului, cataliza sau ca precursor pentru sinteza altor nanostructuri pe bază de carbon (Ali-Boucetta et al., 2013).

1.3.2 Efecte biologice

Testarea efectelor fullerenele asupra plantelor reprezintă un domeniu relativ nou de cercetare, care implică studierea impactului acestor compuși și al altor nanomateriale de carbon asupra dezvoltării plantelor, în ideea conceperii de noi aplicații agricole și de protecție a mediului.

Pentru a înțelege impactul diferitelor nanomateriale de carbon, inclusiv a fullerenele, asupra dezvoltării plantelor au fost efectuate diferite cercetări. De exemplu, unele studii au testat activitatea

antifungică a fullerinelor și a altor nanomateriale de carbon împotriva ciupercilor fitopatogene, demonstrând cea mai puternică activitate antifungică pentru nanotuburile de carbon cu un singur perete (SWCNT) și ineficiența, în mare parte, a fullerinelor și a cărbunelui activ, (Zaytseva și Neumann, 2016).

Cu toate acestea, funinginea de fulerene ridică preocupări privind impactul lor ecotoxicologic și asupra sănătății, ca urmare a dimensiunii nanometrice a particulelor, persistenței în mediu și reactivității suprafeței. Cercetările existente indică potențialul acestui material de a interacționa cu sistemele biologice, inducând stres oxidativ și efecte citotoxice, care pot varia în funcție de compoziția chimică și gradul de funcționalizare al suprafeței (Sayes et al., 2004; Lyon et al., 2006).

Capitol II – Subfamilia Lemnoideae

II.1 Familia Araceae

Familia Araceae, grup mare și divers de plante cu flori, bine cunoscut pentru structura unică a inflorescențelor (de obicei un spadice înconjurat de o spată) include o varietate de plante precum *Philodendron*, *Anthurium*, *Spathiphyllum*, *Colocasia* și *Lemna* (Lintița).

II.2 Subfamilia Lemnoideae

II.2.1 Descriere

Subfamilia Lemnoideae este o subfamilie de plante cu flori cunoscute sub numele comun de *lintiță*. Aceste plante sunt adesea găsite plutind pe sau imediat sub suprafața apei în corpuri de apă stagnante sau cu mișcare lentă, în special în zonele de apă dulce și mlăștinoasă. În clasificările anterioare, care datează în principal dinaintea sfârșitului secolului al XX-lea, aceste plante erau considerate a forma o familie separată, denumită Lemnaceae (McIlraith et al., 1989; THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP*, 2003).

Plantele prezintă o structură anatomică simplă, lipsită de tulpini sau frunze distincte. Fiecare plantă din această subfamilie este alcătuită dintr-o mică structură numită „tal” sau „frondă”, care constă adesea doar din câteva straturi de celule și este prevăzută cu punși de aer (aerenchim) ce permit flotabilitatea pe sau imediat sub suprafața apei. În funcție de specie, plantele individuale pot fi lipsite de rădăcini sau pot avea una sau mai multe rădăcini simple (Blodgett, 1915; Bowker et al., 1980).

Medii propice dezvoltării:

O varietate de factori de mediu precum temperatura apei, pH-ul și concentrația nutrienților au o influență mare asupra creșterii și

supraviețuirii lintiței. Alți factori de mediu care influențează rata de creștere a coloniilor de lintiță sunt prezența toxinelor în apă, aglomerarea prin creșterea exagerată a coloniei și concurența cu alte plante pentru lumină și nutrienți. Cu toate acestea, rata de creștere a lintiței este favorizată de poluanți organici, precum și de substanțe nutritive anorganice (Guha, 1997).

Temperatura optimă pentru o creștere maximă a majorității grupurilor de indivizi se situează între 17,5 și 30°C (Culley et al., 1981; Gaigher et al., 1986). Cu toate că unele specii pot tolera temperaturi apropiate de îngheț, rata lor de creștere scade la temperaturi sub 17°C (Culley și colab., 1981), iar cele mai multe specii riscă să moară dacă temperatura apei crește peste 35°C. Efectul temperaturii asupra creșterii este amplificat și de intensitatea luminii, în sensul că, pe măsură ce intensitatea sa crește, se intensifică și rata de creștere a plantelor.

Lemnaceele au o toleranță mare pentru pH-ul mediului. Acestea pot supraviețui bine la un pH cu valori de 5 până la 9, cu toate că unii autori pun limitele pH-ului între 3 și 10. În general lintița crește cel mai bine la un pH de 6,5 - 7, o dublare a biomasei sale în 2 până la 4 zile fiind observată la un nivel de pH cuprins între 7 și 8 unități (Culley și colab., 1981).

II.2.3 Distribuția lemnaceelor în mediu

Disponibilitatea nutrienților joacă un rol crucial în determinarea distribuției plantelor în mediile umede, cu o importanță deosebită pentru speciile de plante acvatice, cum ar fi lintița. Aceste plante sunt de obicei prezente în medii eutroifice sau bogate în nutrienți. Ele se răspândesc în mod activ prin diverse mecanisme, fiind transportate de către curenții de apă sau prin atașarea la corpul unor păsări sau mamifere acvatice. Totuși, în zonele caracterizate prin curenți de apă puternici sau revărsări frecvente, extinderea lor este limitată deoarece plantele sunt adesea transportate în aval. Există anumite locații cu modele ciclice de creștere influențate de condițiile meteorologice,

unde lintița se dezvoltă în perioadele cu niveluri scăzute de apă, dar este afectată și eliminată în perioadele de ploi abundente.

Pe lângă importanța lor ecologică, lemnaceele reprezintă o sursă esențială de hrană bogată în proteine pentru păsările acvatice și oferă refugiu pentru alevinii multor specii de pești. Aceste specii sunt folosite ca habitat de diverse organisme din iazuri, precum broaștele și peștii, oferind umbră și reducând creșterea algelor fotoautotrofe cauzată de lumină.

Distribuția geografică a lemnaceelor reflectă adaptabilitatea acestora la o gamă largă de climate, condiții de umiditate și nișe ecologice. În continuare prezentăm distribuția lor globală, conform „GBIF” cu accent pe regiuni, specii și preferințe față de condițiile de mediu (Fig. II.1) (Les et al., 2002; Sree et al., 2016; Lee et al., 2020; “GBIF”):

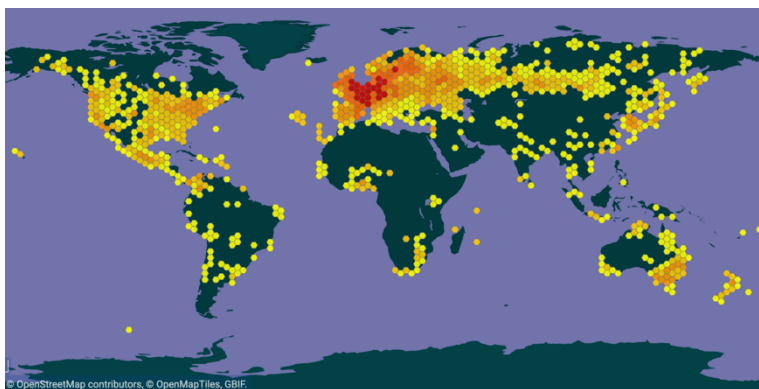


Fig. II.1 – Distribuția subfamiliei lemnoideae pe glob. (GBIF - Global Biodiversity Information Facility, <https://www.gbif.org> – Accesat 25.01.2024)

Lemnaceele au, de asemenea, mai multe caracteristici care le fac în mod unic utile pentru testele de toxicitate:

- reproducerea lor vegetativă și populațiile omogene din punct

de vedere genetic permit coloniilor clonale să fie utilizate pentru toate experimentele, astfel fiind eliminate variațiile genetice (Bishop și Perry, 1981; Hillman, 1961);

- indivizii pot fi dezinfectați și crescuți într-un mediu lichid sau pe agar (Hillman, 1961);

- cultura de *Lemna* poate crește în laborator pe termen nelimitat, iar condițiile controlate de temperatură, lumină și de nutriție sunt mult mai ușor de menținut decât pentru alte angiosperme (Hillman, 1961; Wang, 1987);

- exemplarele de *Lemna* au o suprafață mare pentru raportul de volum, iar cuticula de pe suprafața inferioară a frondei lipsește sau este redusă, înlesnind astfel absorbția substanțelor ce se testează (Bishop și Perry, 1981);

- plantele sunt acumulative excelente ale unui număr mare de elemente metalice, caracteristică ce le face candidați buni pentru utilizarea în monitorizarea calității apei și în testele de laborator pentru studiile de toxicitate și de absorbție (Jenner și Janssen-Mommen, 1993);

- exemplarele de lintiță sunt deosebit de sensibile la substanțele active de suprafață, compuși hidrofobi și substanțe similare, care se concentrează la interfața aer-apă (Taraldsen și Norberg-King, 1990; A.S.T.M., 1991);

- spre deosebire de testele de toxicitate utilizate pentru alge, soluțiile de testare pentru *Lemna* pot fi reînnoite, proces util pentru completarea acestora cu substanțele ce se pierd rapid din soluții ca urmare a volatilizării, fotodegradării, precipitării sau biodegradării. (Taraldsen și Norberg-King, 1990).

II.2.5 Utilizări ale lemnaceelor pentru depoluarea apei

Subfamilia Lemnoideae include plante acvatice mici ce plutesc liber, cunoscute în mod obișnuit sub numele de *lintiță*, care au demonstrat un potențial considerabil de utilizare în depoluarea apei, în special în activitățile de tratare a apelor uzate și de eliminare a poluanților din mediile acvatice. Diferite specii din Lemnoideae precum *Lemna minor*, *Lemna minuta* și *Lemna trisulca* au fost studiate pentru capacitățile lor de a absorbi și acumula nutrienți și contaminanți din mediile acvatice, proprietăți ce au permis cercetătorilor să le considere agenți eficienți pentru fitoremediere (Ansari et al., 2020; Ceschin et al., 2020).

1. Înlăturarea excesului de nutrienți:

Lintița este foarte eficientă în absorbția și asimilarea **azotului** și **fosforului** din apă, poluanți obișnuiți în scurgerile agricole, în apele uzate urbane și în efluenții de la stațiile de epurare. Concentrațiile mari ale acestor nutrienți în corpurile de apă pot duce la eutrofizarea lor, proces care are ca rezultat creșterea excesivă a algelor și epuizarea nivelului de oxigen, afectând negativ viața acvatică.

Prin preluarea rapidă a acestor nutrienți și încorporarea în biomasa lor, plantele de lintiță ajută la atenuarea eutrofizării respectivelor ape cu grade diferite de poluare (Sudiarto et al., 2019; Devlamynck et al., 2020).

În acest sens, demonstrând o capacitate puternică de a reduce concentrațiile ionilor de **amoniu** (NH_4^+) și **nitrați** (NO_3^-) în apa poluată, mai multe specii de lemnacee sunt considerate a fi deosebit de utile în tratarea scurgerilor agricole și a efluenților industriali cu niveluri ridicate de compuși cu azot (Devlamynck et al., 2020; Sudiarto et al., 2019).

2. Înlăturarea metalelor grele:

Lemnaceele pot acumula metale grele din apele contaminate în corpul lor precum **cadmiu**, **plumb**, **crom**, **mercur**, **arsen** și **cupru**

prin procese de **bioacumulare**, procese în care ionii metalici sunt fie adsorbiți pe suprafața organelor plantelor, fie incorporate prin absorbție în țesuturile lor. În acest sens, studiile întreprinse au demonstrat că specii precum *Lemna minor* și *Lemna gibba* sunt deosebit de eficiente în îndepărtarea metalelor grele din corpurile de apă în care vegetează, tolerând și acumulând adesea aceste substanțe toxice în țesuturile lor (Bokhari et al., 2016; Pang et al., 2023).

Dezvoltând mecanisme de detoxifiere specifice, unele specii de lintiță au reușit să tolereze și să stocheze metalele grele în structurile proprii, reducând disponibilitatea acestora în coloana de apă și împiedicându-le să intre în lanțul trofic (Devlamynck et al., 2020; Liu et al., 2021).

3. Degradarea poluanților organici:

Lemnaceele sunt eficiente în îndepărtarea diferiților poluanți organici din apă, inclusiv pesticide, erbicide, produse farmaceutice și alte substanțe chimice organice sintetice, pe care le pot degrada fie prin rizodegradare, în care comunitățile microbiene asociate cu rădăcinile plantelor ajută la degradarea contaminanților organici, fie prin fitodegradare, în care procesele metabolice ale respectivelor plante descompun poluanții (Lobiuc et al., 2018; Ekperusi et al., 2019; Prakash et al., 2021).

4. Reducerea agenților patogeni:

În sistemele de tratare a apelor uzate s-a constatat că plantele de lintiță contribuie la reducerea bacteriilor patogene și a altor microorganisme dăunătoare, covoarele dense de lintiță creând o barieră fizică ce limitează pătrunderea luminii și inhibând astfel creșterea agenților patogeni. În plus, producția ridicată de oxigen în timpul fotosintezei și eliberarea sa ulterioară din corpul plantelor în apă poate spori activitatea microbiană aerobă în acest mediu, fenomen ce ajută la degradarea materiei organice și la reducerea nivelurilor de agenți patogeni (Ishizawa et al., 2019, 2020).

5. Producția de biomasă pentru utilizări secundare:

Producția de biocombustibili: biomasa generată din creșterea lintiței în ape bogate în nutrienți poate fi recoltată și utilizată ca materie primă pentru producția de biocombustibili, inclusiv bioetanol și biogaz. Conținutul ridicat de amidon din lintiță o face o sursă eficientă pentru producția de etanol, în timp ce digestia anaerobă a biomasei de lintiță poate produce biogaz bogat în metan (Sudiarto et al., 2019).

Hrană pentru animale și îngrășăminte: Biomasa de lintiță recoltată poate fi folosită și ca supliment alimentar bogat în proteine pentru animale și pești în acvacultură. În plus, lintița uscată poate servi ca îngrășământ organic, oferind o modalitate durabilă de a recicla nutrienții absorbiți în timpul procesului de depoluare a apei (Hasan și Chakrabarti, 2010; Pagliuso et al., 2022; Demann et al., 2022).

II.3 Specii test

II.3.1 *Lemna minor* L.

Lemna minor L. (lintița) este o specie acvatică de dimensiuni reduse, care formează populații extinse pe suprafața apelor stagnante (lacuri, mlaștini), dar se întâlnește și pe albiile râurilor lent curgătoare (Foto II.1).



Foto II.1 – Indivizi de *Lemna minor* L. (original)

Planta prezintă fronde ovate sau lanceolate, pe fața inferioară cu o singură rădăcină filiformă și cu două brazde laterale posterioare din care înmuguresc noi fronde, antere biloculare și ovar uniovulat. Frondele au ambele fețe plane, dintre care cea superioară ± carenată (Landolt, 1998; Bog et al., 2020).

O plantă de lintiță constă dintr-o singură frunză cu una sau mai multe rădăcini. Cele mai multe specii de lintiță se multiplică în principal prin înmulțire vegetativă, prin formarea de fronde fiice din două „buzunare” aflate pe fiecare parte a capătului îngust al frondei. În timpul fazei inițiale de creștere frondele nou formate rămân atașate plantei mamă și, prin urmare, plantele par să fie alcătuite din mai multe fronde.

Specii din genul *Spirodela* au cele mai mari fronde, ce măsoară 20 mm în diametru, în timp ce specii de *Wolffia* măsoară 2 mm sau mai puțin în diametru. Speciile genului *Lemna* sunt specii de dimensiuni intermediare, de aproximativ 6-8 mm. În timpul vieții sale, care durează o perioadă de 10 zile, până la câteva săptămâni, un individ poate produce aproximativ 20 de fronde fiice. Frondele fiice se vor separa de planta mamă și vor produce, la rândul lor, alte fronde noi (Foto II.2) (Blodgett, 1915; Acosta et al., 2021).

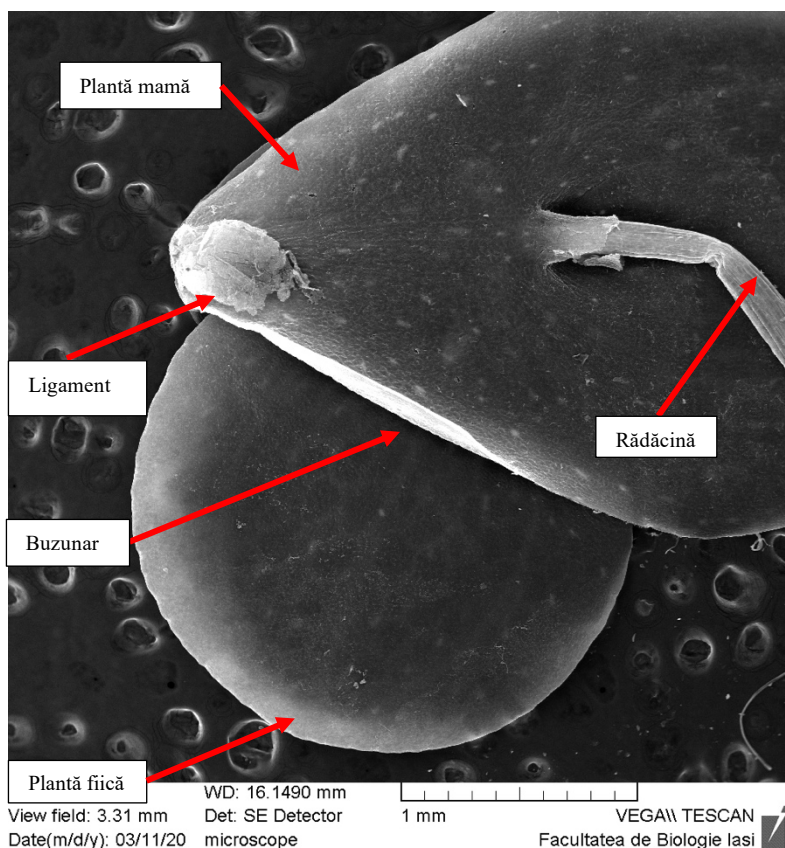


Foto II.2 - *Lemna minor* L. – față inferioară – microfotografie SEM
(original)

Deoarece este o specie natantă, stomatele lîntiței se găsesc pe epiderma superioară (Foto II.3). Fronda este plată, de culoare verde, verde-deschis și prezintă o nervațiune centrală. La baza frondei, pe fața inferioară se găsește rădăcina, cu lungimi cuprinse între 0,2 și 10 cm. La nivelul rădăcinii se găsește o structură asemănătoare scufiei de la rădăcinile plantelor terestre, cu rol în protecție, dar care poartă numele de rizomită (Foto II.4).



Foto II.3 – *Lemna minor* L. - Epiderma superioară cu stomate – microscop optic - 10x (original)



Foto II.4 – *Lemna minor* L.- Rizomită – microscop optic 10x (original)

Observată prin transparență față de o sursă de lumină, fronda prezintă 3 vase conducătoare principale, situate astfel: două pe marginea frondei și unul situat central. Toate aceste vase conducătoare pornesc de la baza plantei, din punctul de prindere al rădăcinii. În structura frondei se pot identifica și spațiile aerifere, reprezentate de celule mari, cu pereți ușor îngroșați (Foto II.5).

Fronța lîntîței se caracterizează printr-un înveliș sau pungă pe fiecare parte a bazei. În cadrul fiecăreia dintre aceste pungi va apărea o frondă a următoarei generații vegetative, care nu se dezvoltă în același timp. Atunci când se formează flori, fiecare crește în poziția în care fronda crește în mod obișnuit, deși o tînără frondă se poate dezvolta mai tîrziu în același buzunar (Tipperry et al., 2021).

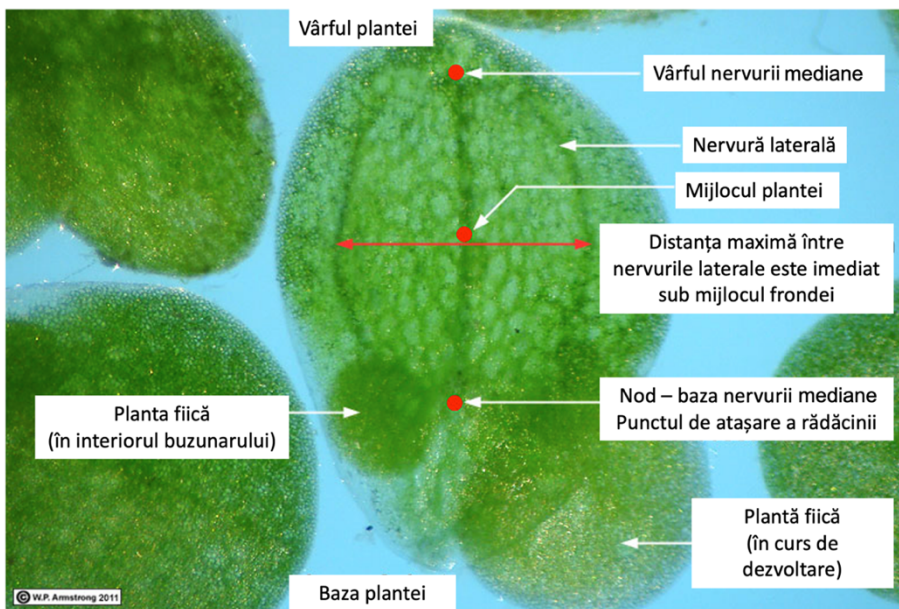


Foto II.5 – *Lemna minor* L. – Elemente de morfologie (d. Armstrong, 2011)

În spațiile frondei sau flori în creștere există un mugur. În mod normal rudimentele acestui mugur apar foarte devreme în dezvoltarea frondei, în axila în care este amplasat. În aproape același timp când rădăcina se dezvoltă, se formează pe suprafața dorsală a mugurelui o ușoară denivelare sau grupare de celule. Până în momentul în care fronda fiică va fi destul de mare și rezistentă, buzunarul în care aceasta se află este închis de o membrană subțire, ce se va rupe în momentul în care țesuturile frondei fiice vor apăsa asupra acesteia (Baek et al., 2021).

Legătura plantei fiice cu planta mamă se păstrează printr-un ligament, un mănunchi de vase conducătoare, pentru a se putea finaliza dezvoltarea rădăcinii plantei fiice deoarece, datorită spațiului redus din buzunar, celulele ce formează rădăcina nu s-au putut multiplica. Ligamentul între cele două plante se poate păstra și după finalizarea dezvoltării (Foto II.6).

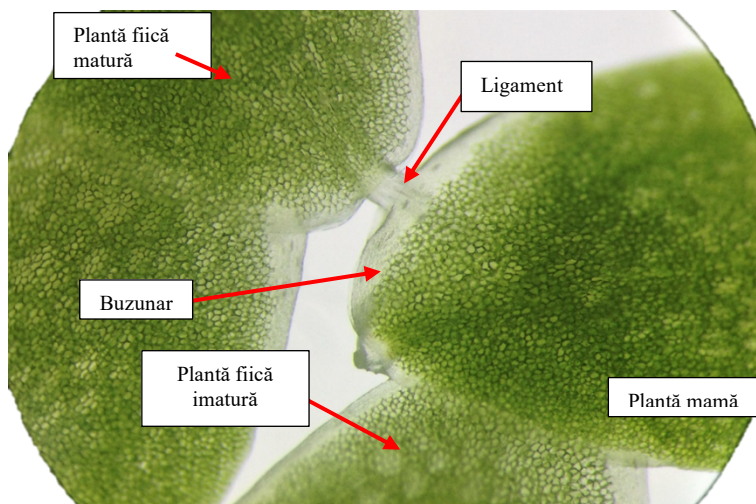


Foto II.6 – *Lemna minor* L. – indivizi atașați prin intermediul unui ligament; vedere fața superioară – foto stereomicroscop - 4x (original)

II.3.2 *Lemna minuta* Kunth

Lemna minuta Kunth, cunoscută în mod obișnuit sub numele de *lintiță* sau *lintiță pitică*, este o specie de plantă acvatică, originară din America, care, fiind introdusă în diferite părți ale Europei, Asiei și Australiei, este adesea considerată invazivă, datorită creșterii sale rapide și capacității de a depăși vegetația acvatică nativă (Hussner et al., 2017; Ceschin et al., 2018).

Lemna minuta Kunth se caracterizează prin dimensiunea sa mică și o structură simplă, tipică lintiței. Planta constă dintr-o frondă cu o structură aplatizată care plutește liber, asemănătoare unei frunze, ce îndeplinește atât funcțiile frunzei, cât și ale tulpinii (Foto II.9). Fronda este foarte mică (aproximativ 1,5 - 4 mm lungime și 1 - 2 mm lățime) de formă ovală până la eliptică, cu vârful rotunjit și baza ușor conică, de culoare verde deschis, cu câteva pungi de aer sau aerenchim, care ajută la flotabilitate; suprafața superioară a acesteia este de obicei netedă, dar poate prezenta, uneori, papile (Ceschin et al., 2016).

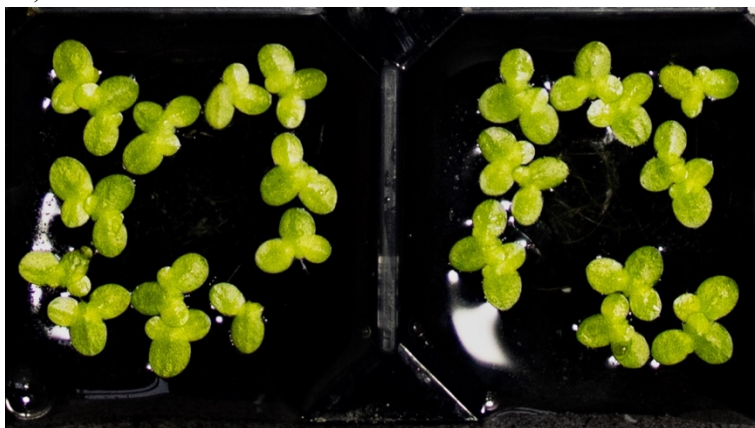


Foto II.9 – *Lemna minuta* Kunth (original)

Fiecare frondă produce de obicei o singură rădăcină subțire, neramificată, situată pe fața sa inferioară, asemănătoare unui fir cu dimensiuni ce variază de la 5 până la 15 mm lungime (Foto II.10), servind în primul rând ca organ de stabilizare, dar care poate ajuta și la absorbția nutrienților din coloana de apă (Landolt, 1998; Ceschin et al., 2016).

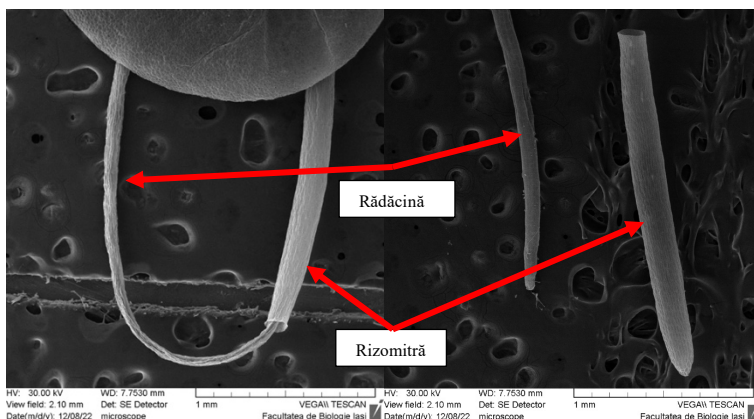


Foto II.10 – *Lemna minuta* Kunth – Apect micromorfologic al rădăcinii – microfotografie SEM (original)

Lemna minuta se reproduce de obicei asexuat prin înmugurire vegetativă. La baza frondei mamă se formează noi fronde fiice, care în cele din urmă se separă și devin independente. Deși reproducerea sexuată este rară la această specie, planta produce flori foarte mici, care sunt în mare parte neobservate, deoarece sunt încorporate în structura frondei și constau dintr-o singură stamină și un pistil.

Lemna minuta este cunoscută pentru reproducerea sa vegetativă rapidă. Planta produce noi indivizi într-un ritm ridicat în condiții favorabile, fapt ce conduce la o creștere exponențială.

În mediile bogate în nutrienți, cum ar fi iazurile, pâraiele cu mișcare lentă sau șanțurile cu niveluri ridicate de azot și fosfor, *Lemna minuta* poate forma rapid colonii dense, care acoperă suprafața apei (Landolt, 1998; Ceschin et al., 2018; Chen et al., 2022).

Partea a II-a – Contribuții personale

Capitol III – Material și metode

III.1 Specii test

Materialul vegetal utilizat în cercetările din prezenta teză este reprezentat de exemplare de plante aparținând la două specii din subfamilia Lemnoideae: *Lemna minor* L. și *Lemna minuta* Kunth.

Indivizii de *Lemna minor* L. au fost recoltați la data de 26.08.2018 de pe raza municipiului Iași (cursul râului Nicolina, la confluența cu râul Bahlui, coordonate GPS aferente locației: 47.157632 lat. N, 27.569232 long. E). Deși specia se dezvoltă pe suprafața apelor stătătoare, vegetația abundentă și conținutul mare de nutrienți din aceste râuri au permis formarea de colonii de lintiță ce sunt purtate de curenți de fiecare dată când crește nivelul apei.

Câteva exemplare aparținând acestei specii au fost depuse la Herbarul Facultății de Biologie a Universității “Alexandru Ioan Cuza” din Iași, primind numărul de înregistrare 207024.



Foto III.1 - Locație de colectare a plantelor aparținând speciei *Lemna minor* L. la data de 26.08.2018
(d. Google Maps, 2023)

Indivizii de *Lemna minuta* Kunth au fost recoltați la data de 01.07.2022 din iazul Staw Południowy, zona Huby Moraskie situată la periferia orașului Poznań, Polonia. Coordonatele GPS ale locației sunt: 52.466094 lat. N, 16.933088 long. E.

Câteva exemplare aparținând acestei specii au fost depuse la Herbarul Facultății de Biologie a Universității “Alexandru Ioan Cuza” din Iași, primind următorul număr de înregistrare: *Lemna minuta* Kunth – 207026.

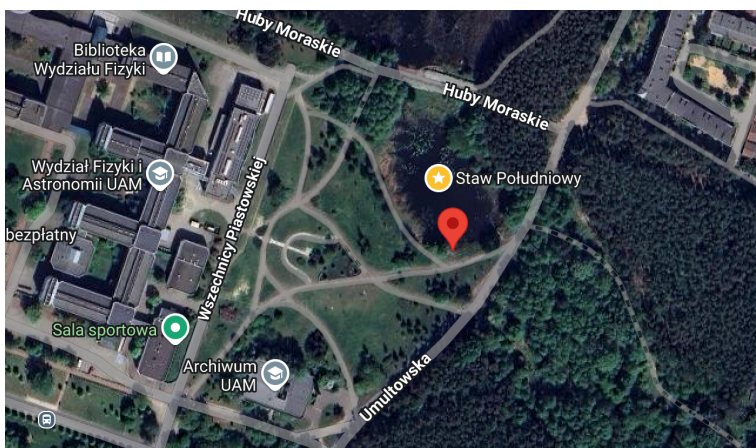


Foto III.2 - Locație de colectare a plantelor aparținând speciilor *Lemna minuta* Kunth și *Lemna trisulca* L. la data de 01.07.2022 (d. Google Maps, 2023)

III.2 Nanomateriale

În prezenta teză s-au utilizat trei tipuri de nanomateriale sintetice pe bază de carbon:

- nanotuburi de carbon multistratificate cu un diametru exterior de 8 nm, puritate > 96%, Producător Nanografî, Ankara, Turcia – Cod produs: NG01MW0101;

- nanotuburi de carbon multistratificate carboxilate cu un diametru exterior cuprins între 8 și 18 nm, puritate > 96%, Producător Nanografi, Ankara, Turcia – Cod produs: NG01MW0303;
- funingine de fullerene – o combinație de fullerene C60, C70 și negru de fum, care pot fi utilizate într-o varietate de aplicații, cum ar fi purificarea apei, stocarea hidrogenului, obținerea de supercondensatori și în nanoelectronică - Producător Sigma-Aldrich – Cod produs: 572497-5G,

III.3 Protocol experimental

III.3.1 Design experimental

În vederea unei bune desfășurări a procesului de testare, am urmat prevederile ghidului de testare nr. 221 al Organizației pentru Cooperare și Dezvoltare Economică (OCDE), care oferă proceduri detaliate pentru cultivarea speciilor genului *Lemna* L., în special *Lemna gibba* L. și *Lemna minor* L.

Prezentăm în continuare principalele etape ale procedurii de cultivare a speciilor test de lintiță:

- Crearea și menținerea culturii stoc de *Lemna* în condiții optime, pentru o creștere sănătoasă, exponențială, activitate care a implicat transferul regulat al acestora pe mediu proaspăt, pentru a preveni epuizarea nutrienților și acumularea de deșeuri. Culturile obținute astfel au fost păstrate în condiții controlate, cu o temperatură de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ și iluminare timp de 17 ore pe zi, la o intensitate de aproximativ 115 - 118 $\mu\text{mol/s/m}^2$.
- Crearea de culturi stoc secundare, pornind de la un singur individ pentru fiecare specie testată, pentru a evita variabilitatea fenotipică a indivizilor de *Lemna*.

- Selectarea din aceste culturi secundare a indivizilor necesari efectuării testelor: plantele au fost cultivate pe parcursul experimentelor în tăvi cu 10 godeuri cu un volum de câte 10 ml fiecare, acoperite pe exterior cu vopsea de culoare neagră, pentru a împiedica dezvoltarea algelor contaminante.
- Menținerea culturilor în termostaț la o temperatură constantă de 25 °C și iluminare timp de 17 ore pe zi, și monitorizarea creșterii indivizilor la intervale de câte 2-3 zile.

*Pentru a asigura o creștere și reproductibilitate adecvate în timpul perioadei de testare fiecare godeu a primit un număr definit de fronde (1 individ = 3 fronde)(Foto III.3).

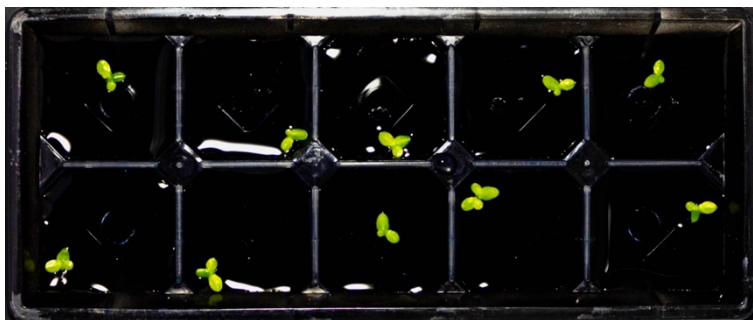


Foto III.3 – Tavă de cultivare a indivizilor de *Lemna* (original)

Design-ul experimental care a vizat răspunsul plantelor test la prezența nanomaterialelor sintetice pe bază de carbon incluse experimental în mediul de cultură a fost particularizat pentru cele două specii ale genului *Lemna* L. astfel:

- în cazul speciei *Lemna minor* L., recunoscută ca specie model în cercetările de ecotoxicologie acvatică, cercetările au cuprins determinări morfo-anatomice, fiziologice, biochimice și de biologie moleculară (subcap. IV.1 al capitolului IV din Partea personală);

- în cazul speciei *Lemna minuta* Kunth, larg răspândită, dar puțin studiată sub aspectul reactivității complexe morfo-funcționale la modificarea condițiilor de viață, cercetările au cuprins determinări morfologice, biochimice și fiziologice (subcap. IV.2 al capitolului IV din Partea personală).

Capitol IV – Rezultate și discuții

IV.1 Interacțiuni ale plantelor aparținând speciei *Lemna minor* L. cu nanomateriale sintetice pe bază de carbon

IV.1.1 Reacții morfologice și micromorfologice

Pentru observarea și interpretarea eventualelor modificări morfologice induse de tratamentele cu nanomateriale aplicate plantelor de lintiță (*Lemna minor*) materialul vegetal a fost analizat prin transparență la stereomicroscop în preparate microscopice proaspete.

IV.1.5 Reacții fiziologice

IV.1.5.1 Fluorescența clorofiliană

La momentul inițial al experimentului, valorile parametrului Φ PSII au fost relativ ridicate și uniforme între toate tratamentele aplicate, sugerând că expunerea inițială a plantelor test la nanomaterialele testate nu a exercitat un efect imediat asupra eficienței fotosistemului II al acestora. În ultima zi a experimentului, se observă o tendință clară de reducere a valorilor Φ PSII, mai ales în cazul variantelor tratate cu nanotuburi. Aceste modificări indică o posibilă toxicitate cumulativă a nanomaterialelor, manifestată progresiv, în timp, asupra aparatului fotosintetic.

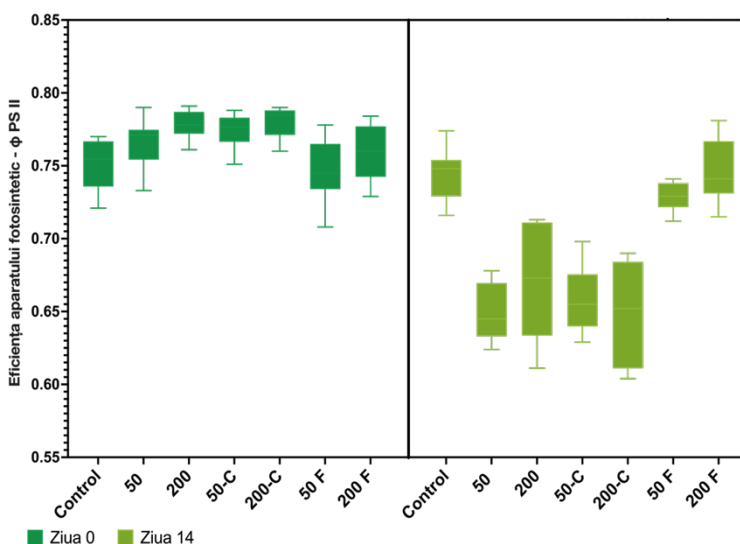


Fig. IV.5 – Evoluția fluorescenței clorofilice a indivizilor de *Lemna minor* L. din ziua 0 până în ziua 14 a experimentului. Variante experimentale: Control, 50 - 50 mg/l MWCNT, 200 – 200 mg/l MWCNT, 50-C – 50 mg/l MWCNT-COOH, 200-C - 200 mg/l MWCNT-COOH, 50 F – 50 mg/l Funingine de fulerene, 200 F – 200 mg/l Funingine de fulerene.

IV.1.5.2 Conținutul de pigmenți asimilatori

Pentru toate categoriile de pigmenți fotoasimilatori analizați (clorofila a, clorofila b și pigmenți carotenoidici) tratamentul cu nanotuburi de carbon multistratificate a condus la niveluri cantitative mai reduse, comparativ cu varianta control, indicând un efect fitotoxic al acestora, dependent de doză (Fig. IV.7, Anexa 5). Aceste rezultate sugerează că expunerea la MWCNT accentuează stresul oxidativ și fotoinhibitor, aspect documentat anterior în cazul plantelor acvatice expuse prezenței nanomaterialelor (Meften et al., 2023).

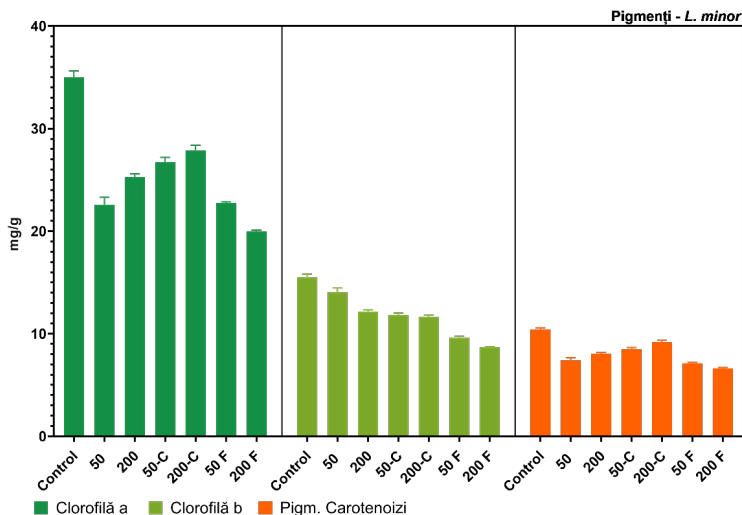


Fig. IV.7 –Conținutul de pigmenți asimilatori al plantelor de *Lemna minor* L. în ziua 14 a experimentului. Variante experimentale: Control, 50 - 50 mg/l MWCNT, 200 - 200 mg/l MWCNT, 50-C - 50 mg/l MWCNT-COOH, 200-C - 200 mg/l MWCNT-COOH, 50 F - 50 mg/l Funingine de fulerene, 200 F - 200 mg/l Funingine de fulerene.

IV.1.5.3 Conținutul de flavonoide

Tratamentul cu nanotuburi de carbon multistratificate funcționalizate cu grupări carboxil (MWCNT-COOH) a determinat o creștere semnificativă a conținutului de flavonoide, ca un răspuns clar al metabolismului plantelor test dependent de doza aplicată, cea mai mare acumulare a acestor compuși fiind observată la concentrația de 200 mg/l MWCNT-COOH, indicând o activare intensă a căilor antioxidante, cel mai probabil ca răspuns la un stres oxidativ amplificat (Fig. IV.11, Anexa 6). Acest efect poate fi atribuit reactivității chimice sporite și biodisponibilității crescute a nanotuburilor funcționalizate, care sunt favorizate în pătrunderea lor

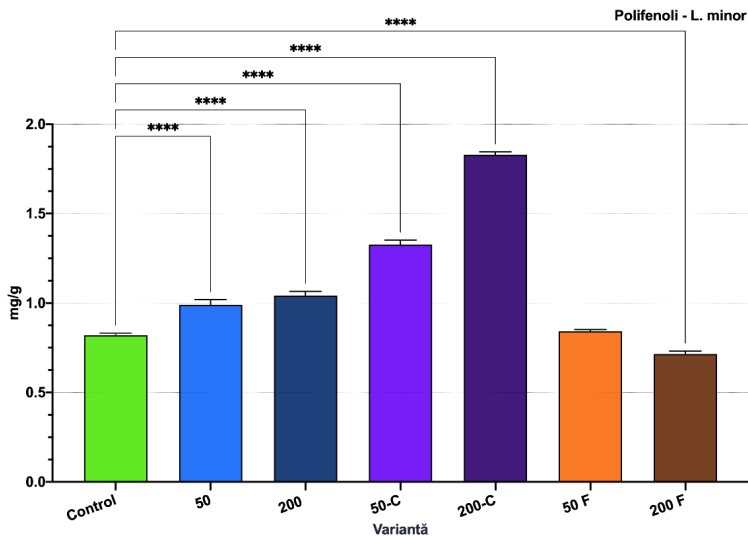


Fig. IV.12 – Conținutul de polifenoli al plantelor de *Lemna minor* L. cultivate în condiții experimentale. Variante experimentale: Control, 50 - 50 mg/l MWCNT, 200 - 200 mg/l MWCNT, 50-C - 50 mg/l MWCNT-COOH, 200-C - 200 mg/l MWCNT-COOH, 50 F - 50 mg/l Funingine de fulerene, 200 F - 200 mg/l Funingine de fulerene. Diferențele semnificative statistic sunt marcate cu * (**** - $p < 0.0001$)

IV.1.6 Reacții biochimice

IV.1.6.1 Activitatea peroxidazei (POD)

În urma expunerii la nanotuburi de carbon multistratificate (MWCNT) și la nanotuburi funcționalizate cu grupări carboxil (MWCNT-COOH), plantele de *Lemna minor* au manifestat o reducere semnificativă a activității POD, mai ales la concentrația de 200 mg/l. Cea mai accentuată reducere a fost înregistrată în cazul tratamentului cu MWCNT-COOH. Această inhibare enzimatică ar putea fi atribuită deteriorării oxidative a protein-enzimelor direct implicate sau unei interferențe în căile de reglare a expresiei genice asociate apărării antioxidante (Ma et al., 2010; Siddiqui et al., 2015). Pe de altă parte,

scăderea activității POD poate reflecta o acumulare excesivă de ROS, care depășește capacitatea de detoxifiere enzimatică a plantei, conducând la dezechilibre redox și la deteriorare celulară extensivă (Dietz și Herth, 2011).

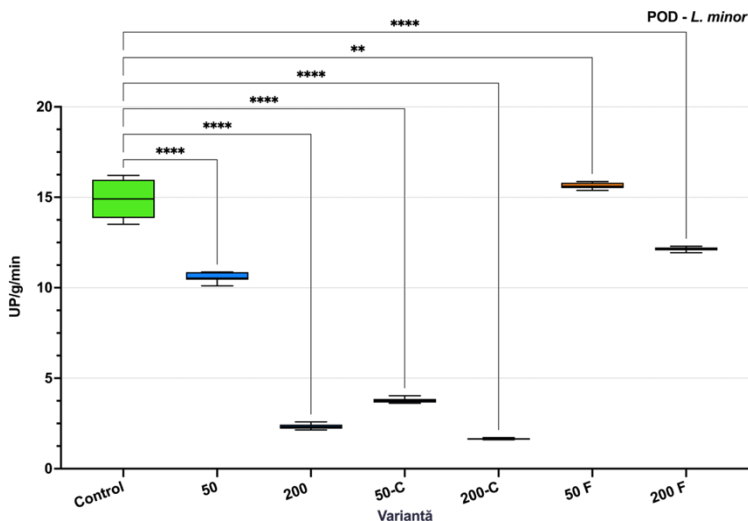


Fig. IV.13 – Activitatea peroxidazei a exemplarelor de *Lemna minor* L. cultivate în condiții experimentale. Variante experimentale: Control, 50 - 50 mg/l MWCNT, 200 - 200 mg/l MWCNT, 50-C - 50 mg/l MWCNT-COOH, 200-C - 200 mg/l MWCNT-COOH, 50 F - 50 mg/l Funingine de fullerene, 200 F - 200 mg/l Funingine de fullerene. Diferențele semnificative statistic sunt marcate cu * (** - $p = 0.0026$; **** - $p < 0.0001$)

IV.1.6.2 Activitatea superoxid-dismutazei (SOD)

În urma tratamentelor cu MWCNT, MWCNT-COOH și funingine de fullerene, lintița a prezentat o scădere semnificativă a activității SOD, cele mai reduse niveluri fiind observate la concentrația de 200 mg/l pentru toate nanomaterialele analizate. Această inhibare indică o dereglare majoră a echilibrului redox în plantele testate, posibil fie prin epuizarea capacității antioxidante a

SOD ca urmare a acumulării excesive de ROS, fie prin inactivarea directă a enzimei la nivel celular din cauza stresului oxidativ (Mittler, 2002; Gill și Tuteja, 2010) (Fig. IV.14, Anexa 9).

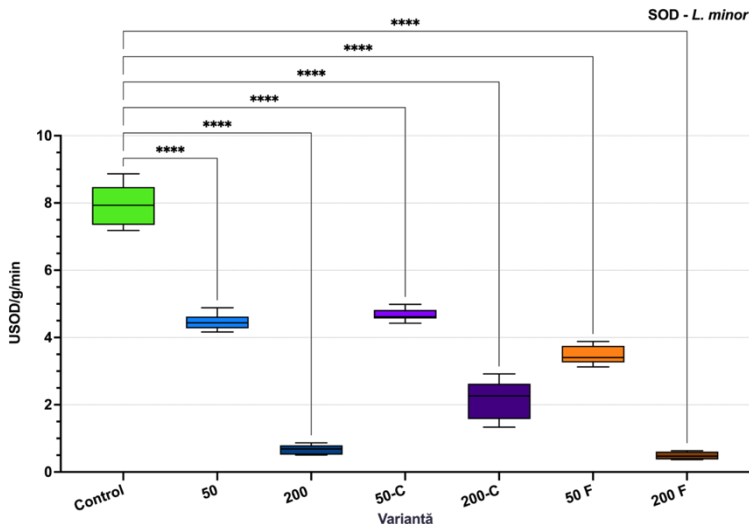


Fig. IV.14 – Activitatea superoxid-dismutazei a exemplarelor de *Lemna minor* L. cultivate în condiții experimentale. Variante experimentale: Control, 50 - 50 mg/l MWCNT, 200 – 200 mg/l MWCNT, 50-C – 50 mg/l MWCNT-COOH, 200-C - 200 mg/l MWCNT-COOH, 50 F – 50 mg/l Funingine de fullerene, 200 F – 200 mg/l Funingine de fullerene. Diferențele semnificative statistic sunt marcate cu * (**** - $p < 0.0001$)

IV.1.6.3 Conținutul de proteine solubile

Expunerea culturilor de *Lemna minor* la diferite concentrații de nanotuburi de carbon multistratificate (MWCNT), MWCNT funcționalizate cu grupări carboxilice (MWCNT-COOH) și funingine de fullerene a determinat variații semnificative ale conținutului total de proteine, în comparație cu grupul martor. Aceste rezultate sunt în acord cu datele din literatura de specialitate, care descriu stresul oxidativ și

perturbarea metabolismului proteic ca răspuns la expunerea la nanomateriale (Mittler, 2002; Zhang et al., 2017) (Fig. IV.15, Anexa 10).

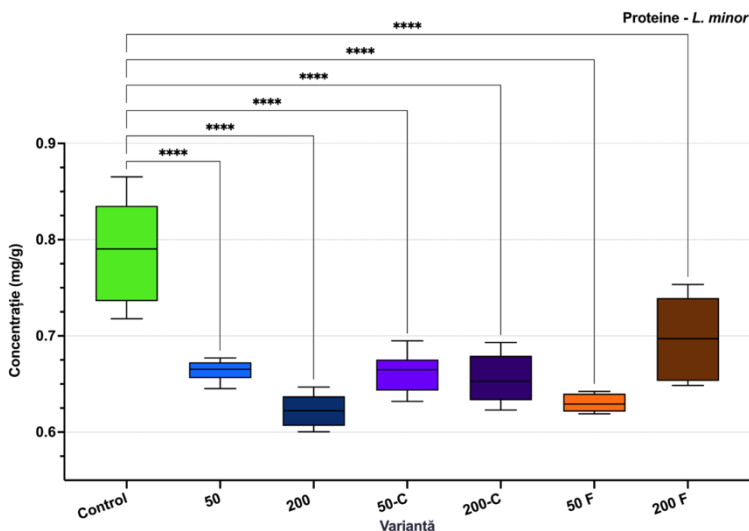


Fig. IV.15 – Conținutul de proteine al exemplarelor de *Lemna minor* L. cultivate în condiții experimentale. Variante experimentale: Control, 50 - 50 mg/l MWCNT, 200 - 200 mg/l MWCNT, 50-C - 50 mg/l MWCNT-COOH, 200-C - 200 mg/l MWCNT-COOH, 50 F - 50 mg/l Funingine de fullerene, 200 F - 200 mg/l Funingine de fullerene. Diferențele semnificative statistic sunt marcate cu * (**** - $p < 0.0001$)

IV.1.6.4 Activitatea antioxidantă totală

Comparativ cu varianta martor, toate tratamentele cu nanomateriale au generat plantelor test modificări semnificative ale activității de captare a radicalilor DPPH, confirmând faptul că prezența nanomaterialelor în mediul de cultură le-a provocat acestora un răspuns oxidativ sistemic, în care creșterea cea mai evidentă a activității antioxidante totale a fost observată la tratamentul cu MWCNT-COOH cu o concentrație de la 200 mg/l, urmat de

tratamentul cu MWCNT cu concentrația de 200 mg/l (Fig. IV.16, Anexa 11).

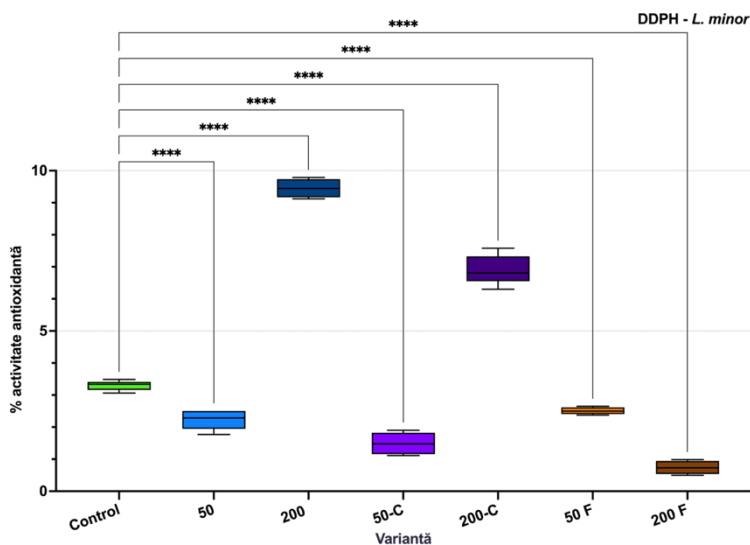


Fig. IV.16 – Activitatea antioxidantă totală a exemplarelor de *Lemna minor* L. cultivate în condiții experimentale (Test DPPH). Variante experimentale: Control, 50 - 50 mg/l MWCNT, 200 – 200 mg/l MWCNT, 50-C – 50 mg/l MWCNT-COOH, 200-C - 200 mg/l MWCNT-COOH, 50 F – 50 mg/l Funingine de fullerene, 200 F – 200 mg/l Funingine de fullerene. Diferențele semnificative statistic sunt marcate cu * (**** - $p < 0.0001$)

IV.1.7 Evaluarea expresiei genelor

IV.1.7.4 Expresia genei marker pentru activitatea fotosintetică: RBSC

În toate variantele de tratament, expresia RBSC a fost semnificativ redusă comparativ cu martorul, ceea ce indică o scădere a procesului fotosintetic evaluat la nivel transcripțional. O scădere semnificativă s-a înregistrat în cazul tratamentelor cu MWCNT și MWCNT-COOH, evidențiind influența tipului de nanomaterial asupra stresului oxidativ și asupra suprimării expresiei genice în plantele testate (Fig. IV.17, Anexa 12) (Gill și Tuteja, 2010).

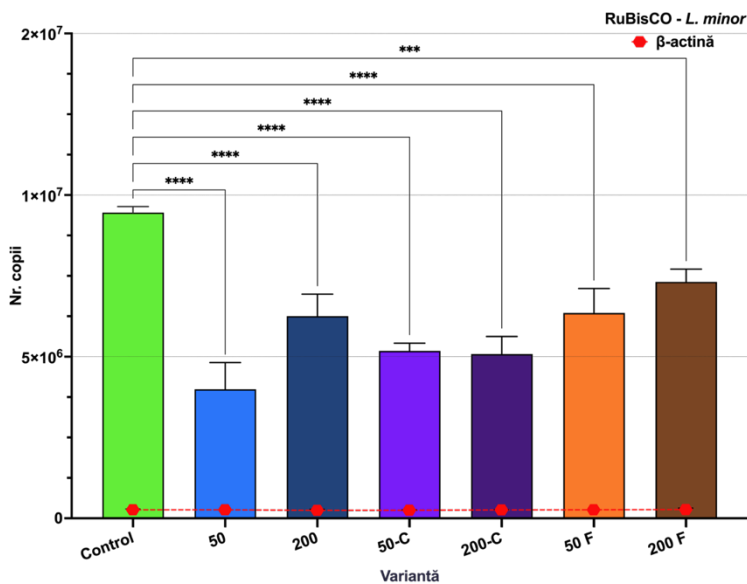


Fig. IV.17 – Expresia genei RBSC a exemplarelor de *Lemna minor* L. cultivate în condiții experimentale. Variante experimentale: Control, 50 - 50 mg/l MWCNT, 200 - 200 mg/l MWCNT, 50-C - 50 mg/l MWCNT-COOH, 200-C - 200 mg/l MWCNT-COOH, 50 F - 50 mg/l Funingine de fullerene, 200 F - 200 mg/l Funingine de fullerene. Diferențele semnificative statistic sunt marcate cu * (***) - $p = 0.0003$; **** - $p < 0.0001$)

IV.1.7.5 Expresia genei asociate cu metabolismul hormonal: NCED

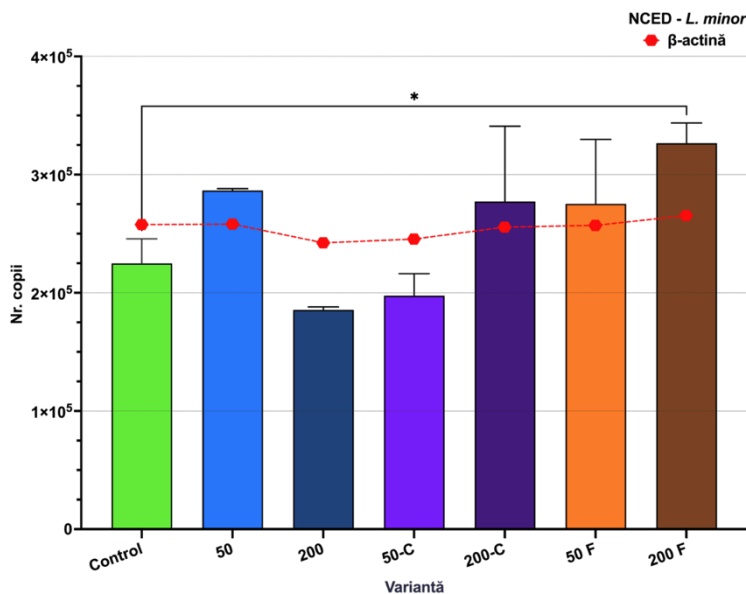


Fig. IV.18 – Expresia genei NCED9 a exemplarelor de *Lemna minor* L. cultivate în condiții experimentale. Variante experimentale: Control, 50 - 50 mg/l MWCNT, 200 - 200 mg/l MWCNT, 50-C - 50 mg/l MWCNT-COOH, 200-C - 200 mg/l MWCNT-COOH, 50 F - 50 mg/l Funingine de fullerene, 200 F - 200 mg/l Funingine de fullerene. Diferențele semnificative statistic sunt marcate cu * (* - $p = 0.0121$)

La variantele tratate cu MWCNT și MWCNT-COOH, expresia genei NCED a fost crescută la ambele concentrații testate (50 și 200 mg/l), cu un nivel de inducție mai accentuat la doza de 200 mg/l. Acest model sugerează o activare doză-dependentă a căii biosintetice ABA, reflectând severitatea stresului oxidativ indus de aceste nanomateriale (El-Saadony et al., 2022).

IV.1.7.6 Expresia genei implicate în răspunsul la stres oxidativ: POD (peroxidaza)

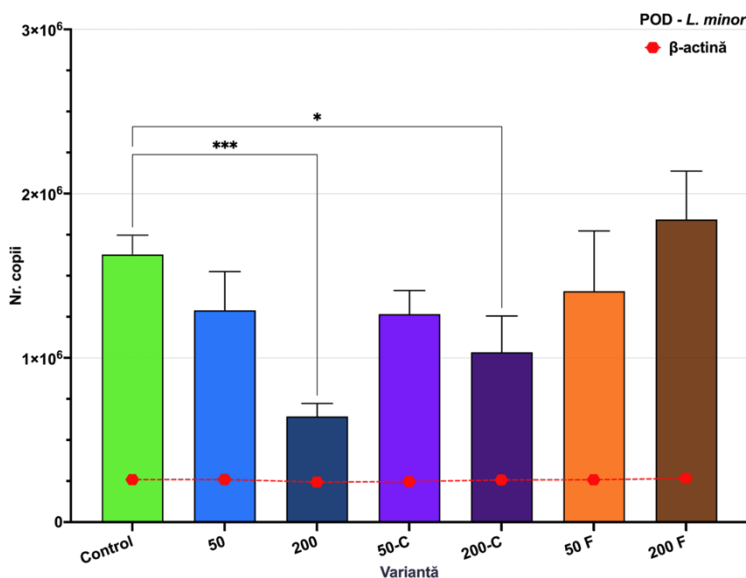


Fig. IV.19 – Expresia genei POD a exemplarelor de *Lemna minor* L. cultivate în condiții experimentale. Variante experimentale: Control, 50 - 50 mg/l MWCNT, 200 - 200 mg/l MWCNT, 50-C - 50 mg/l MWCNT-COOH, 200-C - 200 mg/l MWCNT-COOH, 50 F - 50 mg/l Funingine de fulerene, 200 F - 200 mg/l Funingine de fulerene. Diferențele semnificative statistic sunt marcate cu * (* - $p = 0.0232$; *** - $p = 0.0002$)

Rezultatele obținute indică faptul că funinginea de fulerene, în special la concentrații mari, stimulează transcripția POD mai eficient decât celelalte tipuri de nanomateriale testate, posibil datorită generării continue de ROS sau modificării semnalizării redox intracelulare (Wang et al., 2024).

IV.1.7.7 Expresia genei implicate în răspunsul la stres oxidativ: SOD (superoxid dismutaza)

Expresia relativă a genei SOD a fost crescută în toate variantele de tratament cu nanomateriale pe bază de carbon, comparativ cu grupul martor, ceea ce indică un răspuns oxidativ sistemic în plantele de *Lemna minor* (Fig. IV.20, Anexa 15).

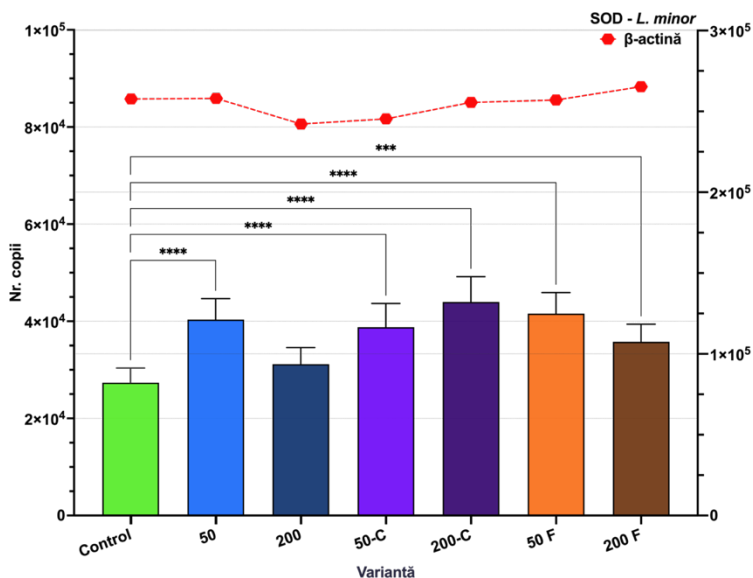


Fig. IV.20 – Expresia genei SOD a exemplarelor de *Lemna minor* L. cultivate în condiții experimentale. Variante experimentale: Control, 50 - 50 mg/l MWCNT, 200 - 200 mg/l MWCNT, 50-C - 50 mg/l MWCNT-COOH, 200-C - 200 mg/l MWCNT-COOH, 50 F - 50 mg/l Funingine de fullerene, 200 F - 200 mg/l Funingine de fullerene. Diferențele semnificative statistic sunt marcate cu * (***) - $p = 0.0007$; **** - $p < 0.0001$)

MWCNT cu o concentrație de 200 mg/l a determinat o creștere a expresiei acestei gene, însă ușor inferioară celei observate pentru tratamentul cu 50 mg/l, fapt ce poate reflecta fie o reglare negativă prin feedback, fie o suprasolicitare a sistemului antioxidant în condiții de stres mai sever (Cheng et al., 2016).

MWCNT-COOH în concentrații de 50 și 200 mg/l au menținut niveluri ridicate de expresie ale genei SOD, susținând ipoteza că funcționalizarea carboxilică a nanotuburilor amplifică interacțiunea lor cu țesuturile vegetale și favorizează în celulele plantelor test o producție continuă de ROS.

Funinginea de fulerene, atât la concentrația de 50 mg/l, cât și la cea de 200 mg/l a condus la o creștere moderată a expresiei genei SOD, cu o inducere mai pronunțată la concentrația mai mare, sugerând o semnalizare oxidativă a acesteia dependentă de doza aplicată (Yang et al., 2021).

IV.1.7.8 Expresia genei asociate cu senescența și apoptoza: DAD

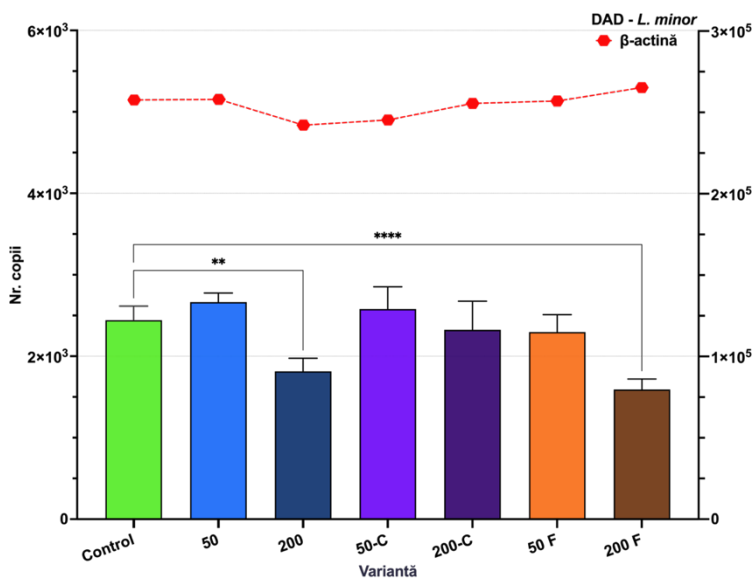


Fig. IV.21 – Expresia genei DAD1 a exemplarelor de *Lemna minor* L. cultivate în condiții experimentale. Variante experimentale: Control, 50 - 50 mg/l MWCNT, 200 - 200 mg/l MWCNT, 50-C - 50 mg/l MWCNT-COOH, 200-C - 200 mg/l MWCNT-COOH, 50 F - 50 mg/l Funingine de fulerene, 200 F - 200 mg/l Funingine de fulerene. Diferențele semnificative statistic sunt marcate cu * (** - $p = 0.0017$; **** - $p < 0.0001$)

În cazul tratamentului cu MWCNT, expresia genei DAD a fost ușor crescută la concentrația de 50 mg/l, indicând un răspuns adaptativ al plantelor la un nivel moderat de stres oxidativ. Totuși, la concentrația de 200 mg/l, expresia acestei gene a scăzut semnificativ, sugerând că intensificarea stresului a depășit capacitatea sistemului de apărare al plantelor, conducând la posibila activare a căilor de moarte celulară.

IV.2 Interacțiuni ale unor plante aparținând speciei *Lemna minuta* Kunth cu nanomateriale sintetice pe bază de carbon

IV.2.1 Dezvoltarea culturilor de *Lemna minuta* Kunth în condiții experimentale de cultivare

IV.2.1.1 Reacții morfologice

În cazul tratamentului cu nanotuburi de carbon multistratificate s-a observat un declin al numărului de frunze / fronde aparținând concentrației de 50 mg/l. Acest model experimental indică un efect inhibitor al nanotuburilor testate, dependent de doza aplicată, rezultatele practice obținute fiind în concordanță cu rapoartele anterioare referitoare la efectul aplicării de nanotuburi de carbon multistratificate (MWCNT), care afectează integritatea suprafeței organelor vegetative și de reproducere ale plantelor și le suprimă creșterea (Begum et al., 2012b).

O reducere și mai accentuată a numărului de frunze / fronde ale plantelor de *Lemna minuta* a fost evidențiată în cazul aplicării ambelor concentrații de nanotuburi carboxilate, fenomenul sugerând că procesul de carboxilare le sporește acestor nanotuburi toxicitatea, probabil ca urmare a solubilității și biodisponibilității lor crescute, după cum se afirmă în literatura de specialitate (Zhang et al., 2016).

Tratamentul cu funingine de fullerene a indus un răspuns diferit: numărul frunzelor / frondelor plantelor de *Lemna minuta* nou

formate a crescut ca urmare a aplicării concentrației de 50 mg/l, dar a scăzut ușor în cazul aplicării concentrației de 200 mg/l. Această tendință bifazică de răspuns poate reflecta un efect hormetic, în care dozele mici de nanomateriale sintetice pe bază de carbon favorizează procesul de creștere al plantelor test, în timp ce dozele mai mari declanșează stresul oxidativ, fenomen relatat de literatura de specialitate în legătură cu efectul nanotuburilor de fulerene aplicate experimental plantelor test (Gogos et al., 2012)(Fig. IV.22, Anexa 17, Anexa 31).

IV.2.2 Reacții fiziologice

IV.2.2.1 Fluorescența clorofiliană

În cazul testării nanotuburilor de carbon multistratificate (MWCNT) s-a obținut o reducere clară a valorilor parametrului ΦPSII (dependente de concentrația tratamentului aplicat), rezultatele practice indicând o afectare progresivă a eficienței fotosintetice a aparatului fotoasimilator al plantelor de *Lemna minuta* odată cu creșterea expunerii lor la aceste nanomateriale. Această constatare se aliniază rezultatelor comunicate de literatura de specialitate, care arată că MWCNT pot perturba structura cloroplastului, pot reduce nivelurile conținutului de clorofilă și pot induce formarea de ROS conducând, în cele din urmă, la fenomene de fotoinhibiție în plantele test (Meften et al., 2023)

Scăderea eficienței fotosintetice a aparatului fotoasimilator al plantelor de *Lemna minuta* a fost și mai pronunțată în cazul cultivării lor în prezența nanotuburilor carboxilate. Astfel, la concentrația de 200 mg/l, ΦPSII a atins cea mai mică valoare din întregul șir experimental, fapt ce sugerează că procesul de funcționalizare sporește toxicitatea nanotuburilor, probabil din cauza dispersiei lor îmbunătățite în mediu

și a absorbției mai intense la nivelul celulelor epidermice ale frunzelor / frondelor plantelor test (Wang et al., 2014).

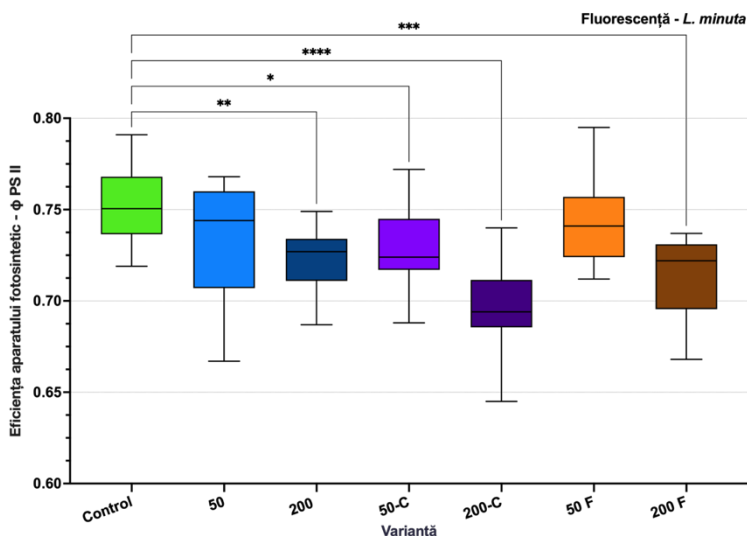


Fig. IV.26 – Eficiența fotosintetică a plantelor de *Lemna minuta* Kunth în ziua 14 a experimentului. Variante experimentale: Control, 50 - 50 mg/l MWCNT, 200 - 200 mg/l MWCNT, 50-C - 50 mg/l MWCNT-COOH, 200-C - 200 mg/l MWCNT-COOH, 50 F - 50 mg/l Funingine de fullerene, 200 F - 200 mg/l Funingine de fullerene. Diferențele semnificative statistic sunt marcate cu * (* - $p = 0.0348$; ** - $p = 0.0064$; *** - $p = 0.0001$; **** - $p < 0.0001$)

IV.2.2.2 Conținutul de pigmenți asimilatori

Ambele tratamente cu nanotuburi de carbon multistratificate testate au determinat în plantele de *Lemna minuta* o ușoară scădere a conținutului de pigmenți fotoasimilatori (clorofilă a, clorofilă b, pigmenți carotenoidici) valorile astfel obținute indicând inducerea unui efect inhibitor dependent de doza aplicată. Această tendință înregistrată practic reflectă probabil perturbarea progresivă a

biosintezei pigmentilor sau degradarea structurii cloroplastului în țesutul fotoasimilator al plantelor test, procese potențial declanșate de stresul oxidativ indus de nanotuburile simple (MWCNT) prezent în mediul lor de cultură (Wellburn et al., 1972).

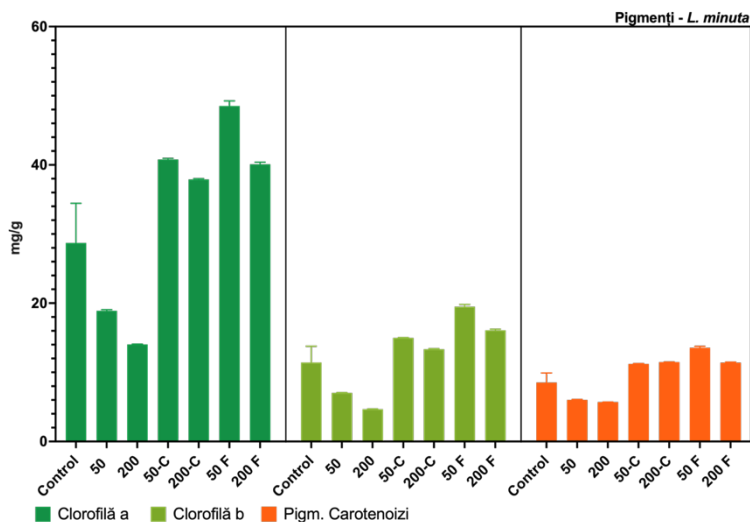


Fig. IV.27 – Comparație a conținutului de pigmenți asimilatori al plantelor de *Lemna minuta* Kunth în ziua 14 a experimentului. Variante experimentale: Control, 50 - 50 mg/l MWCNT, 200 – 200 mg/l MWCNT, 50-C – 50 mg/l MWCNT-COOH, 200-C - 200 mg/l MWCNT-COOH, 50 F – 50 mg/l Funingine de fullerene, 200 F – 200 mg/l Funingine de fullerene.

IV.2.2.3 Conținutul de flavonoide

La varianta de tratament cu nanotuburi de carbon multistratificate (MWCNT) a fost înregistrată, pe măsura creșterii concentrației lor (de la 50 mg/l la 200 mg/l), o creștere modestă a conținutului de flavonoide, rezultatele obținute indicând o activare a răspunsului de biosinteză a acestor compuși cu rol antioxidant în țesuturile plantelor test dependentă de doza de aplicare a respectivelor nanotuburi. Ambele variante au prezentat niveluri de flavonoide sub

varianta martor. Răspunsul înregistrat reflectă un posibil nivel ridicat de stres oxidativ manifestat în țesuturile plantelor de *Lemna minor*, flavonoidele fiind cunoscute pentru rolul lor de atenuare a acțiunii speciilor reactive de oxigen (ROS) apărute în organismele vegetale în condițiile manifestării în structurile lor a unui stres abiotic indus de prezența în mediu a diverse tipuri de compuși chimici, inclusiv nanomateriale de sinteză (Ma et al., 2010; Jiang et al., 2019).

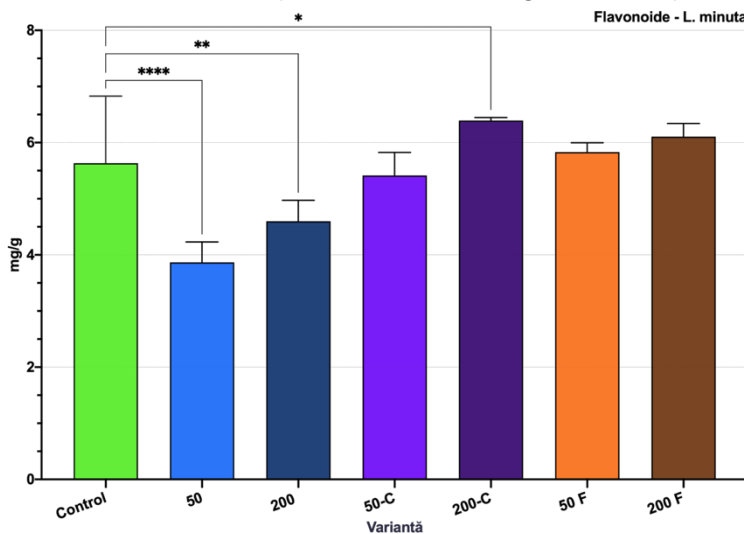


Fig. IV.31 – Conținutul de flavonoide al plantelor de *Lemna minuta* Kunth cultivate în condiții experimentale. Variante experimentale: Control, 50 - 50 mg/l MWCNT, 200 - 200 mg/l MWCNT, 50-C - 50 mg/l MWCNT-COOH, 200-C - 200 mg/l MWCNT-COOH, 50 F - 50 mg/l Funingine de fullerene, 200 F - 200 mg/l Funingine de fullerene. Diferențele semnificative statistic sunt marcate cu * (* - $p = 0.0354$; ** - $p = 0.0017$; **** - $p < 0.0001$)

IV.2.2.4 Conținutul de polifenoli

În cazul tratamentelor cu nanotuburi de carbon multistratificate carboxilate (MWCNT-COOH) s-a observat o creștere a nivelului total de polifenoli sintetizați de către plantele test. Acest tip de reacție fiziologică a plantelor de *Lemna minuta* implică o stimulare

intensă a sistemului lor antioxidant de apărare, reacție determinată, probabil, de dispersabilitatea îmbunătățită a respectivelor nanotuburi în mediul acvatic și de absorbția celulară sporită a nanotuburilor funcționalizate (MWCNT-COOH) la nivelul țesuturilor vegetale, caracteristici ce le sporesc impactul funcțional cu plantele suport (Aryal et al., 2019).

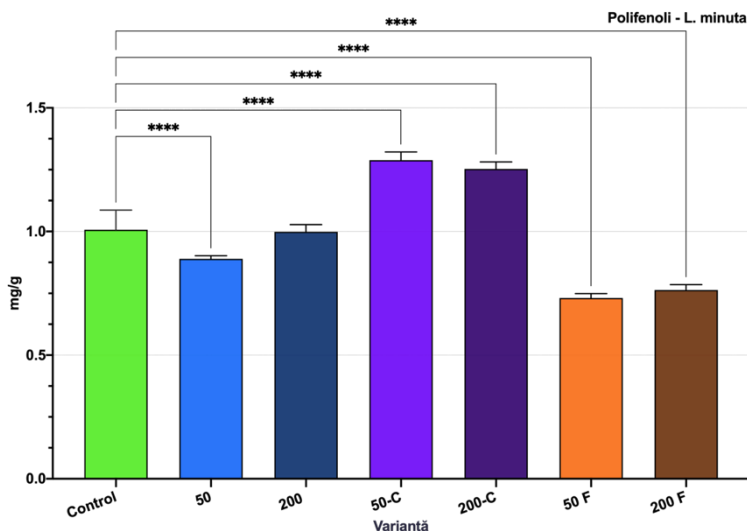


Fig. IV.32 – Conținutul de polifenoli al plantelor de *Lemna minuta* Kunth cultivate în condiții experimentale. Variante experimentale: Control, 50 - 50 mg/l MWCNT, 200 - 200 mg/l MWCNT, 50-C - 50 mg/l MWCNT-COOH, 200-C - 200 mg/l MWCNT-COOH, 50 F - 50 mg/l Funingine de fullerene, 200 F - 200 mg/l Funingine de fullerene. Diferențele semnificative statistic sunt marcate cu * (**** - $p < 0.0001$)

IV.2.3 Reacții biochimice

IV.2.3.1 Activitatea peroxidazei (POD)

Activitatea peroxidazei (POD) a prezentat o creștere notabilă la concentrația de 50 mg/l pentru toate nanomaterialele aplicate experimental în mediul de cultură al plantelor test, inducând activarea capacității antioxidante a acestora, ca răspuns la stresul oxidativ creat.

În cazul concentrațiilor mari de nanomateriale utilizate experimental (200 mg/l), activitatea POD s-a redus, ajungând chiar sub valoarea înregistrată pentru varianta control, ceea ce sugerează că valori mai mari ale concentrației acestor compuși chimici de sinteză pot copleși sistemul de apărare enzimatică al plantelor, ducând la o deteriorare oxidativă celulară instalată ca urmare a inhibării activității enzimelor componente (Ma et al., 2010)(Fig. IV.33, Anexa 24).

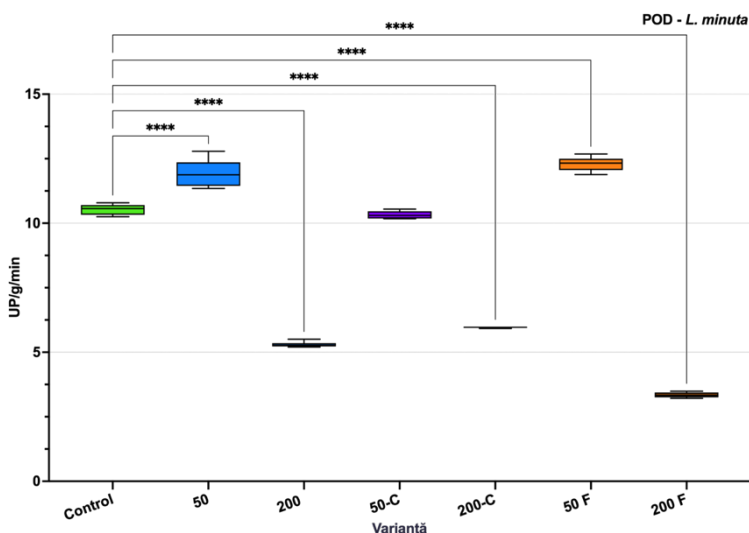


Fig. IV.33 – Activitatea peroxidazei la exemplare de *Lemna minuta* Kunth cultivate în condiții experimentale. Variante experimentale: Control, 50 - 50 mg/l MWCNT, 200 - 200 mg/l MWCNT, 50-C - 50 mg/l MWCNT-COOH, 200-C - 200 mg/l MWCNT-COOH, 50 F - 50 mg/l Funingine de fullerene, 200 F - 200 mg/l Funingine de fullerene. Diferențele semnificative statistic sunt marcate cu * (**** - $p < 0.0001$)

IV.2.3.2 Activitatea superoxid-dismutazei (SOD)

În cazul culturilor de *Lemna minuta* aflate în interacțiune cu nanomaterialele pe bază de carbon aplicate experimental, activitatea SOD a fost puternic redusă în mod constant de prezența acestor compuși chimici în mediul lor de viață, inhibarea cea mai evidentă

fiind observată la aplicarea concentrațiilor mari de nanomateriale (200 mg/l). Acest tip de răspuns biochimic reflectă un efect inhibitor al activității SOD dependent de doza de tratament experimentată, efect posibil legat de o „explozie” oxidativă inițială la concentrații mai scăzute ale nanomaterialelor test, urmată de inactivarea enzimei sau de apariția de leziuni oxidative celulare grave în țesuturile vegetale, ca urmare a măririi dozei de aplicare a respectivelor nanomaterialelor (Ma et al., 2010)(Fig. IV.34, Anexa 25).

Aspectele biochimice discutate sugerează o posibilă cale de tulburare a apărării antioxidante primare a plantelor și de creștere a susceptibilității lor la stresul oxidativ al mediului, rezultatele obținute validând SOD ca biomarker fiabil al perturbării oxidative și al afectării enzimatică la plantele acvatice expuse prezenței nanomaterialelor în mediul de viață.

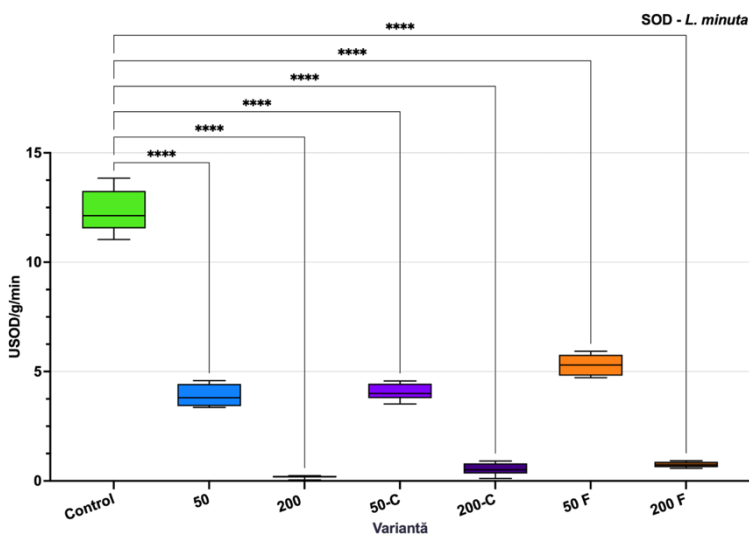


Fig. IV.34 – Activitatea superoxid-dismutazei la exemplare de *Lemna minuta* Kunth cultivate în condiții experimentale. Variante experimentale: Control, 50 - 50 mg/l MWCNT, 200 – 200 mg/l MWCNT, 50-C – 50 mg/l MWCNT-COOH, 200-C - 200 mg/l MWCNT-COOH, 50 F – 50 mg/l

Funingine de fulerene, 200 F – 200 mg/l Funingine de fulerene. Diferențele semnificative statistic sunt marcate cu * (**** - $p < 0.0001$)

IV.2.3.3 Conținutul de proteine solubile

Variația conținutului de proteine, superior la aproape toate variantele test comparativ cu varianta control, sugerează că majoritatea nanomaterialelor sintetice pe bază de carbon determină activarea metabolică asociată cu procesele de apărare și adaptare celulară. Singurul efect inhibitor, observat la concentrația de 50 mg/l nanotuburi de carbon multistratificate (MWCNT), indică o potențială suprimare metabolică sau un răspuns întârziat al plantelor aparținând respectivei variante experimentale la stresul chimic indus de această concentrație mai mică a MWCNT. În schimb, nanomaterialele funcționalizate (MWCNT-COOH) și funinginea de fulerene au determinat creșterea conținutului de proteine, indicând capacitatea acestora de a stimula mecanismele de detoxifiere și reparare celulară. Aceste rezultate susțin conținutul total de proteine ca indicator fiabil al modificărilor metabolice și al răspunsurilor la stresul oxidativ induse de nanomateriale în plantele acvatice (Ma et al., 2010; Zhang et al., 2017)(Fig. IV.35, Anexa 26).

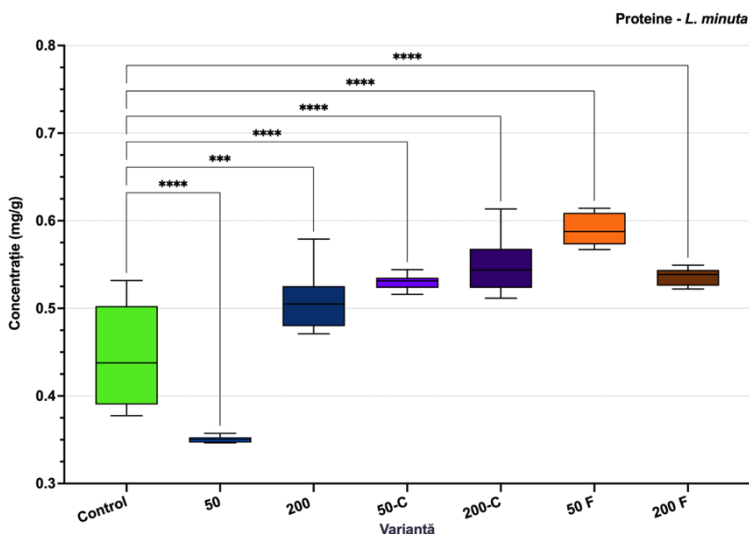


Fig. IV.35 – Conținutul de proteine al exemplarelor de *Lemna minuta* Kunth cultivate în condiții experimentale. Variante experimentale: Control, 50 - 50 mg/l MWCNT, 200 - 200 mg/l MWCNT, 50-C - 50 mg/l MWCNT-COOH, 200-C - 200 mg/l MWCNT-COOH, 50 F - 50 mg/l Funingine de fulerene, 200 F - 200 mg/l Funingine de fulerene. Diferențele semnificative statistic sunt marcate cu * (***) - $p = 0.0003$; **** - $p < 0.0001$)

IV.2.3.4 Activitatea antioxidantă totală

Răspunsul antioxidant al culturilor de *Lemna minuta* evaluat prin intermediul testului DPPH demonstrează efectele distincte ale nanomaterialelor pe bază de carbon în funcție de compoziția acestora. Astfel, nanotuburile de carbon multistratificate și funinginea de fulerene au redus capacitatea antioxidantă a plantelor test, probabil din cauza stresului oxidativ și al afectării sistemelor lor endogene de apărare. În schimb, nanotuburile de carbon multistratificate carboxilate au îmbunătățit semnificativ activitatea antioxidantă a indivizilor de *Lemna minor*, indicând o posibilă activare în țesuturile acestora a căilor de neutralizare a speciilor reactive de oxigen,

determinată de îmbunătățirea absorbției nanotuburilor și a semnalizării intracelulare. Aceste constatări evidențiază rolul critic al funcționalizării și al concentrației nanomaterialelor sintetice pe bază de carbon în modularea răspunsurilor fiziologice ale plantelor și confirmă faptul că testele bazate pe DPPH servesc drept indicatori fiabili ai adaptării sau suprimării stresului oxidativ la plantele acvatice (Ma et al., 2010; Begum și Fugetsu, 2012; Tripathi et al., 2017)(Fig. IV.36, Anexa 27).

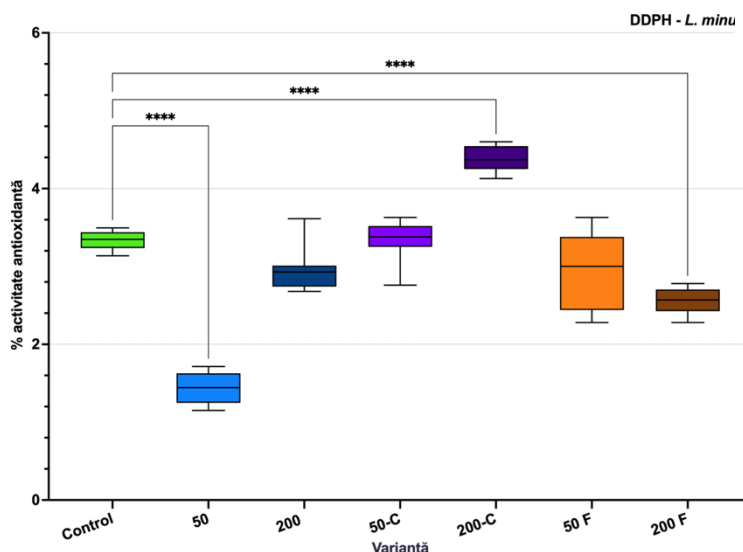


Fig. IV.36 – Activitatea antioxidantă totală a exemplarelor de *Lemna minuta* Kunth cultivate în condiții experimentale (Test DPPH). Variante experimentale: Control, 50 - 50 mg/l MWCNT, 200 – 200 mg/l MWCNT, 50-C – 50 mg/l MWCNT-COOH, 200-C - 200 mg/l MWCNT-COOH, 50 F – 50 mg/l Funingine de fullerene, 200 F – 200 mg/l Funingine de fullerene. Diferențele semnificative statistic sunt marcate cu * (**** - $p < 0.0001$)

Considerații finale

Lucrarea de față a urmărit să ofere, prin rezultatele obținute, o evaluare comparativă a impactului morfo - fiziologic și biochimic resimțit de reprezentanții a două specii de plante acvatice înrudite - *Lemna minor* L. și *Lemna minuta* Kunth - ca urmare a interacțiunii lor în mediul de cultură cu nanomateriale sintetice pe bază de carbon (MWCNT, MWCNT-COOH și funingine de fulerene).

- În timp ce specia *Lemna minor* L. este considerată specie model, recunoscută în cercetarea ecotoxicologică, includerea în grupul plantelor tip pentru astfel de cercetări a speciei *Lemna minuta* Kunth, larg răspândită, dar puțin studiată sub aspectul reactivității complexe morfo-funcționale și biochimice la modificarea condițiilor de viață, evidențiază potențialul său de bioindicator sensibil al calității bazinelor de apă dulce și susține o direcție nouă de cercetare în ecologia acvatică.

- Analiza integrativă a modificărilor morfologice și micromorfologice (dezvoltarea coloniilor, caracteristicile suprafeței foliare, structura stomatală), a modificărilor fiziologice și biochimice (fluorescența clorofiliană, conținutul de pigmenți fotoasimilatori, conținutul de metaboliți secundari, activitatea enzimatică antioxidantă), precum și a expresiei genelor implicate în răspunsul la stres al indivizilor aparținând speciei *Lemna minor* L. oferă dovezi convingătoare că tipul și concentrația nanomaterialelor sintetice pe bază de carbon influențează semnificativ coordonarea și amploarea răspunsurilor lor la condițiile stresului abiotic al mediului de viață. Aceste rezultate consolidează relevanța speciei ca organism model în studiile de nanotoxicitate și susțin necesitatea abordării de cercetări multi- și interdisciplinare în evaluarea impactului ecotoxicologic al nanomaterialelor sintetice pe bază de carbon asupra ecosistemelor acvatice.

- Modificările morfo-fiziologice și biochimice observate la plantele aparținând speciei *Lemna minuta* L., ca răspuns al interacțiunii lor cu nanomateriale sintetice pe bază de carbon, care

acoperă aspecte referitoare la dezvoltarea coloniilor, structura stomatală, conținutul și compoziția pigmentilor fotoasimilatori, activitatea enzimatică și concentrația unor compuși metabolici cu rol antioxidant demonstrează că această specie este un bioindicator sensibil al gradului de poluare al mediului acvatic. Capacitatea sa de reacție la stresul oxidativ prin perturbări metabolice și modificări morfologice specifice, evidențiate experimental, îi subliniază valoarea în evaluarea practică a riscurilor ecotoxice reprezentate de contaminarea ecosistemelor de apă dulce cu nanomateriale sintetice.

- În cazul speciei *Lemna minor* L. nanotuburile de carbon multistratificate simple (MWCNT) au redus semnificativ eficiența sistemului fotosintetic II (PSII) și conținutul de pigmenti fotoasimilatori în special la concentrații de 200 mg/l, acestea inducând toxicitatea și deteriorarea cloroplastelor, urmată de reduceri ale conținutului de clorofil a, b și de pigmenti carotenoidici. În același timp, enzimele antioxidante au reacționat asimetric, POD manifestând o creștere a activității la unele tratamente, în timp ce activitatea SOD, în general inhibată, a fost evident suprimată mai ales în prezența nanotuburilor funcționalizate cu grupări carboxilice (MWCNT-COOH). Asimetria enzimatică constatată sugerează activarea preferențială a detoxifierii metabolice mediată de peroxidază, indicând instalarea unui dezechilibru redox în celulele vegetale, ca efect al prezenței factorilor chimici perturbatori reprezentați de nanomaterialele de sinteză testate.

- Nanomaterialele sintetice pe bază de carbon exercită efecte specifice compoziției chimice, dependente de concentrația de aplicare și asupra culturilor de *Lemna minuta* Kunth, alterându-le atât morfologia, cât și homeostazia biochimică. Între variantele testate se disting nanotuburile funcționalizate cu grupări carboxilice (MWCNT-COOH), care au prezentat cea mai mare fitotoxicitate, afectând semnificativ creșterea, capacitatea antioxidantă și performanța fotosintetică a plantelor test, probabil datorită reactivității și biodisponibilității sporite a suprafeței lor de interacțiune cu plantele

suport. În schimb, funinginea de fulerene a produs răspunsuri mai blânde în corpul plantelor test, inclusiv efecte stimulative la concentrații mai mici de aplicare, fapt ce indică un răspuns hormetic al organismelor vegetale aflate în interrelație cu respectivii compuși din mediul acvatic. Aceste constatări subliniază rolul esențial al chimiei de suprafață și al concentrației nanotuburilor sintetice pe bază de carbon în determinarea și cuantificarea efectelor lor fitotoxice.

- Plantele de *Lemna minuta* Kunth au prezentat răspunsuri mai puternice decât cele aparținând speciei *Lemna minor* L., manifestate prin modificări vizibile în cazul variației mai multor parametri morfo-fiziologici și biochimici, inclusiv creșterea frunzelor / frondelor, conținutul de pigmenți fotoasimilatori și acumularea de metaboliți secundari cu rol detoxifiant al mediului celular, reacții ce sugerează că specia *Lemna minuta* Kunth este un bioindicator mai receptiv funcțional la modificarea calitativă a mediului de viață, fiind potrivită pentru testarea nanotoxicității acute a ecosistemelor acvatice de apă dulce.

- Prezentând atât modele de răspuns comune celor două specii ale genului *Lemna* avute în atenție, cât și specifice fiecăreia dintre ele și demonstrând sensibilitatea crescută a indivizilor de *Lemna minuta* Kunth la prezența nanomaterialelor pe bază de carbon sintetic, rezultatele obținute completează baza lor științifică de utilizare ca sisteme model în evaluarea riscurilor de mediu și susțin integrarea interdisciplinară a cercetărilor de nanotoxicologie pentru viitoarele modele de monitorizare și reglementare a calității mediilor acvatice.

- Recunoscute ca organisme model valoroase în cercetările de ecotoxicologie datorită creșterii rapide, propagării clonale și sensibilității ridicate la poluanți, speciile genului *Lemna*, în special *Lemna minor* L. și *Lemna minuta* Kunth prezintă anumite trăsături asociate cu un puternic potențial invaziv în ecosistemele acvatice naturale, precum capacitatea de a se reproduce vegetativ la rate ridicate, capacitatea de a forma covoare dense de suprafață și de a tolera diverse condiții de mediu, trăsături ce le permit să concureze cu

macrofitele native prin limitarea disponibilității luminii și perturbarea structurilor trofice locale; în acest sens, literatura de specialitate din mai multe țări europene prezintă specia *Lemna minuta* Kunth ca taxon exotic invaziv, proliferarea sa fiind strâns legată de perturbările antropice și de apele îmbogățite cu nutrienți.

- În contextul prezentat, utilizarea în culturi experimentale a indivizilor de *Lemna* spp. se impune a fi realizată în condiții strict controlate, care să evite riscul eliberării lor accidentale în mediile naturale. Punerea în aplicare a unor măsuri corecte și sigure de utilizare și valorificare a materialelor vegetale implicate în activități de decontaminare și depoluare a mediilor acvatice afectate - care respectă reglementările naționale și internaționale în vigoare privind eliminarea lor în condiții de siguranță - sunt esențiale pentru prevenirea impactului ecologic asociat cu evadarea din perimetrele organizate special pentru cultivare și utilizare experimentală / de exploatare a acestor posibili invadatori vegetali acvatici cu creștere rapidă.

Proiectarea prezentului design experimental pe mai multe niveluri, cuprinzând aspecte ale creșterii, caracteristici morfologice și micromorfologice ale suprafeței foliare, aspecte funcționale, biochimice și, nu în ultimul rând, elemente ale expresiei genelor implicate în răspunsul la stres, poate constitui un model de cercetare aplicată integrativ și comparativ în nanotoxicologia lemnaceelor. Accentul pus în special pe nanotuburile de carbon multistratificate, al căror comportament în mediu natural rămâne insuficient caracterizat, reprezintă efortul nostru de a acoperi, cu rezultate susținute statistic, lacunele existente încă în înțelegerea modului prin care tipul de nanomateriale influențează fitotoxicitatea mediilor acvatice populate cu taxoni ai genului *Lemna* L..

Perspective de continuare a cercetărilor

1. Investigații asupra absorbției și transportului nanomaterialelor:

Pentru a desluși modul în care MWCNT și funinginea de fulerene interacționează cu macrofite acvatice precum *Lemna minor* L., *Lemna minuta* Kunth și *Lemna trisulca* L., lucrările viitoare vor utiliza modalități avansate de imagistică cum ar fi TEM, SEM-EDX, micro-CT și microscopia confocală alături de spectroscopia Raman. Aceste instrumente pot ajuta la clarificarea modului în care trăsăturile structurale precum morfologia rădăcinii și arhitectura frunzelor influențează absorbția și distribuția nanomaterialelor la nivel celular și subcelular.

2. Analiza răspunsului la stres specific speciilor:

Investigarea modificărilor transcriptomice și proteomice ca răspuns la nanomateriale va fi esențială pentru înțelegerea modului în care aceste specii gestionează stresul oxidativ. Țintirea genelor și proteinelor legate de sistemele antioxidante (de exemplu, SOD, POD, CAT), căile hormonale și metabolismul stresului ar putea dezvălui diferențe-cheie în sensibilitatea și mecanismele de protecție ale speciilor *Lemna minor* L., *Lemna minuta* Kunth și *Lemna trisulca* L..

3. Perspective la nivel comunitar și de ecosistem:

Încorporarea speciilor *Lemna minor* L., *Lemna minuta* Kunth și *Lemna trisulca* L. în sisteme acvatice cu mai multe specii (de exemplu într-un *microcosm*) ar oferi o imagine mai clară a modului în care nanomaterialele se propagă prin comunitățile de plante, alge și rețelele trofice acvatice.

Bibliografie selectivă

- Acosta, K., Appenroth, K.J., Borisjuk, L., Edelman, M., Heinig, U., Jansen, M.A.K., Oyama, T., Pasaribu, B., Schubert, I., Sorrels, S., Sree, K.S., Xu, S., Michael, T.P., Lam, E., 2021. Return of the Lemnaceae: duckweed as a model plant system in the genomics and postgenomics era. *The Plant Cell* 33, 3207-3234. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab189>
- Ajayan, P.M., Ebbesen, T.W., 1997. Nanometre-size tubes of carbon. *Rep. Prog. Phys.* 60, 1025. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/60/10/001>
- Ali-Boucetta, H., Nunes, A., Sainz, R., Herrero, M.A., Tian, B., Prato, M., Bianco, A., Kostarelos, K., 2013. Asbestos-like pathogenicity of long carbon nanotubes alleviated by chemical functionalization. *Angewandte Chemie International Edition* 52, 2274-2278. <https://doi.org/10.1002/anie.201207664>
- Alimohammadi, M., Xu, Y., Wang, D., Biris, A.S., Khodakovskaya, M.V., 2011. Physiological responses induced in tomato plants by a two-component nanostructural system composed of carbon nanotubes conjugated with quantum dots and its invivo multimodal detection. *Nanotechnology* 22. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/29/295101>
- Ansari, A.A., Naeem, M., Gill, S.S., AlZuaibr, F.M., 2020. Phytoremediation of contaminated waters: An eco-friendly technology based on aquatic macrophytes application. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 46, 371-376. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.03.002>
- Armstrong, W.P., 2011. The Lemnaceae (Duckweed Family) [WWW Document]. URL <https://www.waynesword.net/1wayindx.htm> (data accesării 5.8.20).
- Aryal, S., Baniya, M.K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R., Koirala, N., 2019. Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. *Plants (Basel)* 8, 96. <https://doi.org/10.3390/plants8040096>
- A.S.T.M., 1991. Standard guide for conducting static toxicity tests with *Lemna gibba* G3. ASTM standard. Book of ASTM Standards.
- Baek, G., Saeed, M., Choi, H.-K., 2021. Duckweeds: their utilization, metabolites and cultivation. *Appl Biol Chem* 64, 73. <https://doi.org/10.1186/s13765-021-00644-z>
- Bakry, R., Vallant, R.M., Najam-ul-Haq, M., Rainer, M., Szabo, Z., Huck, C.W., Bonn, G.K., 2007. Medicinal applications of fullerenes. *Int J Nanomedicine* 2, 639-649.

- Begum, P., Fugetsu, B., 2012. Phytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes on red spinach (*Amaranthus tricolor* L) and the role of ascorbic acid as an antioxidant. *Journal of Hazardous Materials* 243, 212-222. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.10.025>
- Begum, P., Ikhtiar, R., Fugetsu, B., 2011. Graphene phytotoxicity in the seedling stage of cabbage, tomato, red spinach, and lettuce. *Carbon* 49, 3907-3919. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.05.029>.
- Begum, P., Ikhtiar, R., Fugetsu, B., Matsuoka, M., Akasaka, T., Watari, F., 2012a. Phytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes assessed by selected plant species in the seedling stage. *Applied Surface Science* 262, 120-124. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.03.028>
- Begum, P., Ikhtiar, R., Fugetsu, B., Matsuoka, M., Akasaka, T., Watari, F., 2012b. Phytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes assessed by selected plant species in the seedling stage. *Applied Surface Science, Surface and Interface of Biomaterials - Structure and effect from macro to nano* 262, 120-124. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.03.028>
- Bishop, W., Perry, R., 1981. Development and Evaluation of a Flow-Through Growth Inhibition Test with Duckweed (*Lemna minor*), in: *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*. ASTM International 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19428-2959, pp. 421-435. <https://doi.org/10.1520/STP34172S>
- Blodgett, F.H., 1915. Morphology of the Lemna Frond. *Botanical Gazette* 60, 383-390. <https://doi.org/10.1086/331676>
- Bog, M., Appenroth, K.J., Sree, K.S., 2020. Key to the determination of taxa of Lemnaceae: an update. *Nordic Journal of Botany* 38, njb.02658. <https://doi.org/10.1111/njb.02658>
- Bokhari, S.H., Ahmad, I., Mahmood-Ul-Hassan, M., Mohammad, A., 2016. Phytoremediation potential of *Lemna minor* L. for heavy metals. *International Journal of Phytoremediation* 18, 25-32. <https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1058331>
- Bowker, D.W., Duffield, A.N., Denny, P., 1980. Methods for the isolation, sterilization and cultivation of Lemnaceae. *Freshwater Biol* 10, 385-388. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1980.tb01212.x>
- Ceschin, S., Abati, S., Leacche, I., Zuccarello, V., 2018. Ecological comparison between duckweeds in central Italy: The invasive *Lemna minuta* vs the native *L. minor*. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 152, 674-683. <https://doi.org/10.1080/11263504.2017.1317671>
- Ceschin, S., Crescenzi, M., Iannelli, M.A., 2020. Phytoremediation potential of the duckweeds *Lemna minuta* and *Lemna minor* to remove

- nutrients from treated waters. *Environ Sci Pollut Res* 27, 15806-15814. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08045-3>
- Ceschin, S., Leacche, I., Pascucci, S., Abati, S., 2016. Morphological study of *Lemna minuta* Kunth, an alien species often mistaken for the native *L. minor* L. (Araceae). *Aquatic Botany* 131, 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2016.01.005>
- Chandra Kanth, P., Verma, S.K., Gour, N., 2020. Functionalized nanomaterials for biomedical and agriculture industries, in: *Handbook of Functionalized Nanomaterials for Industrial Applications*. Elsevier, pp. 231-265. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816787-8.00010-7>
- Chen, G., Stepanenko, A., Lakhneko, O., Zhou, Y., Kishchenko, O., Peterson, A., Cui, D., Zhu, H., Xu, J., Morgun, B., Gudkov, D., Friesen, N., Borysyuk, M., 2022. Biodiversity of Duckweed (Lemnaceae) in Water Reservoirs of Ukraine and China Assessed by Chloroplast DNA Barcoding. *Plants* 11, 1468. <https://doi.org/10.3390/plants11111468>
- Chen, M., Zhou, S., Zhu, Y., Sun, Y., Zeng, G., Yang, C., Xu, P., Yan, M., Liu, Z., Zhang, W., 2018. Toxicity of carbon nanomaterials to plants, animals and microbes: Recent progress from 2015-present. *Chemosphere* 206, 255-264. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.020>
- Cheng, F., Liu, Y.-F., Lu, G.-Y., Zhang, X.-K., Xie, L.-L., Yuan, C.-F., Xu, B.-B., 2016. Graphene oxide modulates root growth of *Brassica napus* L. and regulates ABA and IAA concentration. *Journal of Plant Physiology* 193, 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.02.011>
- Culley, D.D., Réjmenková, E., Kvet, J., Frye, 1981. Production, chemical quality and use of duckweeds (Lemnaceae) in aquaculture, waste management, and animal feeds. *Journal of the World Mariculture Society* 12, 27-49.
- Das, K.K., You, Y., Torres, M., Barrios-Masias, F., Wang, X., Tao, S., Xing, B., Yang, Y., 2018. Development and application of a digestion-Raman analysis approach for studying multiwall carbon nanotube uptake in lettuce. *Environmental Science: Nano* 5, 659-668. <https://doi.org/10.1039/C7EN01047H>
- De La Torre-Roche, R., Hawthorne, J., Deng, Y., Xing, B., Cai, W., Newman, L.A., Wang, Q., Ma, X., Hamdi, H., White, J.C., 2013. Multiwalled Carbon Nanotubes and C₆₀ Fullerenes Differentially Impact the Accumulation of Weathered Pesticides in Four Agricultural Plants. *Environ. Sci. Technol.* 47, 12539-12547. <https://doi.org/10.1021/es4034809>

- Demann, J., Petersen, F., Dusel, G., Bog, M., Devlamynck, R., Ulbrich, A., Olfs, H.-W., Westendarp, H., 2022. Nutritional Value of Duckweed as Protein Feed for Broiler Chickens—Digestibility of Crude Protein, Amino Acids and Phosphorus. *Animals* 13, 130. <https://doi.org/10.3390/ani13010130>
- Deng, Y., Eitzer, B., White, J.C., Xing, B., 2017. Impact of multiwall carbon nanotubes on the accumulation and distribution of carbamazepine in collard greens (*Brassica oleracea*). *Environmental Science: Nano* 4, 149-159. <https://doi.org/10.1039/C6EN00419A>.
- Devlamynck, R., Fernandes de Souza, M., Bog, M., Leenknecht, J., Eeckhout, M., Meers, E., 2020. Effect of the growth medium composition on nitrate accumulation in the novel protein crop *Lemna minor*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 206, 111380. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111380>
- Dietz, K.-J., Herth, S., 2011. Plant nanotoxicology. *Trends in Plant Science* 16, 582-589. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.08.003>
- Eatemadi, A., Daraee, H., Karimkhanloo, H., Kouhi, M., Zarghami, N., Akbarzadeh, A., Abasi, M., Hanifehpour, Y., Joo, S.W., 2014. Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications. *Nanoscale Res Lett* 9, 393. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-393>
- Ekperusi, A.O., Sikoki, F.D., Nwachukwu, E.O., 2019. Application of common duckweed (*Lemna minor*) in phytoremediation of chemicals in the environment: State and future perspective. *Chemosphere* 223, 285-309. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.025>
- El-Saadony, M.T., Saad, A.M., Soliman, S.M., Salem, H.M., Desoky, E.-S.M., Babalghith, A.O., El-Tahan, A.M., Ibrahim, O.M., Ebrahim, A.A.M., Abd El-Mageed, T.A., Elrys, A.S., Elbadawi, A.A., El-Tarabily, K.A., AbuQamar, S.F., 2022. Role of Nanoparticles in Enhancing Crop Tolerance to Abiotic Stress: A Comprehensive Review. *Front. Plant Sci.* 13, 946717. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.946717>
- European Commission. Joint Research Centre. Institute for Health and Consumer Protection., 2014. Multi-walled carbon nanotubes, NM-400, NM-401, NM-402, NM-403, characterisation and physico-chemical properties. Publications Office, LU.
- Fan, X., Xu, J., Lavoie, M., Peijnenburg, W.J.G.M., Zhu, Y., Lu, T., Fu, Z., Zhu, T., Qian, H., 2018. Multiwall carbon nanotubes modulate paraquat toxicity in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Pollution* 233, 633-641. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.116>.

- Fang, S., Shen, L., Zhang, X., 2017. Chapter 9 - Application of Carbon Nanotubes in Lithium-Ion Batteries, in: Peng, H., Li, Q., Chen, T. (Ed.), *Industrial Applications of Carbon Nanotubes, Micro and Nano Technologies*. Elsevier, Boston, pp. 251-276. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-41481-4.00009-5>
- Gaigher, I.G., Short, R., Wamsley, I., Wan, J.G., 1986. An evaluation of duckweed (Lemnaceae) as a candidate for aquaculture in South Africa. Canberra, CSIRO.
- Gao, J., Zhang, X., Yu, M., Ren, G., Yang, Z., 2015. Cognitive deficits induced by multi-walled carbon nanotubes via the autophagic pathway. *Toxicology* 337, 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.08.011>.
- Ghodake, G., Seo, Y.D., Park, D., Lee, D.S., 2010. Phytotoxicity of Carbon Nanotubes Assessed by Brassica Juncea and Phaseolus Mungo. *Journal of Nanoelectronics and Optoelectronics* 5, 157-160. <https://doi.org/10.1166/jno.2010.1084>
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Gogos, K., A, B.G., K, K., TD, B., 2012. Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 9781-9792. <https://doi.org/10.1021/jf302154y>.
- Gohari, G., Safai, F., Panahirad, S., Akbari, A., Rasouli, F., Dadpour, M.R., Fotopoulos, V., 2020. Modified multiwall carbon nanotubes display either phytotoxic or growth promoting and stress protecting activity in *Ocimum basilicum* L. in a concentration-dependent manner. *Chemosphere* 249, 126171. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126171>
- González-García, Y., López-Vargas, E.R., Cadenas-Pliego, G., Benavides-Mendoza, A., González-Morales, S., Robledo-Olivo, A., Alpuche-Solis, Á.G., Juárez-Maldonado, A., 2019. Impact of Carbon Nanomaterials on the Antioxidant System of Tomato Seedlings. *IJMS* 20, 5858. <https://doi.org/10.3390/ijms20235858>
- Guha, R., 1997. Duckweeds. *Envis Newsletter*, Bangalore, Indian Institute of Science 5-9.
- Hasan, M.R., Chakrabarti, R., 2010. Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture: a review, *FAO fisheries and aquaculture technical paper*. FAO, Rome.

- Hassan, A.A., Mansour, M.K., Sayed El Ahl, R.M.H., El Hamaky, A.M.A., Oraby, N.H., 2020. 23 - Toxic and beneficial effects of carbon nanomaterials on human and animal health, in: Abd-Elsalam, K.A. (Ed.), *Carbon Nanomaterials for Agri-Food and Environmental Applications, Micro and Nano Technologies*. Elsevier, pp. 535-555. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819786-8.00023-2>
- Hatami, M., 2017. Toxicity assessment of multi-walled carbon nanotubes on *Cucurbita pepo* L. under well-watered and water-stressed conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142, 274-283. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.018>
- He, H., Pham-Huy, L.A., Dramou, P., Xiao, D., Zuo, P., Pham-Huy, C., 2013. Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine. *BioMed Research International* 2013, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2013/578290>
- Herrero-Latorre, C., Álvarez-Méndez, J., Barciela-García, J., García-Martín, S., Peña-Creciente, R.M., 2015. Characterization of carbon nanotubes and analytical methods for their determination in environmental and biological samples: A review. *Analytica Chimica Acta* 853, 77-94. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.10.008>
- Hillman, W.S., 1961. The Lemnaceae, or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. *Bot. Rev* 27, 221-287. <https://doi.org/10.1007/BF02860083>
- Hong, J., Peralta-Videa, G.-T., JR, J.L., 2013. Nanomaterials in agricultural production: benefits and possible threats?, in: Shamim, N., Sharma, V.K. (Ed.), *Sustainable Nanotechnology and the Environment: Advances and Achievements*. pp. 73-90.
- Hussain, C.M. (Ed.), 2020. *The ELSI handbook of nanotechnology: risk, safety, ELSI and commercialization*, First edition. ed. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ.
- Hussner, A., Stiers, I., Verhofstad, M.J.J.M., Bakker, E.S., Grutters, B.M.C., Haury, J., Van Valkenburg, J.L.C.H., Brundu, G., Newman, J., Clayton, J.S., Anderson, L.W.J., Hofstra, D., 2017. Management and control methods of invasive alien freshwater aquatic plants: A review. *Aquatic Botany* 136, 112-137. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2016.08.002>
- Iijima, S., Ichihashi, T., 1993. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature* 363, 603-605. <https://doi.org/10.1038/363603a0>
- Ishizawa, H., Kuroda, M., Inoue, K., Inoue, D., Morikawa, M., Ike, M., 2019. Colonization and Competition Dynamics of Plant Growth-Promoting/Inhibiting Bacteria in the Phytosphere of the Duckweed

- Lemna minor. Microb Ecol 77, 440-450.
<https://doi.org/10.1007/s00248-018-1306-x>
- Ishizawa, H., Tada, M., Kuroda, M., Inoue, D., Futamata, H., Ike, M., 2020. Synthetic Bacterial Community of Duckweed: A Simple and Stable System to Study Plant-microbe Interactions. Microb. Environ. 35, n/a. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME20112>
- Jackson, P., Jacobsen, N.R., Baun, A., Birkedal, R., Kühnel, D., Jensen, K.A., Vogel, U., Wallin, H., 2013. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. Chemistry Central Journal 7, 154. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-154>
- Jenner, Henk A., Janssen-Mommen, Joke P.M., 1993. Duckweed Lemna minor as a tool for testing toxicity of coal residues and polluted sediments. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 25. <https://doi.org/10.1007/BF00230704>
- Jiang, L., Yanase, E., Mori, T., Kurata, K., Toyama, M., Tsuchiya, A., Yamauchi, K., Mitsunaga, T., Iwahashi, H., Takahashi, J., 2019. Relationship between flavonoid structure and reactive oxygen species generation upon ultraviolet and X-ray irradiation. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 384, 112044. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.112044>
- Jiang, Y., Hua, Z., Zhao, Y., Liu, Q., Wang, F., Zhang, Q., 2014. The Effect of Carbon Nanotubes on Rice Seed Germination and Root Growth, in: Zhang, T.-C., Ouyang, P., Kaplan, S., Skarnes, B. (Ed.), Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012). Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1207-1212. https://doi.org/10.1007/978-3-642-37922-2_129
- Jiang, Z., Zhu, L., Wang, Q., Hou, X., 2020. Autophagy-Related 2 Regulates Chlorophyll Degradation under Abiotic Stress Conditions in Arabidopsis. IJMS 21, 4515. <https://doi.org/10.3390/ijms21124515>
- Jordan, J.T., Oates, R.P., Subbiah, S., Payton, P.R., Singh, K.P., Shah, S.A., Green, M.J., Klein, D.M., Cañas-Carrell, J.E., 2020. Carbon nanotubes affect early growth, flowering time and phytohormones in tomato. Chemosphere 256, 127042. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127042>
- Joshi, A., Kaur, S., Dharamvir, K., Nayyar, H., Verma, G., 2018. Multi-walled carbon nanotubes applied through seed-priming influence early germination, root hair, growth and yield of bread wheat (*Triticum aestivum* L.): Multiwalled Carbon nanotube influence on Bread wheat. J. Sci. Food Agric. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8818>
- Keypour, H., Noroozi, M., Rashidi, A., 2013. An improved method for the purification of fullerene from fullerene soot with activated carbon,

- celite, and silica gel stationary phases. *J Nanostruct Chem* 3, 45.
<https://doi.org/10.1186/2193-8865-3-45>
- Khodakovskaya, M.V., de Silva, K., Biris, A.S., Dervishi, E., Villagarcia, H., 2012. Carbon Nanotubes Induce Growth Enhancement of Tobacco Cells. *ACS Nano* 6, 2128-2135. <https://doi.org/10.1021/nn204643g>
- Khodakovskaya, Mariya V., Kim, B.-S., Kim, J.N., Alimohammadi, M., Dervishi, E., Mustafa, T., Cernigla, C.E., 2013. Carbon Nanotubes as Plant Growth Regulators: Effects on Tomato Growth, Reproductive System, and Soil Microbial Community. *Small* 9, 115-123. <https://doi.org/10.1002/sml.201201225>
- Khodakovskaya, M.V., Kim, B.S., Kim, J.N., Alimohammadi, M., Dervishi, E., Mustafa, T., Cernigla, C.E., 2013. Carbon nanotubes as plant growth regulators: Effects on tomato growth, reproductive system, and soil microbial community. *Small* 9, 115-123. <https://doi.org/10.1002/sml.201201225>.
- Krätschmer, W., Lamb, L.D., Fostiropoulos, K., Huffman, D.R., 1990. Solid C60: a new form of carbon. *Nature* 347, 354-358. <https://doi.org/10.1038/347354a0>
- Kroto, H.W., Heath, J.R., O'Brien, S.C., Curl, R.F., Smalley, R.E., 1985. C60: Buckminsterfullerene. *Nature* 318, 162-163. <https://doi.org/10.1038/318162a0>
- Kumar, A., Singh, A., Panigrahy, M., Sahoo, P.K., Panigrahi, K.C.S., 2018. Carbon nanoparticles influence photomorphogenesis and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 37, 901-912. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2277-6>
- Lahiani, M.H., Chen, J., Irin, F., Puretzky, A.A., Green, M.J., Khodakovskaya, M.V., 2015. Interaction of carbon nanohorns with plants: Uptake and biological effects. *Carbon* 81, 607-619. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2014.09.095>.
- Lahiani, M.H., Dervishi, E., Chen, J., Nima, Z., Gaume, A., Biris, A.S., Khodakovskaya, M.V., 2013. Impact of Carbon Nanotube Exposure to Seeds of Valuable Crops. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5, 7965-7973. <https://doi.org/10.1021/am402052x>
- Lahiani, M.H., Dervishi, E., Ivanov, I., Chen, J., Khodakovskaya, M., 2016. Comparative study of plant responses to carbon-based nanomaterials with different morphologies. *Nanotechnology* 27, 1-13. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/26/265102>.
- Lahiani, M.H., Nima, Z.A., Villagarcia, H., Biris, A.S., Khodakovskaya, M.V., 2018. Assessment of Effects of the Long-Term Exposure of Agricultural Crops to Carbon Nanotubes. *J. Agric. Food Chem.* 66, 6654-6662. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01863>

- Landolt, E., 1998. Lemnaceae, în: Kubitzki, K. (Ed.), Flowering Plants · Monocotyledons. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 264-270. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03531-3_28
- Lanthemann, L., van Moorsel, S.J., 2022. Species interactions in three Lemnaceae species growing along a gradient of zinc pollution. *Ecology and Evolution* 12, e8646. <https://doi.org/10.1002/ece3.8646>
- Lara-Romero, J., Campos-García, J., Dasgupta-Schubert, N., Borjas-García, S., Tiwari, D., Paraguay-Delgado, F., Jiménez-Sandoval, S., Alonso-Núñez, G., Gómez-Romero, M., Lindig-Cisneros, R., Reyes De la Cruz, H., Villegas, J.A., 2017. Biological effects of carbon nanotubes generated in forest wildfire ecosystems rich in resinous trees on native plants. *PeerJ* 5, e3658. <https://doi.org/10.7717/peerj.3658>
- Lee, Y., Choi, H.J., Shiga, T., 2020. Taxonomic identity of *Landoltia punctata* (Araceae, Lemnoideae) in Korea. *Journal of Asia-Pacific Biodiversity* 13, 494-498. <https://doi.org/10.1016/j.japb.2020.04.003>
- Lehman, J.H., Terrones, M., Mansfield, E., Hurst, K.E., Meunier, V., 2011. Evaluating the characteristics of multiwall carbon nanotubes. *Carbon* 49, 2581-2602. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.03.028>
- Lemna distribution [WWW Document], f.a. . Global Biodiversity Information Facility. URL <https://www.gbif.org/species/6979> (data accesării 1.25.24).
- Lemna minuta* Kunth (World flora) [WWW Document], f.a. . PlantNet. URL <https://identify.plantnet.org/ro/k-world-flora/species/Lemna%20minuta%20Kunth/data> (data accesării 2.2.23).
- Les, D.H., Crawford, D.J., Landolt, E., Gabel, J.D., Kimball, R.T., 2002. Phylogeny and Systematics of Lemnaceae, the Duckweed Family. *SYSTEMATIC BOTANY* 27, 20.
- Liu, Q., Chen, B., Wang, Q., Shi, X., Xiao, Z., Lin, J., Fang, X., 2009. Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells. *Nano Letters* 9, 1007-1010. <https://doi.org/10.1021/nl803083u>.
- Liu, Y., Xu, H., Yu, C., Zhou, G., 2021. Multifaceted roles of duckweed in aquatic phytoremediation and bioproducts synthesis. *GCB Bioenergy* 13, 70-82. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12747>
- Lobiuc, A., Olaru, S., Hancu, E.I., Costica, N., Fortuna, M.E., Zamfirache, M.M., Constantinescu, G., 2018. Toxicity and removal of Direct

- Red 28 diazo dye in living polymeric systems. *Rev. Chim.* 69, 1628-1635. <https://doi.org/10.37358/RC.18.7.6384>
- Lyon, D.Y., Adams, L.K., Falkner, J.C., Alvarez, P.J.J., 2006. Antibacterial activity of fullerene water suspensions: effects of preparation method and particle size. *Environ Sci Technol* 40, 4360-4366. <https://doi.org/10.1021/es0603655>
- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y., Kolmakov, A., 2010. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of The Total Environment* 408, 3053-3061. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.031>
- Malhotra, B.D., Ali, Md.A., 2018. Chapter 2 - Functionalized Carbon Nanomaterials for Biosensors, in: Malhotra, B.D., Ali, Md.A. (Ed.), *Nanomaterials for Biosensors, Micro and Nano Technologies*. William Andrew Publishing, pp. 75-103. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44923-6.00002-9>
- Martínez-Ballesta, M.C., Zapata, L., Chalbi, N., Carvajal, M., 2016. Multiwalled carbon nanotubes enter broccoli cells enhancing growth and water uptake of plants exposed to salinity. *J Nanobiotechnol* 14, 42. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0199-4>
- Mathew, S., Victório, C.P., 2022. Carbon Nanotubes Applications in Agriculture, in: Abraham, J., Thomas, S., Kalarikkal, N. (Ed.), *Handbook of Carbon Nanotubes*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1579-1593. https://doi.org/10.1007/978-3-030-91346-5_35
- Maurel, C., 2007. Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. *FEBS Letters* 581, 2227-2236. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.021>
- McIlraith, A.L., Robinson, G.G.C., Shay, J.M., 1989. A field study of competition and interaction between *Lemna minor* and *Lemna trisulca*. *Can. J. Bot.* 67, 2904-2911. <https://doi.org/10.1139/b89-373>
- Meftan, M.T., Abdel-Razik, A.B., Ibrahim, S.A., Mohamed, A.S., 2023. The Impact Of Carbon-Nano Tubes On Morphological, Photosynthetic Pigments, Protein Content And Enzyme Activity Of In-Vitro Multiplication Of Cucumber. *Journal of Pharmaceutical Negative Results* 14.
- Miralles, P., Church, T.L., Harris, A.T., 2012a. Toxicity, uptake, and translocation of engineered nanomaterials in vascular plants. *Environmental Science and Technology* 46, 9224-9239. <https://doi.org/10.1021/es202995d>

- Miralles, P., Johnson, E., Church, T.L., Harris, A.T., 2012b. Multiwalled carbon nanotubes in alfalfa and wheat: Toxicology and uptake. *Journal of the Royal Society Interface* 9, 3514-3527. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0535>.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7, 405-410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
- Møller, P., Jensen, D.M., Christophersen, D.V., Kermanizadeh, A., Jacobsen, N.R., Hemmingsen, J.G., Danielsen, P.H., Karottki, D.G., Roursgaard, M., Cao, Y., 2015. Measurement of oxidative damage to DNA in nanomaterial exposed cells and animals. *Environ Mol Mutagen* 56, 97-110.
- Mukherjee, A., Majumdar, S., Servin, A.D., Pagano, L., Dhankher, O.P., White, J.C., 2016. Carbon nanomaterials in agriculture: a critical review. *Frontiers in Plant Science* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00172>.
- Myojo, T., Ono-Ogasawara, M., 2018. Review; Risk Assessment of Aerosolized SWCNTs, MWCNTs, Fullerenes and Carbon Black. *KONA* 35, 80-88. <https://doi.org/10.14356/kona.2018013>
- Nasu, Y., Kugimoto, M., 1981. *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 10, 159-169. <https://doi.org/10.1007/BF01055618>
- OECD, 2009. Preliminary Review of OECD Test Guidelines for Their Applicability to Manufactured Nanomaterials, OECD Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials and other Advanced Materials. OECD. <https://doi.org/10.1787/b1b0e314-en>
- Olaru, Ș.M.,** Lobiuc, A., Olaru, E.-I., Zamfirache, M.-M., 2019. Toxicity of multiwalled carbon nanotubes present in growth medium on *Lemna minor* L., în: *Current Aspects and Prospects in Ecology and Genofond Protection., Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community, Biotehdesign, Chișinău*, pp. 157–158.
- Olaru, Ș.M.,** Zamfirache, M.-M., 2025. Toxicological Assessment of Carbon Nanomaterials on *Lemna minor* L.: Insights into Physiological and Biochemical Alterations, *Journal of Experimental and Molecular Biology (J. Exp. Molec. Biol.)*, ISSN 2601-6974, <https://doi.org/10.47743/jemb-2025-247>
- Olaru, Ș.M.,** Zamfirache, M.-M., 2025. Physiological and Biochemical Responses of *Lemna minuta* Kunth to Multi-Walled Carbon Nanotubes and Fullerene Soot Exposure., *Studia Universitatis*

- “Vasile Goldiș”, Seria Științele Vieții, ISSN: 1584-2363, Vol. 35, issue 1, 2025, pp. 5 - 13.
- Pagliuso, D., Grandis, A., Fortirer, J.S., Camargo, P., Floh, E.I., Buckeridge, M.S., 2022. Duckweeds as Promising Food Feedstocks Globally (preprint). BIOLOGY. <https://doi.org/10.20944/preprints202201.0067.v1>
- Pang, Y.L., Quek, Y.Y., Lim, S., Shuit, S.H., 2023. Review on Phytoremediation Potential of Floating Aquatic Plants for Heavy Metals: A Promising Approach. Sustainability 15, 1290. <https://doi.org/10.3390/su15021290>
- Patel, D.K., Kim, H.-B., Dutta, S.D., Ganguly, K., Lim, K.-T., 2020. Carbon Nanotubes-Based Nanomaterials and Their Agricultural and Biotechnological Applications. Materials 13, 1679. <https://doi.org/10.3390/ma13071679>
- Prakash, P., Kumar, J.A., Dhandapani, B., Vishnu, D., Sree, S.H., Madhumeena, S., Lavanya, Y., Inbathamizh, L., 2021. Utilization of eutrophicated Lemna minor for biosorption of acid blue dye. Biomass Conv. Bioref. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-02024-5>
- Ramsden, J.J., 2011. Chapter 9 - Carbon-Based Nanomaterials and Devices, în: Ramsden, J.J. (Ed.), Nanotechnology, Micro and Nano Technologies. William Andrew Publishing, Oxford, pp. 189-197. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-096447-8.00009-0>
- Ren, L., Wang, M.-R., Wang, Q.-C., 2021. ROS-induced oxidative stress in plant cryopreservation: occurrence and alleviation. Planta 254, 124. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03784-0>
- Roebben, G., Kestens, V., Varga, Z., Charoud-Got, J., Ramaye, Y., Gollwitzer, C., Bartczak, D., Geißler, D., Noble, J., Mazoua, S., Meeus, N., Corbisier, P., Palmai, M., Mihály, J., Krumrey, M., Davies, J., Resch-Genger, U., Kumarswami, N., Minelli, C., Sikora, A., Goenaga-Infante, H., 2015. Reference materials and representative test materials to develop nanoparticle characterization methods: the NanoChOp project case. Frontiers in chemistry 3, 56. <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00056>
- Sano, N., Wang, H., Chhowalla, M., Alexandrou, I., Amaratunga, G. a. J., 2001. Synthesis of carbon „onions” in water. Nature 414, 506-507. <https://doi.org/10.1038/35107141>
- Sayes, C.M., Fortner, J.D., Guo, W., Lyon, D., Boyd, A.M., Ausman, K.D., Tao, Y.J., Sitharaman, B., Wilson, L.J., Hughes, J.B., West, J.L., Colvin, V.L., 2004. The Differential Cytotoxicity of Water-Soluble

- Fullerenes. *Nano Lett.* 4, 1881-1887.
<https://doi.org/10.1021/nl0489586>
- Schwerdtfeger, P., Wirz, L.N., Avery, J., 2015. The topology of fullerenes. *WIREs Computational Molecular Science* 5, 96-145.
<https://doi.org/10.1002/wcms.1207>
- Serag, M.F., Kaji, N., Habuchi, S., Bianco, A., Baba, Y., 2013. Nanobiotechnology meets plant cell biology: Carbon nanotubes as organelle targeting nanocarriers. *RSC Advances* 3, 4856-4862.
<https://doi.org/10.1039/c2ra22766e>.
- Shen, C.X., Zhang, Q.F., Li, J., Bi, F.C., Yao, N., 2010. Induction of programmed cell death in Arabidopsis and rice by single-wall carbon nanotubes. *American Journal of Botany* 97, 1602-1609.
<https://doi.org/10.3732/ajb.1000073>.
- Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, M.H., Firoz, M., Al-Khaishany, M.Y., 2015. Role of Nanoparticles in Plants, in: Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, M.H., Mohammad, F. (Ed.), *Nanotechnology and Plant Sciences: Nanoparticles and Their Impact on Plants*. Springer International Publishing, Cham, pp. 19-35. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14502-0_2
- Smirnova, E., Gusev, A., Zaytseva, O., Sheina, O., Tkachev, A., Kuznetsova, E., Lazareva, E., Onishchenko, G., Feofanov, A., Kirpichnikov, M., 2012. Uptake and accumulation of multiwalled carbon nanotubes change the morphometric and biochemical characteristics of *Onobrychis arenaria* seedlings. *Front. Chem. Sci. Eng.* 6, 132-138.
<https://doi.org/10.1007/s11705-012-1290-5>
- Sree, K., Bog, M., Appenroth, K., 2016. Taxonomy of duckweeds (Lemnaceae), potential new crop plants. *Emir. J. Food Agric* 28, 291. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-01-038>
- Sudiarto, S.I.A., Renggaman, A., Choi, H.L., 2019. Floating aquatic plants for total nitrogen and phosphorus removal from treated swine wastewater and their biomass characteristics. *Journal of Environmental Management* 231, 763-769.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.070>
- Taha, R.A., Hassan, M.M., Ibrahim, E.A., Abou Baker, N.H., Shaaban, E.A., 2016. Carbon nanotubes impact on date palm in vitro cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 127, 525-534.
<https://doi.org/10.1007/s11240-016-1058-6>.
- Tan, X., Lin, C., Fugetsu, B., 2009. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on suspension rice cells. *Carbon* 47, 3479-3487.
<https://doi.org/10.1016/j.carbon.2009.08.018>

- Taraldsen, J.E., Norberg-King, T.J., 1990. New method for determining effluent toxicity using duckweed (*Lemna Minor*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9, 761-767. <https://doi.org/10.1002/etc.5620090610>.
- THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP*, 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botan J Linn Soc* 141, 399-436. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2003.t01-1-00158.x>
- Tippary, N.P., Les, D.H., Appenroth, K.J., Sree, K.S., Crawford, D.J., Bog, M., 2021. Lemnaceae and Orontiaceae Are Phylogenetically and Morphologically Distinct from Araceae. *Plants* 10, 2639. <https://doi.org/10.3390/plants10122639>
- Tiwari, D.K., Dasgupta-Schubert, N., Villaseñor Cendejas, L.M., Villegas, J., Carreto Montoya, L., Borjas García, S.E., 2014. Interfacing carbon nanotubes (CNT) with plants: enhancement of growth, water and ionic nutrient uptake in maize (*Zea mays*) and implications for nanoagriculture. *Appl Nanosci* 4, 577-591. <https://doi.org/10.1007/s13204-013-0236-7>
- Tripathi, D.K., Shweta, Singh, Shweta, Singh, Swati, Pandey, R., Singh, V.P., Sharma, N.C., Prasad, S.M., Dubey, N.K., Chauhan, D.K., 2017. An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry* 110, 2-12. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.07.030>
- Ugarte, D., 1992. Curling and closure of graphitic networks under electron-beam irradiation. *Nature* 359, 707-709. <https://doi.org/10.1038/359707a0>
- van der Zande, M., Junker, R., Walboomers, X.F., Jansen, J.A., 2011. Carbon nanotubes in animal models: a systematic review on toxic potential. *Tissue Eng Part B Rev* 17, 57-69. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2010.0472>
- Verma, S.K., Das, A.K., Gantait, S., Kumar, V., Gurel, E., 2019. Applications of carbon nanomaterials in the plant system: A perspective view on the pros and cons. *Science of The Total Environment* 667, 485-499. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.409>
- Villagarcia, H., Dervishi, E., Silva, K., Biris, A.S., Khodakovskaya, M.V., 2012. Surface chemistry of carbon nanotubes impacts the growth and expression of water channel protein in tomato plants. *Small* 8, 2328-2334. <https://doi.org/10.1002/smll.201102661>
- Wang, C., Liu, H., Chen, J., Tian, Y., Shi, J., Li, D., Guo, C., Ma, Q., 2014. Carboxylated multi-walled carbon nanotubes aggravated

- biochemical and subcellular damages in leaves of broad bean (*Vicia faba* L.) seedlings under combined stress of lead and cadmium. *Journal of Hazardous Materials* 274, 404-412. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.04.036>
- Wang, M., Sun, G., Li, G., Hu, G., Fu, L., Hu, S., Yang, J., Wang, Z., Gu, W., 2024. Effects of Multi Walled Carbon Nanotubes and Nano-SiO₂ on Key Enzymes for Seed Germination and Endogenous Hormone Level in Maize Seedling. *Agronomy* 14, 2908. <https://doi.org/10.3390/agronomy14122908>
- Wang, X., Han, H., Liu, X., Gu, X., Chen, K., Lu, D., 2012. Multi-walled carbon nanotubes can enhance root elongation of wheat (*Triticum aestivum*) plants. *J Nanopart Res* 14, 841. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-0841-5>
- Wang, Z., Ke, X., Zhu, Z., Zhu, F., Ruan, M., Chen, H., Huang, R., Zheng, L., 2001. A new carbon solid made of the world's smallest caged fullerene C₂₀. *Physics Letters A* 280, 351-356. [https://doi.org/10.1016/S0375-9601\(00\)00847-1](https://doi.org/10.1016/S0375-9601(00)00847-1)
- Wellburn, A.R., Majernik, O., Wellburn, F.A.M., 1972. Effects of SO₂ and NO₂ polluted air upon the ultrastructure of chloroplasts. *Environmental Pollution* (1970) 3, 37-49. [https://doi.org/10.1016/0013-9327\(72\)90016-X](https://doi.org/10.1016/0013-9327(72)90016-X)
- Xihuang, Z., Zhennan, G., Yongqing, W., Yiliang, S., Zhaoxia, J., Yan, X., Biyun, S., Yi, W., Hua, F., Jingzun, W., 1994. Separation of C₆₀ and C₇₀ fullerenes in gram quantities by fractional crystallization. *Carbon* 32, 935-937. [https://doi.org/10.1016/0008-6223\(94\)90052-3](https://doi.org/10.1016/0008-6223(94)90052-3)
- Yadav, B.C., Kumar, R., 2008. Structure, properties and applications of fullerenes. *International Journal of Nanotechnology and Applications* 2, 15-24.
- Yan, B., Zhou, H., Gardea-Torresdey, J.L. (Ed.), 2017. Bioactivity of Engineered Nanoparticles, Nanomedicine and Nanotoxicology. Springer Singapore, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5864-6>
- Yan, S., Zhao, L., Li, H., Zhang, Q., Tan, J., Huang, M., He, S., Li, L., 2013. Single-walled carbon nanotubes selectively influence maize root tissue development accompanied by the change in the related gene expression. *Journal of Hazardous Materials* 246-247, 110-118. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.12.013>
- Yang, J., Cao, W., Rui, Y., 2017. Interactions between nanoparticles and plants: phytotoxicity and defense mechanisms. *Journal of Plant*

<https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1310944>

- Yang, L., Han, Y., Wu, D., Yong, W., Liu, M., Wang, S., Liu, W., Lu, M., Wei, Y., Sun, J., 2017. Salt and cadmium stress tolerance caused by overexpression of the Glycine Max Na⁺/H⁺ Antiporter (GmNHX1) gene in duckweed (*Lemna turionifera* 5511). *Aquatic Toxicology* 192, 127-135. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.08.010>
- Yang, Z., Deng, C., Wu, Y., Dai, Z., Tang, Q., Cheng, C., Xu, Y., Hu, R., Liu, C., Chen, X., Zhang, X., Li, A., Xiong, X., Su, J., Yan, A., 2021. Insights into the mechanism of multi-walled carbon nanotubes phytotoxicity in *Arabidopsis* through transcriptome and m6A methylome analysis. *Science of The Total Environment* 787, 147510. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147510>
- Zaytseva, O., Neumann, G., 2016. Phytotoxicity of carbon nanotubes is associated with disturbances of zinc homeostasis. *Eur. Chem. Bull* 5, 238-244.
- Zhang, H., Yue, M., Zheng, X., Xie, C., Zhou, H., Li, L., 2017. Physiological Effects of Single- and Multi-Walled Carbon Nanotubes on Rice Seedlings. *IEEE Trans.on Nanobioscience* 16, 563-570. <https://doi.org/10.1109/TNB.2017.2715359>
- Zhang, L., Gu, J., Song, L., Chen, L., Huang, Y., Zhang, J., Chen, T., 2016. Underwater superoleophobic carbon nanotubes/core-shell polystyrene@Au nanoparticles composite membrane for flow-through catalytic decomposition and oil/water separation. *Journal of Materials Chemistry A* 4, 10810-10815. <https://doi.org/10.1039/c6ta04362c>.
- Zhao, Q., Ma, C., White, J.C., Dhankher, O.P., Zhang, X., Zhang, S., Xing, B., 2017. Quantitative evaluation of multi-wall carbon nanotube uptake by terrestrial plants. *Carbon* 114, 661-670. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.12.036>