



ACADEMIA ROMÂNĂ

Școala de Studii Avansate a Academiei Române

Institutul de Biologie București

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Identificarea de biomarkeri morfologici și structurali
la plante cu rol în evaluarea impactului poluării
atmosferice.**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

Acad. Octavian POPESCU

DOCTORAND:

Gabriel-Mihai MARIA

2024

CUPRINS

Mulțumiri.....	5
Lista de abrevieri.....	6
1. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	7
1.1. POLUAREA ATMOSFERICĂ.....	7
1.1.1. Tipuri de poluanți.....	8
1.1.2. Efectul poluării asupra vegetației.....	11
1.1.2.1. Impactul poluării cu metale grele asupra vegetației.....	16
1.1.3. Surse antropice de contaminare.....	21
1.1.4. Metode de evidențiere a efectului poluanților atmosferici asupra plantelor.....	25
1.1.4.1. Studii de microscopie electronică.....	26
1.1.4.2. Determinarea permeabilității foliare.....	30
1.1.4.3. Compoziția chimică a cerii epicuticulare.....	33
1.1.4.4. Modificări în compoziția chimică a cerii provocate de poluanții atmosferici.....	35
1.2. ALȚI FACTORI CARE DETERMINĂ RĂSPUNS FIZIOLOGIC SAU MORFOGEN.....	36
1.3. BIOMONITORIZAREA	38
1.3.1. Biomonitorizarea pasivă.....	39
1.3.2. Biomonitorizarea activă.....	39
1.3.3. Bioindicatori.....	39
1.3.3.1. Clasificarea bioindicatorilor vegetali.....	41
1.3.4. Bioacumulatori.....	42
1.3.5. Biomarkeri.....	42
1.3.5.1. Tipuri principale de biomarkeri.....	46
1.3.5.1.1. Biomarkeri biochimici.....	47
1.3.5.1.1.1. Biomarkeri biochimici specifici.....	47
1.3.5.1.1.2. Biomarkeri biochimici pentru grupe de elemente.....	47
1.3.5.1.1.3. Biomarkeri biochimici generali.....	47
1.3.5.1.2. Biomarkeri biofizici.....	48
1.3.5.1.2.1. Concentrația clorofilei în spectru infraroșu.....	48
1.3.5.1.2.2. Fluorescența clorofilei.....	48
1.3.5.1.3. Biomarkeri fiziologici.....	48
1.3.5.1.3.1. Concentrația de acid ascorbic.....	48
1.3.5.1.3.2. Concentrația de clorofilă totală.....	49
1.3.5.1.4. Biomarkeri morfologici și structurali.....	49
1.3.5.1.4.1. Efectele particulelor aeropurtate asupra vegetației.....	49
1.3.5.1.4.2. Asimetria fluctuantă.....	51

1.3.5.1.4.3. Impactul poluării atmosferice asupra micromorfologiei și anatomiei plantelor.....	52
1.3.5.1.5. Biomarkeri vizibili.....	55
1.3.5.1.5.1. Biomarkeri fiziologici vizibili.....	55
1.3.5.1.5.2. Biomarkeri morfologici vizibili.....	56
1.3.5.1.6. Clasificarea biomarkerilor după răspunsul toxicologic.....	56
1.3.5.1.6.1. Biomarkeri ai expunerii.....	56
1.3.5.1.6.2. Biomarkeri ai efectului.....	56
1.3.5.1.6.3. Biomarkeri de susceptibilitate sau sensibilitate.....	57

CONTRIBUȚII PERSONALE

2. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT.....	58
3. MATERIALE ȘI METODE.....	59
3.1 MATERIALUL BIOLOGIC.....	59
3.2. ANALIZA SUPRAFEȚELOR FOLIARE.....	62
3.2.1. Colectarea materialului vegetal.....	62
3.2.2. Pregătirea materialului pentru analizele de microscopie optică (stereomicroscopie).....	65
3.2.3. Pregătirea materialului pentru analiza asimetriei fluctuante AF.....	66
3.2.3. Pregătirea probelor pentru analizele de Microscopie electronică cu baleiaj (Scanning Electron Microscopy – SEM).....	66
3.3. ANALIZA STRUCTURILOR FOLIARE	68
3.3.1. Fixarea probelor	68
3.3.2. Secționarea probelor.....	68
3.3.3. Analiza probelor	71
3.4. ANALIZA CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ A DEPUNERILOR.....	71
3.4.1. Analiza elementală prin spectroscopie de raze X cu dispersie de energie (EDX).....	71
3.4.2. Analiza elementală prin spectrometrie de fluorescență de raze X (XRF).....	72
3.4.3. Metode statistice de analiză	72
3.4.3.1. Statistica descriptivă.....	72
3.4.3.2. Testul Fisher.....	74
4. REZULTATE ȘI DISCUȚII	77
4.1. MODIFICĂRI LA NIVELUL MORFOLOGIEI FOLIARE.....	77
4.1.1. Rezultatele măsurătorilor unor parametri morfologici ai acelor de Pinus nigra din zone cu grade diferite de poluare atmosferică.....	77
4.1.2. Analiza descriptivă a datelor.....	81

4.2. MODIFICĂRI LA NIVELUL MICROMORFOLOGIEI FOLIARE.....	89
4.2.1. Alterări premature ale configurației stratului de ceară.....	89
4.2.2. Îngroșări peri-stomatice asemănătoare cu ”inelele Florin”.....	92
4.2.3. Celule epidermice cu pereți cutinizați, suprafețe foliare neregulate.....	95
4.2.4. Alterarea prematură a structurii complexului stomatic.....	98
4.2.5. Eroziunea depunerilor intra-stomatice de ceară.....	99
4.2.6. Serații anormale.....	103
4.2.7. Colonizarea cu fungi.....	106
4.3. MODIFICĂRI LA NIVELUL STRUCTURILOR FOLIARE.....	109
4.4. CARACTERIZAREA PRINCIPALELOR TIPURI DE DEPUNERI	115
4.5. SINTEZA REZULTATELOR	143
5. CONCLUZII	147
6. BIBLIOGRAFIE.....	149

1. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1.1. POLUAREA ATMOSFERICĂ

Poluarea aerului este definită ca eliberarea în atmosferă de gaze, de particule foarte fine sau de aerosoli lichizi, în cantități care depășesc capacitatea mediului de a-i absorbi, dilua sau disipa (Nathanson, 2020).

Poluarea atmosferică a devenit în ultimele decenii una dintre cele mai grave probleme de sănătate publică la nivel global, cu efect asupra calității vieții oamenilor și a mediului înconjurător și cu un impact major de ordin socio-economic.

Conform raportului EEA (Agenția Europeană de Mediu) din 2019, realizat între anii 2000 și 2017, emisiile de poluanți și concentrațiile acestora au crescut la nivel global, iar în Europa, în ciuda încercărilor de reducere a lor, calitatea aerului rămâne nesatisfăcătoare în multe zone. În prezent, poluarea aerului reprezintă cel mai important factor de risc pentru sănătatea umană și al doilea cel mai mare motiv de îngrijorare pentru sănătatea cetățenilor europeni, după schimbările climatice (EEA, 2019).

Înțelegerea cauzelor poluării atmosferice este necesară pentru a optimiza acțiunile de reducere a acesteia, a modului în care poluanții ajung în atmosferă și a transformărilor acestora, a efectului pe care aceștia îl au în timp asupra compoziției chimice a atmosferei și implicit asupra sănătății oamenilor, a ecosistemelor, a climei și, ulterior, asupra societății și a economiei. Deși poluarea aerului afectează întreaga populație, anumite grupuri sunt mai vulnerabile la efectele sale asupra sănătății, cum ar fi copiii, persoanele în vârstă, femeile însărcinate și persoanele cu probleme de sănătate preexistente. Același raport al EEA din 2019 arată că aproape toți europenii care locuiesc în zonele urbane sunt expuși unor niveluri de poluare a aerului care depășesc limitele recomandate privind calitatea aerului, stabilite de Organizația Mondială a Sănătății (OMS). Sănătatea acestora este în special afectată de particulele aeropurtate (PM), de dioxidul de azot (NO₂) și de ozonul de la nivelul solului (O₃), care provoacă cele mai multe daune (EEA, 2019).

De exemplu, s-a constatat că doar încărcătura atmosferică de particulele fine (PM_{2,5}) a cauzat aproximativ 412.000 de decese premature în 41 de țări europene în anul 2016. Aproximativ 374.000 dintre aceste decese au fost înregistrate în Uniunea Europeană (UE). În plus față de efectele asupra sănătății și reducerea speranței de viață, calitatea slabă a

aerului provoacă și pierderi economice, prin creșterea costurilor de îngrijire a pacienților, prin scăderea producției agricole și silvice și prin diminuarea productivității muncii (EEA, 2019).

Expunerea individuală la diverse tipuri de poluanți crește riscul îmbolnăvirii cauzate de aerul ambiental contaminat, deoarece toxinele pot ajunge prin intermediul căilor respiratorii și în alte zone țintă ale organismului (Samet, 2007).

1.1.1. Tipuri de poluanți

În ultimele decenii, tipurile de poluanți atmosferici precum și concentrațiile acestora s-au schimbat semnificativ: poluanții tradiționali (SO_2 și fumul negru, spre exemplu) au scăzut substanțial în concentrații în timp ce emisiile traficului rutier au devenit principala cauză a slabei calități a aerului din zonele urbane.

Compoziția, varietatea și concentrația acestor poluanți depind de tehnologia cu care vehiculele sunt dotate precum și de condițiile de operare a acestora. Poluanții diferă de la o zonă la alta în funcție de sursele de poluare și sunt dependenți în principal de emisiile traficului rutier deoarece vehiculele cu motoare care au combustie internă folosesc combustibili pe bază de petrol și motorină. Cei mai importanți poluanți fitotoxici asociați transportului rutier sunt monoxidul de azot (NO) și dioxidul de azot (NO_2). Urme de alți compuși care conțin azot, cum ar fi acidul azotos (HONO), protoxidul de azot (N_2O) și amoniacul (NH_3), pot fi prezente de asemenea, în gazele de eșapament ale vehiculelor (Honour *et al.*, 2009).

Au fost realizate de-a lungul timpului numeroase studii cu privire la modul în care poluanții atmosferici modifică parametrii precum structura fizică, compoziția chimică și modul în care schimbul de gaze și ioni sunt reglate de suprafața foliară a frunzei, aceștia fiind considerați markeri de diagnosticare ai stresului provocat de poluarea atmosferică din zonele industriale. Poluanții gazoși (care pătrund prin ostiola stomatelor) și ionii în soluții apoase, odată ce penetrează frunza, pot produce modificări în procesele metabolice și pot afecta suprafața acesteia prin modificarea biosintezei cerii (Cape, 1994).

Principalii poluanți atmosferici precum și modul de acțiune al acestora asupra suprafețelor foliare sunt:

- **Ozonul**, un oxidant puternic a cărui prezență afectează procesele metabolice; acesta pătrunde în interiorul plantei prin intermediul stomatelor, dar și prin difuzie la nivel de cuticulă (Matyssek *et al.*, 1995).
- **Dioxidul de sulf (SO₂)**, poate afecta procesele metabolice ale plantei și influența biosinteza componentelor suprafeței foliare; expunerile pe perioade scurte de timp la concentrații mari de SO₂, cât și expunerile pe perioade lungi de timp la cantități mici de SO₂ pot duce la acumularea de SO₂ în frunzele aciculare ale coniferelor și pot produce efecte dăunătoare arborilor, inclusiv pe perioada iernii, când activitatea fiziologică a arborilor este scăzută (Manninen și Huttunen, 1995).
- **Oxizii de azot (NO și NO₂)** pot reacționa în mod direct cu structurile cuticulare în urma unei expuneri de durată la concentrații mari și pot provoca întreruperea unor procese metabolice în urma absorbției foliare (Cape, 1994).
- **Amoniacul** poate perturba unele efecte metabolice și deci dezvoltarea suprafeței foliare, dar fără un efect considerabil direct (Cape, 1994).
- **Particulele aeropurtate PM** (de praf sau funingine) sau în suspensie în picăturile de apă nu provoacă efecte adverse semnificative, dar se pot acumula până în punctul în care stomatele se pot colmata sau lumina nu mai poate ajunge pe suprafața frunzei. Acestea pot afecta totuși integritatea suprafeței frunzei în mod direct prin abraziune, prin atingerea frunzelor între ele sau prin particulele antrenate de mișcări ale maselor de aer (Cape, 1994).

Comparativ cu majoritatea poluanților gazoși sau în soluții apoase, doar moleculele organice, soluțiile acide și oxizii de azot pot afecta în mod direct suprafețele foliare (Cape, 1994).

1.1.2. Efectul poluării asupra vegetației

Prezența poluanților sub forma de particule aeropurtate PM în zonele urbane induce modificări la nivel morfologic, biochimic și fiziologic la plante, dar și un răspuns de adaptare al acestora pentru a limita stresul și a maximiza folosirea resurselor interne și externe (Rai, 2016). În urma interacțiunii dintre plante și diferitele tipuri de poluanți, au fost observate modificări fiziologice, ultrastructurale și biochimice la nivelul foliar al plantelor utilizate ca indicatori ai poluării atmosferice (Thawale *et al.*, 2011).

Există mai mulți factori de stres biotic și abiotic care pot provoca modificări structurale la nivel foliar care se manifestă prin apariția unor simptome macroscopice cum ar fi:

- *Îmbătrânirea prematură* poate fi definită ca un proces de maturare al unor organe pe parcursul căruia țesuturile complet dezvoltate și funcționale suferă modificări fiziologice și structurale într-un ritm progresiv și o scădere a vitalității acestor țesuturi (Günthardt-Goerg și Vollenweider, 2007).
- *Senescența ontologică* reprezintă un proces degenerativ ce are loc în ultimul stadiu de dezvoltare al celulelor sau organelor și este caracterizat prin schimbarea culorii coroanei arborilor (*galben* – apare în urma degradării clorofilei, *roșu* – sinteza *de novo* a antocianilor anterior degradării clorofilei, *maro* – apare în urma oxidării componentelor celulare, *negru* – rezultat din inducerea fenoloxidazelor în urma decompartmentării celulelor) din zonele temperate și îngălbenirea caracteristică acelor coniferelor.
- *Senescența celulară accelerată* se manifestă înainte de venirea toamnei la frunzele tinere.
- *Moartea celulară accidentală sau programată* rezultă în urma unor leziuni mecanice ce pot fi cauzate de fenomene meteorologice (de exemplu, grindină, îngheț etc.) sau de expunerea la concentrații mari de substanțe chimice și poluanți toxici.
- *Răspunsul hipersensibil* este un proces care apare în urma interacțiunii dintre plantă și un agent patogen și constituie un sistem de apărare al plantei la infecții microbiene. Scopul acestui răspuns este de reducere a riscului de răspândire și dezvoltare a patogenilor în țesuturile sănătoase (Heath, 2000).
- *Stresul oxidativ*. Acumularea speciilor reactive de oxigen (ROS) provoacă stres oxidativ și poate duce la peroxidarea lipidelor, inactivarea proteinelor și ruperea unor catene de ADN (Bartosz, 1997).

1.1.2.1. Impactul poluării cu metale grele asupra vegetației

Termenul de „metale grele” se referă la orice element metalic care are o densitate relativ mare și are efect toxic, chiar și în concentrații scăzute. Acestea fac parte din grupul de metale și metaloizi cu densitate atomică mai mare de 4 g/cm^3 și includ: plumb (Pb), cadmiu (Cd), nichel (Ni), cobalt (Co), fier (Fe), zinc (Zn), crom (Cr), arsen (As), argint (Ag), precum și metalele platinice (ruteniu (Ru), rodiu (Rh), paladiu (Pd), osmiu (Os), iridiu (Ir)

și platină (Pt) (Gill, 2014). Metalele grele (Pb, Zn, Cr, Ni și Cd) provenite prin arderea incompletă a carburanților, precum și din activități industriale sunt eliberate în atmosferă sub formă de particule cu dimensiuni variabile. Plantele pot fi utilizate cu succes ca biomonitori ai poluării atmosferice, studiile demonstrând că o creștere a cantităților de metale grele, în special de Pb rezultat în urma arderii combustibililor fosili și a turbei pentru încălzirea locuințelor, provoacă efecte vizibile la vegetația înconjurătoare (Martin *et al.*, 2015).

CONTRIBUȚII PERSONALE

2. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT

Scopul general al tezei constă în propunerea de noi biomarkeri morfologici și structurali la plante care pot fi utilizați ca indicatori ai poluării atmosferice din zonele urbane. Astfel, am inițiat un studiu în care au fost evidențiate caracteristici micromorfologice și modificări anatomice dezvoltate la frunzele speciei *Pinus nigra*, colectate din mai multe zone din Municipiul București. Atât materialul vegetal colectat din cele 21 puncte diferite (15 intersecții și artere rutiere intens circulat, o zonă mai puțin poluată, Câmpina și 5 puncte din interiorul parcului Alexandru Ioan Cuza), cât și pulberile depuse pe frunze și cele de pe pereții țevilor de exhaustare ale automobilelor, au fost analizate cu ajutorul microscopiei optice, microscopiei electronice (SEM și SEM-EDX) precum și cu ajutorul spectrometriei de fluorescență de raze X. Prin toate aceste investigații, au fost urmărite mai multe obiective:

- Evidențierea unor modificări morfologice, micromorfologice și structurale ale acelor de *Pinus nigra* expuse poluării prin investigații histologice și tehnici de microscopie optică, prin comparație cu probe colectate din zone fără poluare.
- Observarea depunerilor de diverse particule și materii la nivelul suprafețelor foliare cu ajutorul microscopiei electronice SEM.
- Analiza elementală a depunerilor cu ajutorul spectrometriei de fluorescență de raze X.
- Caracterizarea și clasificarea diverselor tipuri de particule aeropurtate din punct de vedere al morfologiei, dar și al compoziției elementale cu ajutorul microscopiei electronice SEM și EDX (Energy-Dispersive X-ray).

3. MATERIALE ȘI METODE

3.1. MATERIALUL BIOLOGIC

Specia de la care au fost colectate probele de material biologic pentru identificarea de biomarkeri structurali și morfologici, a fost *Pinus nigra* J. F. Arnold. Această specie a fost selectată deoarece prezintă o serie de caracteristici care o recomandă ca un excelent material de studiu pentru identificarea de biomarkeri ai poluării atmosferice: prezintă frunze sempervirescente, acestea persistând între 4 și 7 ani ceea ce permite modificărilor fiziologice să se poată exprima fenotipic; este o specie rezistentă la secetă, dar și la îngheț care s-a adaptat foarte bine la condițiile schimbărilor climatice; este o specie des întâlnită în mediul urban fiind cultivată în parcuri, de-a lungul arterelor rutiere, grădini sau diverse spații verzi.

3.2. ANALIZA SUPRAFEȚELOR FOLIARE

3.2.1. Colectarea materialului vegetal

Probele supuse analizelor au fost reprezentate de frunze aciculare ale speciei *Pinus nigra*. Stabilirea punctelor de colectare a probelor de material vegetal s-a bazat pe identificarea unor zone poluate din interiorul Municipiului București, zone cu trafic rutier intens (intersecții și artere rutiere principale) unde a putut fi identificată specia de interes și dintr-o zonă considerată a fi cu cel mai curat aer din România, respectiv din orașul Câmpina (zona martor), Județul Prahova.

Colectarea materialului s-a făcut de la o înălțime de aproximativ 150-200 cm, aceasta fiind considerată înălțimea aerului respirabil, conform „Ghidului de utilizare a speciilor în programele de biomonitorizare” (Ștefănuț *et al.*, 2017).

Coordonatele geografice ale punctelor de colectare a materialului vegetal supus investigațiilor sunt prezentate în Tabelul 3.1.

Tabel 3.1. Coordanatele geografice ale punctelor de colectare a materialului vegetal

Situri	Coordonate geografice	Adresa punctelor de colectare
P1	44°27'05.9"N 26°02'45.9"E	Șos Virtuții
P2	44°26'05.4"N 25°59'07.0"E	Bd. Iuliu Maniu
P3	44°24'04.3"N 26°03'09.1"E	Intrarea Ghimeș

P4	44°24'15.1"N 26°05'46.9"E	Bd. Pieptănari
P5	44°23'36.4"N 26°07'20.2"E	Șos. Olteniței
P6	44°25'34.2"N 26°07'04.8"E	Bd. Unirii
P7	44°25'39.9"N 26°06'12.9"E	Piața Unirii/Parc Unirii
P8	44°26'13.0"N 26°06'07.3"E	Bd. Nicolae Bălcescu
P9	44°27'09.8"N 26°05'11.1"E	Piața Victoriei/Cotroceni
P10	44°26'29.2"N 26°08'01.5"E	Piața Iancului
Proba Control Câmpina	45°08'29.3"N 25°46'38.6"E	Str. Zăpodie
Proba Control Suceava	47°40'25.6"N 25°11'38.6"E	Moldova-Sulița

3.2.2. Pregătirea materialului pentru analizele de microscopie optică (stereomicroscopie)

Materialul colectat din teren a fost analizat în cel mult 24 de ore de la colectare pentru a se evita contaminarea secundară cu fungi și/sau bacterii. Pentru analiza la stereomicroscop, probele nu au fost prelucrate sau fixate deoarece s-a urmărit observarea cât mai fidelă a gradului de acoperire cu depuneri. De asemenea, materialul vegetal a fost manipulat la un nivel minim necesar pentru a se evita pierderea depunerilor.

3.2.3. Pregătirea materialului pentru analiza asimetriei fluctuante AF

Materialul vegetal colectat din teren constând din 100 perechi de frunze aciculare din al 2-lea an a fost analizat la cel mult 48 de ore de la colectare și păstrat la frigider la +4°C.

Probele au fost colectate din zece puncte din interiorul Municipiului București, respectiv 5 puncte din zone ferite de surse de poluare (probele P1, P2, P3, P4 și P5 din Parcul Alexandru Ioan Cuza, I.O.R) și 5 puncte din zone cu trafic rutier intens probele P6 (Bd. Camil Ressu), P7, P8 (Bd. Mihai Bravu) și P9, P10 (intersecție Piața Iancului).

Pentru analiza asimetriei fluctuante și a morfologiei generale au fost urmăriți doi parametri, respectiv lungimea (mm) și greutatea (g) fiecărui ac de pin din fiecare pereche de ace.

3.2.4. Pregătirea probelor pentru analizele de Microscopie electronică cu baleiaj (Scanning Electron Microscopy – SEM)

Pentru realizarea investigațiilor de microscopie electronică de baleiaj (SEM), acele de pin au fost tăiate în fragmente de aproximativ 2-3 cm lungime din vârful, de la mijlocul și de la baza acestora și montate pe suporti de aluminiu ai microscopului electronic cu ajutorul benzilor dublu adezive electroconductoare cât și a pastei electroconductoare cu pulbere de Ag, astfel încât să poată fi studiate ambele suprafețe ale frunzelor, adaxial și abaxial.

Pentru a putea compara rezultatele obținute în urma analizelor electronomicroscopice privind depunerile de particule aeropurtate de pe suprafețele frunzelor de pin, au fost colectate probe și de pe interiorul țevilor de exhaustare ale unor autovehicule cu motoare cu ardere internă care folosesc atât motorină, cât și benzină drept combustibil.

3.3. ANALIZA STRUCTURILOR FOLIARE

3.3.1. Fixarea probelor

Pentru a putea observa stratul de depuneri de la suprafața epidermei, probele de material vegetal nu au fost spălate sau curățate și au fost manipulate cât mai puțin posibil. După maximum 24 de ore de la colectare, probele au fost introduse în flacoane care conțin un amestec volumetric în proporție de 1:3 de acid acetic glacial și alcool etilic 95%. Probele au fost fixate în acest amestec pentru minimum 12 ore înainte de secționare.

3.3.2. Secționarea probelor

Probele supuse secționării au constat din fragmente cu lungimea de aproximativ 1cm, prelevate din zona apexului, din zona mediană și, respectiv de la baza frunzelor aciculare. Fragmentele foliare au fost secționate utilizând briciul botanic și microtomul manual de tip Euromex MT.500. Secțiunile au fost executate transversal și au avut grosimi cuprinse între 15 și 20 μm . Pentru creșterea acurateții observațiilor, au fost secționate atât probe de material proaspăt, cât și probe fixate. Probele de material proaspăt au fost secționate după maximum 24 de ore de la prelevare. De asemenea, au fost executate secțiuni transversale și cu ajutorul criotomului Histo-Line MC4000 din cadrul laboratorului de Histologie al Departamentului de Biologia Dezvoltării.

Au fost secționate cu ajutorul bisturiului fragmente proaspete de ace de pin cu o lungime de aproximativ 8 mm și introduse în soluție crioprotectoare (CRYO-M-BED Embedding Compound), timp de 24 de ore, pentru a facilita absorbția soluției cât mai

profund în țesutul vegetal. După tratament, probele au fost introduse în matrițe de silicon cu formă piramidală pline cu aceeași soluție crioprotectoare și lăsate timp de 30 de minute în camera de înghețare a criotomului MC4000 la -20°C . După înghețarea completă, probele au fost montate pe suportul de aluminiu al criotomului și s-au efectuat secțiuni transversale cu o grosime de aproximativ 10-15 μm (la un unghi de 10°), atât din zona apexului, din zona mediană, cât și de la baza frunzelor aciculare, după care au fost montate pe lame de sticlă și vizionate cu ajutorul microscopului optic.

3.3.3. Analiza probelor

Deoarece s-a dorit păstrarea pe cât posibil a conținutului celular, secțiunile nu au fost clarificate. De asemenea, pentru a putea decela prezența taninurilor în structuri, secțiunile nu au fost colorate.

Pentru analiza structurilor au fost efectuate preparate microscopice temporare prin imobilizarea secțiunilor între lamă și lamelă într-o picătură de apă distilată. Secțiunile au fost analizate cu ajutorul microscopului Nikon Eclipse E200. Imaginile au fost preluate utilizând camera digitală Nikon Coolpix 5400 atașată microscopului.

3.4. ANALIZA CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ A DEPUNERILOR

3.4.1. Analiza elementală prin spectroscopie de raze X cu dispersie de energie (EDX)

Probele studiate au constat atât din depunerile pe suprafața foliară a materialului colectat din zonele menționate în capitolul **3.2.1. Colectarea materialului vegetal** (Tabel 3.1.), cât și în cenușa colectată de pe interiorul țevilor de eșapament al unor autovehicule cu motor diesel sau pe benzină. Investigațiile SEM-EDX au urmat același protocol de pregătire a probelor ca cel descris anterior în cazul investigațiilor SEM (**3.2.3. Pregătirea probelor pentru analizele de Microscopie electronică cu baleiaj (Scanning Electron Microscopy – SEM)**), respectiv acele de pin au fost tăiate în fragmente de 2-3 cm lungime atât de la vârful, de la mijlocul, cât și de la baza acestora și montate pe suporti de aluminiu ai microscopului electronic cu ajutorul benzilor dublu adezive electroconductoare și a pastei electroconductoare cu pulbere de Ag. S-a făcut o evaluare atât calitativă cât și cantitativă a elementelor identificate în probele studiate, iar pentru cuantificarea elementelor au fost înregistrate spectrograme EDX în care sunt afișate în spectru atât procentul de masă, cât și procentul atomic al fiecărui element identificat.

3.4.2. Analiza elementală prin spectrometrie de fluorescență de raze X (XRF)

Conținutul total de metale a fost măsurat cu spectrometrul cu fluorescență de raze X Rigaku ZSX100e. Pentru a deosebi particulele aeropurtate depuse pe suprafețele frunzelor de cele acumulate în interiorul țesuturilor, au fost analizate atât ace de pin spălate, cât și nespălate. Atât probele spălate, cât și cele nespălate au fost uscate în cuptor la o temperatură de 60°C până la stabilizarea greutății probei uscate și mojarate până la obținerea unei pudre fine. Pregătirea probelor vegetale sub formă de pulbere s-a realizat în atmosferă de He de puritate 99,99%. Au fost introduse câte 5 g de pudră obținută din acele de pin, în recipiente cilindrice speciale cu diametrul de 30 mm (cat. No. CH1530) acoperite pe ambele părți cu folie de polipropilenă Rigaku cu grosimea de 6 μm (cat. No. 3399G003) și fixate cu inele de etanșare ale recipientelor. Rezultatele au fost generate în procente de oxizi ale elementelor detectate în pudra de material vegetal (Young *et al.*, 2016). Rezultatele finale au fost exprimate în mg de metale de particule aeropurtate depuse pe kg de material uscat conform formulei:

$$PMD = M_{uw} - M_w \quad (1)$$

PMD = conținutul de metale din depunerile de particule aeropurtate;

M_{uw} = conținutul de metale din probelor nespălate;

M_w = conținutul de metale din probele spălate.

3.4.3. Metode statistice de analiză

3.4.3.1. Statistica descriptivă

Analizele statistice aplicate pentru interpretarea rezultatelor au fost realizate cu ajutorul programului software XLSTAT Pro (Xlstat Add in, 2013).

Statistica descriptivă împreună cu diagramele **Boxplot** au fost utilizate pentru a organiza și analiza sumar setul de date obținut, oferind astfel o imagine cuprinzătoare a distribuției, variabilității precum și valorile extreme prezente. De asemenea, metodele selectate ne permit compararea diferitelor seturi de date pentru identificarea similarităților sau diferențelor acestora. Prelucrările de statistică descriptivă s-au făcut pe date nelogaritmă pentru a evidenția distribuția datelor colectate în teren și pentru înțelegerea tendințelor în funcție de criteriile testate.

3.4.3.2. Testul Fisher

Înainte de utilizarea analizelor parametrice precum *Testul Fisher* pentru dispersii, datele au fost testate dacă urmează sau nu o distribuție normală. În acest scop a fost aplicat testul de normalitate *Shapiro-Wilk*.

Testul Fisher F este o metodă statistică folosită pentru testarea diferențelor (variabilitatea) între două eșantioane diferite (două seturi de date). În cazul studiului nostru, compararea varianței dintre două eșantioane: *greutatea acelor de pin din partea dreaptă* comparativ cu *greutatea acelor de pin din partea stângă*. Testul Fisher bilateral (Two-tailed) - testează diferențele în ambele direcții între variantele celor două grupuri.

Principiul metodei se bazează pe formularea ipotezelor statistice:

- ipoteza nulă (H0) - Varianțele celor două populații sunt egale;
- ipoteza alternativă (H1) - Varianțele celor două populații sunt diferite.

Rezultatul se obține împărțind varianța eșantionului mai mare la varianța eșantionului mai mic (DuToit *et. al*, 2012).

4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

4.1. MODIFICĂRI LA NIVELUL MORFOLOGIEI FOLIARE

4.1.1. Rezultatele măsurătorilor unor parametri morfologici ai acelor de *Pinus nigra* din zone cu grade diferite de poluare atmosferică

Rezultatele măsurătorilor parametrilor morfologici ale perechilor de ace de *Pinus nigra* indică faptul că probele de material vegetal colectat din zonele cu trafic rutier intens (P6, P7, P8, P9, P10), prin comparație cu probele colectate de la arbori din zone mai puțin expuse poluării urbane și cu condiții de nutriție și hidratare superioare (P1, P2, P3, P4, P5), prezintă abateri mai mari de la simetria perfectă din punct de vedere al parametrilor investigați, respectiv al greutateii și lungimii perechilor de ace.

Cel mai vizibil indicator al asimetriei fluctuante este dat de diferența dintre lungimile perechilor de ace (diferența dintre acul stâng și cel drept din perechea de ace dintr-o teacă), parametrul cu cea mai mare valoare putând fi observat la probele P6 (Bd. Camil Ressu) și P7 (Bd. Mihai Bravu), iar cea mai mică valoare la probele P1 și P3 (Parc Alexandru Ioan Cuza) și P10 (Piața Iancului).

Cel de-al doilea parametru urmărit pentru determinarea asimetriei fluctuante, respectiv raportul dintre greutatea acului stâng și greutatea acului drept din fiecare pereche

de ace dintr-o teacă, a indicat de asemenea, cea mai mare diferență la materialul colectat din zona Bd. Mihai Bravu ($P7 = 0,0212$ g), respectiv P-ța Iancului ($P9 = 0,0220$ g). În condiții normale de mediu, diferențele de greutate dintre acul din partea stângă și cel din partea dreaptă sunt minime, astfel, cântărirea acelor poate fi considerată o metodă utilă în determinarea impactului antropic asupra mediului înconjurător (Mammadova, 2009).

Tabel 4.1. Rezultatele măsurătorilor unor parametri morfologici ai acelor de *Pinus nigra* din zone cu grade diferite de poluare atmosferică.

NR PROBA	MEDIE LUNGIMI AC STÂNG (MM)	MEDIE LUNGIMI AC DREPT (MM)	MEDIA RAPORTULUI DINTRE LUNGIMEA ACULUI STÂNG ȘI CEL DREPT (MM)	MEDIE GREUTATE AC STÂNG (SPĂLAT ȘI DESHIDRATAT) (g)	MEDIE GREUTATE AC DREPT (SPĂLAT ȘI DESHIDRATAT) (g)	MEDIA RAPORTULUI GREUTĂȚII DINTRE ACUL STÂNG ȘI ACUL DREPT (g)
P1	1413,3	1414,3	1	0,8286	0,8155	0,0131
P2	1515,7	1513,2	2,5	0,7615	0,7572	0,0043
P3	1520,2	1519,2	1	0,8006	0,7833	0,0173
P4	1379,2	1381,2	2	0,6846	0,6861	0,0015
P5	734,1	733	1,1	0,7828	0,772	0,0108
P6	1442,5	1445,5	3	0,5566	0,5617	0,0051
P7	1264	1260,2	3,8	0,7081	0,6869	0,0212
P8	1790,2	1788,5	1,7	0,8601	0,8442	0,0159
P9	1577,7	1576,6	1,1	0,6908	0,6688	0,0220
P10	1251,8	1252,1	0,3	0,6154	0,6287	0,0133

4.1.2. Analiza descriptivă a datelor

Rezultatele studiului nostru au indicat unele diferențe ale trăsăturilor arborilor din zonele cu trafic comparativ cu cele din zonele de parc.

Dimensiunile acelor

Analiza trăsăturilor dimensiunilor acelor din probele proaspete spălate din cele două tipuri de zone a evidențiat valori mai ridicate ale acelor (ace stânga –146,524 mm; ace dreapta –146,458 mm) din zonele cu trafic rutier comparativ cu cele din parc (ace stânga – 131,250 mm; ace dreapta – 131,218 mm). În zonele cu trafic intens minimele și maximele acelor au fost mai mari decât cele din zonele curate, în timp ce deviația standard a arătat o împrăștiere mai mare a datelor în zonele curate. Acestea explică faptul că în punctele din interiorul parcului, acele au prezentat o variabilitate mai mare a dimensiunilor acestora.

Tabel 4.3. Statistica descriptivă a dimensiunilor acelor din zonele de studiu.

Statistic	Parc		Trafic rutier	
	S-PS (mm)	D-PS (mm)	S-PS (mm)	D-PS (mm)
Minimum	61,000	61,000	115,800	115,500
Maximum	173,000	173,000	241,000	239,000
Medie	131,250	131,218	146,524	146,458
Deviație standard (n-1)	32,214	32,247	24,201	24,158

În zonele din parc au fost înregistrate valori anormale (*outliers*), valori care au fost mult mai mici decât intervalul normal al datelor. Acestea, pentru ambele tipuri de ace din zona curată au tras mediile („+”) în jos, fiind astfel observate sub mediană.

În zonele cu trafic, diagramele au arătat similaritate în ceea ce privește răspândirea datelor și în ambele grupuri s-a remarcat prezența valorilor extreme care în diagrame au fost semnalate și ca valori maxime. Valorile mediilor și medianelor nu au fost aproape de centrul distribuției, indicând că datele au avut o distribuție ușor asimetrică.

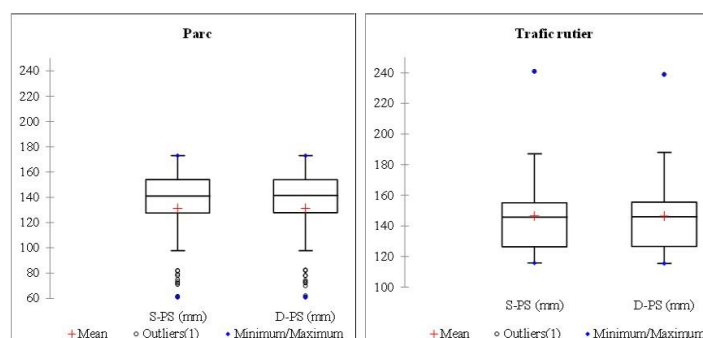


Figura 4.1. Diagrama boxplot privind statistica descriptivă a dimensiunilor (mm) acelor din zonele de studiu.

Statistica descriptivă privind greutatea probelor proaspete cu depuneri

Greutatea acelor colectate din parc (proaspete cu depuneri) din partea stângă și din partea dreaptă a indicat valori minime mai mici (0,065 – 0,062 g) comparativ cu a celor din zonele cu trafic rutier (0,073 – 0,072 g). De asemenea, valorile maxime au arătat că în zonele cu trafic au fost vârfuri mai mari în comparație cu zonele din parc. Acestea s-au reflectat și în mediile înregistrate ce au caracterizat aceste zone, ceea ce sugerează că zonele de trafic au fost caracterizate de valori ușor mai ridicate a greutateii (Tabel 4.4.). Datele obținute de la

probele din parc au fost mai variate în comparație cu cele din zonele de trafic. Chiar dacă valorile greutateii acelor colectate din parc au fost mai mici, s-a identificat o variabilitate a tipurilor de ace din această zonă.

Tabel 4.4. Statistica descriptivă a greutateii (g) acelor proaspete cu depuneri.

Statistic	Parc		Trafic rutier	
	S-PD (g)	D-PD (g)	S-PD (g)	D-PD (g)
Minimum	0,065	0,062	0,073	0,072
Maximum	0,211	0,201	0,235	0,241
Medie	0,134	0,132	0,137	0,136
Deviație standard (n-1)	0,035	0,033	0,030	0,028

Zonele cu trafic rutier au fost caracterizate de valori extreme ale greutateii acelor, ceea ce poate semnifica faptul că au fost identificate zone care au modificat semnificativ trăsăturile probelor. În timp ce mediile („+”) din zona parcului au fost apropiate de mediane, ceea ce indică o simetrie în distribuția valorilor atât pentru S–PD cât și pentru D–PD, în zonele cu trafic mediile au fost peste mediane ceea ce indică faptul că ponderea greutateilor mai ridicate, precum prezența valorilor extreme (*outliers*) a avut un impact asupra distribuției datelor.

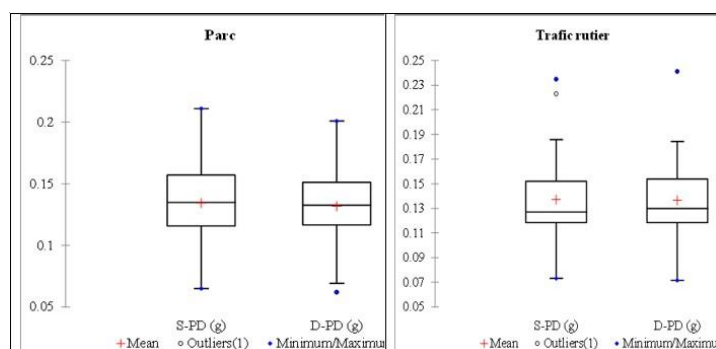


Figura 4.2. Diagrama boxplot privind statistica descriptivă a greutateii (g) acelor de pin din zona curată comparativ cu zonele cu trafic rutier.

Probele spălate și deshidratate

Rezultatele obținute din măsurătorile greutateilor probelor deshidratate și spălate au evidențiat că, în zonele cu trafic, atât pentru S – SD, cât și pentru D – SD, valorile medii au fost ușor mai mici (0,069 – 0,068) comparativ cu zona parcului (0,077 – 0,076), dar cu o

abatere standard ușor mai mare (Tabel 4.5.). Astfel, variabilitatea rezultatelor cântărilor acelor în condiții de deshidratare din zonele cu trafic a fost mai mare. De remarcat însă că atât minimele, cât și maximele probelor din zonele cu trafic au fost inferioare celor colectate din parc. În schimb, într-o analiză comparativă a valorilor acelor din partea stângă cu valorile acelor din partea dreaptă, în ambele tipuri de zone, probele din partea stângă au fost superioare (Tabel 4.5.).

Tabel 4.5. Statistica descriptivă a greutateii (g) acelor spălate cu apă distilată și deshidratate.

Statistic	Parc		Trafic rutier	
	S-SD (g)	D-SD (g)	S-SD (g)	D-SD (g)
Minimum	0,058	0,057	0,038	0,037
Maximum	0,109	0,105	0,106	0,103
Medie	0,077	0,076	0,069	0,068
Deviație standard (n-1)	0,013	0,011	0,014	0,012

În ceea ce privește greutatea probelor deshidratate din zonele din parc comparativ cu cele din zonele cu trafic rutier, se observă faptul că varianta acelor din partea stângă a avut o gamă mai mare de valori. În ceea ce privește greutatea acelor din partea dreaptă, diagrama boxplot a evidențiat prezența mai multor valori aberante (*outlieri* – marcați prin cercuri), ceea ce sugerează că au existat probe cu dimensiuni semnificativ diferite de restul datelor.

În zonele cu trafic, mustățile au lungimi diferite între partea stângă și partea dreaptă, indicând o anumită variabilitate în răspândirea datelor. Astfel, acele din partea dreaptă au prezentat o variabilitate mai mică comparativ cu cele din stânga. În ambele tipuri de zone, probele din dreapta au prezentat mai multe valori extreme.

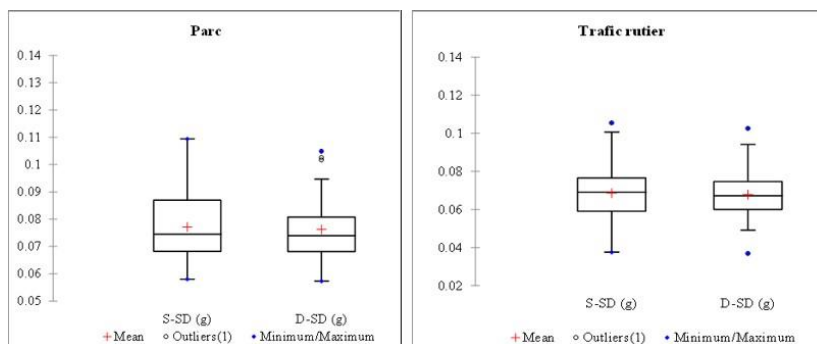


Figura 4.3. Diagrama boxplot privind statistica descriptivă a greutateilor (g) probelor deshidratate și spălate din zona curată comparativ cu zonele cu trafic rutier.

Testele de varianță Fisher dintre 2 eșantioane: ac stâng (zone din parc comparativ cu zone cu trafic rutier), ac drept (zone din parc comparativ cu zone cu trafic rutier).

Rezultatele au indicat diferențe semnificative în ceea ce privește dimensiunile acelor de pe partea stângă $p (< 0,0001)$ și a celor de pe partea dreaptă $p (< 0,0001)$. Din raportul dintre variantele celor două eșantioane (Tabelul 4.6.) s-a observat că diferența dintre variantele celor două eșantioane, zona parcului și zonele cu trafic rutier, a fost mai mare la acele de pe partea stângă (de $3,639 \times$) comparativ cu acele din partea dreaptă (de $0,275 \times$). În schimb, din analizele probelor spălate și deshidratate precum și probelor proaspete și cu depuneri (nеспălate), nu au fost găsite influențe ale zonelor asupra greutateilor acelor.

Tabel 4.6. Rezultatele testelor Fisher pentru evaluarea diferențelor dintre probele colectate din parc și probele din zone cu trafic rutier (ace de pe partea stângă și ace de pe partea dreaptă).

	s-PD	d-PD	s-SD	d-SD	S-PSmm	D-PS mm
Raport	1,480	1,449	0,830	0,790	3,639	0,275
F (Valoare observată)	1,480	1,449	0,830	0,790	3,639	0,275
F (Valoare critică)	1,762	1,762	1,762	1,762	1,762	1,762
DF1: Grade de libertate						
1	49	49	49	49	49	49
DF2: Grade de libertate						
2	49	49	49	49	49	49
p-valoare (Test bilateral)	0,174	0,198	0,518	0,413	< 0,0001	< 0,0001
Alpha	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

Testele de varianță Fisher dintre 2 eşantioane (ac stâng comparativ cu ac drept din zonele din parc și ac stâng comparativ cu ac drept din zonele cu trafic rutier)

Testele de varianță Fisher dintre greutatea și dimensiunea acelor de pe partea dreaptă în comparație cu acele de pe partea stângă nu au evidențiat diferențe semnificative. Chiar dacă raportul dintre variantele celor două eşantioane (stânga și dreapta) per fiecare variantă de probă (zone din parc, zone cu trafic) au evidențiat ușoare diferențe între acestea, rezultatele nu au atins pragul minim necesar de semnificație ($p < 0,05$).

Tabel 4.7. Rezultatele testelor Fisher pentru a evalua diferențele dintre acele stângi comparativ cu cele drepte.

	Parc			Trafic rutier		
	PN	DS	PS mm	PN	DS	PS mm
Ratio	1,140	1,286	0,997	1,116	1,224	0,997
F (Valoare observată)	1,140	1,286	0,997	1,116	1,224	0,997
F (Valoare critică)	1,762	1,762	1,762	1,762	1,762	1,762
DF1: Grade de libertate 1	49	49	49	49	49	49
DF2: Grade de libertate 2	49	49	49	49	49	49
p-valoare	0,649	0,382	0,992	0,703	0,482	0,992
Alpha	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

Probele proaspete

În general, acele din **zonele cu trafic rutier** au avut dimensiuni și greutateți mai mari, dar cu o variabilitate mai mică în comparație cu acele **din parc**. Aceste diferențe sugerează că atât poluarea cât și alți factori de mediu din zonele cu trafic influențează creșterea și dezvoltarea acelor, conducând la un profil diferit al acestora în comparație cu acele din zonele mai curate.

Valorile mai mici observate la **probele din parcuri** reflectă condiții de mediu mai favorabile și o creștere mai sănătoasă a acelor de pin, în timp ce valorile mai mari și prezența *outlier-ilor* în **zonele cu trafic rutier** indică influența negativă și variabilă a poluării și a altor factori de stres asupra dezvoltării acelor și totodată faptul că indivizii au reacționat în mod disproporționat la poluare sau la alți factori, specifici traficului rutier.

Probele spălate și deshidratate

Greutățile acelor spălate și deshidratate după cântărire au arătat că valorile medii sunt mai mici în zonele cu trafic, dar cu o variabilitate ușor mai mare, ceea ce poate indica

un impact mai complex al poluării asupra acestor probe. Acele din partea stângă au avut, în general, valori superioare celor din partea dreaptă, atât în zonele de parc, cât și în cele cu trafic, iar prezența valorilor aberante (outlieri) a fost mai pronunțată în zonele cu trafic rutier, indicând o influență semnificativă a acestor condiții de mediu asupra distribuției datelor.

Studiul demonstrează **influența mediului urban poluat asupra caracteristicilor acelor de pin, atât în ceea ce privește dimensiunea, cât și greutatea acestora**, evidențiind necesitatea unei monitorizări atente a acestor indicatori în evaluarea impactului poluării asupra vegetației urbane.

Chiar dacă rezultatele de statistică descriptivă au evidențiat diferențe între probele testate reflectate prin valori ale minimelor, maximelor, mediilor și diagrame boxplot, analizele Fisher au indicat faptul că variabilitatea dintre acestea a fost mică, astfel unele dintre aceste măsurători nu au atins pragul de semnificație minim ($p < 0.05$) necesar.

Cu toate acestea, **diferențele semnificative între dimensiunile acelor din zonele de parc și cele cu trafic rutier** precum și **Raportul de varianță** au aratat că variabilitatea dimensiunilor acelor din partea stângă a fost cu mult mai mare în zonele cu trafic rutier comparativ cu cele din partea stângă din parcuri.

Este important de reținut că varianța mai mare observată la acele din zona cu trafic rutier (în special pentru cele din partea stângă) indică o frecvență mai mare a acestor variante de ace în această zonă. Acest lucru poate reflecta variațiile în condițiile de mediu (ex. poluare) care afectează uniformitatea creșterii acelor.

În schimb, analizele au evidențiat că greutatea acelor nu a fost influențată de expunerea arborilor la poluarea din trafic. Lipsa semnificației la greutate se poate explica prin faptul că, deși dimensiunile variază, masa acelor nu este influențată în același mod, ceea ce poate reflecta o adaptare a arborilor la condițiile de stres.

Lipsa rezultatelor semnificative în ceea ce privește AS vs AD din aceeași zonă

Asemănarea între acele din partea stângă și acele din partea dreaptă poate fi explicată prin faptul că, deși au fost observate ușoare diferențe între cele două tipuri de probe, acestea nu au fost suficiente pentru a atinge pragul de semnificație statistică. Astfel, există probabilitatea ca variabilitatea naturală și factorii de mediu să nu fi fost suficient de diferite pentru a produce diferențe mai semnificative în dimensiune și greutate între cele două variante de ace ale speciei selectate pentru studiu.

4.2. MODIFICĂRI LA NIVELUL MICROMORFOLOGIEI FOLIARE

Rezultatele analizelor de microscopie electronică cu baleiaj (SEM) au evidențiat că probele colectate din zonele cu trafic intens din București prezintă alterări ale micromorfologiei foliare comparativ cu cele colectate din zone mai puțin expuse poluării atmosferice. Abaterile de la micromorfologia normală includ:

- alterări premature ale configurației stratului de ceară;
- îngroșări peri-stomatice asemănătoare cu „inelele Florin”;
- celule epidermice cu pereți cutinizați, suprafețe foliare neregulate;
- alterarea prematură a structurii complexului stomatic;
- eroziunea depunerilor intra-stomatice de ceară;
- serații anormale.

4.2.1. Alterări premature ale configurației stratului de ceară

La conifere, ceara epicuticulară este secretată și depusă pe suprafețele foliare în decursul maturării frunzelor. Este secretată intens la frunzele mai tinere de 1 an, cu intensitate mai redusă la frunzele de 2 ani și aproape deloc la cele mature care au 3 ani.

Frunzele tinere colectate din zone nepoluate au ceara epicuticulară depusă sub forma unei rețele dense de microtubuli cantonată în special în zona stomatelor (Fig.4.4.a,b).

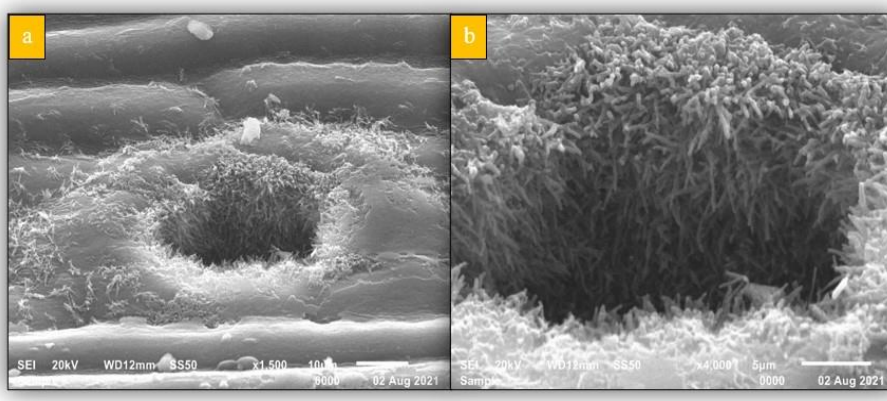


Figura 4.4. Dispunere normală a cerii epicuticulare la frunze de 1 an – material colectat din Câmpina a – aspect general, b – detaliu.

În condițiile stresului provocat de diferiți poluanți atmosferici ritmul de producere al cerii nu poate compensa degradarea acesteia așa încât devin vizibile alterări chiar și la frunzele de 1 an. Aceste degradări au fost observate la toate probele de frunze tinere și au constat din compactarea rețelei de tubuli prin fuziunea acestora.

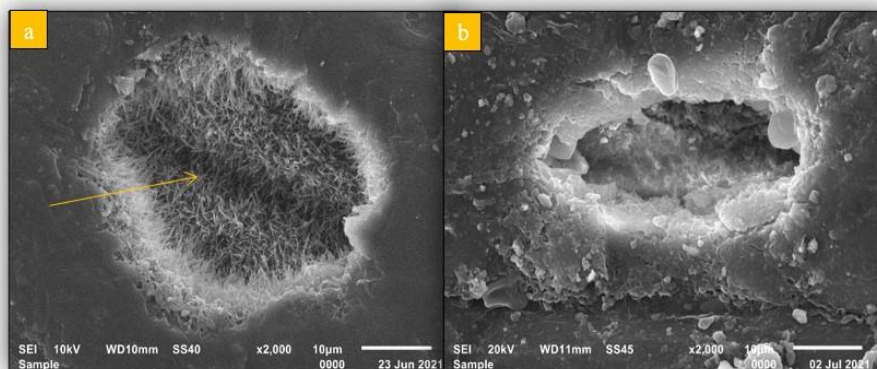


Figura 4.6. Alterări timpurii ale structurii în rețea a tubulilor de ceară, la frunzele de 1 an, *a* – fantă mediană vizibilă, stadiu incipient de alterare; *b* – alterări profunde.

La frunzele complet maturate, degradările timpurii ale cerii cuticulare sunt mult mai vizibile și sunt caracterizate prin aspectul complet amorf, atât la periferia aperturii camerei suprastomatice, cât și în interiorul acesteia. Mai mult, ceara depusă periferic, în decursul maturării foliare se destructurează și „cade” colmatând camera suprastomatică (Fig.4.7.a,b).

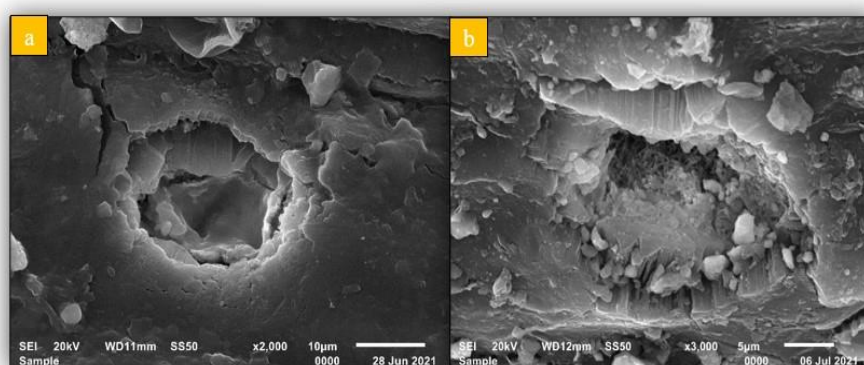


Figura 4.7. Alterări avansate ale cerii cuticulare la frunze mature de 2 ani *a* - ceară destructurată care colmatează aproape total camera suprastomatică, *b*- camera suprastomatică colmatată integral.

4.2.2. Îngroșări peri-stomatice asemănătoare cu „inelele Florin”

La probele la care depunerile de particule sunt consistente, iar camera suprastomatică este colmatată s-a observat o îngroșare circulară care urmărește conturul stomatei (Fig.4.9.).

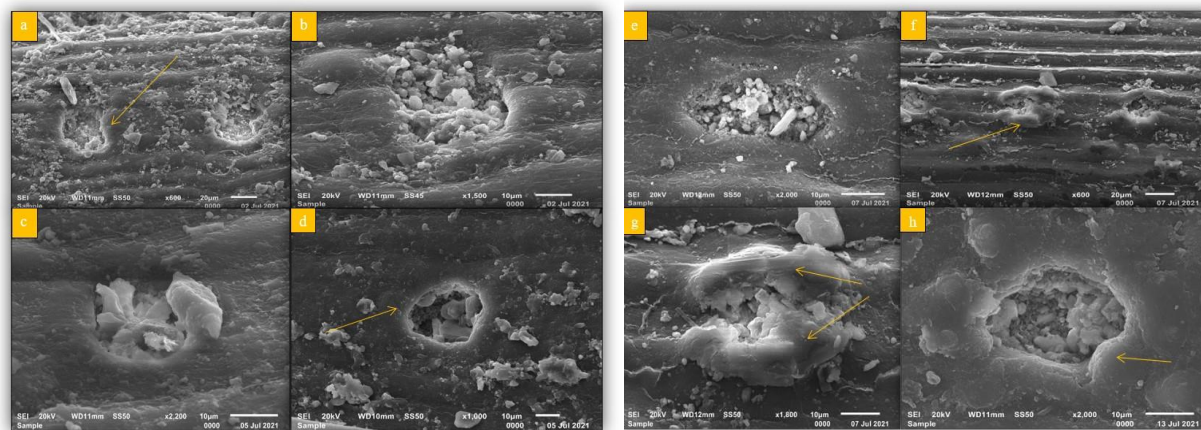


Figura 4.9. Îngroșări peristomatice la material cu diverse proveniențe *a, b* – material colectat din zona Intrarea Ghimeș (sector 5, București), *c, d* – material colectat din zona Șoseaua Olteniței (sector 4, București) Stomate cu depuneri și îngroșări peristomatice - *e, f, g*- material provenit din din zona Bd.Unirii (Sector 3, București) *h*- material provenit din din zona Bd. N. Bălcescu (Sector 1, București).

Aceste îngroșări sunt fie discrete, dar vizibile (Fig.4.9.a, b, c, d), fie foarte elevate și evidente (Fig.4.9. e, f, g, h.).

Îngroșările peri-stomatice previn deschiderea largă a ostiolelor având rol în reglarea eliminărilor de apă prin stomate (Pautov *et al.*, 2017), iar prezența acestor „borduri” peristomatice poate schimba direcția de creștere a hifelor scăzând astfel șansele de pătrundere a acestora prin deschiderea ostiolară (Mohammadian *et al.*, 2009).

4.2.3. Celule epidermice cu pereți cutinizați, suprafețe foliare neregulate

La toate probele la care suprafețele foliare sunt populate de depuneri, pereții externi ai celulelor epidermice sunt bombați prezentând îngroșări și cutinizări accentuate care conferă un relief general striat, atipic pentru frunzele speciei *P. Nigra*.

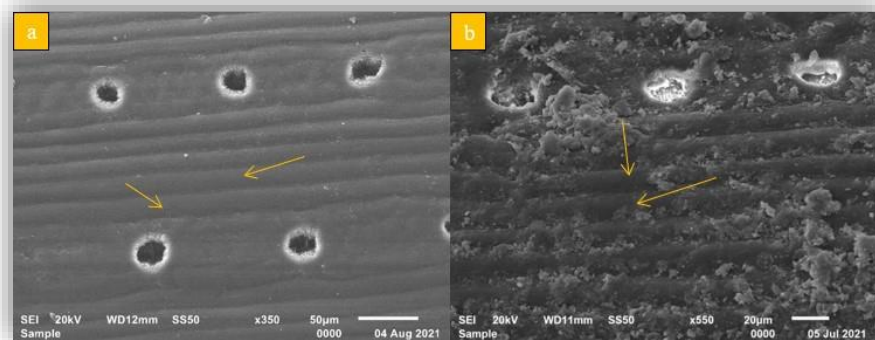


Figura 4.12. *a* – îngroșări normale, relief aproape uniform (probă control colectată din zona Câmpina) *b* – îngroșări exagerate ale pereților externi ai celulelor epidermice, relief epicuticular foarte neuniform.

4.2.4. Alterarea prematură a structurii complexului stomatic

La toate probele colectate din zone cu trafic intens s-a putut observa o compromitere a funcționării complexului stomatic prin colmatarea completă cu depuneri a camerei suprastomatice.

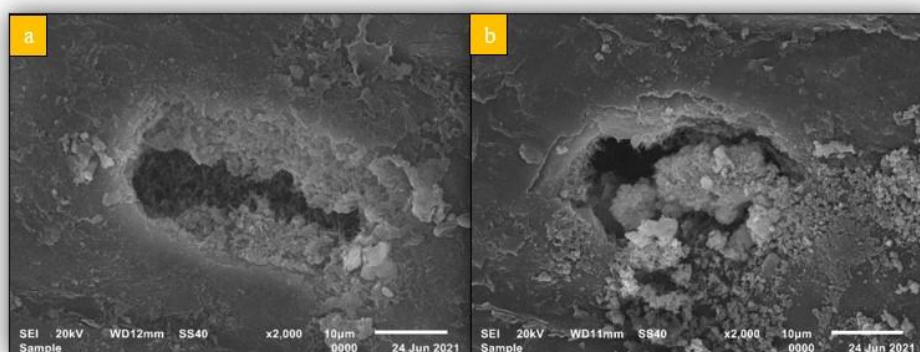


Figura 4.13. *a* – colmatare timpurie, în profunzime sunt vizibili microtubulii, *b* – colmatare combinată ceară-depuneri, parietal se observă insule de microtubuli.

Pe măsură ce frunza ajunge la maturitate, ceara intrastomatică se compactează ajungând ca la frunzele care au peste 2 ani să formeze adevărate dopuri care limitează schimbul de gaze și de apă. Aparatul stomatic prezintă un rol important în procese fiziologice esențiale ca fotosinteza, respirația și transpirația.

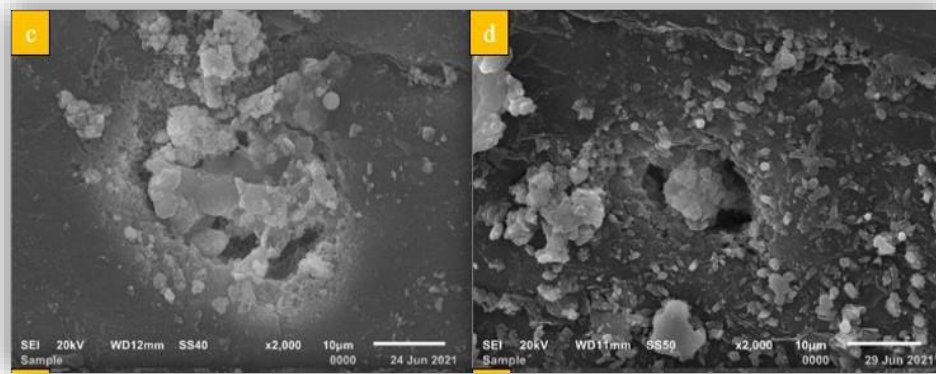


Figura 4.14. *c* și *d* – Colmatarea camerei suprastomatice la frunzele imature

4.2.5. Eroziunea depunerilor intra-stomatice de ceară

Formarea dopurilor de ceară este un proces fiziologic normal la conifere și se manifestă la acele complet maturate. Aceste structuri au în principal rolul de a limita pierderile de apă prin transpirație (Brodrribb și Hill, 1997) și de a reduce șansele de contaminare endogenă cu fungi prin împiedicarea pătrunderii acestora prin ostiole (Deckert *et al.*, 2001; Mohammadian *et al.*, 2009).

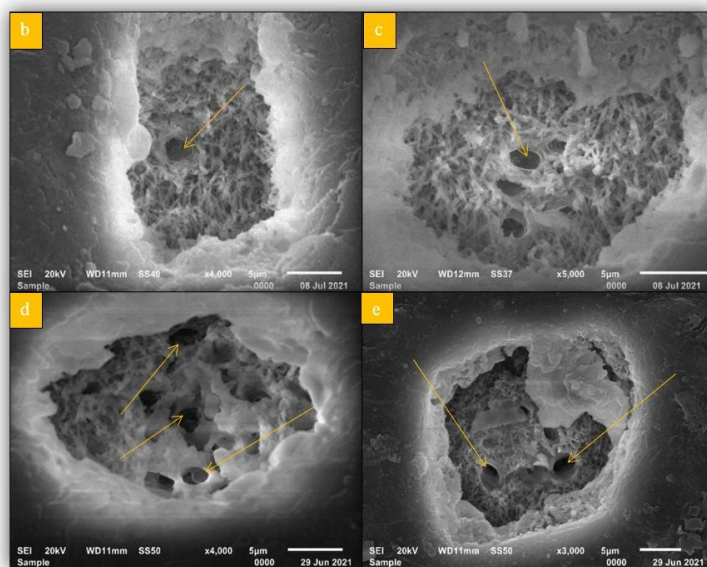


Figura 4.16. *b*, *c*, *d*, și *e* – perforații ale dopurilor de ceară în stadiu incipient de formare.

4.2.6. Serații anormale

Una dintre cele mai interesante micromorfologii vizibilă la acele mature cu vârste de 2-3 ani a fost prezența de denticuli epidermici în zona mediană a limbului, structuri ce conturează un debut de serație suplimentară într-o zonă în care în mod normal serațiile sunt absente.

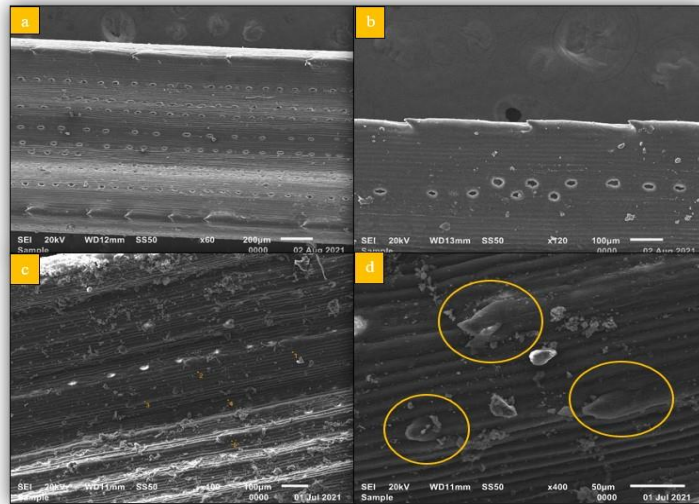


Figura 4.19. *a* – aspect limb cu margini serate normal (Proba control, Câmpina); *b* – detaliu de limb normal cu margine serată (P .control Câmpina); *c* - serații mediane, atipice; *d* – detaliu denticuli.

4.2.7. Colonizarea cu fungi

Colonizarea cu fungi nu reprezintă o abatere de la micromorfologia speciei, dar poate reprezenta una dintre consecințele unor alterări ale structurii cerii epicuticulare. În literatura de specialitate există numeroase studii care demonstrează că breșele din structura compactă a cerii cuticulare favorizează colonizarea și infecțiile fungice. Mai mult, se consideră că prezența de infecții fungice semnalizează că ceara cuticulară este semnificativ afectată (Grodzińska-Jurczak, 1998).

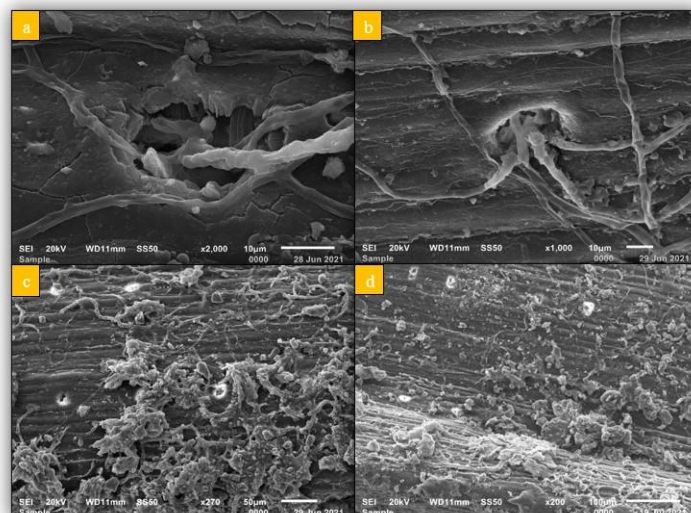


Figura 4.24. *a, b* – Pătrunderea hifelor în interiorul stomatei; *c, d* – colonizare masivă cu fungi.

4.3. MODIFICĂRI LA NIVELUL STRUCTURILOR FOLIARE

Observațiile realizate cu ajutorul microscopului optic ale secțiunilor transversale au revelat o serie de modificări structurale la probele provenite din zone poluate. Aceste modificări includ formarea de canale rezinifere în număr crescut, degenerarea țesuturilor liberiene, hipertrofierea celulelor Strasburger și acumularea de compuși fenolici în diverse țesuturi. Aceste modificări au fost observate la aproape toate probele analizate și afectează structuri implicate în mecanismele de apărare (canalele rezinifere), în menținerea echilibrului hidric (stomatele), în transportul apei și a asimilatelor (țesuturi conducătoare – xilem și floem), precum și structuri asociate acestora cum sunt: endoderma, celulele Strasburger și teaca de sclerenchim.

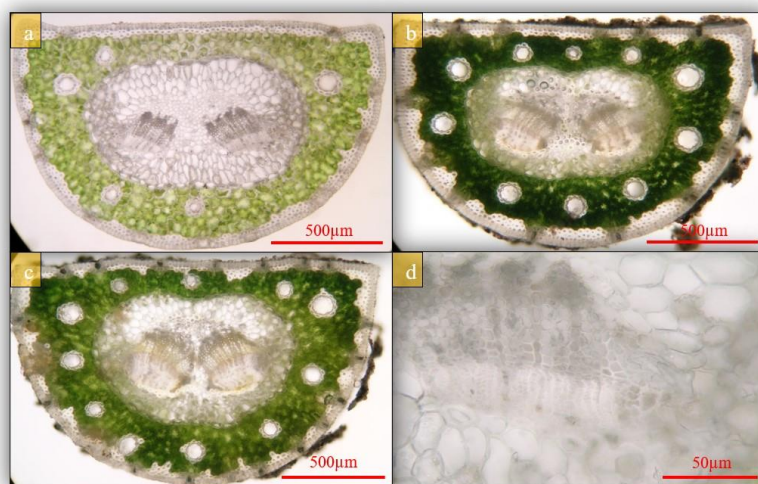


Figura 4.25. *a* – Canale rezinifere – aspect normal la material colectat din zona Câmpina; *b*, *c*- Număr crescut de canale rezinifere la material colectat din zone poluate; *d* – detaliu de fascicul conducător cu floem și xilem integre (material colectat din zona Câmpina).

Compușii fenolici se acumulează de regulă în vacuole sub formă de conjugate hidrofile. Există numeroase studii privind corelația dintre conținutul total în compuși fenolici ai acelor de conifere și expunerea la diverse surse de poluare. Mai mult, concentrația de compuși fenolici totali din frunzele coniferelor este considerată un indicator biologic al calității aerului (Pasqualini *et al.*, 2003). În probele analizate de noi au fost observate frecvent depuneri de compuși fenolici în mai multe categorii de țesuturi: conducătoare – în celulele și vasele de floem și în celule de parenchim lemnos mecanice – în teaca perifasciculară de sclerenchim și în colenchimul hipodermic asimilatoare – în celulele de

mezofil asimilator parenchimatice – în parenchimul de transfuzie și în unele țesuturi protectoare – celule endodermice.

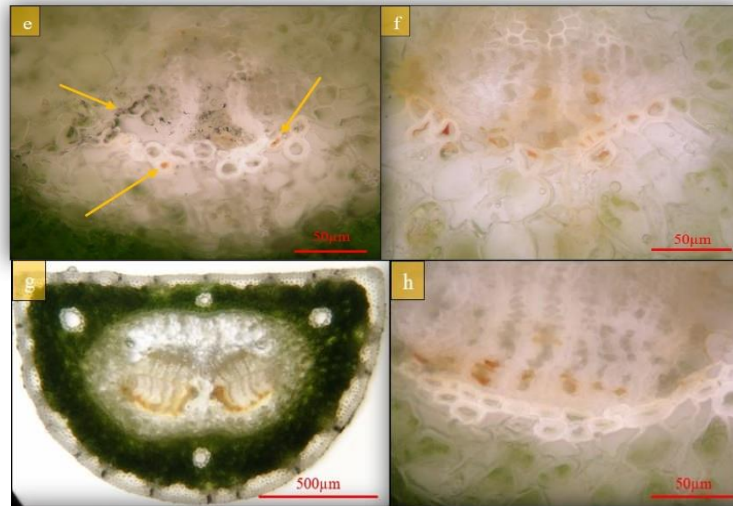


Figura 4.27. *e* – celule sclerenchimice cu polifenoli, mici cavități rezultate prin dezintegrarea vaselor liberiene; *f* – degenerarea floemului și acumulare de polifenoli în celule de sclerenchim; *g* – aspect general degenerare floem; *h* – detaliu de degenerare a floemului;

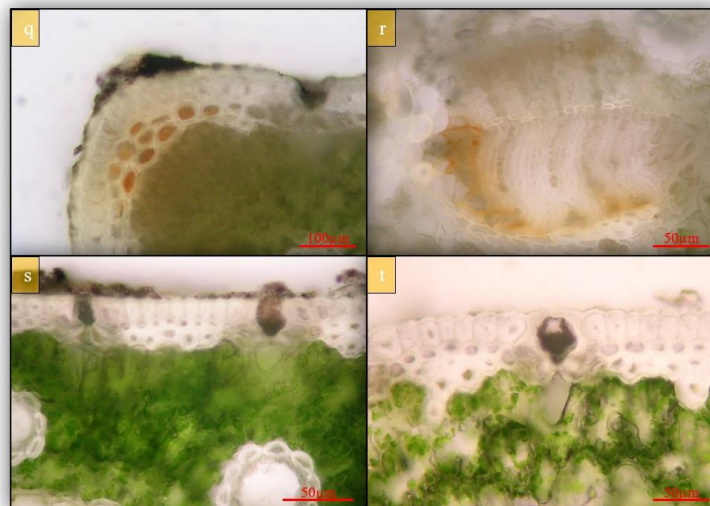


Figura 4.30. *q* – acumulare de polifenoli în celulele de colenchim (în proximitatea depunerilor); *r* – detaliu degenerare floem; *s* – detaliu depuneri în camera suprastomatică; *t* – stomată colmatată cu depuneri, detaliu.

4.4. CARACTERIZAREA PRINCIPALELOR TIPURI DE DEPUNERI

Pentru identificarea elementelor componente ale depunerilor observate pe suprafața probelor analizate au fost utilizate două metode: *Analiza elementală prin spectrometrie de fluorescență de raze X (XRF)* și *Analiza elementală prin spectroscopie de raze X cu dispersie de energie (EDX)*.

Analiza elementală prin spectrometrie de fluorescență de raze X (XRF) a permis evaluarea conținutului total de metale depuse pe suprafețele foliare ale probelor analizate.

Tabelul 4.8. Conținutul în metale din depunerile de pe suprafețele foliare.

Proba/Conținutul de metale din depuneri	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Al	-	8,75	17,06	-	3,90	8,79	3,44	3,95	-	10,71
K	-	-	-	145,49	24,89	-	-	-	65,10	-
Ca	56,31	-	-	24,56	28,86	-	-	51,37	50,38	-
Ti	4,59	-	-	-	-	-	-	27,54	79,95	-
V	-	16,83	-	-	30,86	23,76	-	-	-	-
Mn	-	34,21	-	18,65	12,84	-	-	-	-	-
Fe	2,67	77,98	30,96	-	-	43,36	13,76	30,28	61,85	103,82
Co	-	-	-	-	-	-	-	4,96	-	-
Ni	-	-	7,04	-	-	-	-	-	-	-
As	-	-	9,17	7,70	-	-	3,99	-	-	3,70
Sr	-	1,66	-	-	-	-	5,53	-	8,01	-
Cr	-	-	14,79	-	-	-	8,28	-	-	10,61
Ge	-	-	-	-	11,40	-	6,86	-	-	-
Y	-	-	4,90	-	-	-	4,54	-	7,14	-
Ce	-	-	73,44	-	-	-	-	-	-	49,40
Cu	-	-	-	8,41	-	6,25	6,63	-	10,14	-
Zn	-	-	-	-	8,28	-	5,70	8,67	-	-

Probele care au avut conținutul cel mai ridicat de Stronțiu, Ytriu, Cupru și Titan au fost cele colectate din zona Piața Victoriei – Sectorul 1 (P9); probele care au acumulat cantitățile cele mai ridicate de Aluminu, Crom, Cesium, Arsen și Nichel sunt cele care au provenit din zona Intrarea Ghimeș – Sectorul 5 (P3); probele cu acumulările cele mai crescute de Vanadiu și Germaniu au fost prelevate din zona Șoseaua Olteniței – Sectorul 4 (P5); probele la care s-au înregistrat concentrațiile cele mai mari de Cobalt și Zinc au fost cele care au provenit din zona Bulevardul Nicolae Bălcescu – Sectorul 1 (P8), iar cele la care s-a acumulat în cantitățile cele mai mari Fier, Mangan, Potasiu și, respectiv Calciu au fost probele prelevate din zonele Piața Iancului – Sectorul 2 (P10), Bulevardul Iuliu Maniu – Sectorul 6 (P2), Bulevardul Pieptănari – Sectorul 5 (P4) și, respectiv Șoseaua Virtuții – Sectorul 6 (P1).

Analiza elementală prin spectroscopie de raze X cu dispersie de energie (EDX) ne-a permis discriminarea ținută a compoziției în elemente a diverselor tipuri de depuneri observate pe suprafața probelor analizate.

După aspect, morfologie și compoziție elementală, depunerile au putut fi grupate în mai multe categorii:

Particule cristaloide de 2-5 μm , cu aspect neregulat

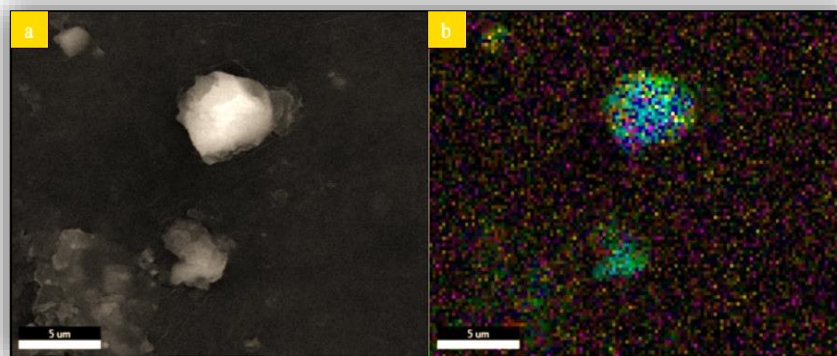


Fig 4.32. *a* – imagine preluată la SEM, *b* – diagrama dispunerii elementelor componente.

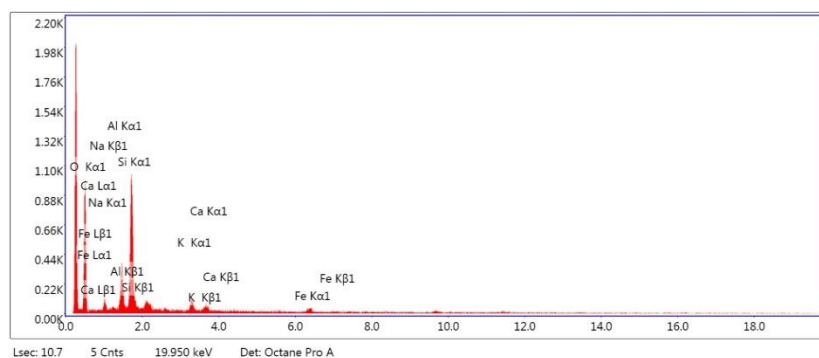


Fig 4.33. Spectrul EDX al elementelor componente.

Conform datelor din Figura 4.33., acest tip de particule conțin în special Siliciu, Aluminiu și Sodiu și, într-o proporție redusă, Calciu, Potasiu și Fier.

Particule cristaloide sub formă de prisme compuse cu aspect stelat

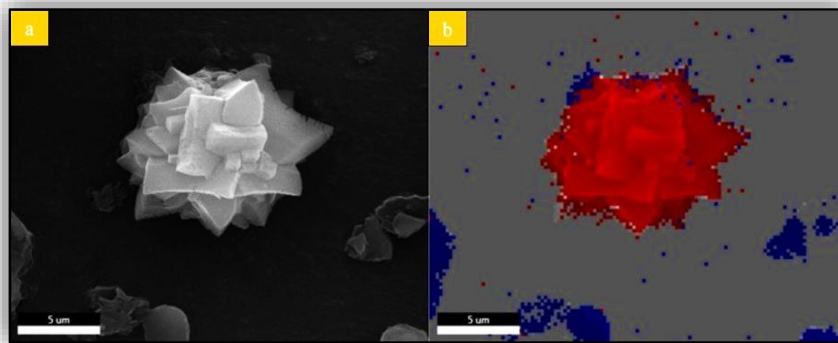


Fig 4.37. *a* – imagine preluată la SEM, *b* – diagrama dispunerii elementelor componente.

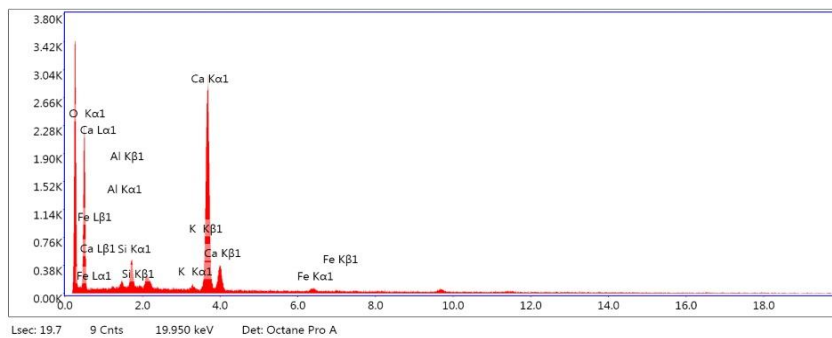


Fig 4.38. Spectrul EDX al elementelor componente.

Datele obținute au arătat că acest tip de particule sunt alcătuite preponderent din Calciu și, în proporție mai mică, din Siliciu și urme de Aluminiu, Fier și Potasiu.

Depuneri crustoase de formă neregulat prismatică

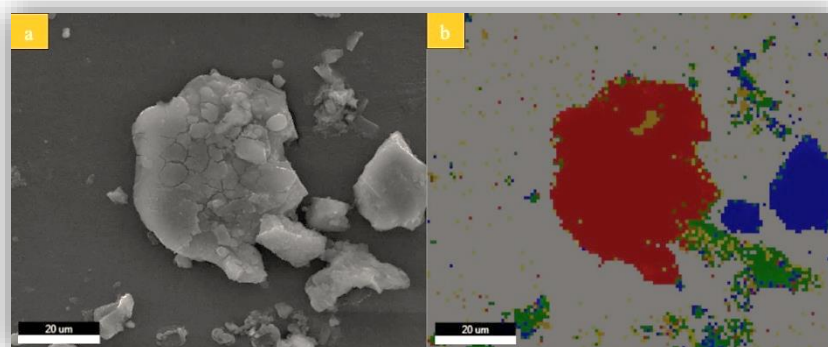


Fig 4.46. *a* – imagine preluată la SEM, *b* – diagrama dispunerii elementelor componente

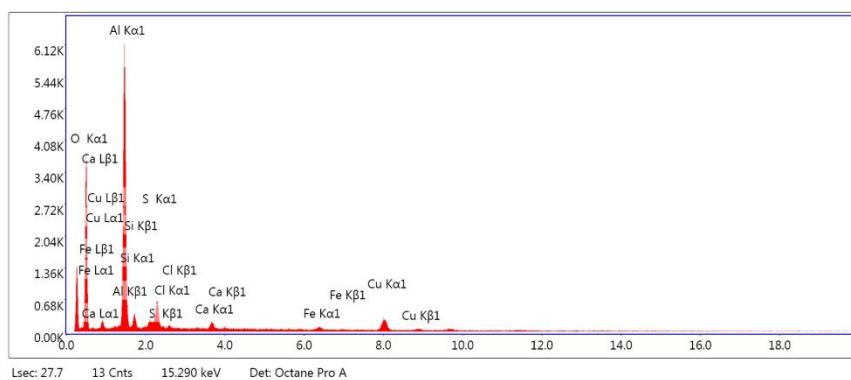


Fig 4.47. Spectrul EDX al elementelor componente

Datele analizei EDX demonstrează că astfel de particule sunt formate în special din Aluminiu și, în proporție scăzută, din Sulf, Cupru și Siliciu.

Agregate amorse compacte

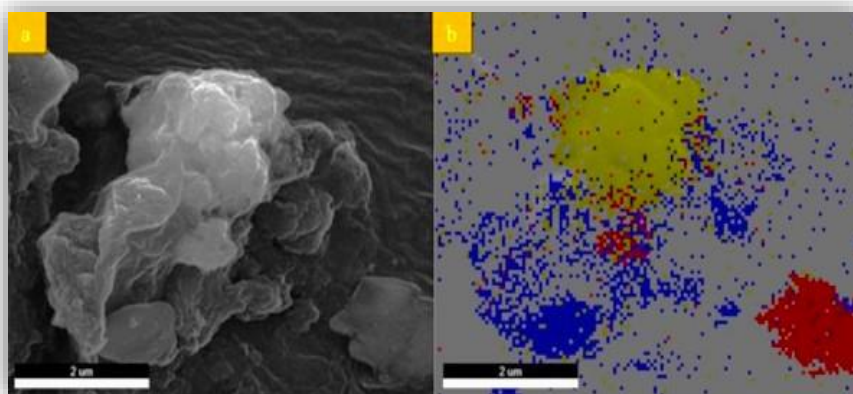


Fig 4.53. *a* – imagine preluată la SEM, *b* – diagrama dispunerii elementelor componente.

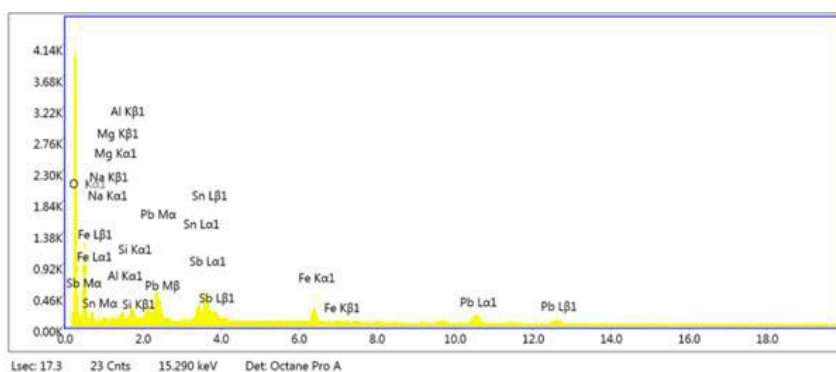


Fig 4.54. Spectrul EDX al elementelor componente.

Analiza EDX a demonstrat că astfel de depuneri au o compoziție elementală complexă în care predomină Plumbul, alături de Stibiu și Staniu, dar conțin, în proporție mai mică, și Sodiu, Aluminiu, Siliciu, Fier și Magneziu.

Agregate compacte fin granulate

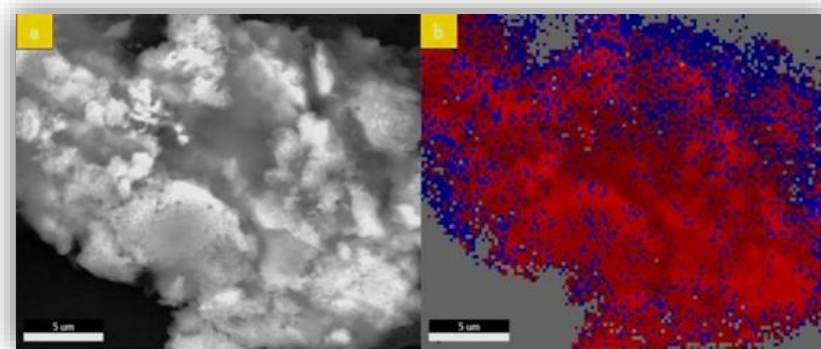


Fig 4.57. *a* – imagine preluată la SEM, *b* – diagrama dispunerii elementelor componente.

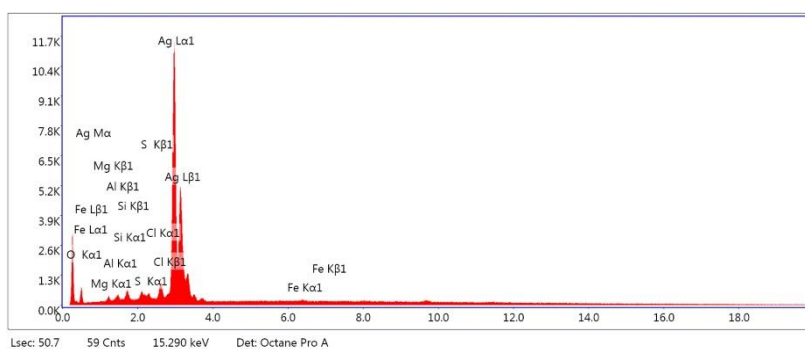


Fig 4.58. Spectrul EDX al elementelor componente.

Datele obținute în urma analizelor EDX au arătat că astfel de depuneri sunt constituite predominant din Argint și conțin doar urme de Siliciu, Sulf, Clor, Aluminiu, Fier și Magneziu.

Depuneri sub formă de cristale prismatice compacte

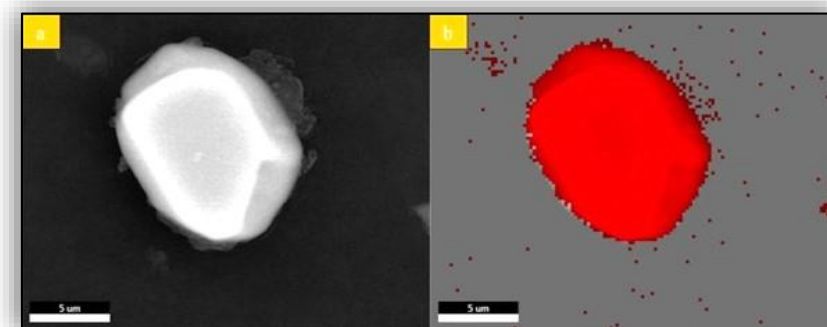


Fig 4.59. *a* – imagine preluată la SEM, *b* – diagrama dispunerii elementelor componente.

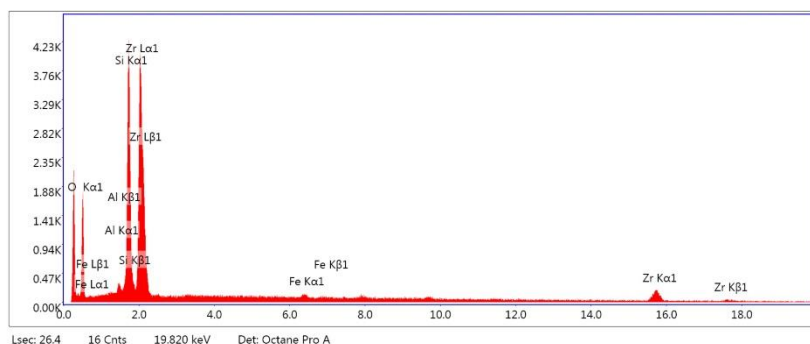


Fig 4.60. Spectrul EDX al elementelor componente.

Rezultatele analizei EDX au demonstrat că acet tip de particule sunt compuse în special din Zirconiu, dar și din cantități mai mici de Siliciu, precum și urme de Aluminiu și Fier.

Particule sub formă de microsferă

O categorie de particule frecvent observată în depunerile de pe suprafața acelor de pin negru a fost reprezentată de formațiuni sferice de dimensiuni mici (0,5-3 μ m). Acest tip de microparticule deși prezintă o micromorfologie foarte asemănătoare caracterizată printr-un aspect neted-sticlos au o compoziție elementală ușor diferită care ne-a permis clasificarea în 5 tipuri după cum urmează:

- Microsfere care conțin în principal Aluminiu și Magneziu (Figura 4.63 A).
Analiza EDX a indicat că microsferile au conținut ridicat de Aluminiu și Magneziu, dar și Siliciu, Sodiu și Bariu, în cantități mai mici.
- Microsfere cu Siliciu și Aluminiu (Figura 4.63. B).
Analiza EDX a indicat că astfel de microsferă au conținut ridicat de Siliciu, Aluminiu și Sodiu, în cantități mai mici, precum și urme de Fier, Magneziu, Potasiu și Calciu.
- Microsfere cu un conținut ridicat de Siliciu și Sodiu (Figura 4.63. C).
Analiza EDX a indicat că astfel de microsferă au un conținut ridicat de Siliciu și Sodiu, dar și Aluminiu, Fier, Calciu și Magneziu, dar în cantități mai mici.
- Microsfere constituite în principal din Siliciu și Aluminiu (Figura 4.63. D).
Analiza EDX a indicat că astfel de microsferă au conținut ridicat de Siliciu și Aluminiu, dar și cantități reduse de Sodiu, Fier și Magneziu.
- Microsfere formate preponderent din Siliciu (Figura 4.63. E).
Analiza EDX a indicat că astfel de microsferă au conținut ridicat de Siliciu, Aluminiu în cantitate mai mică, dar și Sodiu, Fier și Potasiu.

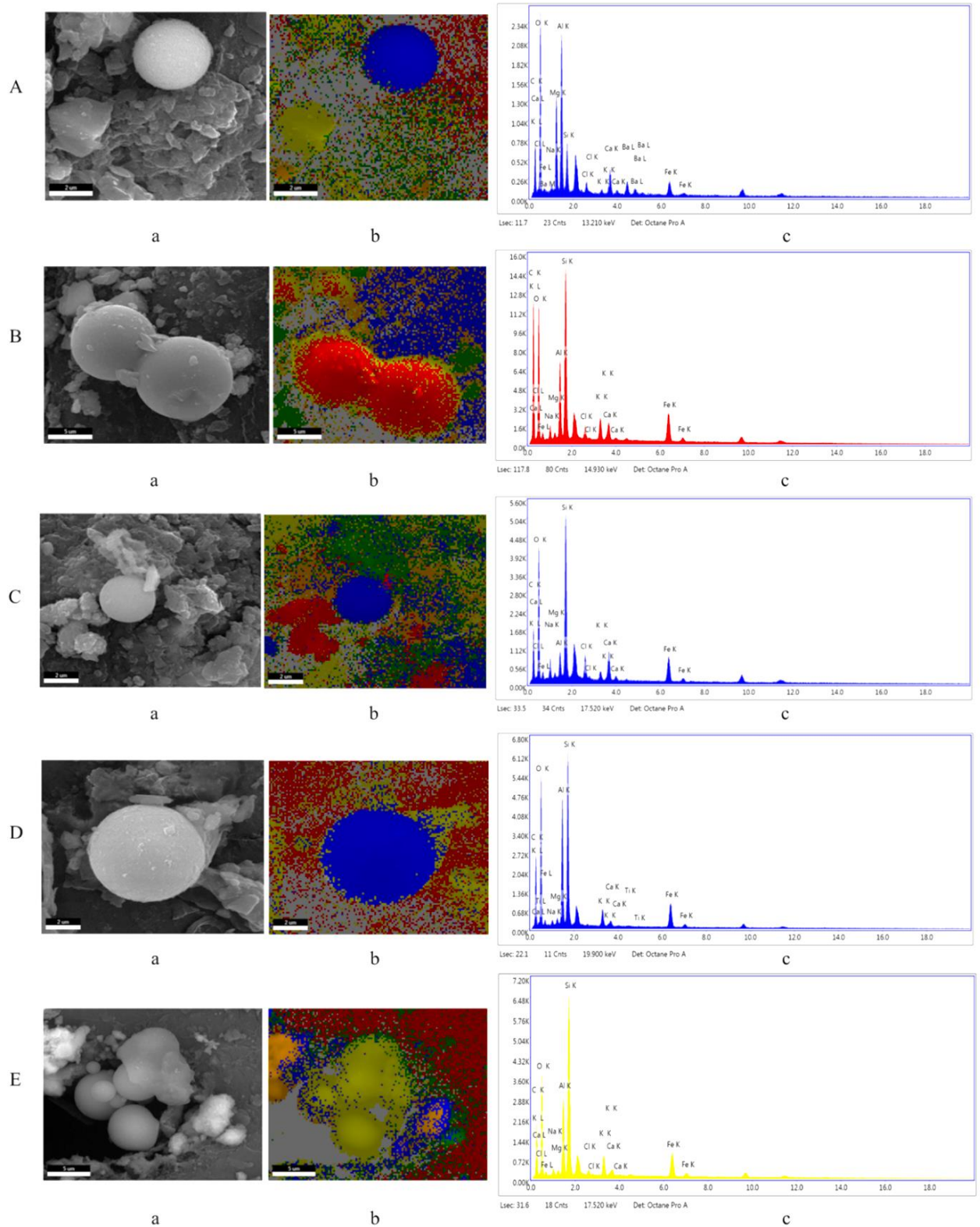


Figura 4.63. **A** – Microsfere Al-Mg, **B** – Microsfere Si-Al-Na, **C** – Microsfere Si-Na, **D** – Microsfere Si-Al, **E** – Microsfere Si-Al-Na-Fe
(a – imagini SEM, b – diagrama EDX, c – spectru EDX).

Alte tipuri de particule

Pe parcursul investigațiilor la microscopul electronic cu baleiaj au fost observate o serie de particule care nu se pot încadra în niciuna dintre categoriile descrise anterior. Cel mai probabil, aceste microfragmente se încadrează în categoria de microplastice.

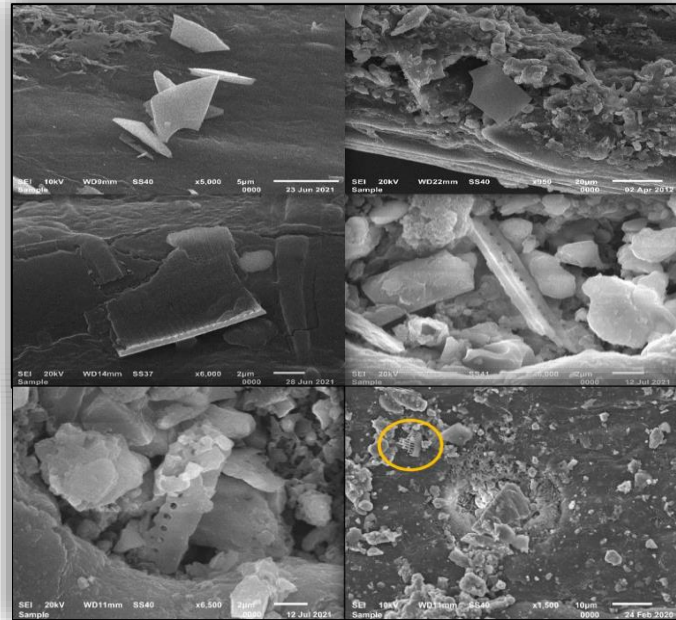


Figura 4.64. Microfragmente cu origine antropică.

Analiza EDX a unui astfel de tip de microparticule a evidențiat că sunt formate în special din Siliciu, dar și din cantități mici de Aluminiu și Sodiu, precum și din urme de Fier și Magneziu.

În prezentarea rezultatelor analizelor EDX au fost selectate numai graficele și diagramele asociate particulelor de interes. Rezultatele extinse obținute în urma analizelor EDX sunt prezentate în **Anexa 2**.

4.5. SINTEZA REZULTATELOR

Analiza probelor atât morfologică, micromorfologică, cât și structurală a evidențiat o serie de abateri de la caracteristicile speciei *Pinus nigra*. Aceste abateri au constat din:

- manifestarea asimetriei fluctuante a acelor
- alterări premature ale configurației stratului de ceară

- îngroșări peri-stomatice asemănătoare cu „inelele Florin”
- celule epidermice cu pereți cutinizați, suprafețe foliare neregulate
- alterarea prematură a structurii complexului stomatic
- eroziunea depunerilor intra-stomatice de ceară
- serații anormale
- canale rezinifere suplimentare
- degradarea timpurie a floemului
- hipertrofierea celulelor Strasburger
- acumularea de compuși fenolici

Deoarece aceste modificări sunt stabile, **considerăm că se pot constitui în markeri morfologici și structurali ai poluării.** Toate abaterile de la structura normală indentificate de noi sunt argumente suplimentare care susțin și completează datele existente în literatură conform cărora, **pinul negru poate fi un indicator util în evaluarea stării de poluare a unor zone.** Specia *Pinus nigra* a fost subiectul a numeroase studii complexe prin care s-a dovedit că reprezintă un eficient acumulator de metale, pesticide, hidrocarburi aromatice policiclice (Kaya *et al.*, 2010, Pavlovic *et al.*, 2017, Baroudi *et al.*, 2021, Zeiner *et al.*, 2021, Chudzińska *et al.*, 2014, Oleksyn *et al.*, 1987, Rimondi *et al.*, 2020, Piccardo *et al.*, 2005, Klingberg *et al.*, 2022, Parzych și Sobisz, 2012) ceea ce îl recomandă atât ca specie biomonitor a poluării aerului (Baroudi *et al.*, 2022, Katsidi *et al.*, 2023, Chiarantini *et al.*, 2016, Klánová *et al.*, 2009, Rai, 2013, Zsigmond *et al.*, 2021, Keskin și Ili, 2012, Berlizov *et al.*, 2007) cât și ca filtru verde pentru reducerea gradului de poluare (Koksal *et al.*, 2024, Petrova, 2020, Petrova, 2024, Juranovic, *et al.*, 2019). S-a dovedit că pinul negru reacționează la poluarea atmosferică printr-o multitudine de tipuri de răspuns inclusiv la nivel genetic și epigenetic (Katsidi *et al.*, 2023).

Analizele la microscopul electronic cu baleiaj au permis identificarea de depuneri cu morfologii diverse, variind de la cristaloides prismatice, structuri granulare laxe sau compacte, cruste, pelicule, agregate amorfe sau microsferice.

Analizele elementale au demonstrat că particulele identificate pe probele analizate de noi au o compoziție diversă și complexă care cuprinde: Aluminiu, Siliciu, Calciu, Magneziu, Mangan, Fier, Fosfor, Sulf, Potasiu, Plumb, Ytriu, Zirconiu, Stibiu, Staniu, Stronțiu, Argint, Cobalt, Titan, Germaniu, Cesium, Arsen, Clor, Vanadiu. Elemente ca Zinc, Mangan, Vanadiu, Bariu, Aluminiu, Zirconiu, Ytriu, Cesium, Rubidiu, Stibiu, Staniu, Bariu,

Crom, Fier și Cupru sunt recunoscute ca fiind principalele componente ale particulelor generate de traficul rutier (Hjortenkrans *et al.*, Guéguen *et al.*, 2012). Principalele surse de contaminare din zonele cu trafic intens sunt gazele de exhaustare (în special, Nichel și Zinc), particulele generate de uzura frânelor și cele din uzura anvelopelor. Se consideră că principalele metale emise prin uzura frânelor sunt Cuprul, Stibiul și Zincul, în timp ce Plumbul și Cadmiul sunt considerate reziduuri istorice emise prin utilizarea aditivilor la combustibili (Johansson *et al.*, 2009, Hjortenkrans *et al.*, 2006). În plus, față de elementele semnalate în literatură ca fiind generate de traficul rutier, analizele efectuate de noi au identificat și alte elemente cum ar fi: Zirconiu, Stibiu, Staniu, Stronțiu, Argint, Cobalt, Titan, Germaniu, Cesium, Arsen, Clor și Vanadiu. Aceste elemente ar putea proveni tot din uzura sistemelor de frânare deoarece materialele utilizate la producerea acestora sunt foarte diverse. De asemenea, alte activități, cum ar fi generarea de căldură în centralele termice sau focurile de artificii, pot genera o varietate de elemente aeropurtate. De exemplu, spectacolele pirotehnice generează particule care conțin Potasiu, Bariu, Stronțiu, Cadmiu, Sulf și Fosfor (Kumar *et al.*, 2016).

O categorie specială de depuneri identificate este cea reprezentată de microsferă. Datorită dimensiunilor mici, adesea sub $3\mu\text{m}$, acestea se încadrează în categoria *particulelor în suspensie de $2,5\mu\text{m}$* , așa-numitele PM_{2,5}. În prezent, sunt publicate studii privind aspectul și compoziția particulelor rezultate din gazele de exhaustare (Chernyshev *et al.*, 2018, Pallares *et al.*, 2019, Wang *et al.*, 2019, Chernyshev *et al.*, 2018, Neer & Koylu, 2006), dar în niciun studiu nu sunt descrise particule perfect sferice cu astfel de origine. Rezultatele noastre demonstrează că microsferă aeropurtate pot proveni și din gazele de exhaustare. În materialul prelevat din interiorul țevilor de exhaustare ale unor autovehicule cu motoare cu ardere internă care folosesc motorină și, respectiv benzină au fost izolate particule microsferice cu același aspect, dimensiuni și compoziție ca cele identificate pe suprafețele foliare (Rapoartele EDX sunt disponibile în Anexa 2). Datorită dimensiunilor reduse, aceste particule sunt cu risc pentru o serie de afecțiuni asociate cu PM_{2,5} care includ boli respiratorii, cardiovasculare, neurologice sau dermatologice (Valavanidis *et al.*, 2008, Wu *et al.*, 2019, Manisalidis *et al.*, 2020, Zhang *et al.*, 2015, Yang *et al.*, 2020, Sierra-Vargas *et al.*, 2023, Kim *et al.*, 2020). Rezultatele noastre au indicat că microsferă rezultate din exhaustare conțin cantități apreciabile de Aluminiu (între 2,79% și 11,88% din greutatea microsferă) care inhalat odată cu microsferă poate ajunge în sistemul circulator și de aici în mai multe țesuturi, inclusiv în cel cerebral. Se cunoaște faptul că Aluminiul poate traversa

bariera sânge-țesut cerebral (hemato-encefalică), acumulându-se în arii cerebrale care sunt bogate în receptorii transferinei (Inan-Eroglu & Ayaz, 2018). În prezent, sunt disponibile studii în care sunt aduse dovezi privind efectul neurotoxic al Aluminiului, care includ formarea plăcii beta-amiloide și a nodurilor neurofibrilare – factori etiologici primari ai instalării maladiei Alzheimer (Exley, 2017, Exley & Clarkson, 2020).

5. CONCLUZII

1. Specia *Pinus nigra* prezintă o serie de calități care o recomandă ca biomonitor al calității aerului. Acestea sunt: rezistența crescută la poluanții atmosferici, capacitatea de a adapta la condițiile mediului urban, manifestarea unor răspunsuri ușor detectabile sub ațiunea poluanților atmosferici și frecvența ca specie decorativă în peisajul urban, de-a lungul arterelor rutiere în parcuri și în diverse tipuri de spații verzi.
2. Manifestarea asimetriei foliare la pinul negru poate fi un indicator al expunerii la poluare. Acest parametru se evidențiază la pinul negru prin fluctuații ale greutateii și lungimii acelor perechi.
3. Modificări structurale evidente ca: dezvoltarea de canale rezinifere suplimentare, degradarea floemului, hipertrofierea celulelor Strasburger și acumularea de compuși fenolici în țesuturi care în mod obișnuit nu produc acest tip de compuși, pot fi indicatori ai expunerii la poluare.
4. Alterarea prematură a configurației stratului de ceară, celule epidermice cu pereți cutinizați neuniform, suprafețe foliare neregulate, alterarea prematură a structurii complexului stomatic sunt manifestări de răspuns la poluare și pot fi utilizate ca indicatori ai poluării atmosferice.
5. Serațiile mediane anormale identificate pe suprafața limbului foliar la *Pinus nigra*, sunt aberații structurale semnalate pentru prima dată la o specie de conifere și pot fi utilizate ca biomarkeri ai poluării.
6. Prezența micromorfologiei de tip ”inel Florin” este menționată pentru prima dată la specia *Pinus nigra*, și se poate constitui într-un indicator al poluării.
7. Colonizarea masivă cu fungi a suprafețelor foliare poate fi un indicator al eroziunii de la nivel epicuticular cauzată de diverse agenți poluanți.

8. Toți indicatorii identificați sunt biomarkeri ai poluării și pot constitui baza unor protocoale rapide și la costuri reduse de evaluare a calității mediului .
9. *Pinus nigra* este un excelent material de studiu pentru identificarea diverselor particule aeropurtate. Depunerile consistente de ceară epicuticulară imobilizează o varietate de particule aeropurtate, arborii de pin negru acționând ca un eficient ”filtru verde”.
10. Depunerile de pe suprafețele foliare au aspect, structură și compoziție elementală diferită, cele mai multe conținând Siliciu și Aluminiu dar și Calciu, Magneziu, Mangan, Fier, Fosfor, Sulf, Potasiu, Plumb, Ytriu, Zirconiu, Stibiu, Staniu, Stronțiu, Aur, Argint, Cobalt, Titan, Germaniu, Cesium, Arsen, Clor, Vanadiu..
11. Principalele surse de contaminare din zonele cu trafic intens sunt gazele de exhaustare, particulele generate de uzura frânelor și cele din uzura anvelopelor. La acestea se adaugă și alte tipuri de particule generate de activități antropice cum sunt arderea cărbunilor sau spectacolele pirotehnice.
12. Microsferele identificate pe suprafețele foliare ale acelor expuse traficului intens provin și din materialul exhaustat de automobile, atât la cele cu benzină cât și la cele cu motorină, nu numai din arderea cărbunelui așa cum se specifică în literatura de specialitate.
13. Microsferele identificate, deoarece au dimensiuni mici sunt respirabile și prezintă un risc crescut pentru sănătate, microparticulele aeropurtate fiind asociate cu dezvoltarea de afecțiuni respiratorii, cardiovasculare și neurologice.
14. Microsferele care conțin Aluminiu odată inhalate pot prezenta un risc pentru dezvoltarea de anomalii structurale la nivelul țesutului cerebral care sunt recunoscute ca fiind precursori instalării maladiei Alzheimer.
15. Simpla evaluare a depunerilor existente pe acele de pin negru poate oferi informații valoroase asupra particulelor aeropurtate cu risc crescut pentru sănătate.

Bibliografie selectivă

1. Baroudi, F., Al-Alam, J., Chimjarn, S., Haddad, K., Fajloun, Z., Delhomme, O. and Millet, M., 2022. Use of *Helix aspersa* and *Pinus nigra* as Bioindicators to study temporal air pollution in Northern Lebanon. *International Journal of Environmental Research*, 16(1), p.4.
2. Baroudi, F., Al-Alam, J., Delhomme, O., Chimjarn, S., Fajloun, Z. and Millet, M., 2021. The use of *Pinus nigra* as a biomonitor of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in Lebanon. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, pp.10283-10291.
1. Bartosz, G., 1997. Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 19, 47e64.
3. Berlizov, A. N., Blum, O. B., Filby, R. H., Malyuk, I. A., și Tryshyn, V. V., 2007. Testing applicability of black poplar (*Populus nigra* L.) bark to heavy metal air pollution monitoring in urban and industrial regions. *Science of the Total Environment*, 372(2-3), 693-706.
2. Brodribb, T., Hill, R.S., 1997. Imbricacy and stomatal wax plugs reduce maximum leaf conductance in southern hemisphere conifers. *Australian Journal of Botany* 45: 657–668. doi: 10.1071/bt96060.
3. Cape, J.N., 1994. Evaluation of pollutant critical levels from leaf surface characteristics in air pollutants and the leaf cuticle (pp. 123-138). *Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg*.
4. Chernyshev, V. V., Zakharenko, A. M., Ugay, S. M., Hien, T. T., Hai, L. H., Kholodov, A. S., Burykina, T.I., Stratidakis A.K., Mezhuev, Ya. O., Tsatsakis, A.M., Golokhvast, K. S., 2018. Morphologic and chemical composition of particulate matter in motorcycle engine exhaust. *Toxicology Reports*, 5, 224-230
5. Chernyshev, V. V., Zakharenko, A. M., Ugay, S. M., Hien, T. T., Hai, L. H., Kholodov, A. S., Burykina, T.I., Stratidakis A.K., Mezhuev, Ya. O., Tsatsakis, A.M., Golokhvast, K. S., 2018. Morphologic and chemical composition of particulate matter in motorcycle engine exhaust. *Toxicology Reports*, 5, 224-230.
4. Chiarantini, L., Rimondi, V., Benvenuti, M., Beutel, M.W., Costagliola, P., Gonnelli, C., Lattanzi, P. and Paolieri, M., 2016. Black pine (*Pinus nigra*) barks as biomonitors of airborne mercury pollution. *Science of the Total Environment*, 569: 105-113.
5. Chudzińska, E., Diatta, J. B., & Wojnicka-Półtorak, A., 2014. Adaptation strategies and referencing trial of Scots and black pine populations subjected to heavy metal pollution. *Environmental science and pollution research*, 21, 2165-2177.
6. Deckert, R.J., Melville, L.H., Peterson, R.L., 2001. Epistomatal chambers in the needles of *Pinus strobus* L. (eastern white pine) function as microhabitat for specialized fungi. *International Journal of Plant Sciences* 162: 181–189. doi: 10.1086/317905.
7. DuToit, S.H., Steyn, A.G.W. and Stumpf, R.H., 2012. Graphical exploratory data analysis. *Springer Science & Business Media*.
8. EEA, 2019. Air quality in Europe — 2019 report No 10/2019. *European Environment Agency* (<https://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2019> - accesat la 20.07.2020).

9. EEA, 2019. Cutting air pollution in Europe would prevent early deaths, improve productivity and curb climate change (<http://www.eea.europa.eu/highlights/cutting-air-pollution-in-europe> - accesat la 8.06.2020).
10. Exley, C., 2017. Aluminum should now be considered a primary etiological factor in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, 1(1), 23-25.
11. Exley, C., Clarkson, E., 2020. Aluminum in human brain tissue from donors without neurodegenerative disease: A comparison with Alzheimer's disease, multiple sclerosis and autism. *Scientific Reports*, 10(1), 1-7.
12. Gill, M., 2014. Heavy Metal Stress in Plants: a review. *International Journal of Advanced Research*, 2(6), 1043-1055.
13. Gostin, I., 2007. Biomarkeri structurali la plante. *Editura Universității „Alexandru Ioan Cuza”, Iași*. ISBN 9737032918, 184p.
14. Grodzińska-Jurczak, M., 1998. Conifer epicuticular wax as a biomarker of air pollution: an overview. *Acta societatis botanicorum Poloniae*, 67(3-4), p.291.
15. Guéguen, F., Stille, P., Dietze, V., Gieré, R., 2012. Chemical and isotopic properties and origin of coarse airborne particles collected by passive samplers in industrial, urban, and rural environments. *Atmospheric Environment*, 62, 631-645.
16. Günthardt-Goerg, M.S. și Vollenweider, P., 2007. Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: new diagnostic perspectives. *Environmental pollution*, 147(3), pp.467-488.
17. Heath, M.C., 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44, 321e334.
18. Hjortenkrans, D., Bergbäck, B., Häggerud, A., 2006. New metal emission patterns in road traffic environments. *Environmental Monitoring and Assessment*, 117, 85-98.
19. Hjortenkrans, D., Bergbäck, B., Häggerud, A., 2006. New metal emission patterns in road traffic environments. *Environmental Monitoring and Assessment*, 117, 85-98.
20. Honour, S.L., Bell, J.N.B., Ashenden, T.W., Cape, J.N., Power, S.A., 2009. Responses of herbaceous plants to urban air pollution: effects on growth, phenology and leaf surface characteristics. *Environmental pollution*, 157(4), 1279-1286.
21. Inan-Eroglu, E. and Ayaz, A., 2018. Is aluminum exposure a risk factor for neurological disorders?. *Journal of Research in Medical Sciences*, 23(1), p.51.
22. Iordanidis, A., Buckman, J., Triantafyllou, A. G., Asvesta, A., 2008. Fly ash–airborne particles from Ptolemais–Kozani area, northern Greece, as determined by ESEM-EDX. *International Journal of Coal Geology*, 73(1), 63-73.
23. Johansson, C., Norman, M., Burman, L., 2009. Road traffic emission factors for heavy metals. *Atmospheric Environment*, 43(31), 4681-4688.
24. Juranović Cindrić, I., Zeiner, M., Starčević, A. and Stingerer, G., 2019. Metals in pine needles: characterisation of bio-indicators depending on species. *International journal of environmental science and technology*, 16(8), pp.4339-4346.
6. Katsidi, E.C., Avramidou, E.V., Ganopoulos, I., Barbas, E., Doulis, A., Triantafyllou, A. and Aravanopoulos, F.A., 2023. Genetics and epigenetics of *Pinus nigra* populations with differential exposure to air pollution. *Frontiers in Plant Science*, 14, p.1139331.

25. Katsidi, E.C., Avramidou, E.V., Ganopoulos, I., Barbas, E., Doulis, A., Triantafyllou, A. and Aravanopoulos, F.A., 2023. Genetics and epigenetics of *Pinus nigra* populations with differential exposure to air pollution. *Frontiers in Plant Science*, 14, p.1139331.
7. Kaya, G., Ozcan, C. and Yaman, M., 2010. Flame atomic absorption spectrometric determination of Pb, Cd, and Cu in *Pinus nigra* L. and *Eriobotrya japonica* leaves used as biomonitors in environmental pollution. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 84, pp.191-196.
8. Keskin, N., şi Ili, P., 2012. Investigation of particular matters on the leaves of *Pinus nigra* Arn. subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe in Denizli (Turkey). *Pak. J. Bot*, 44(4), 1369-1374.
26. Kim, H., Kim, W-H., Kim, Y-Y., Park, H-Y., 2020. Air Pollution and Central Nervous System Disease: A Review of the Impact of Fine Particulate Matter on Neurological Disorders. *Frontiers in Public Health*, 8:575330.
9. Klánová, J., Čupr, P., Baráková, D., Šeda, Z., Anděl, P., & Holoubek, I., 2009. Can pine needles indicate trends in the air pollution levels at remote sites?. *Environmental Pollution*, 157(12), 3248-3254.
10. Koksal, S. E., Kelleci, O., Tekingunduz, G., & Aydemir, D., 2024. The influence of road traffic and industrial plant-induced air pollution on the physical, mechanical, chemical and morphological properties of the black pine wood. *Maderas: Ciencia y tecnología*, 26(1), 1.
27. Kumar, M., Singh, R. K., Murari, V., Singh, A. K., Singh, R. S., Banerjee, T. 2016. Fireworks induced particle pollution: a spatio-temporal analysis. *Atmospheric Research*, 180, 78-91.
28. Mamedova, A.O. and Farzalieva, N.M., 2020. *Pinus eldarica* Medw. As indicator of vehicular pollution. *Вестник Нижневартковского государственного университета*, (1), pp.134-139.
29. Mammadova, A.O., 2009. Phytoindicator and environmental quality management. *Annals of Agrarian Science*, 7(4), pp.58-60.
30. Manisalidis, I., Stavropoulou, E., Stavropoulos, A., Bezirtzoglou, E., 2020. Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review. *Frontiers in Public Health*, 8:14.
31. Manninen, S. şi Huttunen, S., 1995. Scots pine needles as bioindicators of sulphur deposition. *Canadian Journal of Forest Research*, 25(10), pp.1559-1569.
32. Martín, J.R., De Arana, C., Ramos-Miras, J.J., Gil, C., Boluda, R., 2015. Impact of 70 years urban growth associated with heavy metal pollution. *Environmental pollution*, 196, 156-163.
33. Matyssek, R., Günthardt-Goerg, M.S., Maurer, S., Keller, T., 1995. Nighttime exposure to ozone reduces whole-plant production in *Betula pendula*. *Tree physiology*, 15(3), pp.159-165.
34. Mohammadian, M. A., Hill, R. S. & Watling, J. R., 2009. Stomatal plugs and their impact on fungal invasion in *Agathis robusta*. *Australian Journal of Botany*, 57(5), 389-395.

35. Nathanson, J.A., 2020. Air pollution. *Encyclopedia Britannica*, <https://www.britannica.com/science/air-pollution>. Accesat la 08-12-2020.
36. Neer, A., Koylu, U. O., 2006. Effect of operating conditions on the size, morphology, and concentration of submicrometer particulates emitted from a diesel engine. *Combustion and Flame*, 146(1-2), 142-154.
37. Pallarés, S., Gómez, E. T. & Jordán, M. M., 2019. Typological characterization of mineral and combustion airborne particles indoors in primary schools. *Atmosphere*, 10(4), 209.
38. Parzych, A., și Sobisz, Z., 2012. The macro-and microelemental content of *Pinus sylvestris* L. and *Pinus nigra* JF Arn. needles in Cladonio-Pinetum habitat of the Słowiński National Park.
39. Pasqualini, V., Robles, C., Garzino, S., Greff, S., Bousquet-Mélou, A., & Bonin, G., 2003. Phenolic compounds content in *Pinus halepensis* Mill. needles: a bioindicator of air pollution. *Chemosphere*, 52(1), 239-248.
40. Pautov, A., Bauer, S., Ivanova, O., Krylova, E., Sapach, Y., Gussarova, G., 2017. Role of the outer stomatal ledges in the mechanics of guard cell movements. *Trees*, 31(1), 125-135.
41. Petrova, S. T., 2020. Efficiency of *Pinus nigra* JF Arnold in removing pollutants from urban environment (Plovdiv, Bulgaria). *Environmental Science and Pollution Research*, 27(31), 39490-39506.
42. Petrova, S., 2024. The Added Value of Urban Trees (*Tilia tomentosa* Moench, *Fraxinus excelsior* L. and *Pinus nigra* JF Arnold) in Terms of Air Pollutant Removal. *Forests*, 15(6), p.1034.
43. Rai, P. K., 2013. Environmental magnetic studies of particulates with special reference to biomagnetic monitoring using roadside plant leaves. *Atmospheric Environment*, 72, 113-129.
44. Samet, J.M., 2007. Traffic, air pollution, and health. *Inhalation Toxicology*, 19(12), 1021-1027.
45. Sierra-Vargas, M.P., Montero-Vargas, J.M., Debray-García, Y., Vizuet-de-Rueda, J.C., Loeza-Román, A., Terán, L.M., 2023. Oxidative Stress and Air Pollution: Its Impact on Chronic Respiratory Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (1), 853.
46. Ștefănuț, S., Manole, A., Ion, C.M, Öllerer, K.Á, Onete, M., Manu, M., Vicol, I., Moldoveanu M.M., Maican S., Banciu C., Cobzaru I., Nicoară R.G., Florescu L.I., Mogîldea, E.D., Purice, D.-M., Nicolae, C.D., Catană, R.D., Văleanu, V.F., Constantin, M., 2017. Ghid de utilizare a speciilor în programele de biomonitorizare. (<https://www.ibiol.ro/biomonro/pdf/ghid/ghidbiomonitorizare.pdf> - accesat la 8.05.2020)
47. Thawale, P.R., Satheesh Babu, S., Wakode, R.R., Singh, S.K., Kumar, S., Juwarkar, A.A., 2011. Biochemical changes in plant leaves as a biomarker of pollution due to anthropogenic activity. *Environmental monitoring and assessment*, 177, pp.527-535.
48. Valavanidis, A., Fiotakis, K., Vlachogianni, T., 2008. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of

- particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *Journal of Environmental Sciences and Health, Part C.*, 26 (4), 339-362.
49. Wang, X., Wang, Y., Bai, Y., Wang, P. & Zhao, Y., 2019. An overview of physical and chemical features of diesel exhaust particles. *Journal of the Energy Institute*, 92(6), 1864-1888.
 50. Wu, L., Luo, X. S., Li, H., Cang, L., Yang, J., Yang, J., Yang, J., Zhao, Z., Tang, M., 2019. Seasonal levels, sources, and health risks of heavy metals in atmospheric PM_{2.5} from four functional areas of Nanjing city, eastern China. *Atmosphere* 10(7), 419.
 51. Yang, J. B., Yun, H. J., Yeon, M. J., Jeoung, D., Jo, K. N., Jung, H. S., 2020. Electron microscopic and spectroscopic analysis of airborne ultrafine particles: its effects on the cell viability. *Journal of Analytical Sciences and Technology*, 11, 1-8.
 52. Zeiner, M., Juranović Cindrić, I., 2021. Accumulation of major, minor and trace elements in pine needles (*Pinus nigra*) in Vienna (Austria). *Molecules*, 26(11), p.3318.
 53. Zhang, R., Wang, G., Guo, S., Zamora, M. L., Ying, Q., Lin, Y., Wang, W., Hu, M., Wang, Y., 2015. Formation of urban fine particulate matter. *Chemical reviews*, 115(10), 3803-3855.
 54. Zsigmond, A. R., Száraz, A., & Urák, I., 2021. Macro and trace elements in the black pine needles as inorganic indicators of urban traffic emissions. *Environmental Pollution*, 291, 118228.