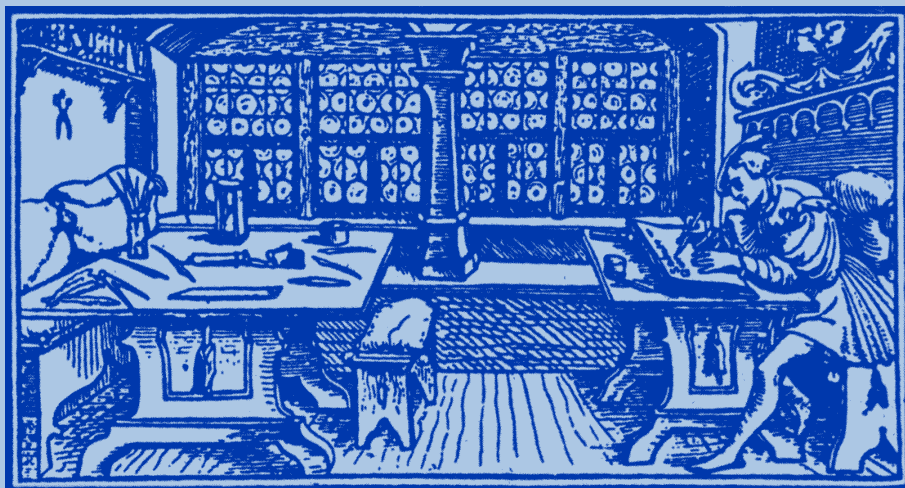


# STUDIA

UNIVERSITATIS  
BABEȘ-BOLYAI

B i o l o g i a

C L U J - N A P O C A 2 0 0 5



# S T U D I A

## UNIVERSITATIS BABEȘ–BOLYAI

### BIOLOGIA

2

---

**EDITORIAL OFFICE:** Republicii no. 24, 400015 Cluj-Napoca • Phone 0264-40.53.52

---

#### SUMAR – CONTENTS – SOMMAIRE – INHALT

O. POPESCU, Victor Babeș – schiță biografică .....	5
<u>S. KISS</u> , Victor Babeș – microbiolog .....	9
N. TOMESCU, D. MUREȘAN, L. OLARU, R. HOTEA, Terrestrial Isopod Communities ( <i>Crustacea, Isopoda</i> ) in Riverside Coppices and Meadows of Mountainous, Hilly and Depression Areas .....	19
V. BERCEA, Studii ecofiziologice la plante arbustive endemice sub presiunea factorilor de habitat. I. Studiul procesului de creștere * Ecophysiological Studies of Endemic Shrubs Exposed to Habitat Factors' Pressure. I. Study on Growth Process .....	27
V. BERCEA, Studii ecofiziologice la plante arbustive endemice sub presiunea factorilor de habitat. II. Evoluția conținutului în pigmenți asimilatori * Ecophysiological Studies of Endemic Shrubs Exposed to Habitat Factors' Pressure. II. The Dynamic of Assimilatory Pigment Contents .....	37
V. BERCEA, Studii ecofiziologice la plante arbustive endemice sub presiunea factorilor de habitat. III. Studiul unor componente celulare (proteine, hidrați de carbon) * Ecophysiological Studies of Endemic Shrubs Exposed to Habitat Factors' Pressure. III. Study on some Cellular Components (Proteins and Carbohydrates) .....	49
G. PERSEGHIN, L. PICENI-SERENI, C. LANG, L. LUZI, Metabolic Outcome of Rapamycin Administration in Type 1 Diabetes Mellitus.....	63
C. LANG, E. DRĂGHICI, C. TARBA, Prevention of Spontaneous Autoimmune Diabetes in Non Obese Diabetic Mice by Rapamycin and Rapamycin-IL-10 Combination.....	73
C. PAȘCA, V.-D. SANDU, M. GORDAN, Comparative Structural and Ultrastructural Aspects of the Toxic Effect of Carboplatin and Cisplatin at the Level of the Thymus of the White Wistar Rats.....	81
V.-D. SANDU, C. PAȘCA, M. GORDAN, Structural and Ultrastructural Aspects of the Nephrotoxicity and Cardiotoxicity of Carboplatin (Paraplatin) in White Wistar Rats .....	99

- A. FLOREA, C. CRĂCIUN, C. PUICĂ, Modificări structurale și ultrastructurale produse în glandele suprarenale după administrarea experimentală a veninului de albine (*Apis mellifera* L.) I. Glandele corticosuprarenale \* Structural and Ultrastructural Changes Produced in Adrenal Glands Consequently to the Honey Bee Venom Experimental Administration. I. The Adrenal Cortex ..... 111
- A. FLOREA, C. CRĂCIUN, C. PUICĂ, Modificări structurale și ultrastructurale produse în glandele suprarenale după administrarea experimentală a veninului de albine (*Apis mellifera* L.) II. Glandele medulosuprarenale \* Structural and Ultrastructural Changes Produced in Adrenal Glands Consequently to the Honey Bee Venom Experimental Administration. II. The Adrenal Medula ..... 127
- M. DRĂGAN-BULARDA, G. PILCĂ, E. TUROS, Cercetări privind dinamica creșterii și a fermentării glucidelor la o tulpină de *Saccharomyces cerevisiae* utilizată în industria spirtului \* Researches Concerning the Growth Dynamic and Glucides Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* Strains Used in Spirt Industry ..... 137
- M. CURTICĂPEAN, M. DRĂGAN-BULARDA, The Quantitative Distribution of Some Ecological Groups of Bacteria from the Tarnița Dam Reservoir – Cluj County ..... 147
- L. D. ȘTEF, M. DRĂGAN-BULARDA, V. MUNTEAN, Analiza germenilor coliformi de-a lungul râului Mureș, pe sectorul Răstolița-Alba Iulia, în anul 2003 \* Analysis of Coliform Germs along the Mureș River, between Răstolița and Alba Iulia, during 2003 .. 165
- V. MUNTEAN, L. D. ȘTEF, M. DRĂGAN-BULARDA, Cercetări microbiologice asupra unor sedimente de pe cursul mijlociu al râului Mureș \* Microbiological Research on Sediments from the Middle Sector of the Mureș River ..... 175
- C. BUZAN, M. DRĂGAN-BULARDA, Cercetări asupra poluării fecaloide a apei râului Someș \* Research on the Faecaloid Pollution of the the Someș River Water ..... 183
- C. BUZAN, M. DRĂGAN-BULARDA, Cercetări enzimologice asupra sedimentelor râului Someș la confluența cu râul Lăpuș \* Enzymological Research on Sediments from the Someș at Confluence with the Lăpuș River ..... 189
- D. PAȘCA, R. PAȘCA, Analiza enzimologică a unor zăcăminte de turbă din România \* Enzymological Analysis of Some Romanian Peatlands ..... 195
- L. OPREAN, E. GASPARGASPAR, Capacități maltazice și de multiplicare ale unor tulpini de drojdii de panificație \* Maltasic and Multiplication Capacity of Some Baker's Yeasts Strains.. 205
- R. CRIȘAN, Cercetări microbiologice în turbe oligotrofe din bazinele hidrografice ale Someșului Cald și Someșului Rece și a turbei terapeutice de la Băile Someșeni \* Microbiological Researches on Oligotrophic Peats from the Hydrographic Basins of Someșul Cald and Someșul Rece and Therapeutic Peat from Băile Someșeni – Cluj..... 213
- H. BANCIU, Taxonomy and Physiology of the Obligately Chemolithoautotrophic, Alkaliphilic Sulfur-Oxidizing Bacteria from Soda Lakes..... 221

Acest volum cuprinde și lucrări susținute la

**Simpozionul Omagial**  
**“150 de ani de la nașterea lui Victor Babeș”**

(25-26 iunie 2004, Cluj-Napoca).

Simpozionul a fost organizat sub patronajul  
Rectoratului Universității “Babeș-Bolyai” și în mod special cu sprijinul  
Prof. Univ. Dr. Vasile CRISTEA și al Prof. Univ. Dr. Octavian POPESCU

**DR. VICTOR BABEȘ**  
**(28 iulie 1854, Viena - 18 octombrie 1926, București)**  
**- schiță biografică -**

Al doilea din cei nouă copii (șase băieți și trei fete) ai familiei Vincențiu BABEȘ, **Victor Babeș** s-a născut la Viena în 28 iulie 1854 în apartamentul din Sankt Ulrichgasse; mama sa, Sofia HOLDSCHIED, provenea dintr-o familie vieneză înstărită.

Victor Babeș a moștenit de la tatăl său tendința spre austeritate, nevoia de ordine și disciplină, perseverența și conștiinciozitatea, spiritul combativ și înclinarea spre înflăcăări generoase, iar de la mama sa sensibilitatea și înclinarea ușor romantică.

A urmat studiile primare la Viena pe care le-a absolvit după doi ani; a susținut în particular două clase într-un an. Între 1862 și 1865 a urmat cursurile gimnaziale la Lugoj, când a învățat limba română; în această perioadă a locuit în casa bunului prieten al tatălui său, Iulian Ianculescu.

În 1863 familia Babeș se mută la Budapesta într-o locuință din apropierea podului Franz Joseph. În 1866, după ce revine de la Lugoj, este înscris în clasa a III-a la Liceul Piaristilor din Buda. La vârsta de 14 ani începe să scrie poezii în limba germană. În timpul studiilor liceale, începând din 1868, își ajută familia prin lecțiile de științe naturale, istorie și latină, pe care le dă celor interesați în afara programului școlar.

În toamna anului 1871, după absolvirea liceului se înscrie la Conservatorul de Muzică, dar după 2-3 luni renunță la conservator și se înscrie la Facultatea de Medicină din Budapesta (începutul iernii 1871). Victor Babeș promovează cu rezultate excepționale primele examene, în special la Botanică. Datorită acestor rezultate devine membru al Societății Regale Ungare de Științe Naturale.

În 1872 pleacă la Viena, unde se înscrie în anul al II-lea la Facultatea de Medicină, după ce promovează examenul de echivalență. Din 1873 beneficiază de o bursă a Fundației Gojdu. Datorită pregătirii sale excepționale, în 1873 este numit demonstrator la cursul de Anatomie al profesorului Langer (12 ore pe săptămână). În continuare, în anul al III-lea de studii (1873-1874) este remarcat de profesorul Rokitansky, șeful Catedrei de Anatomie Patologică. Profesorul Gustav Scheuthauer, de la Facultatea de Medicină din Budapesta, îi cere profesorului Rokitansky ajutorul în recrutarea unui tânăr medic care să-i urmeze la catedră. Astfel, profesorul Rokitansky îl propune pe tânărul Victor Babeș asistent la Catedra de Anatomie Patologică a Facultății de Medicină din Budapesta. De obicei, numai absolvenții facultății erau propuși pentru astfel de posturi. În toamna anului 1874 este numit mai întâi provizoriu, iar în octombrie 1875 definitiv, asistent al profesorului Scheuthauer, șeful Catedrei de Anatomie Patologică a Facultății de Medicină din Budapesta. În această calitate, Victor Babeș efectuează zilnic autopsii la Spitalul pentru copii săraci "Ștefania" din Budapesta. Tot aici organizează primul laborator de specialitate din Ungaria și din

Europa Centrală. În prezent, clădirea în care a lucrat Victor Babeș aparține de Clinica de Pediatrie a Universității Semmelweis. Pe 18 noiembrie 2005 a fost dezvelită oficial placa comemorativă Victor Babeș.

În 1876, Victor Babeș termină studiile la Facultatea de Medicină din Budapesta. Doi ani mai târziu, în 2 august 1878, obține titlul de Doctor în Medicină cu profesorul Heschl la Viena (profesorul Rokitansky murise în primăvară) cu calificare pentru specialitățile: chirurgie, oftalmologie și obstetrică.

În 1880, la sugestia tatălui său, Vincențiu Babeș (membru fondator al Societății Academice Române, ulterior Academia Română), publică în *Revista Științifică* din România lucrarea "Considerațiuni asupra raportului științelor naturale către filosofie".

Adept al maximei lui Juvenal: *Mens sana in corpore sano*, dr. Victor Babeș a fost și un sportiv desăvârșit. Astfel, în calitate de membru al Clubului Nautic "Hunia" traversează înot Lacul Balaton (7 km, în porțiunea sa cea mai îngustă).

În 1882, dr. Victor Babeș o cunoaște pe viitoarea soție **Iozefina TORMA** (fiica lui Carol Torma, arheolog și profesor de Drept Roman la Budapesta), cu care se va căsători în 1886 (19 aprilie).

Între 1877 și 1882 publică peste 30 de lucrări științifice în reviste de specialitate maghiare (în special, *Orvosi Hetilap*, Gazeta Săptămânală Medicală) și germane; prima publicație s-a intitulat "Sifilisul congenital".

Profesorul (din 1874 și mentorul său) Gustav Scheuthauer îl propune în 1882 pentru o bursă a guvernului ungar în Germania și Franța. În drum spre Paris se oprește la Viena, München și Heidelberg. La München îi cunoaște pe Otto von Bollinger și Hugo von Ziemssen (Ziemssen îl solicită să scrie capitolul referitor la tumorile pielii din viitorul său tratat de patologie). La Heidelberg lucrează în laboratorul profesorilor Arnold și Thoma unde pune la punct trei metode noi de colorare histologică. Acestea sunt prezentate în lucrarea "Asupra unor metode de colorare, în special pentru țesuturile bolnave, cu ajutorul safraninei și rezultatele obținute" publicată în *Archiv für mikroskopische Anatomie*.

La sfârșitul anului 1882 (30 decembrie) ajunge la Paris și își începe activitatea ca preparator la Institutul de Anatomie Patologică fondat de André-Victor Cornil și Louis Ranvier. Aici se bucură de aprecierea lui Cornil (elev al lui Virchow), titularul Catedrei de Anatomie Patologică a Facultății de Medicină din Paris, care îi propune să colaboreze la un tratat de bacteriologie.

În cursul anului 1883, dr. Victor Babeș prezintă mai multe comunicări științifice importante la Academia de Științe, Societatea de Biologie și Societatea de Anatomie din Paris.

Pe lângă activitatea la Institutul de Anatomie Patologică, dr. Victor Babeș intră în contact cu Louis Pasteur, Jean Martin Charcot, Paul Bert, Charles-Joseph Bouchard, Aristide Auguste Stanislas Verneuil și Alfred Vulpian.

Semnificativ este faptul că la două săptămâni după sosirea sa la Paris, dr. Victor Babeș este solicitat să verifice rezultatul autopsiei lui Gambetta. În final, dr. Victor Babeș infirmă concluzia primei autopsii și pune diagnosticul de peritonită generalizată provocată de perforarea apendicelui.

În timp ce se documenta pentru tratatul de bacteriologie (câteva luni), dr. Victor Babeș publică 16 lucrări în reviste medicale franceze, germane și maghiare.

În mai multe rânduri, dr. Victor Babeș poartă discuții de specialitate cu Louis Pasteur, care din 1856 era administratorul și directorul studiilor științifice la École Normale Supérieure, rue d'Ulm, Paris; în 1867, Pasteur inaugurează un nou laborator în rue d'Ulm. Actualul Institut Pasteur a fost inaugurat în 1888.

Dr. Victor Babeș este nevoit să revină la Budapesta în toamna anului 1883.

Anul următor, pe 4 octombrie 1884, ajunge la Berlin unde îi vizitează pe Rudolf Virchow și Robert Koch. Virchow îi prezintă pe Emil von Behring și Paul Ehrlich și îl solicită să organizeze și să conducă o secție de bacteriologie în institutul său. Dr. Victor Babeș observă imediat că relațiile între Virchow și Koch sunt tensionate.

După aproape o săptămână (10 octombrie 1884), dr. Victor Babeș este din nou la Paris, în calitate de invitat al profesorului Cornil. Continuă redactarea tratatului de bacteriologie, tratat care apare în 1885 sub titlul "**Bacteriile și rolul lor în etiologia, anatomia și histologia patologică a bolilor infecțioase**". Lucrarea, considerată primul tratat de bacteriologie din lume, se bucură de un succes extraordinar.

Ecourile acestui succes ajung și la Budapesta, unde dr. Victor Babeș este avansat de la docent la profesor universitar la Catedra de Histopatologie special creată cu această ocazie. Concomitent, în cadrul Spitalului "Ștefania", se înființează Institutul de Histopatologie. Agoston Trefort, ministrul Instrucțiunii Publice de la Budapesta, a avut o contribuție esențială în recunoașterea meritelor științifice ale doctorului V. Babeș. În acest fel, dr. Victor Babeș devine în 1885 cel mai tânăr profesor al Universității din Budapesta.

În perioada ianuarie-februarie 1886, dr. V. Babeș revine la Paris unde încearcă (fără succes) să-l convingă pe Pasteur să-l ajute să înființeze un centru antirabic la Budapesta. Până la urmă, la sfârșitul anului 1886, dr. V. Babeș reușește să deschidă un centru antirabic la Budapesta datorită virusului stabil (fix) primit de la Louis Pasteur.

Ecoul succeselor sale ajung și la București. Imediat, dr. V. Babeș primește vizita ministrului român al Instrucțiunii Publice, Dimitrie Sturza, care insistă să accepte invitația de a veni la București. Dr. V. Babeș promite că după încheierea anului universitar 1886-1887 va cere provizoriu un concediu de un an pentru a veni în România.

Între timp îmbunătățește tratamentul antirabic inițiat de Pasteur, prin punerea la punct a unor noi metode bazate pe propriile cercetări de laborator.

Adunarea Deputaților de la București votează în 1887 numirea doctorilor Gheorghe Asachi, Victor Babeș și Nicolae Kalinderu ca profesori la Facultatea de Medicină din București.

În luna august 1887, dr. V. Babeș ajunge la București, unde constată că promisiunile făcute nu pot fi îndeplinite: în locul sumei de 800 000 de lei „garantate” de Dimitrie Sturza i se oferă numai 100 000 de lei, iar în locul unei clădiri noi pentru Institutul de Patologie și Bacteriologie i se oferă o clădire veche închiriată!

În cele din urmă, inaugurarea Institutului de Patologie și Bacteriologie din București cu dr. V. Babeș director are loc în 30 noiembrie 1887. Clădirea actuală în care se află Institutul dr. Victor Babeș a fost construită 12 ani mai târziu (1899).

În foarte scurt timp, institutul se face cunoscut pe plan internațional prin cele două descoperiri capitale ale dr.-lui V. Babeș: **babesiile și principiul seroterapiei**, la care se adaugă **metoda română de vaccinare antirabică**.

În 1889 apare primul număr al *Analelor Institutului de Patologie și Bacteriologie din București*. Se subînțelege că dr. V. Babeș a avut o contribuție fundamentală la acest eveniment editorial.

Datorită dr.-lui V. Babeș, cercetarea științifică medicală românească cunoaște, un adevărat reviriment. Același lucru se poate spune și despre activitatea sanitaro-socială.

În 1912, dr. V. Babeș publică la Paris monografia clasică asupra turbării, lucrare încununată cu premiul Bréant al Academiei de Științe, "Institut de France".

În timpul Primului Război Mondial, dr. V. Babeș rămâne în București.

În 1919, Consiliul Dirigent, cu rol de guvern provizoriu în Transilvania, îl solicită pe profesorul V. Babeș să preia conducerea Catedrei de Anatomie Patologică și Bacteriologie la Universitatea din Cluj. Profesorul V. Babeș și soția sa Iozefina primesc două camere în vila profesorului Lechner (în prezent, Clinica de Neuropsihiatrie Infantilă).

Profesorul V. Babeș, pe lângă cele trei cursuri, organizează la Cluj Institutul de Anatomie Patologică și Institutul de Bacteriologie. În paralel, se ocupă de institutul și catedra din București.

În 1924, dr. V. Babeș împlinește 70 de ani, ocazie cu care este omagiat de foștii elevi și de studenții din țară, precum și de savanți și asociații științifice de peste hotare. Primește însemnele de Comandor al Legiunii de Onoare și un vibrant omagiu din partea Academiei de Medicină din Paris.

Prin Decretul din 2 martie 1925, Institutul de Patologie și Bacteriologie din București se numește "Institutul dr. Victor Babeș".

În noaptea de 18 spre 19 octombrie 1926, Victor Babeș se stinge din viață.

**Prof. Univ. Dr. Octavian POPESCU**



## VICTOR BABEȘ - MICROBIOLOG

În piosul nostru omagiu de recunoștință adus memoriei marelui microbiolog Victor Babeș, unul din fii de geniu ai poporului român, vom cita o parte din descoperirile sale microbiologice și vom căuta să subliniem importanța acestora în lumina realizărilor recente ale microbiologiei și biologiei moleculare. O exhaustivă trecere în revistă a descoperirilor lui Victor Babeș ar fi, pentru noi, o sarcină extrem de dificilă din motivul că de numele celebrului savant sunt legate un număr mare de descoperiri. Ne referim în acest sens la Baumgarten, microbiolog german contemporan cu Babeș, care a declarat că nu poate publica descoperirile sale decât după ce a consultat publicațiile lui Babeș pentru a se convinge că aceste descoperiri nu au fost descrise mai înainte de către Babeș.

Cercetările lui Babeș, în general, și cercetările sale microbiologice, în special, se caracterizează prin multilateralitate, printr-un diapazon larg al tematicii. Ele cuprind probleme de virusologie, bacteriologie, micologie și protistologie, cu teme de morfologie, fiziologie, biochimie, ecologie și taxonomie microbiană, din domeniul microbiologiei medicale, veterinare și a mediului ambiant.

În cercetările **virusologice** ale lui Babeș, agentul turbării (virusul rabic) ocupă un loc central. Babeș descoperă incluziile rabice în celulele nervoase ale animalelor și oamenilor morți de turbare. Primele sale observații asupra acestor incluzii le-a făcut în 1886. A descris și a desenat incluziile rabice într-o lucrare apărută în *Annales de l'Institut Pasteur* în 1892 și într-o altă publicație (*Handbuch der gesamten Therapie*, 1893). Incluziile rabice au fost redescoperite în 1903 de savantul italian Negri și astăzi ele poartă denumirea de *corpusculii Babeș-Negri*. Acești corpusculi sunt tipici pentru turbare, nu apar în bolile nerabice. Sunt deci de mare valoare pentru diagnosticul *post mortem* al turbării. Se evidențiază mai ales din neuronii cornului lui Amon. Sunt incluzii citoplasmice, nu se găsesc în nucleu. Au putut fi observați la microscopul fonic, deoarece au dimensiuni relativ mari (peste 1 μm). Forma lor este sferică sau ovoidă. Se colorează ușor cu coloranții de anilină. În stadiile timpurii, corpusculii sunt bazofili. În stadiile tardive, ei devin acidofili (euzinofili), dar pot conține una sau mai multe granule bazofile fine. Corpusculii se găsesc în interiorul unei vacuole care este înconjurată de o membrană. Corpusculii se pot grupa sub formă de rozetă sau roată.

Babeș a fost de părere că apariția incluziilor rabice este rezultatul reacției celulei împotriva agentului turbării: agentul turbării este învelit și sechestrat în citoplasmă. Incluziile nu reprezintă forma activă a agentului turbării, dar îl conțin în stare sechestrată. Considerând corpusculii timpurii, bazofili, drept nuclee celulare, Negri susținea că incluziile rabice sunt protozoare și reprezintă agentul turbării.

Constatările ulterioare au confirmat părerea lui Babeș și au infirmat ipoteza lui Negri. Astfel, s-a dovedit că incluziile rabice constau dintr-o substanță fundamentală (matrice) acidofilă, în care pot fi incluși virioni rabici, iar granulele bazofile sunt sediul aglomerării și sechestrării virionilor.

Azi se poate afirma că Victor Babeș a fost primul om care a văzut virionii turbării. În *Atlas d'Histologie pathologique du système nerveux*, apărut în 1898, Babeș descrie și desenează, pe baza observațiilor microscopice, niște granule rotunde și bastonașe de 100-200 nm, situate în citoplasma celulelor nervoase rabice, degenerate. Ele sunt absente în nucleu și în celulele sănătoase. Se colorează intens în urma mordansării cu tanin. Limitele lor sunt puțin difuze. Dar în 1898 Babeș nu s-a pronunțat asupra semnificației acestor granule, după cum accentuează el însuși în lucrările sale ulterioare.

În 1904, Schüder și Remlinger observă că agentul turbării trece prin filtrele care rețin bacteriile, dovedind astfel natura virotică a turbării. Totodată, consideră că virusul turbării este atât de mic încât nu este vizibil la microscop. În același an, Babeș repetă experiența lui Schüder și Remlinger și comunică rezultatele sale Academiei Române. Babeș a constatat că virusul turbării trece prin filtrele pe care le străbat și bacteriile având un diametru de aproape 100 nm; prin filtrele prin care aceste bacterii nu mai trec, virusul turbării de asemenea este oprit. În felul acesta, Babeș conchide că virusul turbării are un diametru de aproape 100 nm. Pe baza acestei concluzii, Babeș identifică granulele și bastonașele de 100-200 nm, descrise de el în 1898, cu agentul turbării, deci – folosind terminologia modernă – cu virionii de virus rabic.

Ideile lui Babeș privind dimensiunile și forma virionilor rabici și-au găsit confirmarea în lucrarea lui Hummeler și Koprowski, apărută în 1969 în revista londoneză *Nature*. Acești autori au reușit să obțină un preparat viral foarte purificat. La microscopul electronic s-a observat că virionii au formă de glonț și constau din două populații. Virionii din prima populație au dimensiuni de 180x80 nm și corespund virionilor bacilari de 200 nm, văzuți de Babeș. Populația a doua, care cuprinde un număr mai mic de virioni, se caracterizează prin dimensiuni de 120-150x80 nm. Acești virioni seamănă cu virionii sferici evidențiați de Babeș.

Metoda românească de vaccinare antirabică, elaborată de Babeș reprezintă o altă realizare a marelui om de știință. Aici subliniem doar descoperirea făcută de Babeș, după care atenuarea virulenței virusului rabic din măduva spinării animalelor contaminate poate fi realizată mai eficient printr-un tratament termic moderat decât prin metoda de uscare a lui Pasteur. Această descoperire a fost primul pas spre elaborarea metodei românești de vaccinare antirabică. Babeș a studiat și inactivarea chimică a virusului turbării din măduvă, constatând că sublimatul corosiv în soluție de 0,01 % și fenolul în soluție de 1 % distrug virusul în 2-4 ore. În glicerol, virusul își păstrează virulența timp de 4 săptămâni. Babeș a fost primul savant care a dovedit că în organismul animal și uman virusul turbării se răspândește pe calea nervilor.

Babeș s-a distins și prin cercetările sale **bacteriologice**.

Studiind celula bacteriană, Babeș descoperă incluziile metacromatice. Acestea se numesc metacromatice, deoarece se colorează în altă culoare decât cea a colorantului, de ex. cu albastrul de metilen se colorează în roșu închis sau, mai rar, în violet închis, în timp ce restul celulei se colorează în albastru.

Pentru prima oară, Babeș a observat aceste incluzii în 1887 la vibriionul holerici, bacilul difteric, bacilul tuberculozei și la bacilul leprei. În același an, Ernst face, independent de Babeș, observații similare. Din acest motiv, incluziile metacromatice au fost denumite corpusculii Babeș-Ernst. În anii 1889 și 1895, Babeș descrie incluziile metacromatice și la alte bacterii (spirili, sarcine, streptococi, actinomicete). Incluziile metacromatice apar, cel mai evident la bacilul difteric, ceea ce facilitează diagnosticul bacteriologic al difteriei. În 1912, Meyer constată că *Spirillum volutans* conține cantități mari de incluzii metacromatice. Datorită acestui fapt, corpusculii Babeș-Ernst sunt cunoscuți și sub denumirea de volutină.

Babeș a susținut părerea că incluziile metacromatice nu rezultă din degenerescența bacteriilor, ci sunt constituenți normale ale celulei bacteriene. Cercetările ulterioare au confirmat justetea părerii lui Babeș și au clarificat compoziția chimică a incluziilor metacromatice. Acestea sunt alcătuite din polifosfați, ARN, proteine și lipide. Metacromazia se datorește polifosfaților. În 1959, Widra descifrează structura fină a corpusculilor Babeș-Ernst. S-a elucidat și semnificația biologică a polifosfaților din corpusculii Babeș-Ernst: polifosfații servesc ca sursă de P, dar fiind bogăți în energie, pot servi și ca sursă de energie. Adăugăm că importanța polifosfaților depășește sfera bacteriologiei. Amintim în acest sens că Fox a reușit în 1965 să obțină proteinoizi în condiții prebiotice simulate, folosind pentru polimerizarea aminoacizilor energia polifosfaților în soluții încălzite. Este, totodată, bine cunoscut că tehnologia și utilizarea îngrășămintelor fosfatice se află într-o transformare fundamentală – se experimentează înlocuirea îngrășămintelor fosfatice clasice prin polifosfați sintetici, al căror model este reprezentat de polifosfații din corpusculii Babeș-Ernst.

Cercetările lui Babeș asupra capsulei bacteriene au avut o puternică influență asupra dezvoltării ulterioare a bacteriologiei și chiar a biologiei în ansamblu.

Babeș a descoperit capsula la o serie de bacterii (streptococi, stafilococi etc.) și a studiat structura și semnificația biologică a acesteia. Babeș a arătat că structura capsulei de obicei este simplă, capsula fiind alcătuită dintr-un material omogen. Dar la unele bacterii, capsula are o structură concentric stratificată, iar la bacteriile mucogene, producătoare de mult material capsular mucoid, capsula constă din granule regulat așezate. Constatările lui Babeș au fost confirmate prin experiențele elegante ale lui Dubos și Avery (1931-1939) și ale lui Tomcsik și Guex-Holzer (1954). Folosind metode enzimatice și imunologice, Dubos și Avery au dovedit că la pneumococii de tip III capsula este alcătuită din două straturi polizaharidice concentrice: dintr-un strat extern, nelegat de celulă, îndepărtabil pe cale enzimatică și dintr-un strat intern, legat de celulă și rezistent la hidroliză enzimatică. Tomcsik și Guex-Holzer au studiat o tulpină mucogenă de *Bacillus megaterium*. Capsula acestei

bacterii este alcătuită dintr-un polizaharid și dintr-un polipeptid. Polizaharidul ocupă regiunile polare ale capsulei sub forma unor calote, iar polipeptidul formează granule situate între cele două regiuni polare.

În timpul lui Babeș a predominat printre bacteriologi părerea, după care capsula este semnul degenerescenței bacteriilor. Babeș a susținut o părere cu totul contrară: capsula este un factor de virulență, contribuind la agresivitatea bacteriilor patogene; capsula conferă bacteriilor rezistență față de mijloacele de luptă mobilizate în organism contra lor. Pentru a include și bacteriile capsulate saprofite, Babeș prezintă următoarea generalizare privind semnificația biologică a capsulei: capsula este un organit de protecție contra condițiilor neprielnice de viață.

Semnificația biologică atribuită capsulei de către Babeș a fost recunoscută ulterior de toți bacteriologii. Astfel, este unanim recunoscut că pneumococii patogeni sunt capsulogeni (pneumococi S), iar cei nepatogeni nu produc capsulă (pneumococi R). Se știe că cercetările lui Griffith (1928), Dawson și Sia (1931), Avery și colab. (1944) privind transformarea pneumococilor R în pneumococi S stau la baza apariției geneticii moleculare și, în general, a biologiei moleculare. Dar, la rândul lor, aceste cercetări s-au bazat pe concepția lui Babeș privind rolul capsulei în virulența bacteriilor patogene. Nu exagerăm deci când afirmăm că Babeș trebuie considerat precursor al biologiei moleculare.

Babeș a descoperit mai multe bacterii zoopatogene și a contribuit la o mai bună cunoaștere a multor bacterii care au fost descoperite de alți savanți.

Babeș a descris în 1881 bacilul morvei la om, iar Löffler și Schütz au publicat numai în 1882 observațiile lor privind evidențierea acestei bacterii la caii bolnavi de morvă. Babeș demonstrează că bacilul morvei este capabil să pătrundă în organism și prin pielea normală intactă. A extras din culturile acestei bacterii o substanță analoagă tuberculinei, morvina, numită și maleină, pe care a întrebuințat-o pentru diagnosticul bolii la cai.

Descoperă în 1890 bacilul influenței, pe care Pfeiffer îl cultivă în 1892.

Bacilul fuziform a fost descoperit tot de Babeș, dar, în mod eronat, descoperirea este atribuită lui Vincent și Plaut.

Babeș a stabilit asemănările și deosebirile dintre agentul leprei și cel al tuberculozei. Ambii sunt bacili acidorezistenți, adică rezistenți la decolorarea cu acizi. Ei se pot evidenția ușor din produsele patologice și țesuturi, inclusiv țesuturile putrezite, uscate sau supuse acțiunii sucurilor digestive. Dar bacilul leprei este un bastonaș mai drept și mai rigid, în timp ce bacilul tuberculozei se prezintă ca un bastonaș ondulat sau curbat. Extremitățile bacilului leprei arată adesea îngroșări rotunjite, iar bacilul tuberculozei nu prezintă decât rareori aceste îngroșări terminale. Agentul leprei este mai rezistent la decolorare decât cel al tuberculozei. Dezvoltarea bacilului leprei în țesuturi este mai lentă decât a bacilului tuberculozei.

Babeș a exprimat rezerve față de datele publicate de Lévy, Weil și de alți autori, după care bacilul leprei a putut fi cultivat pe medii bacteriologice. Babeș a avut perfectă dreptate. Se știe că nici până azi nu s-a reușit cultivarea bacilului

leprei, în multe generații, pe medii bacteriologice, cu toate că au fost testate, în acest scop, peste 20.000 de medii diferite.

În 1883 Babeș evidențiază bacilul tuberculozei din urina unor bolnavi și dovedește că această bacterie poate afecta și aparatul urogenital, lucru cu totul necunoscut până atunci, părerea generală fiind că tuberculoza ar fi o boală exclusiv pulmonară. Tot în 1883 Babeș scria: "... *prezența și propagarea bacilului tuberculozei în țesuturi la om nu sunt întotdeauna suficiente pentru a ne da seama de simptome și de anatomia patologică. Astfel, cu toate cercetările ingenioase ale lui Koch .... trebuie admis un alt factor care contribuie la formarea produselor tuberculoase*". Presupunerea lui Babeș cu privire la existența acestui factor este în concordanță cu datele moderne, după care formarea tubercuilor în țesuturi este determinată de un acid gras specific, sintetizat numai de bacilul tuberculozei, acidul 3,13,19-trimetiltricosanoic numit și acid ftioic.

În 1897, Babeș dovedește împreună cu Constantin Levaditi că bacilul tuberculozei poate crește și sub formă filamentoasă, actinomicotică, distingându-se de actinomicet numai prin acidorezistența sa tinctorială. Această constatare a avut o importanță fundamentală pentru taxonomie. Bacilul tuberculozei, bacilul leprei și celelalte bastonașe acidorezistente au fost grupate în genul *Mycobacterium*, respectiv în familia *Mycobacteriaceae*, care la rândul ei a fost plasată în ordinul *Actinomycetales* (astăzi în sistemul lui Margulis și Schwartz fiind încadrat în îngrengătura B-12 *Actinobacteria (Actinomycota)*). După cum se știe taxonomia numerică a fost introdusă în bacteriologie de către Sneath în 1957 și aplicată ulterior și de alți cercetători. În taxonomia numerică poziția bacilului tuberculozei față de actinomicete a rămas neschimbată, ceea ce este o nouă dovadă a importanței constatărilor lui Babeș și Levaditi din 1897.

Babeș observă că la injecția cu bacilii tuberculozei aviare cobaiul reacționează doar local și nu contractează o tuberculoză fatală. În același timp, injectarea bacililor tuberculozei umane duce la moartea animalului. În concordanță cu observațiile lui Babeș, în clasificatoarele moderne cele două bacterii sunt recunoscute ca specii distincte.

Louis Pasteur credea că agentul holerei aviare este un diplococ. Babeș dovedește și demonstrează personal lui Pasteur că în realitate agentul holerei aviare este un bastonaș care se colorează mai intens în regiunile polare. Pasteur a luat drept două corpuri distincte regiunile polare ale bastonașului. Astăzi este unanim recunoscut că agentul holerei aviare și celelalte specii ale genului *Pasteurella* sunt bastonașe scurte care se colorează bipolar. Menționăm în paranteză că primele preparate în care Pasteur a putut observa clar bacilul tifoid și agentul tuberculozei au fost făcute de Babeș în perioada specializării sale în laboratoarele lui Pasteur.

În 1889 Babeș atrage atenția asupra deosebirilor în comportarea streptococilor și stafilococilor în țesuturi. El subliniază tendința streptococilor de a se răspândi în țesuturi spre deosebire de stafilococii care au tendința de a provoca procese strict delimitate. Babeș constată deci deosebiri în invazivitatea diferitelor bacterii patogene.

În conformitate cu constatările lui Babeș, Duran-Reynals dovedește în 1942 că invazivitatea se datorește unui compus chimic care ulterior a fost denumit factor Duran-Reynals și identificat cu enzima hialuronidază. Această enzimă scindează hidrolitic, distruge acidul hialuronic din țesuturi, facilitând astfel răspândirea bacteriilor. Cantitatea hialuronidazei variază la diferitele specii și tulpini bacteriene patogene. Tulpinile de streptococi produc în general mai multă hialuronidază decât tulpinile de stafilococi, deci tind spre a se răspândi în țesuturi.

Concepțiile lui Babeș privind poziția bacteriilor în sistemul viețuitoarelor s-au dovedit a fi previziuni geniale care au fost integral confirmate începând din anul 1964 în cursul cercetărilor de biologie moleculară.

În lucrarea *Variațiile și speciile microbilor și raportul lor cu organismele superioare* apărută în 1903, Babeș scria: "...bacteriile nu sunt plante sau ciuperci inferioare, precum s-a afirmat în timpurile din urmă, căci le lipsesc anumite caractere ale plantelor, cu toate că bacteriile au rudenie evidentă cu algele, și anume cu cianoficeele". Într-adevăr, cercetările de biologie moleculară au dovedit că bacteriile și cianoficeele (azi cianobacterii) au celule procariote, iar celelalte alge, toate ciupercile, protozoarele, plantele și animalele sunt organisme eucariote. Procariotele se disting de eucariote printr-un număr mare de caractere: absența nucleului adevărat, absența mitocondriilor (și a cloroplastelor), absența reticulului endoplasmatic, absența ribosomilor 80S (prezența numai a ribosomilor 70S), absența în ARNm a secvenței de acid poliadenilic 3'-terminal, prezența în perete a unui mucopeptid alcătuit din resturi de N-acetilglucozamină, acid N-acetilmuramic și aminoacizi, absența în organitele de locomoție a unei structuri alcătuită din 9 + 2 fibrile etc.

Babeș s-a ocupat și cu problema apariției vieții, în general, și a bacteriilor, în special, pe planeta noastră. În 1895 afirmă că "*bacteriile provin din epoci geologice foarte îndepărtate*", iar în 1903 scrie că "*primele organisme trebuie să se fi dezvoltat înaintea apariției amibelor și chiar a plantelor inferioare*", înțelegând prin primele organisme bacteriile. Cercetările recente de paleontologie microbiană, inițiate de Barghoorn în 1965 și continuate de mai mulți cercetători, au confirmat justetea ideilor lui Babeș. Astfel, Brooks și colab. (1973), Muir și Hall (1974) evidențiază microfosile bacteriene din formația geologică sudafricană Onverwacht veche de  $3,4 \cdot 10^9$  ani, iar Hofmann (1974) arată că unele microfosile găsite în rocile de pe insula Belcher (Canada) vechi de  $1,6 \cdot 10^9$  ani erau alge verzi primitive. Deci, primele eucariote au apărut cu cel puțin  $3,4 \cdot 10^9$  ani în urmă, iar primele eucariote s-au dezvoltat mult mai târziu, numai cu  $1,6 \cdot 10^9$  ani în urmă.

În comparație cu virusurile și bacteriile, Babeș a studiat mai puțin **ciupercile (fungii)**. Menționăm că într-o lucrare publicată în 1881, Babeș trece în revistă cunoștințele privind mucegaiurile zoopatogene.

Babeș are merite mari și în dezvoltarea **protistologiei**. În 1888 identifică parazitul endoglobular care producea o boală gravă la bovideele din lunca Dunării. Prin această descoperire, Babeș a făcut ca țara noastră să devină leagănul istoriei *piroplasmozelor*.

Boala cunoscută de popor sub denumirea de "*urinare cu sânge*" sau "*boala secetei*" era însoțită de hemoglobinurie și apăsarea mai ales în anotimpurile călduroase.

Pe baza unor investigații minuțioase, la care a participat și C.Starcovici, Babeș constată că în această boală globulele roșii sunt distruse de un parazit cocciform cu un diametru de aproximativ 5 μm care deseori apărea dublu, asemănându-se diplococilor. Parazitul l-a denumit *Haematococcus bovis* și credea că acesta are poziție intermediară între bacterii și protozoare. Babeș relevă și asemănarea izbitoare a hemoglobinuriei bovideelor din România cu febra de Texas, boală care decima cirezile de vite cornute mari din Texas și în alte regiuni, în care s-au importat vaci și tauri din Texas.

Observațiile sale le-a publicat pentru prima oară în 1888 în *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* și apoi în ianuarie 1889 în *Virchows Archiv*.

Folosind metodele lui Babeș, Theobald Smith descoperă, în globulele roșii ale vacilor bolnave din Texas, niște corpi rotunzi sau ovali, pe care îi consideră agenții cauzali ai febrei din Texas. Rezultatele sale s-au publicat sub forma unei note preliminare în decembrie 1889 în revista *Medical News*. Patru ani mai târziu, Smith și Kilborn descriu complet atât febra de Texas cât și parazitul endoglobular. Demonstrează că parazitul este un protozoar, pe care îl denumesc *Pyrosoma bigemina*. Arată de asemenea că parazitul este transmis de căpușe. Smith recunoaște prioritatea lui Babeș, afirmând că "*Babeș a găsit un microorganism constant ca apariție, iar descoperirea și reprezentarea sa arată o mare concordanță între parazitul sanguin al său și al meu*".

În 1882 Babeș descoperă și agentul cauzal al cărceagului oilor, gășind că acest parazit este asemănător cu cel care cauzează hemoglobinuria boilor.

Starcovici publică în 1893 un studiu comparativ despre paraziții endoglobulari descriși de Babeș și de Smith și Kilborn, recunoaște natura lor protozoică și propune gruparea lor în genul *Babesia*, în care include cele 3 specii: *Babesia bovis* Babeș 1888, *Babesia ovis* Babeș 1892 și *Babesia bigemina* Smith și Kilborn 1893.

Nomenclatura propusă de Starcovici a fost susținută de protistologul francez Blanchard și acceptată de Congresul Internațional de Zoologie de la Londra (1900).

FAO și Oficiul Internațional de epizootii de asemenea adoptă această nomenclatură, incluzând în genul *Babesia* încă două specii: *Babesia caballi* (parazit la cai) și *Babesia trautmanii* (parazit la porci).

Babeș a fundamentat concepția despre *asociațiile microbiene*, arătând că între diferite specii de microorganisme se formează asociații. Raporturile dintre microorganisme pot fi raporturi de colaborare sau de luptă.

Pasteur și Koch au stabilit specificitatea microbilor patogeni, afirmând că de fiecare boală infecțioasă ar fi responsabil câte un singur microb. În 1888 și în anii următori, Babeș a dovedit multilateral că în declanșarea celor mai multe boli infecțioase intervin asociații microbiene, acțiunea microbului specific combinându-se aproape întotdeauna cu acțiunea microbului asociat. Există asociații la care participă două specii de bacterii patogene (de ex., bacilul tuberculozei și pneumococul).

Bacilul fuziform, o bacterie saprofită, asociindu-se cu o altă bacterie saprofită din microflora bucală normală poate produce angină. O bacterie se poate asocia și cu o ciupercă (bacilul tuberculozei cu *Aspergillus*) sau cu o amibă (bacilul dizenteric cu *Entamoeba histolytica*). Pot exista asociații și între bacterii și virusuri.

Studiind încă din 1885 lupta dintre microorganisme, așa-numitul antagonism microbial pe medii de cultură, Babeș ajunge la concluzia că "*există microorganisme care pot elabora substanțe capabile să oprească creșterea altor microorganisme, modificând mediul de cultură și făcându-l impropriu altor specii microbiene... O maladie cauzată de o anumită bacterie ar putea fi tratată cu o altă bacterie, putându-se deschide astfel noi orientări în terapeutică*". Previțiunea genială a lui Babeș s-a confirmat prin descoperirea antibioticelor și prin aplicarea lor în terapeutică. Amintim în acest sens că Howard Florey, care a izolat în stare pură penicilina descoperită de Fleming, recunoaște că Babeș este primul savant care s-a preocupat în mod voit și metodic de combaterea unui microb patogen cu alte microorganisme.

Cercetările sale de **microbiologia mediului ambiant** au fost concentrate asupra apei. Scopul principal al acestor cercetări a fost alimentarea municipiului București cu apă potabilă de calitate superioară. Babeș a subliniat importanța deosebită a cercetării microbiologice a apei, dar a considerat absolut necesară și examinarea ei fizică și chimică. Babeș și fratele său, Aurel au constatat că filtrele de apă instalate la Bâcu în apropiere de București erau defectuoase și neigenice, din care cauză apa filtrată prezenta primejdie pentru consumatorii din capitală. După publicarea acestor constatări, primarul Bucureștiului a cerut primului ministru destituirea lui Babeș din funcția de director al Institutului de Bacteriologie. Totuși, datorită luptei pe care a dus-o, Babeș a reușit să contribuie la alimentarea capitalei cu apă bună care, la indicațiile sale, a fost găsită la Ulmi.

Babeș a contribuit în mare măsură și la dezvoltarea **tehnicii de cercetare** în microbiologie. Metodele elaborate, aparatele și instrumentele inventate de el au fost însușite și întrebuințate în laboratoarele de microbiologie din toată lumea. Babeș a elaborat metode pentru colorarea incluziilor rabice, a incluziilor metacromatice, a capsulei bacteriene. Aplică metoda colorației vitale la bacterii. Pune la punct metoda pentru studierea antagonismului microbial pe medii de cultură, metodă care stă la baza standardizării antibioticelor și a altor medicamente cu efect antimicrobial. Această metodă este de mare importanță și pentru stabilirea efectelor pesticidelor asupra microorganismelor folositoare din soluri și ape. Deci, metoda contribuie, în mod indirect, la prevenirea și combaterea poluării mediului ambiant. Babeș a inventat cutiile care, în mod eronat, se numesc cutiile Petri. Babeș a descris aceste cutii în tratatul "*Les Bactéries*" apărut în 1885, iar Petri, colaborator al lui Koch, a lucrat cu asemenea cutii la un an de la apariția tratatului. Babeș a fost primul care a introdus reglatoarele electrice în termostate. Împreună cu Aurel Babeș a inventat un aparat pentru floclarea impurităților din ape cu ajutorul alaiunului.



Babeș a **publicat** din domeniul microbiologiei un număr mare de articole și o serie de lucrări de sinteză. Subliniem primul tratat de bacteriologie din lume, "*Les Bactéries et leur rôle dans l'anatomie et l'histologie pathologique des maladies infectieuses*", publicat de Babeș în colaborarea cu profesorul francez Andre-Victor Cornil. Prima ediție a tratatului a apărut în 1885 la Paris. Cartea a fost completată și reeditată de două ori (în 1886 și 1890). Orientarea cărții ca, de altfel, și contribuția cea mai mare la alcătuirea ei, îi revine lui Babeș; aceasta o mărturisește Cornil însuși, considerându-se elev al lui Babeș, de la care a învățat bacteriologia. Pentru valoarea excepțională a cărții, Academia Franceză în ședința sa din 26 februarie 1887, prezidată de Pasteur, distinge autorii cărții cu premiul Monthyon. Babeș a fost un **creator de școală**. Dintre elevii săi microbiologi amintim pe profesorul Paul Riegler, renumit microbiolog veterinar, fondatorul Institutului Pasteur din București și pe profesorul Constantin Levaditi, bacteriolog și virusolog cu renume mondial, distins cu medalia de aur "Paul Ehrlich".

Cercetările microbiologice ca și celelalte cercetări ale lui Babeș au avut o finalitate precisă – aplicarea rezultatelor în practică. Despre drumul spre practică, Babeș scria în 1885: "*Pe când în anume împrejurări, un singur fapt poate să conducă la o descoperire utilă, în alte cazuri, adevăruri noi reies numai dintr-o sumă de observații bine studiate și de multe ori numai observații îndelungate într-un domeniu pur științific fac ca la un moment dat să iasă la lumină o aplicare practică în folosul omenirii*".

Cu privire la contribuția somităților și a micilor cercetători la dezvoltarea microbiologiei, Babeș afirma în 1900 că "...știința noastră pășește neîntrerupt mai departe. Marele cugetător ca și micul lucrător găsesc aici un câmp abundent pentru activitatea lor, presupunând că făclia lor conducătoare este adevărul și conștiinciozitatea".

Incheiem cu un citat din scrierile lui Pasteur:

*"Les hommes célèbres n'ont pas contribué seulement à la richesse, à la gloire et au bonheur de leur pays, mais leur travail personnel devient un bienfait pour le monde entier"* (Oamenii celebri au contribuit nu numai la bogăția, la gloria și la fericirea țării lor, dar munca lor personală devine o binefacere pentru lumea întreagă).

Victor Babeș a fost și rămâne o asemenea celebritate.

**Prof. Univ. Dr. Ștefan KISS**

TERRESTRIAL ISOPOD COMMUNITIES (CRUSTACEA, ISOPODA)  
IN RIVERSIDE COPPICES AND MEADOWS OF MOUNTAINOUS,  
HILLY AND DEPRESSION AREAS

**NICOLAE TOMESCU\***, **DANIELA MUREȘAN\***,  
**LIUBOMIRA OLARU\*\*** and **RADU HOTEA \*\*\***

**SUMMARY.** - The quantitative and qualitative research methods were used to study the terrestrial isopod communities in riverside coppices and meadows of mountainous, hilly, depression and plain areas. Nineteen species of terrestrial isopods were identified, and they can be classified into four ecological categories: 7 paludicolous species (*Ligidium hypnorum*, *Ligidium germanicum*, *Trichoniscus pusillus*, *Hyloniscus riparius*, *Hyloniscus transsylvanicus*, *Hyloniscus siculus*, *Hyloniscus mariae*), 7 sylvan species (*Protracheoniscus politus*, *Porcellium conspersum*, *Trachelipus arcuatus*, *Trachelipus ratzeburgi*, *Trachelipus wachleri*, *Porcellio spinicornis*, *Armadillidium carniolense*), 3 praticolous species (*Trachelipus nodulosus*, *Armadillidium versicolor quinqueseriatum*, *Armadillidium vulgare*) and 2 euritopes species (*Trachelipus rathkei*, *Porcellio scaber*). On the meadows in mountainous areas, there are only paludicolous and sylvan species, fauna similar to the one in the forests. Although these are open ecosystems, there are humidity and temperature conditions similar to the ones in the forests. There are no praticolous species, characteristic of the meadows in hilly and plain areas. In the riverside coppices of mountainous areas, there are only paludicolous and sylvan species, just like in the riverside coppice of the Făget forest, located in a hilly area. Here, the high density of the trees maintains moderate temperatures that do not exceed 18°C under the litter layer. In the riverside coppices of depression and plain areas, there is a larger diversity of microhabitats, which favours the existence of isopod species of all ecologic categories (paludicolous, sylvan, praticolous, euritopes). On the meadows of depression and plain areas, there are only praticolous species (*Trachelipus nodulosus*, *Armadillidium versicolor quinqueseriatum*, *Armadillidium vulgare*).

Between 1968-2003, we made qualitative and quantitative ecologic research in different regions of Romania (Transilvania, Moldavia, Dobrogea, Danube Delta) and in different geomorphological areas (mountainous, hilly, depression, and plain areas) [1,3-5,7-9]. The research was made in wide areas (the basin of the Arieș river, the upper sector of the basin of the Someșul Cald river, Dornelor Depression, the south side of Gutâi Mountains, Danube Delta, the areas bordering Cluj-Napoca etc.) and in ecologically different natural ecosystems (coniferous forests, mixture forests, leaf-bearing forests, riverside coppices, hayfields, pastures). We used the qualitative and quantitative ecologic research to describe the terrestrial isopod communities living in the studied ecosystems, the numerical abundance, the relative abundance, the frequency of species in the samples, the index of ecologic significance,

---

\* Babeș-Bolyai University of Cluj-Napoca, Department of Taxonomy and Ecology,

Email: [ntomescu@biolog.ubbcluj.ro](mailto:ntomescu@biolog.ubbcluj.ro),

\*\* Museum of Natural Sciences of Vatra Dornei

\*\*\* Aurel Vlaicu School of Baia Mare

the ratio of sexes. After having corroborated the data, we noticed that the specific feature of the terrestrial isopod communities is different even in the ecosystems of the same type, the differences being determined by relief (mountainous, hilly, depression). The relief and the altitude give certain values to the ecological factors, especially to the climatic ones, which influence directly plant and animal species. In this paper, we present a synthesis of our research on the terrestrial isopod communities in riverside coppices and on meadows of mountainous, hilly, and depression areas.

**Materials and methods.** The data presented in our paper come from: the basin of the Arieş river, the Dorna Depression, Făget – Cluj-Napoca area, and the south side of Gutâi Mountains.

**The Basin of Arieş river** has a surface of 2970 km<sup>2</sup>, of which 2000 km<sup>2</sup> represent the mountainous area. According to the relief, vegetation and local climate, there are three sectors: upper, middle, and lower sector.

**The upper sector** is characterized by an exclusively mountainous relief, a hydrographic network rich in springs and rivulets, highly humid soils. Here prevail spruce forests and spruce-beech mixture forests, hay fields and pastures bordered by forests.

**The middle sector**, between Câmpeni and Buru, is also in a mountain area. Here, the Arieş Valley is wider, human settlements are more numerous. Here prevail leaf-bearing mixture forest; spruce forests and spruce-beech mixture forests are more rare. There are riverside coppices on the banks of the Arieş river and of rivulets, as well as wide areas used as hay fields and pastures. The stream network is more reduced compared to the one in the upper sector.

**The lower sector** is between Buru and the mouth where the Arieş river flows into the Mureş river. The relief is hilly for about 15 km after Buru, then it continues with plane depressions. Here prevail agricultural cultures and plantations of fruit trees. The hay fields are much smaller and more rare, as well as the Arieş riverside coppices. In the depression area, the soil humidity is much lower, the degree of exposure to the sun on the surface of the soil is very high, and the temperatures reach 30°C. In the summer, the soil becomes dry on the surface.

**The Dorna Depression** lies in an 800-900 m altitude in mountainous area. Here prevail coniferous forests and the meadows used mainly as hay fields. The hydrographic network is rich; there are alder coppices on the banks of the Dorna river and of the streams. The soil humidity is high during the whole year, and the temperature on the surface of the soil does not exceed 16-18°C.

**The south side of Gutâi Mountains.** We made some researches on this side, in an alder coppice at the base of this side, at an altitude of about 500 m. The groundwater is close to the surface of the soil, providing a saturated humidity during the whole year, as well as low temperatures. The grass-like vegetation, specific to humid habitats, is very rich, with a coverage degree of over 95%.

**The Făget Forest** is at the southeastern part of Cluj-Napoca. It is a huge beech forest, with trees of over 80 years old. The density of the trees ensures a cool and humid local climate. In the forest, there are areas with highly humid and marshy soil, its features are similar to the ones of the riverside coppices in mountainous areas. The whole surface is exposed to floods, the excessive humidity comes from the groundwater, which is very close to the surface of the soil. The conditions are excellent for isopod species which need a more humid soil, such as paludicolous species.

The isopods were collected with soil traps and Tullgren devices. Some of the results were published previously. In these papers, we made a comparative analysis of the isopod fauna in coniferous, mixture, leaf-bearing forests, riverside coppices and meadows. [2, 3, 6, 10-13]. In order to know the keystone species in riverside coppices and on meadows, we calculated the relative abundance, the frequency and the index of ecologic significance.

**Results and discussions.** In the studied riverside coppices and meadows, we identified nineteen terrestrial isopod species (Table 1), more or less spread in these ecosystems, according to the ecological needs and to the tolerance towards climatic factors, mainly towards temperature and humidity.

In table 1, we present the values of the relative abundance and of the ecologic significance index. The values of these indexes show the keystone species or the species characteristic of the riverside coppices and of the meadows from the geomorphologic units in which the research was carried out.

The specific structure of the terrestrial isopod communities in the riverside coppices and on the meadows of mountainous areas is different from the one of the terrestrial isopod communities in the riverside coppices and on the meadows of hilly or depression and plain areas. From the ecologic point of view, the nineteen species fall into four ecologic groups. Seven species are paludicolous (*Ligidium hypnorum*, *Ligidium germanicum*, *Trichoniscus pusillus*, *Hyloniscus riparius*, *Hyloniscus transsylvanicus*, *Hyloniscus siculus*, *Hyloniscus mariae*); they live in ecosystems where the soil humidity is saturated and the temperature does not exceed 20-22°C.

There are seven sylvan species that live in the forests (*Protracheoniscus politus*, *Porcellium conspersum*, *Trachelipus wächterli*, *Trachelipus arcuatus*, *Trachelipus ratzeburgi*, *Porcellio spinicornis*, *Armadillidium carniolense*). Three species are praticolous and live in open ecosystems - hilly and plain areas, pastures, hay fields (*Trachelipus nodulosus*, *Armadillidium versicolor quinquieseriatum*, *Armadillidium vulgare*); 2 species are euritopes (*Trachelipus rathkei*, *Porcellio scaber*); the last species has strong synanthropic tendencies.

### **Isopod communities in riverside coppices**

In the riverside coppices of mountainous areas (the upper and middle sectors of the Arieș river Basin, the Dorna Depression and the Gutâi Mountains, as well as in the riverside coppice of the Făget forest hilly area, the communities of species

Table 1

**The fauna of terrestrial isopods in riverside coppices and on meadows in mountainous, hilly and depression areas**

No	Name of species	Riverside Coppices						Meadows				
		Arieş Basin			Dorna Depress.	Făget Cluj	Gutâi Mount.	Arieş Basin			Dorna Depress.	
1	2	A	B	C	6	7	8	A	B	C	12	
1	<i>Lygidium hypnorum</i>	a	5.5	90.6	29.3	69.3	16.3		1.6	35.0	19.8	
		w	2.7	<b>81.5</b>	<b>10.5</b>	<b>62.4</b>	<b>16.3</b>		0.7	<b>14.7</b>	<b>10.9</b>	
2	<i>Lygidium germanicum</i>	*a				9.3		17.0			1.5	
		w				<b>6.9</b>		5.1			0.2	
3	<i>Trichoniscus pusillus</i>	*a										
		w										
4	<i>Hyloniscus riparius</i>	a	7.3	1.2	0.4	9.9			1.3	2.5	7.1	
		w	0.6	0.7	0.03	5.0			0.1	0.3	2.7	
5	<i>Hyloniscus transsylvanicus</i>	*a	22.4	1.7		5.1	30.3	71.0	22.5			
		w	<b>8.9</b>	0.2		3.6	<b>30.3</b>	<b>71.0</b>	<b>10.3</b>			
6	<i>Hyloniscus siculus</i>	*a								0.9		
		w								0.09		
7	<i>Hyloniscus mariae</i>	*a				1.7		0.4				
		w				0.7		0.4				
8	<i>Protracheoniscus politus</i>	**a	55.6	2.6	1.8	6.7	3.9	10.0	65.4	3.2	0.5	
		w	<b>55.0</b>	1.8	0.5	3.3	3.0	3.0	<b>60.2</b>	1.3	0.02	
9	<i>Porcellium conspersum</i>	**a	0.7			0.5	16.5		1.1			
		w	0.8			0.2	<b>16.5</b>		0.2			
10	<i>Trachelipus nodulosus</i>	***a			0.5					21.1		
		w			0.05					<b>12.2</b>		
11	<i>Trachelipus arcuatus</i>	** a			1.8	0.08				0.8		
		w			1.7	0.008				0.1		
12	<i>Trachelipus ratzeburgi</i>	** a				0.6						
13	<i>Trachelipus wächterli</i>	**a	9.0	0.4	0.2	1.5	0.3	1.0	8.2	26.4	23.5	
		w	<b>7.2</b>	0.06	0.02	0.7	0.3	0.1	4.4	<b>8.4</b>	<b>17.6</b>	
14	<i>Trachelipus rathkei</i>	****a									21.4	
		w									1.9	
15	<i>Porcellio scaber</i>	**a			0.6						28.6	
		w			0.05						2.6	
16	<i>Porcellio spinicornis</i>	**a								0.9		
		w								0.1		
17	<i>Armadillidium carniolense</i>	**a	0.3	3.4	1.0					10.1		
		w	<b>0.07</b>	2.0	0.4					<b>6.4</b>		
18	<i>Armadillidium vers. quinq.</i>	***a				61.9						
		w				<b>22.1</b>						
19	<i>Armadillidium vulgare</i>	***a									50.0	
		w									<b>7.5</b>	
Total species			7	6	9	10	6	5	6	9	3	6

A – upper sector, B – middle sector, C – lower sector, a – relative abundance, w – index of ecological significance, \* - paludicolous species, \*\* - sylvan species, \*\*\* - praticalous species, \*\*\*\* - euritopes species

are made up exclusively of paludicolous and sylvan species (Table 1). The ecological conditions in these riverside coppices do not meet the needs of praticolous species. The number of species varies from five species at the base of the south side of the Gutâi Mountains to ten species in the riverside coppices of the Dorna Depression. The large number of species in the riverside coppices of the Dorna Depression is due to the surrounding forests from which migrates a small number of individuals of different sylvan species. This explains also the number of accidental species (2) and accessory species (6). The values of the ecologic significance index show that, in the riverside coppice of the Făget Forest, there are four keystone species of isopods, with numerous populations, three paludicolous species (*L. hypnorum*, *T. pusillus*, *H. transsylvanicus*) and one sylvan species (*P. politus*).

In the riverside coppices of the upper sector of the Arieș river, there are three keystone species, one paludicolous (*H. transsylvanicus*) and two sylvan species (*P. politus*, *T. wächterli*). In the Dorna Depression there are two keystone species (*L. hypnorum* and *L. germanicum*) and in the Gutâi Mountains there are also two keystone species (*L. germanicum*, *H. transsylvanicus*). In the middle sector of the Arieș Basin, there is only one keystone species (*L. hypnorum*). The other species are accessory or accidental. The number of keystone species, represented by numerous populations, is related to the ecologic optimum in the habitats populated by these species. Due to the fact that these are detritofagous species, there is no competition for food or space. The temperature, the humidity and the chemistry of the soil favor or limit the size of terrestrial isopod populations in an ecosystem.

The lower sector of the Arieș basin has depression and plain relief, with few exceptions. In the riverside coppices of this sector were identified nine isopod species, different from the ecologic point of view (two paludicolous species, four sylvan species, two praticolous species and one euritopes species). The riverside coppices of this sector have a larger ecologic diversity, expressed both by the specific structure of isopod communities, and by the keystone species (*Ligidium hypnorum* – paludicolous species and *Armadillidium versicolor quinqueseriatum* – praticolous species). In these riverside coppices, there is an ecologic mosaic of microhabitats, from highly humid areas with low temperatures to dry areas with temperatures of over 25°C.

### **Isopod communities in meadows**

The terrestrial isopod communities living on the meadows were studied in the three sectors of the Arieș basin and in the Dorna Depression. On the meadows (open ecosystems) in the upper sectors of the Arieș basin, with strictly mountainous geomorphologic features, there are only paludicolous and sylvan species of isopods, the fauna is similar to the one in the forests. Here, there are two keystone species, one paludicolous (*H. transsylvanicus*) and one sylvan (*P. politus*). The meadows of the middle sector offer a larger ecologic diversity, due to the meadows lying on less inclined slopes and with lower altitudes, around 400 –500 m. Nine species

were identified on the meadows of this area: three paludicolous, five sylvan and one praticolous species, which is also the prevalent and keystone species, in highly sunny areas. Besides this, another one sylvan species (*T. wächleri*), one praticolous (*T. nodulosus*) and one paludicolous (*L. hypnorum*) are keystone species on the meadows lying on slopes oriented towards north and west. On the meadows of the Dorna Depression (mountainous area), live six isopod species: three paludicolous, two sylvan and one euritope, the last species with strong synanthropic behavior (*Porcellio scaber*).

The presence of the synanthropic species is due to the numerous rural settlements in the Dorna Depression. Populations of *Porcellio scaber* were identified on the meadows of the rural settlement, where this species is also prevalent and keystone. On the meadows farther from human settlements, the prevalent species are: *Ligidium hypnorum* (paludicolous) and *Trachelipus wächleri* (sylvan). On the meadows in the lower sector of the Arieş basin (depression and plain area), there are three terrestrial isopod species, all praticolous. The keystone species is *Armadillidium vulgare*. The local climatic conditions on these meadows do not allow paludicolous and sylvan species to survive.

Of the 19 species identified in riverside coppices and on meadows, *Ligidium hypnorum* is the keystone species in most of the areas where research has been carried out; however, this species is absent in the Gutâi Mountains, where *Ligidium germanicum* is present, and in the depression and plain areas. In the riverside coppices and on meadows of mountainous areas prevail also *Hyloniscus transsylvanicus*, *Protracheoniscus politus* and *Trachelipus wächleri*. The other species are accessory or accidental, being represented by numerically reduced populations.

**Conclusions.** 1. In the riverside coppices and on the meadows of mountainous areas, the isopod communities are made up of paludicolous and sylvan species; their specific structure is similar to the one of the isopod communities living in forests.

2. In the riverside coppices of the hilly areas, inside beech forests, there are also paludicolous and sylvan species.

3. In the riverside coppices of the depression and plain areas, where there is a larger diversity of microhabitats, there are species of terrestrial isopods with very different ecologic needs (paludicolous, sylvan, praticolous, euritopes species).

4. On the meadows in mountainous areas, the isopod communities are made up exclusively of paludicolous and sylvan species, similar to the isopod communities living in the forests.

5. The isopod communities living on the meadows of plain areas are made up exclusively of praticolous species, tolerant to low humidity and high temperatures.

## REFERENCES

1. Dolnițchi – Olariu, L., *Studiul faunistic, biologic și ecologic al populațiilor de izopode terestre din zona Dornelor*, Teză de doctorat, Univ. Babeș-Bolyai Cluj-Napoca, 1999.
2. Dolnițchi – Olariu, L., Tomescu, N., *Aspects ecologiques de la population d'Isopodes terrestres de la zone des Dornas*, "Anuarul Muzeului Național al Bucovinei", 1997, 81-92.
3. Hotea, R., Tomescu, N., Mureșan, D., Hotea, M., *Cercetări faunistice și ecologice asupra izopodelor terestre de pe versantul sudic al Munților Gutâi*, "Anal. Univ. Oradea, Fasc. Biologie", Tom. **10**, 2003, 33- 37.
4. Mureșan, D., *Studiul populațiilor de izopode terestre din Bazinul Arieșului și Bazinul superior al Someșului Cald*, Teză de doctorat, Univ Babeș-Bolyai Cluj-Napoca, 2004.
5. Mureșan, D., Tomescu, N., Dolnițchi – Olariu, L., Hotea, R., *Cercetări faunistice și ecologice asupra izopodelor terestre din sectorul mijlociu al Bazinului Arieșului*, "Anal. Univ. Oradea, Fasc. Biologie", Tom. **10**, 2003, 27-32.
6. Radu, V., Tomescu, N., *Quantitativ-ökologische untersuchungen an Landisopoden*, "Pedobiologia", **Bd. 16 S.**, 1976, 36-43.
7. Tomescu, N., *Cercetări morfologice, biologice și ecologice la izopodele terestre*, Teză de doctorat, Univ. Babes-Bolyai Cluj-Napoca, 1973.
8. Tomescu, N., *Izopode terestre (Crustacea: Isopoda) din Delta Dunării. I. Caraorman și Maliuc*, "Anal. Științ. Institut. Delta Dunării", 1992, 89-90.
9. Tomescu, N., Schneider, A., Weiss, I., *Die Isopoden ines Südhanges im Hügelland Südsiebenbürgens*, "Muz. Brukenthal, Studii și comunicări – Șt.nat.", **23**, 1979, 275- 286.
10. Tomescu, N., Accola, S., Pașca, C., *Ecology of the population of terrestrial isopods (Crustacea, Isopoda) în Cheile Turzii*, "Studia Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **40** (1-2), 1995, 78-94.
11. Tomescu, N., Ardelean, G., Mureșan, D., Popa, V., *Ecology of terrestrial isopods in the nature reserve Scărița- Belioara, Romania*, "Studia Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **45** (1), 2000, 57-64.
12. Tomescu, N., Mureșan, D., Popa, V., *The terrestrial isopods fauna in the superior basin of the Someșul Cald River*, "Studia Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **46** (2), 2001, 43-47.
13. Tomescu, N., Mureșan, D., Popa, V., *Faunistic and ecological researches on the terrestrial isopods from the superior sector of the Arieș River basin*, "Studia Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **46** (1), 2002, 3-14.



N. TOMESCU, D. MURESAN, L. OLARU, R. HOTEA

STUDII ECOFIZIOLOGICE LA PLANTE ARBUSTIVE  
ENDEMICE SUB PRESIUNEA FACTORILOR DE HABITAT.  
I. STUDIUL PROCESULUI DE CREȘTERE

VICTOR BERCEA\*

**SUMMARY. - Ecophysiological Studies of Endemic Shrubs Exposed to Habitat Factors' Pressure. I. Study on Growth Process.** In this paper we conducted an analysis of growth coefficients in endemic shrubs from alpine areas: *Rhododendron myrtifolium* L. and *Vaccinium myrtillus* L. (fam. Ericaceae) from Rodnei Mountains, Pietrosu Massif (2303m). These coefficients provide useful information for decoding the mechanism of plant resistance, harboring multiple ecological implications. Three stationary plots, at different altitudes (1660m, 1825m, and 1930m respectively) have been selected, which are also mirrored by the specific plant communities structure with which the shrubs are competing. The research has been carried out during June, July, and September vegetation periods. We have quantified the shrubs' density (individuals/m<sup>2</sup>), height, the numbers of the leaves, the biomass distribution at different vegetative organs (roots, stem, and leaves), the phytomass (dried aerial substance), and the humidity. The growth process has been estimated on the basis of relative growth rate (RGR) and absolute growth rate in size (AGR). At foliage level, we have taken into consideration specific leaf area (SLA), leaf weight ratio (LWR), leaf area index (LAI), and leaf area ratio (LAR). We conclude that alpine shrubs respond to mountain climatic features by a range of morphological and physiological adjustments. At a large scale, the growth process is controlled by the distribution pattern of dried substance in different vegetative organs. The growth coefficients manifest specificity in evolution for every studied species, being also sensitive to altitudinal gradient.

Factorii edafici și climatici se consideră determinanții tradiționali primari ai distribuției speciilor și comunităților de plante în concordanță cu factorii biotici cum este competiția între speciile vegetale, care influențează puternic această demografie [4].

Limitele de distribuție altitudinală și longitudinală ale arborilor sunt în principal controlate de temperatură, iar efectele sale sunt evidente asupra bugetului de carbon și a dezvoltării speciilor [4]. Recentele concluzii cu privire la mărirea ratelor de creștere la latitudini mari la pădurile de altitudine superioară s-au atribuit ridicării temperaturii ca urmare a schimbării climatice globale [6]. Linia arborilor este un indicator variabil al schimbării climatice, iar ecotonul reprezintă oportunitatea studierii influenței acestor variabile asupra creșterii, supraviețuirii și reproducerii la speciile dominante [7]. Studiile demografice pe termen lung sunt rare, dar sunt cruciale pentru cunoașterea dinamicii populaționale a speciilor, în special, în zonele subalpină și alpină.

---

\* Institutul de Cercetări Biologice 400015/Cluj-Napoca.  
E-mail: bercea\_victor@yahoo.com

În prezenta lucrare s-au studiat coeficienții de creștere necesari evidențierii mecanismului rezistenței cu implicații ecologice la arbuștii endemici din zonele montane. S-au luat în studiu arbuștii de *Rhododendron myrtifolium* L. și *Vaccinium myrtillus* L. (fam. Ericaceae) din M-ții Rodnei, masivul Pietrosu (2303 m). Aceste plante formează tufărișuri întinse (biomi) în zona subalpină și alpină, între cele două specii există o relație de codominanță.

Cercetări asupra acestor specii s-au efectuat în nordul Suediei unde crește *Rhododendron lapponicum* [9-12] și în M-ții Caucaz unde crește *Rhododendron caucasicum* [17].

Cele două plante diferă printr-un număr de caracteristici și însușiri importante pentru creștere. *Rhododendron* este un arbust cu frunze sempervirescente, îngrămădite spre vârful lujerilor, persistente, tari și pieltoase. *Vaccinium* este un arbust cu frunze căzătoare.

Tulpina ambelor specii este în mare parte plagiotropă, acoperită de stratul muscinal și este implicată în înmulțirea vegetativă. Creșterea terminală este încetinită, iar mugurii axilari prezintă o intensă activitate. Suprafețele acoperite cu aceste tufărișuri contribuie din punct de vedere ecologic și practic la estomparea eroziunii solului, iar prin faptul că rețin o mare cantitate de apă, se evită declanșarea de inundații pornite din zonele montane.

**Material și metode.** Pentru efectuarea cercetărilor au fost selectate trei zone (staționare), așezate diferit altitudinal, respectiv 1660 m, 1825 m și 1930 m, diferențele s-au reflectat și în componența comunităților de plante cu care intră în competiție. Staționarul de la 1660 m este situat între limita superioară a pădurilor de conifere și aria ocupată cu jneapăn (*Pinus mugo* L.). Are o expoziție este-nordică, cu solul acoperit de un strat muscinal bine dezvoltat care poate reține o cantitate însemnată de apă. Stratul ierbos este bine dezvoltat și cuprinde diferite specii vegetale.

Staționarul de la 1825 m se află așezat în aria ocupată de jneapăn, mai precis în locurile libere din această arie, având solul acoperit cu un strat ierbos și muscinal. Are o expoziție estică, fiind însoțit pe tot parcursul zilei.

Staționarul de la 1930 m se află situat la limita superioară a jneapănului, având expoziția estică. Solul este acoperit cu un strat ierbos și muscinal mai redus. Solul este parțial acid, iar tipul de sol variază în funcție de substrat și vegetație. Temperatura medie anuală variază în funcție de altitudine și este de  $-1^0-0^0$  la peste 2000 m și de  $+4^0$  între 1500-1700 m [3].

În fiecare staționar s-au ales câte 5 suprafețe a câte 1 m<sup>2</sup> fiecare, distribuite randomizat și cu populații de *Rhododendron* și *Vaccinium* bine reprezentate numeric. Din fiecare m<sup>2</sup> s-au luat pentru cercetare câte 5 indivizi de arbuști, în total 25 de arbuști în fiecare staționar. La nivelul fiecărui staționar s-a analizat densitatea arbuștilor (plantă/m<sup>2</sup>), înălțimea arbuștilor și numărul de frunze, distribuția biomasei pe organe vegetative, respectiv rădăcini, tulpini și frunze, precum și umiditatea, respectiv cantitatea de fitomasă (substanța uscată aeriană). Performanțele de creștere s-

au apreciat pe baza ratei relative de creștere (RGR) și a ratei de creștere absolute (AGR) [5]. La nivel foliar s-au studiat următorii coeficienți: aria specifică foliară (SLA), raportul greutatei foliare (LWR), indicele ariei foliare (LAI) și raportul suprafeței foliare (LAR). Aria foliară s-a determinat geometric prin calcularea ariei elipsei formate de forma frunzelor la care s-au măsurat diametrele lățimii și lungimii foliare. De asemenea, s-a făcut raportul între masa lemnoasă aeriană și cea subterană. Cercetările s-au efectuat în perioadele de vegetație iunie, iulie și septembrie.

**Rezultate și discuții.** Evidențierea potențialului adaptativ cu rol conservativ în relația structurală și funcțională plantă-mediu, s-a făcut prin:

a.- delimitarea zonelor compacte a populațiilor de arbuști endemici cu evidentă putere regenerativă pentru evaluări de lungă durată.

b.- evaluarea coeficienților de creștere sub influența factorilor de mediu.

Performanțele de creștere ale arbuștilor de *Rhododendron* și *Vaccinium* sunt importante pentru menținerea potențialului de distribuție a celor două specii. Speciile luate în studiu au arătat o distribuție similară în condiții nutritive sărace.

Densitatea celor două specii și gradul de distribuție pe m<sup>2</sup> a crescut cu mărirea altitudinii. Densitatea lui *Rhododendron* a crescut la altitudine mare cu peste 114%, iar la *Vaccinium* cu peste 126%, comparativ cu altitudinea mai joasă. Înălțimea arbuștilor a scăzut cu mărirea altitudinii. La *Rhododendron* s-a redus înălțimea până la 63%, iar la *Vaccinium* până la 71%. De asemenea, a scăzut și numărul frunzelor pe plantă în raport cu mărirea altitudinii. La altitudine ridicată s-a redus numărul frunzelor la *Rhododendron* cu 51%, iar la *Vaccinium* reducerea a fost de 80%. Gradul de ramificare al coroanei s-a menținut ridicat în toate staționările în cazul speciei *Rhododendron*.

*Vaccinium* și-a redus gradul de ramificare a coroanei odată cu mărirea altitudinii. Plasticitatea distribuției celor două specii reprezintă o performanță adaptativă la condițiile de mediu.

Temperaturile scăzute și sezonul de creștere scurt determină, la altitudini ridicate, mărirea densității în detrimentul caracteristicilor morfologice. Producția de biomasă vegetală este larg controlată de modul cum asimilatele sunt distribuite în plantă și de timpul și durata perioadelor ciclului vital cum sunt: apariția mugurilor, maturarea frunzelor, înfloritul și senescența foliară. Durata sezonului de creștere este componenta cheie a producției de biomasă și depinde de genotipul și ritmul vital al fiecărei specii. Cele mai multe plante alpine produc numai o generație de frunze și au cea mai mare parte din carbonul fotosintetic plasat în organele vegetative subpământene [14].

În concepția recentă, determinanți ai procesului de creștere se consideră distribuția și repartiția substanței uscate la diferitele organe vegetative. Pentru înțelegerea acestui proces de creștere trebuie studiate o multitudine de variabile, compararea datelor obținute ne va duce la o interpretare ecologică riguroasă [11].

***Rhododendron myrtifolium L.*** Cantitatea de biomasă acumulată s-a mărit direct proporțional cu durata perioadelor de creștere și a scăzut cu altitudinea (Tabel 1). Astfel, creșterile de biomasă în perioada din septembrie s-au situat între 125-383% față de perioada din iunie. Cele mai semnificative mărimi de 383% s-au înregistrat la altitudinea cea mai mare, în perioada din septembrie. Acumularea intensă de biomasă s-a realizat la nivelul organelor vegetative lemnoase, respectiv tulpini, ramuri și rădăcini. Aceste acumulări s-au situat între 80,8-91,1% și au fost mai crescute în perioada din septembrie. La nivelul rădăcinilor a existat o relație directă între acumularea de substanță uscată și durata perioadelor de creștere, creșterile de 8-15% s-au atins în luna septembrie și s-au raportat invers proporțional altitudinii.

La nivelul tulpinilor și ramurilor substanța uscată s-a redus cu 5-7% spre finele ciclului vital și a evoluat invers proporțional cu altitudinea. *Rhododendron* fiind o plantă sempervirescentă poate transloca o parte din asimilate direct de la frunzele bătrâne ori tulpini spre noile creșteri de la nivelul rădăcinilor [12]. Această translocare contribuie la mărirea rezistenței la nivelul rădăcinilor. Acumularea de substanță uscată la nivelul frunzelor s-a situat între 8,9-19,2% și s-a derulat proporțional cu mărirea în altitudine. La altitudine ridicată frunzele au acumulat o semnificativă cantitate de substanță uscată. Mărirea balanței carbonului la altitudinea ridicată evidențiază reacția adaptativă a speciei tradusă în mărirea masei foliare activă fotosintetic cu 16-19%.

Repartiția apei în țesuturile organelor vegetative a fost invers proporțională distribuției biomasei. Astfel, umiditatea a scăzut cu altitudinea și cu durata ciclului vital. La nivelul tulpinilor și ramurilor, conținutul în apă s-a mărit cu altitudinea și cu durata perioadelor de creștere, mai semnificativ pentru staționarul de la 1930 m. Abilitatea speciei de-a menține un status hidric favorabil în condiții de altitudine ridicată constituie o modalitate de rezistență impusă de condițiile de mediu nefavorabile. Această abilitate a plantei de a îndura pierderile de apă depinde de însușirile morfologice ale plantei [18].

La nivelul frunzelor, variații în umiditate s-au înregistrat între diferitele perioade de creștere. Pentru eficientizarea nutrienților ciclului intern, *Rhododendron* este nevoit să-și minimizeze pierderile de nutrienți ceea ce contribuie la menținerea creșterii și dezvoltării în habitatele sărace nutritiv [11]. *J a m e s* și colab. [7] au constatat că lungimea frunzelor de *Pinus sylvestris* scade de-a lungul gradientului de altitudine.

Distribuția fitomasei (substanța uscată aeriană) la altitudini mai reduse variază în funcție de perioada de creștere, respectiv, în luna iulie s-a acumulat cantitatea cea mai semnificativă. La altitudine mare, respectiv 1930 m, cantitatea de fitomasă pe m<sup>2</sup> a crescut semnificativ spre finele perioadei de creștere și s-a datorat creșterii densității arbuștilor (Tabel 1). Alocarea fotoasimilatelor la părțile aeriene ale plantei este semnificativ influențată de genotip și de factorii de mediu cum ar fi disponibilul de apă și nutrienți.

La specia *R. ponticum* s-a constatat că deține o suprafață foliară mare cu mare potențial fotosintetic, iar substanța uscată per unitate de suprafață (g.m<sup>-2</sup>) crește în relație directă cu densitatea fluxului fonic [16].

CREȘTEREA LA RHODODENDRON ȘI VACCINIUM

Valorile raportului dintre masa lemnoasă aeriană și masa lemnoasă subterană s-au redus cu altitudinea și cu durata perioadelor de creștere (Tabel1). Aceste scăderi s-ar datora reducerii biomasei la nivelul tulpinilor și rădăcinilor. În prima parte a lunii iunie când *Rhododendron* înflorește se poate vorbi de o sincronizare a perioadei de înflorit cu acumularea substanțială de biomasă la nivelul tulpinilor și rădăcinilor.

Rata creșterii relative s-a intensificat cu altitudinea. Rata creșterii foarte ridicată la altitudinea de 1930 m a fost aparent o funcție a creșterii proporției de greutate la nivelul organelor vegetative în primele perioade ale creșterii și dezvoltării. Intensificarea ratei de creștere contribuie la mărirea acumulării de biomasă și evidențiază potențialul ridicat al creșterii la specia respectivă. Rata creșterii absolute scade până la 6,4% în raport cu altitudinea.

Tabel 1

**Valorile coeficienților de creștere raportat diferitelor perioade de creștere și difertelor altitudini, la arbuștii de *Rhododendron myrtifolium* L**

Parametrii determinați	Altitudinea								
	1660 m			1825 m			1930 m		
	VI	VII	IX	VI	VII	IX	VI	VII	IX
Densitatea (plante.m <sup>-2</sup> )	89±6			92±5,6			102±22		
Înălțimea (cm)	36±2.4			26±4			22,5±1		
Număr frunze/plantă	232±12.8			167±9.737			118±13.1		
Biomasă (g/plantă)	13.7±	10.2±	17.2±	4.9±	10.1±	9.21±	3.0±	7.63±	11.5±
	0.2	0.4	0.3	0.2	0.3	0.2	0.2	0.4	0.2
Biomasă (%) –rădăcini	26,2	27,3	40,8	30,2	36,9	44,0	29,6	37,2	36,3
- tulpini și ramuri	64,4	61,3	50,3	58,4	47,2	41,7	52,4	43,6	47,1
- frunze	9,4	11,4	8,9	11,4	15,9	14,3	18,0	19,2	16,7
Umiditate(%)- rădăcini	73,8	72,7	59,2	69,8	63,1	56,0	70,4	62,8	63,7
- tulpini și ramuri	35,6	38,7	49,7	41,6	52,8	58,3	47,6	56,4	52,9
- frunze	90,6	88,6	91,1	88,6	64,1	85,7	82,0	80,8	83,3
Fitomasă (g.m <sup>-2</sup> )	875±	615±	751±	432±	888±	787±	462±	862±	1003±
	21	66	51	5.5	7.5	77	33	40	75
Raport T/R	2,6±	2,2±	1,3±	1,9±	1,3±	1.0±	2.2±	1,2±	1,3±
	0.8	0.6	0.4	0.7	0.09	0.2	1.2	0.2	0.5
RGR (mg.g <sup>-1</sup> .zi <sup>-1</sup> )	8.63±0.02			19.9±0.003			23,04±0.03		
AGR (g.zi <sup>-1</sup> )	2.08±1.5			0,16±0.1			0,133±0.09		
SLA (m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> )	0,052±0.005			0,058±0.013			0,042±0.005		
LWR	0,094±0.02			0,111±0.04			0,187±0.08		
LAI (m <sup>2</sup> .m <sup>-2</sup> )	6.10±0.7			4,94±1.7			2.65±0.3		
LAR (m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> )	0,0049±0.001			0,006±0.002			0,0078±0.003		

**RGR= rata creșterii relative; AGR= rata creșterii absolute; LAR= raportul ariei foliare; SLA= aria foliară specifică; LWR= raportul greutății foliare; LAI= indicele ariei foliare; raport T/R = masa lemnoasă aeriană/ masa lemnoasă subterană; VI, VII, IX = lunile anului.**

Distribuția luminii la nivelul frunzelor precum și eficiența de captare a fluxului fonic manifestă o mare influență asupra producției de biomasă. Aria specifică foliară (SLA) s-a redus cu 19% în raport cu mărirea altitudinii din cauza investițiilor în biomasă (Tabelul 1). Indicele ariei foliare (LAI) s-a redus cu mărirea altitudinii cu circa 57% din cauza scăderii ariei foliare totale, respectiv a reducerii numărului de frunze per plantă. Acești coeficienți de creștere foliară sunt foarte eficienți în termeni de biomasă. Măsura acestei eficiențe se exprimă în raportul greutateii foliare (LWR) și în raportul suprafeței foliare (LAR) a căror valori s-au mărit semnificativ cu altitudinea, cu 199% și, respectiv 159%. Grosimea frunzelor crește cu altitudinea [2].

Tabel 2

**Cuprinzând valorile coeficienților de creștere la *Vaccinium myrtillus* L. raportat diferitelor altitudini și perioade de creștere**

Parametrii determinați	Altitudinea								
	1660 m			1825 m			1930 m		
	VI	VII	IX	VI	VII	IX	VI	VII	IX
Densitatea(plante.m <sup>-2</sup> )	100±11			150±2,8			126±8		
Înălțimea (cm)	24±0.8			17,7±1.5			17±1		
Număr frunze/plantă	66±8.7			69±8.5			53±6.6		
Biomasă (g/plantă)	1,33±	2,11	1,5±	0,60±	1,24±	1,29±	0,71±	0,91±	1,75±
	0.13	0.2	0.2	0.08	0.2	0.1	0.09	0.09	0.2
Biomasă (%) –rădăcini	24,6	31,5	22,4	27,0	38,8	40,4	30,2	35,3	33,7
- tulpini și ramuri	65,4	56,1	69,0	59,7	4,8	48,7	60,2	52,5	60,2
- frunze	10,0	12,4	8,6	13,3	16,4	10,9	9,6	12,2	6,1
Umiditate(%) - rădăcini	75,4	68,5	77,6	73,0	61,2	59,6	69,8	64,7	66,3
- tulpini și ramuri	34,6	43,9	40,0	40,3	55,2	51,3	39,8	47,5	39,8
- frunze	90,0	87,6	91,4	86,7	83,6	89,1	90,4	87,8	93,9
Fitomasă (g s.u..m <sup>-2</sup> )	65.2±	194.3±	186,1±	50.5±	96.7±	117,2±	138±	137,5±	158,5±
	11.8	37.7	3.2	29.3	11.5	20.9	28.5	28.7	44
Raport T/R	2,9±	1,82±	3,8±	1,82±	1,62±	1,18±	1,76±	1,56±	1,97±
	0.5	0.6	0.8	0.5	0.6	0.3	0.5	0.4	0.6
RGR (mg.g <sup>-1</sup> .zi <sup>-1</sup> )	12,9±0.4			19,5±0.4			7,2±0.3		
AGR (g.zi <sup>-1</sup> )	0,03±0.01			0,02±0.01			0,01±0.007		
SLA (m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> )	0,205±0.02			0,2±0.03			0,14±0.02		
LWR	0,125±0.04			0,14±0.02			0,1±0.03		
LAI (m <sup>2</sup> .m <sup>-2</sup> )	3.3±0.1			2,70±0.3			2,13±0.5		
LAR (m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> )	0,025±0.009			0,022±0.007			0,013±0.005		

RGR= rata creșterii relative; AGR= rata creșterii absolute; LAR= raportul ariei foliare; SLA= aria foliară specifică; LWR= raportul greutateii foliare; LAI= indicele ariei foliare; raport T/R = masa lemnoasă aeriană/masa lemnoasă subterană; VI, VII, IX = lunile anului

*Vaccinium myrtillus* L. Evoluția parametrilor de creștere s-a modificat în raport cu perioadele de creștere și cu altitudinea. În ce privește acumularea de biomasă, s-a remarcat o specificitate legată de habitat (Tabel 2). Biomasa s-a redus

cu 47-57% în raport cu altitudinea, exceptând perioada din septembrie când s-a înregistrat o creștere de 17%. Raportat perioadelor de creștere, s-a remarcat mărirea biomasei în perioada din septembrie, la toate altitudinile. Au existat variații mari a distribuției substanței uscate pe organe vegetative, de la un biotop la altul. La nivelul rădăcinilor, investițiile în biomasă au crescut la finele ciclului vital, fiind în relație directă cu altitudinea.

La nivelul tulpinilor și frunzelor acumulările de substanță uscată au scăzut proporțional cu durata perioadelor de creștere și cu mărirea altitudinii. Masa lemnoasă, în general, a crescut cu 2% în raport cu altitudinea. După *Johnson* [8] temperatura și CO<sub>2</sub> crescute sunt responsabile de mărirea ratelor de creștere și a cantității de substanță uscată, comparativ cu altitudinea ridicată.

Conținutul în apă al organelor vegetative a evoluat într-un mod similar. A scăzut umiditatea pe durata perioadelor de creștere, situându-se în relație directă cu mărirea altitudinii. Umiditatea cea mai scăzută s-a înregistrat la nivelul tulpinilor și ramurilor (Tabel 2).

Acumularea de fitomasă (substanță uscată aeriană) s-a intensificat în raport cu altitudinea în timpul perioadei din iunie crescând cu 211%, iar în iulie și septembrie a scăzut cu circa 15%.

Raportul între masa lemnoasă aeriană și cea subterană a înregistrat valori scăzute pe durata perioadelor de creștere și în raport cu altitudinea, excepție făcând valorile obținute la staționarul de la 1660 m. Scăderile s-ar datora acumulării intense de substanță uscată la nivelul rădăcinilor în raport cu altitudinea și, în special la finele ciclului vital (Tabel 2).

Rata creșterii relative (RGR) s-a redus cu 44% în raport cu mărirea altitudinii din cauza scăderii acumulării de substanță uscată la nivelul tulpinilor și frunzelor. Aceste reduceri s-au corelat cu evoluția biomasei. Rata creșterii absolute (AGR) a scăzut cu mărirea altitudinii din cauza reducerii biomasei.

Coeficienții de creștere de la nivelul frunzelor au prezentat, în general, o evoluție în relație directă cu altitudinea. Aria specifică foliară (SLA) a scăzut cu 32% în raport cu mărirea altitudinii din cauza reducerii ariei totale foliare ca urmare a reducerii numărului de frunze per plantă (Tabel 2). Speciile cu frunzele mai mici ca dimensiune ocupă habitatele cu lumină multă, cu disponibil de nutrienți și umiditate scăzute în asocieri cu subțierea frunzelor. Dimensiunile foliare afectează direct interceptația luminii și balanța energetică foliară [1]. Indicele ariei foliare (LAI) a scăzut cu 35% în raport cu mărirea altitudinii din cauza reducerii ariei foliare. Raportul greutateii foliare (LWR) și raportul suprafeței foliare (LAR) au scăzut nesemnificativ cu altitudinea din cauza reducerii ariei foliare și a creșterii acumulării de substanță uscată de la finele ciclului vital.

**Concluzii.** 1. Evoluția variabilelor de mărime la *Rhododendron* și *Vaccinium* este restrictivă ori amplificată în raport cu oferta altitudinală. Se remarcă mărirea densității pe m<sup>2</sup> în detrimentul caracterelor morfologice (înălțime, număr de frunze), comparativ cu mărirea altitudinii.



2. Arbuștii de *Rhododendron* și *Vaccinium* sunt biomi dominanți în zona subalpină și alpină. În acest caz exploatarea resurselor poate fi exclusiv competitivă sau complementară. Schimbările climatice globale contemporane afectează distribuția biomasei și fenologia creșterii plantelor. S-a observat că acumularea biomasei este diminuată de-a lungul gradientului altitudinal, dar există o rată sporită la altitudinea ridicată la finele ciclului vital.

3. Creșterea plantelor de *Rhododendron* și *Vaccinium* este controlată la scară mare prin modul de distribuție a substanței uscate la diferitele organe vegetative. La *Rhododendron* există o potrivire între rădăcini și frunze cu privire la intensificarea înmagazinării de substanță uscată de-a lungul gradientului altitudinal, în special, la finele ciclului vital.

La nivelul tulpinilor și ramurilor bugetul substanței uscate se reduce în raport cu mărirea altitudinii și pe întreaga durată a perioadelor de creștere. În cazul plantei *Vaccinium* vorbim de acumulări de substanță uscată la nivelul rădăcinilor. Pentru organele aeriene, tulpini, ramuri și frunze, se manifestă variații în distribuția biomasei, specifice fiecărui habitat.

4. Evoluția fitomasei (substanța uscată aeriană) la cele două specii este similară. Sporul de fitomasă se înscrie de-a lungul gradientului altitudinal la finele ciclului vital.

5. Coeficienții de creștere au o evoluție specifică fiecărei specii. Rata creșterii relative (RGR) și absolute (AGR) la *Rhododendron* prevalează de-a lungul gradientului altitudinal. La *Vaccinium* rata relativă de creștere scade cu mărirea altitudinii. Indicii de creștere se corelează cu distribuția substanței uscate.

6. Variabilele de mărime foliară: aria specifică foliară (SLA) și indicele ariei foliare (LAI) la cele două specii probează diminuarea productivității de-a lungul gradientului altitudinal. Controlul fotoperiodic al creșterii este diferit la cele două specii.

Raportul greutatei foliare (LWR) și raportul suprafeței foliare (LAR) se multiplică la *Rhododendron* în raport cu gradientul altitudinal, iar la *Vaccinium* rapoartele manifestă diferențe evolutive.

Caracteristicile morfologice și de creștere ale populațiilor naturale sunt adaptări importante la condițiile oferite de habitate. Rezultatele obținute cu diferențele și similaritățile constatate evidențiază o segregare habituală între *Rhododendron* și *Vaccinium*. Variațiile specifice evaluate la *Vaccinium* arată că specia este mai puțin aclimatizată. Totuși, cele două specii contribuie la echilibrul ecologic în sfera productivității și la echilibrul bilanțului de apă al zonei ce influențează pozitiv debitul rețelei hidrografice montane.

## BIBLIOGRAFIE

1. A c k e r l y, D.D., R e i c h, P.B., *Convergence and correlations among leaf size and function in seed plants: a comparative test using independent contrasts*, "Am.J.Bot.", **86** (9), 1999, 1272-1281.

2. Chalker – Scott, L., Scott, J.D., *Elevated ultraviolet-B radiation induces cross-protection to cold in leaves of Rhododendron under field conditions*, „Photochem. Photobiol.”, **79** (2), 2004,199-204.
3. Coldea, Gh., Pînzaru, Gh., *La végétation de la reserve Bila-Lala de monts Rodnei*, „Contribuții Bot.(Cluj-Napoca)”, 1986,153-169.
4. Hättenschwiler, S., Körner, C., *Responses to recent climate warming of Pinus sylvestris and Pinus cembra within their montane transition zone in the Swiss Alps*, „J.Veg.Sci.”, **6**, 1995,357-368.
5. Hunt, R., *Basic Growth Analysis*.Unwin Hyman, London, 1990.
6. Innes, J. L., *High-altitude and high-latitude tree growth in relation to past, present and future global climate change*, „Holocene”, **2**, 1991, 168-173.
7. James, J. C., Grace, J., Hoad, S. P., *Growth and photosynthesis of Pinus sylvestris at its altitudinal limit in Scotland*, „J.Ecol.”, **82**, 1994, 297-306.
8. Johnsen, K. H., *Growth and ecophysiological responses of black spruce seedlings to elevate CO<sub>2</sub> under varied water and nutrient additions*, „Can.J.Forest Res.”, **23**, 6, 1993, 1033-1042.
9. Karlsson, P. S., *Micro-site performance of evergreen and deciduous dwarf shrubs in a subarctic heath in relation to nitrogen status*, „Holarctic Ecol.”, **10**, 1987, 114-119.
10. Karlsson, P. S., *Leaf longevity in evergreen shrubs: variation within and among European species*, „Oecologia”, **91**, 1992, 346-349.
11. Karlsson, P. S., *The significance of internal nutrient cycling in branches for growth and reproduction of Rhododendron lapponicum*, „OIKOS”, **70**, 1994, 191-200.
12. Karlsson, P. S., *Photosynthetic capacity and photosynthetic nutrient-use efficiency of Rhododendron lapponicum leaves as related to leaf nutrient status, leaf age and branch reproductive status*, „Functional Ecol.”, **8**, 1994, 694-700.
13. Körner, C., *Some often overlooked plant characteristics as determinants of plant growth: a reconsideration*, „Functional Ecol.”, **5**, 1991, 162-173.
14. Körner, C., *Biomass fractionation in plants: a reconsideration of definitions based on plant functions*, in: *A Whole Plant Perspective on Carbon-Nitrogen Interactions*, (Roy, J., Garnier, E., eds.). 1994, pp.173-185, SPB Acad.Publishing bv, Hague, The Netherlands.
15. Körner, C., *Impact of atmospheric changes on high mountain vegetation*, In: *Mountain Environments in Changing Climates*, (Beniston, M., ed.), 1994, pp.155-166. Routledge. London, New York.
16. Ninemets, Ü., Valladares, P., Ceulemans, R., *Leaf-level phenotypic variability and plasticity of invasive Rhododendron ponticum and non-invasive Ilex aquifolium co-occurring at two contrasting European sites*, „Plant Cell Environm.”, **26**, 2003, 1-16.
17. Tappeiner, U., Cernusca, A., *Microclimate and fluxes of water vapour, sensible heat and carbon dioxide in structurally differing subalpine plant communities in the Central Caucasus*, „Plant, Cell Envir.”, **19**, 1996, 403-417.
18. Yura, H., *Comparative ecophysiology of Larix kaempferi (Lamb.)Carr. and Abies veitchii Lindl. 1. Seedling establishment on bare ground on Mt.Fuji*, „Ecol.Res.”, **3**, 1988, 67-73.

## STUDII ECOFIZIOLOGICE LA PLANTE ARBUSTIVE ENDEMICE SUB PRESIUNEA FACTORILOR DE HABITAT. II. EVOLUȚIA CONȚINUTULUI ÎN PIGMENȚI ASIMILATORI

**VICTOR BERCEA\***

**SUMMARY. - Ecophysiological Studies of Endemic Shrubs Exposed to Habitat Factors' Pressure. II. The Dynamic of Assimilatory Pigment Contents.** This study describes the photosynthetic capacity in different vegetation periods and at different altitudes in endemic shrubs *Rhododendron myrtifolium* L. and *Vaccinium myrtillus* L. The photosynthetic capacity was estimated on the grounds of assimilatory pigments composition. This composition was analyzed during June (blooming period in *Rhododendron*), July and September (leaf senescence) vegetation periods. In *Rhododendron*, a highly variability in chlorophyll content between populations was detected, negatively correlated with altitude. During vegetative cycle, assimilatory pigments level increased in July and decreased in September due to the beginning of foliage senescence. At highly altitude of 1930 m, the shrub population accumulated the lowest levels of assimilatory pigments. This decreasing of chlorophyll index is based on a growing of foliage weight. In *Vaccinium myrtillus*, the amount of chlorophyll *a* per leaf area unit increased with 13% along with altitude gradient, denoting an enlargement of light absorption area. The short vegetation cycle, as well as the unpredictable climatic changes, influences the photosynthesis in alpine shrubs.

Pentru că CO<sub>2</sub> este principala sursă de hrană pentru speciile vegetale, schimbarea proporției acestuia în atmosferă, va duce la schimbări în biosferă și în relațiile intraspecifice dintre organisme, va afecta, în principal, biodiversitatea. Abilitatea plantelor de-a investi aceste glucide, provenind din carbonul absorbit, în noi structuri este limitată prin alte resurse, cum ar fi nutrienții minerali din sol ori temperatura scăzută care constrâng productivitatea [6].

Speciile de plante alpine prezintă o creștere pronunțată a fotosintezei foliare sub CO<sub>2</sub> ridicat față de plantele de câmpie, dar această eficiență nu influențează producția de biomasă. Schimbările variabilelor de mediu au un impact mare asupra creșterii plantelor în mediul alpin față de stimularea directă a fotosintezei prin CO<sub>2</sub> [16]. Comunitățile vegetale alpine sunt compuse din specii de ranguri diferite ca înălțime. Densitatea fluxului fonic activ fotosintetic scade cu adâncimea straturilor de vegetație [8]. Ca o consecință, speciile înalte capătă mai multă lumină, ating o biomasă stabilă și domină în comunitatea de plante. Speciile din straturile joase, capătă mai puțină lumină și adesea ocupă poziții subordonate în termeni de biomasă.

---

\* Institutul de Cercetări Biologice 400015/Cluj-Napoca.  
E-mail: bercea\_victor@yahoo.com

Repartiția fluxului fonic între speciile cohabitabile arată că fluxul fonic absorbit pe unitate de cantitate de biomasă aeriană a fost crescut la speciile subordonate, chiar dacă fluxul fonic per unitate de suprafață a scăzut [4].

Fotosinteza vegetației este un complex de funcții ecologice ce se asociază cu alți factori de mediu cum sunt structura vegetației, caracteristicile foliare și condițiile de mediu [7-9]. Plantele își ajustează distribuția capacității fotosintetice și a clorofilei la densitatea covorului vegetal prin partiția convenabilă a resurselor fotosintetice [14].

În această lucrare s-a studiat capacitatea fotosintetică exprimată pe baza compoziției în pigmenți asimilatori a frunzelor în diferite perioade de creștere, la arbuștii endemici *Rhododendron myrtifolium* L. și *Vaccinium myrtillus* L. (fam. Ericaceae) din M-ții Rodnei, masivul Pietrosu (2303 m).

**Material și metode.** Pentru efectuarea cercetărilor au fost selectate trei zone (staționare), așezate diferit altitudinal, respectiv 1660 m, 1825 m și 1930 m (vezi lucrarea anterioară).

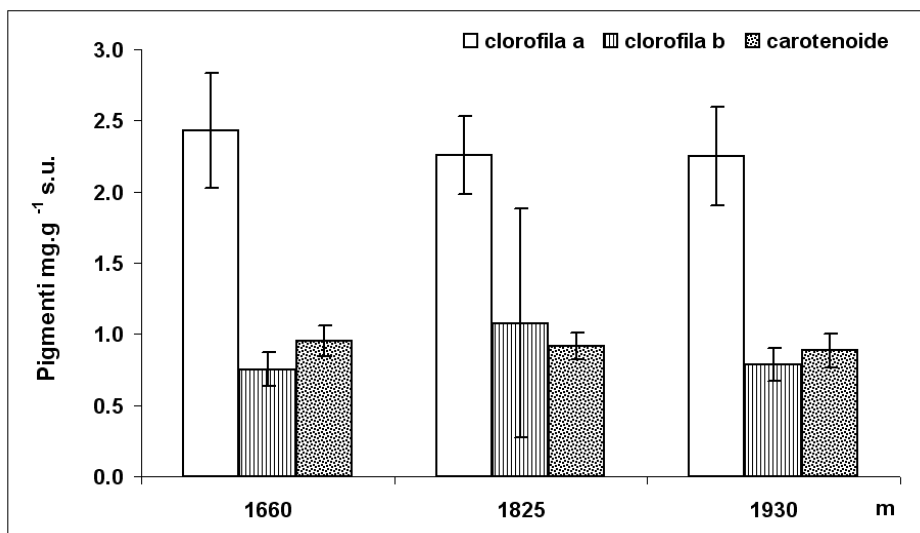
Pentru analiza componentelor pigmentari s-au recoltat frunzele fiecărui individ în perioadele de vegetație iunie, iulie și septembrie. Materialul vegetal s-a mojarat și extras cu acetonă în prezență de  $\text{CaCO}_3$ . Conținutul în clorofile (clorofila a și b) și carotenoide s-a estimat spectrofotometric pe baza coeficienților specifici de absorbție [2,15].

Cantitatea de pigmenți s-a raportat perioadelor de creștere și transectului altitudinal. Raporturile dintre componenții pigmentari sunt trecute în tabele. De asemenea, s-a calculat raportul dintre clorofila a și greutatea foliară totală ori suprafața foliară totală per plantă. Relația logaritmică între totalul pigmentilor asimilatori și indexul suprafeței foliare (LAI) în raport cu altitudinea staționarelor s-a exprimat numai în perioada de creștere din iunie. Rezultatele s-au prelucrat statistic prin sistemul ANOVA.

**Rezultate și discuții.** Timpul de vegetație redus precum și schimbările climatice influențează fotosinteza plantelor alpine. Eficiența de fixare a carbonului la speciile alpine evidențiază o creștere pronunțată a fotosintezei foliare [16]. Procesele fotosintetice și respiratorii joacă un rol central în adaptarea plantelor la habitatele cu condiții climatice diferite [11] și, deci, este necesar de-a caracteriza componenții și procesele biochimice implicate în procesul de fotosinteză [1].

***Rhododendron myrtifolium* L.** Evoluția conținutului în pigmenți asimilatori din timpul înfloritului (iunie) este prezentată în Fig. 1. Cantitatea de clorofilă a a scăzut cu mărirea altitudinii cu 10%, în schimb, clorofila b a crescut ușor, mai semnificativ la plantele situate la 1825 m cu 43%. Carotenoidele au scăzut ușor cu altitudinea cu până la 4-7%, situație reflectată în raporturile dintre componenții pigmentari (Tabel 1). O variabilitate accentuată s-a evidențiat între populații privind conținutul în clorofile, la toate staționarele (diferențe semnificative în valorile abaterii

standard) însemnând perturbări produse în calea metabolică și în necesarul de substrat și energie privind sinteza constituenților aparatului fotosintetic. Gradientul lumină în covorul vegetal are o componentă calitativă și una cantitativă. Acest gradient este implicat în partiția resurselor fotosintetice foliare și inducția senescentei la frunzele mai jos poziționate [14].



Fi g. 1. Acumularea clorofilelor și a carotenoidelor la Rhododendron în perioada de înflorit (iunie) și în raport cu altitudinea.

Tabel 1

**Valorile raporturilor dintre componenții aparatului fotosintetic la speciile de Rhododendron și Vaccinium**

Perioada / Staționarul	Rhododendron		Vaccinium	
	a/b	a+b/c	a/b	a+b/c
<b>IUNIE:</b>				
1660 m	3,05 ± 0,1	3,26 ± 0,1	2,86 ± 0,1	3,51 ± 0,1
1825 m	2,95 ± 0,05	3,32 ± 0,1	3,09 ± 0,04	3,55 ± 0,1
1930 m	2,93 ± 0,1	3,49 ± 0,1	2,64 ± 0,2	3,66 ± 0,02
<b>IULIE:</b>				
1660 m	3,26 ± 0,1	3,26 ± 0,1	2,64 ± 0,1	2,90 ± 0,08
1825 m	3,46 ± 0,1	3,34 ± 0,07	2,77 ± 0,1	2,93 ± 0,07
1930 m	3,28 ± 0,2	3,30 ± 0,1	2,66 ± 0,1	3,25 ± 0,1
<b>SEPTEMBRIE:</b>				
1660 m	1,85 ± 0,1	3,66 ± 0,1	2,25 ± 0,3	3,18 ± 0,03
1825 m	2,26 ± 0,1	3,80 ± 0,1	2,25 ± 0,2	2,72 ± 0,2
1930 m	2,42 ± 0,3	3,15 ± 0,1	2,41 ± 0,2	3,34 ± 0,2

a=clorofila a; b=clorofila b; c=carotenoide

Conținutul în pigmenți asimilatori în perioada din iulie este prezentat în Fig. 2. Cantitatea de clorofilă *a* și *b* a scăzut în raport cu altitudinea cu până la 12-13%, făcând excepție plantele din staționarul de la 1825 m la care acumulările de clorofilă *a* s-au mărit cu 3%, variații ce s-au reflectat în raporturile dintre componenți (Tabel 1). Carotenoidele au scăzut cu 15%. Însurarea componenților fotosintetici a arătat o ușoară creștere la plantele situate la 1825 m cu 1,3%, dar evoluția sub aspect general a rămas invers proporțională cu altitudinea.

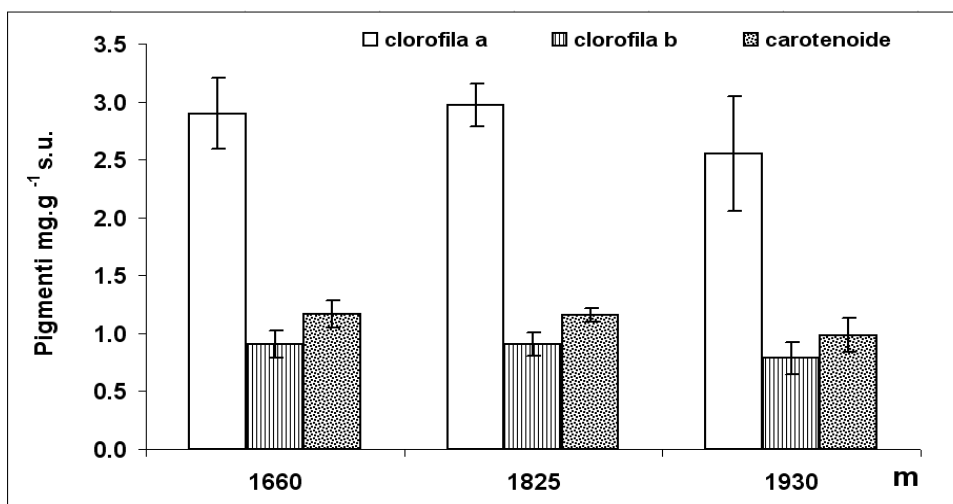


Fig. 2. Conținutul în pigmenți asimilatori la *Rhododendron* în perioada din iulie raportat transectului altitudinal.

Acumularea pigmenților asimilatori în perioada din septembrie este redată în Fig. 3. Diferențele cantitative în raport cu altitudinea au fost mai pronunțate. Cu excepția staționarului intermediar de la 1825 m, cantitatea componenților fotosintetici a scăzut cu altitudinea. La altitudine superioară (1930 m) scăderile în cantitatea de clorofilă *a* (cu 34%), clorofilă *b* (cu 42%) și carotenoide (cu 24%) au fost semnificative.

La plantele provenind din staționarul de la 1825 m s-au înregistrat cantitățile cele mai ridicate de pigmenți asimilatori: clorofila *a* a crescut cu 21%, clorofila *b* cu 7%, iar carotenoidele cu 15%. Pe durata ciclului vegetativ, acumularea pigmenților asimilatori s-a intensificat în perioada din iulie când s-au înregistrat cantitățile cele mai ridicate și a scăzut în perioada din septembrie. În raport cu transectul altitudinal, plantele crescute în staționarul cu altitudine intermediară s-au acumulat cele mai mari cantități. La altitudinea superioară de 1930 m, populația de plante a acumulat cele mai reduse cantități de pigmenți asimilatori.

PIGMENTII ASIMILATORI LA RHODODENDRON ȘI VACCINIUM

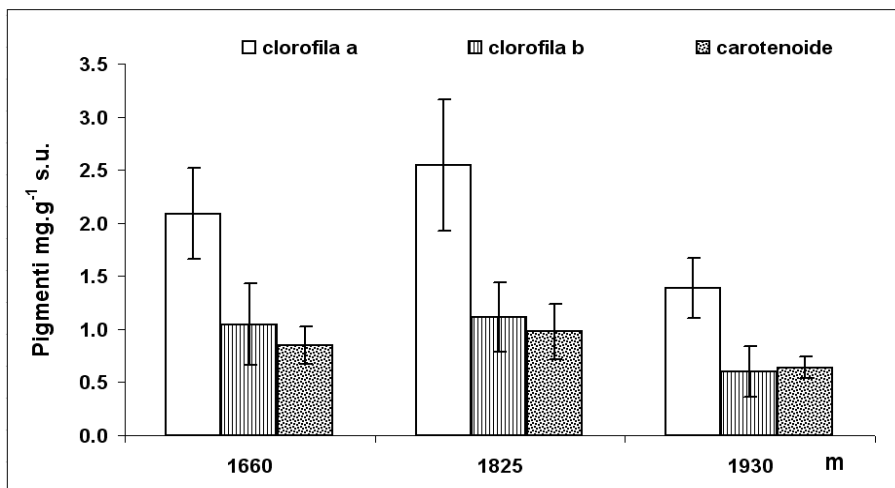


Fig. 3. Conținutul în clorofile și carotenoide la Rhododendron în perioada din septembrie și raportat altitudinii.

*Vaccinium myrtillus* L. Acumularea pigmentilor asimilatori în perioada din iunie este prezentată în Fig. 4. Cantitatea de clorofilă a și b a scăzut semnificativ cu altitudinea. Astfel, clorofila a a scăzut cu 25%, iar clorofila b cu 19-22%.

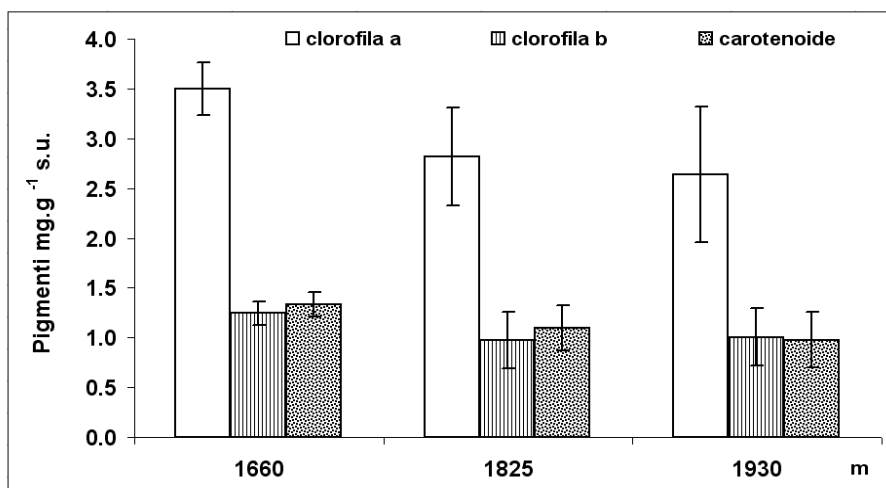


Fig. 4. Acumularea pigmentilor asimilatori la Vaccinium în perioada din iunie, raportat transectului altitudinal.

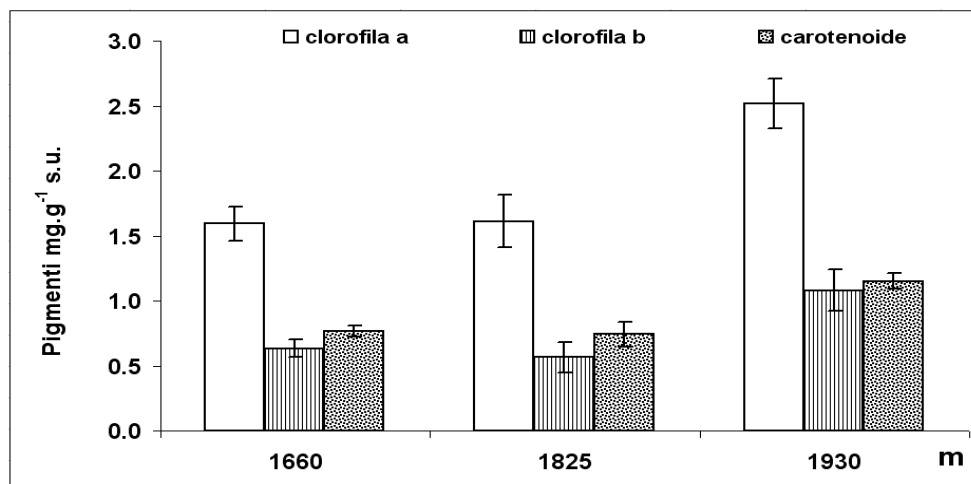


Fig. 5. Conținutul în pigmenți fotosintetici la *Vaccinium* în perioada din iulie și în raport cu diferitele altitudini.

Carotenoidele au prezentat o evoluție asemănătoare, înregistrându-se scăderi cu până la 17-27%, situație oglindită în raporturile dintre componenți (Tabel 1). Diferențele între populațiile de plante s-au intensificat în raport cu mărirea altitudinii (diferențe semnificative între valorile abaterii standard).

Conținutul în pigmenți asimilatori în perioada din iulie este redat în Fig. 5. Acumularea pigmenților asimilatori în această perioadă a manifesta o relație de proporționalitate directă cu mărirea altitudinii. Astfel, clorofila a a crescut cu 58%. Clorofila b a scăzut cu 11% la plantele situate la 1825 m și a crescut cu 70% la plantele situate la altitudine superioară. Carotenoidele au crescut cu 50% în raport cu altitudinea modificând relația dintre componenți (Tabel 1). Valorile abaterii standard au evidențiat diferențe reduse între populații.

Acumularea pigmenților asimilatori în perioada din septembrie este redată în Fig. 6. Variațiile au fost semnificative la plantele crescute la altitudinile extreme. Astfel, cantitatea de clorofilă a a scăzut cu 14% la populația de plante de la 1825 m și a crescut cu 3% la altitudinea de 1930 m. Clorofila b a scăzut cu 16% la populația de plante de la 1825 m și a crescut cu 23% la altitudinea superioară. Conținutul în carotenoide a scăzut cu 16% la altitudinea de 1825 m și cu 1% la populația de la 1930 m. Relația dintre principalii componenți fotosintetici s-au modificat semnificativ (Tabel 1). Diferențele exprimate de abaterea standard au fost semnificative între populațiile crescute în diferite staționare.

În derularea ciclului vegetativ, acumulările intense de pigmenți s-au produs în perioada din iunie și au scăzut în perioada din septembrie. Cu excepția populațiilor de plante de la 1660 m, în perioada din iunie, cantitățile cele mai ridicate de pigmenți asimilatori s-au înregistrat la altitudinea superioară de 1930 m.



PIGMENTII ASIMILATORI LA RHODODENDRON ȘI VACCINIUM

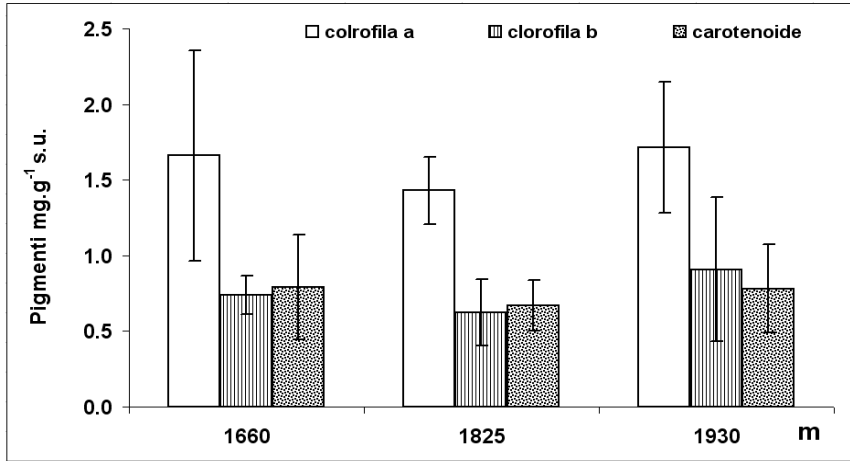


Fig. 6. Acumularea pigmentilor asimilatori la Vaccinium în perioada din septembrie.

Interes aparte au prezentat rezultatele obținute prin raportarea clorofilei a la unitatea de masă foliară și la unitatea de arie foliară (Tabel 2). Astfel, la *Rhododendron* producția de clorofilă a per unitate de masă foliară a scăzut în raport cu mărirea altitudinii, pe durata perioadelor din iulie (cu 14%) și septembrie (cu 56%), ceea ce a evidențiat reducerea capacității de absorbție (captare) a luminii la nivelul aparatului fotosintetic. Deoarece reducerea indicelui clorofilian are la bază creșterea masei foliare a demonstrat capacitatea ridicată de utilizare a energiei luminii de către aparatul fotoasimilator. Competiția pentru lumină este substanțială. Se produce o îmbunătățire a performanțelor fotosintetice de captarea luminii în condițiile luminii slabe și crește capacitatea fotosintetică în condițiile luminii puternice [13].

Tabel 2

**Raportarea clorofilei a la unitate de masă foliară și unitate de arie foliară la *Rhododendron***

Perioada / Staționarul	Greutatea uscată foliară totală (W) g/g plantă	Suprafața totală foliară (S) cm <sup>2</sup> /plantă	Clorofila <u>a</u> mg.g <sup>-1</sup>	Clorofila <u>a</u> /W %	Clorofila <u>a</u> /S %*
<b>IUNIE:</b>					
1660 m	1,246 ± 0,1	691,90 ± 34,3	2,420 ± 0,15	0,19 ± 0,06	0,44 ± 0,09
1825 m	0,670 ± 0,1	453,5 ± 28	2,415 ± 0,2	0,36 ± 0,05	0,36 ± 0,05
1930m	0,631 ± 0,1	214 ± 16	2,273 ± 0,2	0,36 ± 0,09	0,67 ± 0,06
<b>IULIE:</b>					
1660 m	1,551 ± 0,1		3,115 ± 0,1	0,20 ± 0,08	
1825 m	1,938 ± 0,3		2,899 ± 0,1	0,15 ± 0,05	
1930 m	1,827 ± 0,3		2,739 ± 0,2	0,15 ± 0,09	
<b>SEPTEMBRIE:</b>					
1660 m	1,484 ± 0,3		2,360 ± 0,2	0,16 ± 0,06	
1825 m	1,262 ± 0,15		2,645 ± 0,2	0,19 ± 0,02	
1930 m	2,384 ± 0,15		1,308 ± 0,1	0,05 ± 0,03	

\* - cantitatea de clorofilă per plantă (sau eliminat valorile extreme pentru reducerea abaterii)

Răspunsul populației de plante de la 1825 m nu s-a încadrat în această generalizare din cauza unui comportament specific. În perioada din iunie din timpul înfloritului, valorile ridicate ale indicelui clorofilian (cu peste 200%), treptat cu mărirea altitudinii, raportat masei foliare s-ar datora fiziologiei înfloritului plantei.

Cantitatea de clorofilă  $a$  raportată la unitate de suprafață foliară a crescut cu 13% în raport cu mărirea altitudinii (Tabel 2), deci a crescut dimensiunea antenei clorofiliene și astfel s-a mărit eficiența de absorbție a luminii. Relația între capacitatea de absorbție a luminii și potențialul de utilizare a energiei luminii variază în funcție de factorii de mediu [17]. Absorbția luminii poate fi de importanță secundară pentru supraviețuirea plantelor de soare din cauza nutrienților și a apei care sunt cele mai limitative resurse în habitatele naturale [12].

Tabel 3

**Relația dintre clorofila  $a$  și unitatea de masă foliară ori suprafața foliară la *Vaccinium***

Perioada / Staționarul	Greutatea uscată foliară totală (W) g/g plantă	Suprafața totală foliară (S) cm <sup>2</sup> /plantă	Clorofila $a$ mg.g <sup>-1</sup>	Clorofila $a$ /W %	Clorofila $a$ /S %*
<b>IUNIE:</b>					
1660 m	0,1323 ± 0,03	262,2 ± 27	3,393 ± 0,1	2,56 ± 0,2	0,18 ± 0,01
1825 m	0,0804 ± 0,04	90,9 ± 15,8	2,894 ± 0,1	3,60 ± 0,3	0,25 ± 0,07
1930 m	0,0682 ± 0,04	86 ± 14,8	2,152 ± 0,1	3,15 ± 0,8	0,21 ± 0,06
<b>IULIE:</b>					
1660 m	0,2613 ± 0,06		1,68 ± 0,2	0,64 ± 0,1	
1825 m	0,2033 ± 0,06		1,74 ± 0,1	0,85 ± 0,2	
1930 m	0,1107 ± 0,04		2,57 ± 0,2	2,32 ± 0,2	
<b>SEPTEMBRIE:</b>					
1660 m	0,1281 ± 0,09		1,92 ± 0,4	1,50 ± 0,4	
1825 m	0,1407 ± 0,04		1,431 ± 0,2	1,02 ± 0,3	
1930 m	0,1064 ± 0,02		2,018 ± 0,2	1,90 ± 0,3	

\*- cantitatea de clorofilă per plantă (sau eliminat valorile extreme pentru reducerea abaterii)

La *Vaccinium*, producția de clorofilă  $a$  per unitate de masă foliară a crescut cu mărirea altitudinii, cu 60% în perioada din iunie, cu 306% în iulie și doar cu 2% în septembrie (Tabel 3).

Creșterea indicelui clorofilian înseamnă mărirea dimensiunilor antenei clorofiliene și implicit, a capacității de absorbție a luminii. Faptul că aceste creșteri nu sunt însoțite de creșteri în biomasa foliară denotă o capacitate redusă de utilizare a energiei luminii. Raportarea clorofilei  $a$  la unitatea de arie foliară dobândește valori proporționale cu creșterea altitudinii, creșteri cu 18%, ceea ce înseamnă mărirea suprafeței de absorbție a luminii (Tabel 3). *K ö r n e r* și *D i e m e r* [5] au arătat că ratele fotosintezei nete per unitate de suprafață foliară se măresc la speciile de plante alpine.

Compararea cantității de pigmenți asimilatori cu indicele ariei foliare (LAI) în perioada înfloritului a relevat existența unor caracteristici fiziologice specifice speciilor respective. Astfel, la *Rhododendron*, indicele ariei foliare și totalul de pigmenți asimilatori s-au dezvoltat în antiteză la punctele extreme de altitudine (Fig. 7). La nivelul staționarului intermediar, cele două caracteristici s-au întrepătruns.

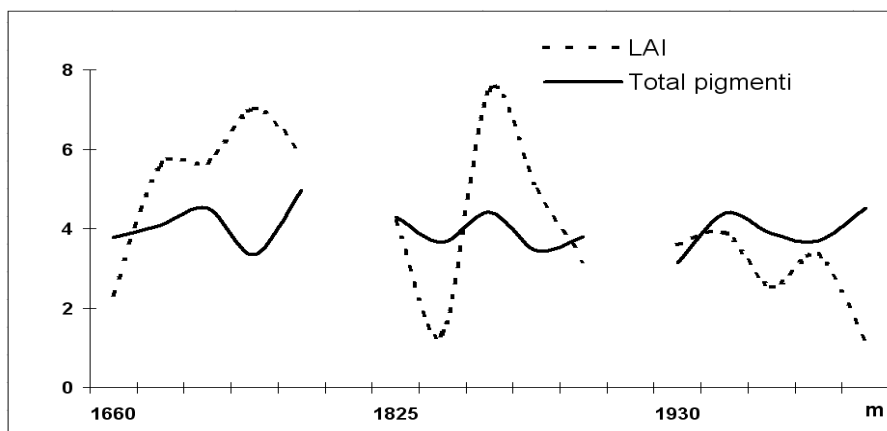


Fig. 7. Compararea indicelui ariei foliare cu totalul pigmenților asimilatori la populațiile de *Rhododendron* în raport cu altitudinea.

Relația logaritmică dintre indicele ariei foliare (LAI) și totalul de pigmenți asimilatori a evidențiat o dezvoltare antinomică a celor două caracteristici în raport cu altitudinea. La populația de la altitudinea intermediară, cele două caracteristici s-au stabilizat (Fig. 8).

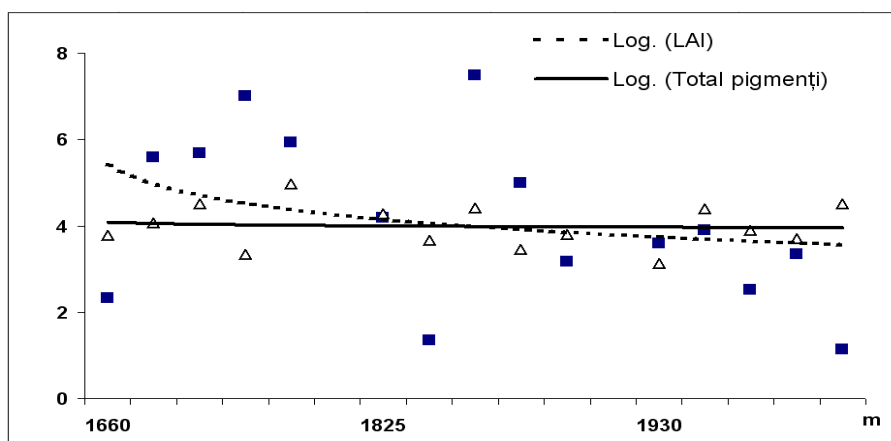


Fig. 8. Relația logaritmică dintre indicele ariei foliare (LAI) și totalul pigmenților asimilatori la populațiile de *Rhododendron*.

La *Vaccinium*, indicele ariei foliare (LAI) și totalul pigmenților asimilatori s-au diferențiat prin mărimea valorilor și s-au dezvoltat concomitent (Fig. 9).

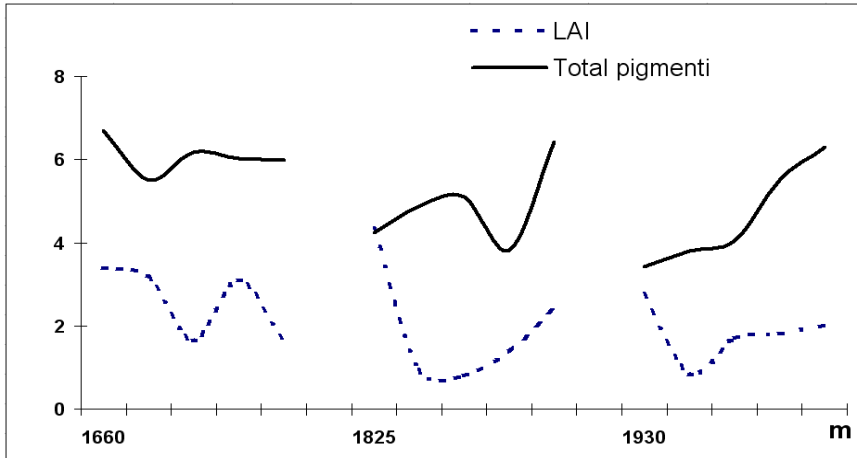


Fig. 9. Compararea indicelui ariei foliare (LAI) cu totalul pigmenților asimilatori la populațiile de *Vaccinium* în raport cu altitudinea.

Relația logaritmică a separat distinctiv paralelismul dintre cele două însușiri (Fig. 10). Între cele două specii luate în studiu a existat un comportament fiziologic diferit în privința derulării procesului de fotosinteză de-a lungul ciclului vegetativ. Ratele fotosintezei sunt dependente de randamentul clorofilei care poate varia considerabil între specii [3]. De asemenea, tipurile metabolice de plante răspund diferit la schimbările climatice [10].

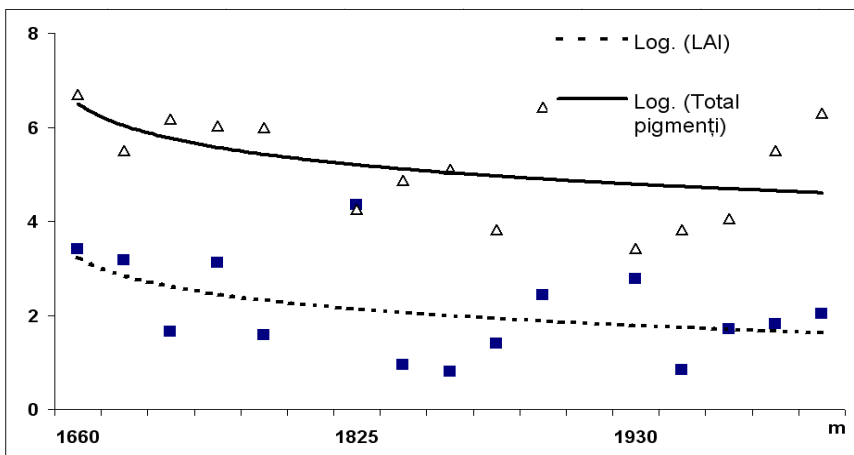


Fig. 10. Relația logaritmică dintre indicele ariei foliare (LAI) și totalul pigmenților asimilatori la populațiile de *Vaccinium*.

**Concluzii.** 1. În fenofaza înfloritului cantitatea de clorofile a scăzut cu mărirea altitudinii, excepție făcând clorofila *b* care a crescut la *Rhododendron*. Carotenoidele au scăzut cu altitudinea, situație reflectată în raporturile dintre componenții pigmentari. O variabilitate accentuată s-a evidențiat între populații privind conținutul în clorofile, la toate staționarele (diferențe semnificative în valorile abaterii standard) însemnând perturbări produse în calea metabolică.

2. În perioada din iulie cantitatea de clorofilă *a* și *b* a scăzut în raport cu altitudinea la *Rhododendron*, în schimb la *Vaccinium* acești componenți au crescut. Acumularea carotenoidele a urmat același plan.

3. Acumularea pigmentilor asimilatori în perioada din septembrie exprimă diminuarea acestor componenți în raport cu altitudinea la *Rhododendron*. La *Vaccinium* acumularea pigmentilor se intensifică în raport cu altitudinea. La plantele situate în staționarul intermediar ca și altitudine s-au înregistrat cantitățile cele mai ridicate de pigmenti asimilatori la *Rhododendron*, în schimb la *Vaccinium* cantitatea pigmentilor s-a diminuat.

4. În relație cu durata ciclului vegetativ, acumularea pigmentilor asimilatori s-a intensificat în perioada din iulie și a scăzut în perioada din septembrie la *Rhododendron*. În raport cu transectul altitudinal, la plantele crescute în staționarul cu altitudine intermediară s-au acumulat cele mai superioare cantități. La altitudinea superioară, s-au acumulat cele mai reduse cantități de pigmenti asimilatori. La *Vaccinium* acumulările intense de pigmenti s-au produs în perioada din iunie și au scăzut în perioada din septembrie. Cantitățile cele mai ridicate de pigmenti asimilatori, în general, s-au înregistrat la altitudinea superioară.

5. La *Rhododendron* producția de clorofilă *a* per unitate de masă foliară a scăzut în raport cu mărirea altitudinii, pe durata perioadelor din iulie și septembrie, ceea ce a evidențiat reducerea capacității de absorbție (captare) a luminii la nivelul aparatului fotosintetic. Excepție au făcut plantele situate în staționarul intermediar. Cantitatea de clorofilă *a* raportată la unitate de suprafață foliară a crescut în raport cu mărirea altitudinii și astfel s-a mărit eficiența de absorbție a luminii. La *Vaccinium*, producția de clorofilă *a* per unitate de masă foliară a crescut cu mărirea altitudinii. Faptul că aceste creșteri nu sunt însoțite de creșteri în biomasa foliară denotă o capacitate redusă de utilizare a energiei luminii. Raportarea clorofilei *a* la unitatea de arie foliară dobândește valori proporționale cu creșterea altitudinii, ceea ce înseamnă mărirea suprafeței de absorbție a luminii.

6. Relația logaritmică dintre indicii ariei foliare (LAI) și totalul de pigmenti asimilatori la *Rhododendron* a evidențiat o dezvoltare antinomică a celor două caracteristici în raport cu altitudinea. La populația de la altitudinea intermediară, cele două caracteristici s-au stabilizat. La *Vaccinium*, relația logaritmică a separat distinctiv paralelismul dintre cele două însușiri.

7. Între cele două specii luate în studiu a exist un comportament fiziologic diferit în privința derulării procesului de fotosinteză de-a lungul ciclului vegetativ. Comportamentul fiziologic diferențiat evidențiază existența segregării fiziologice între cele două specii. Volumul diversității genetice al speciei constituie rezerva de opțiuni adaptative la acțiunea factorilor de mediu în scopul menținerii productivității fotosintetice în timpul procesului de acclimatizare.

## BIBLIOGRAFIE

1. Chung, H. H., Barnes, R. L., *Photosynthate allocation in Pinus taeda. I. Substrate requirement for synthesis of shoot biomass*, "Can.J.For.Res.", **7**, 1977, 106-111.
2. Goodwin, T. W., *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Acad. Press, London, New-York, 1965.
3. Hendry, G. A. F., Stobart, A. K., *Chlorophyll turnover in greening barley*, "Phytochemistry", **25**, 1986, 2735-2738.
4. Hirose, T., Werger, M. J. A., *Photosynthetic capacity and nitrogen partitioning among species in the canopy of a herbaceous plant community*, "Oecologia", **100**, 1994, 203-212.
5. Körner, C., Diemer, M., *In situ photosynthetic responses to temperature and carbon dioxide in herbaceous plants from low and high altitude*, "Funct.Ecol.", **1**, 1987, 179-194.
6. Körner, C., *Biodiversity and CO<sub>2</sub>: global change is under way*, "GAIA", **4**, 1995, 234-245.
7. Kurachi, N., Hagihara, A., Hozumi, K., *Evaluation of the light interception by non-photosynthetic organs in a Larix leptolepis plantation*, "Ecol.Res.", **1**, 1986, 173-183.
8. Kurachi, N., Hagihara, A., Hozumi, K., *Effect of light interception by non-photosynthetic organs on canopy photosynthetic production*, "Ecol.Res.", **4**, 1989, 187-197.
9. Kurachi, N., Hagihara, A., Hozumi, K., *Canopy photosynthetic production in a Japanese larch stand. I. Seasonal and vertical changes of leaf characteristics along the light gradient in a canopy*, "Ecol.Res.", **7**, 1992, 255-265.
10. Krächli, N., *Potential impacts of a climate change on forest ecosystems*, "Eur.J.For.Path.", **23**, 1993, 28-50.
11. Lance, C. J., Guy, C. L., *Changes in pigment levels, Rubisco and respiratory enzyme activity of Ficus benjamina during acclimation to low irradiance*, "Physiol.Plant.", **86**, 1992, 630-638.
12. Ögren, E., Sundin, U., *Photosynthetic responses to variable light: a comparison of species from contrasting habitats*, "Oecologia", **106**, 1996, 18-27.
13. Pons, T.L., Anten, N.P.R., *Is plasticity in partitioning of photosynthetic resources between and within leaves important for whole-plant carbon gain in canopies?*, "Funct.Ecol.", **18**, 2004, 802-811.
14. Pons, T.L., Jong-van-Berkel, Y.E.M., *Species-specific variation in the importance of the spectral quality gradient in canopies as a signal for photosynthetic resource partitioning*, "Ann.Bot.", **94**, 2004, 725-732.
15. Porra, R. J., Thompson, W. A., Kriedeman, P. E., *Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy*, "Biochim.Biophys.Acta", **975**, 1989, 384-394.
16. Schäppi, B., Körner, C., *Growth responses of an alpine grassland to elevated CO<sub>2</sub>*, "Oecologia", **105**, 1996, 43-52.
17. Steffen, K. L., Wheeler, R. M., Arora, R., Paltal, J. P., Tibbitts, T. W., *Balancing photosynthetic light-harvesting and light-utilization capacities in potato leaf tissue during acclimation to different growth temperatures*, "Physiol.Plant.", **94**, 1995, 51-56.

## STUDII ECOFIZIOLOGICE LA PLANTE ARBUSTIVE ENDEMICE SUB PRESIUNEA FACTORILOR DE HABITAT. III. STUDIUL UNOR COMPONENTI CELULARI (PROTEINE, HIDRAȚI DE CARBON)

VICTOR BERCEA\*

**SUMMARY.** - **Ecophysiological Studies of Endemic Shrubs Exposed to Habitat Factors' Pressure. III. Study on some Cellular Components (Proteins and Carbohydrates).** This study focuses on the variation of metabolical components in vegetative organs during different vegetation stages, and their possible implication in acclimation process (resistance), in two species of endemic shrubs: *Rhododendron myrtifolium* L. and *Vaccinium myrtillus* L. The data obtained during a period of three vegetation cycles showed a logarithmic relationship between biomass, carbohydrates and proteins amounts with respect to altitudinal gradient of stationary plots. During the vegetative cycle in *Rhododendron*, the accumulation of cellular proteins intensified in July and then decreased in September, the highest amounts being observed at superior altitudes. Carbohydrates accumulation increased in June, decreased in July, and then intensified again in September, both positive and negative variations being directly correlated with altitude. Similarly, in *Vaccinium*, intense accumulation of cellular proteins occurred in July and declined in September, the highest levels being registered at superior altitudes. The two species exhibit different biochemical features. Thus, *Vaccinium* presented a higher level in proteins, while *Rhododendron* distinguished itself by a higher level in carbohydrates. Both species showed a growing accumulation of carbohydrates in September. The richness in cellular proteins mirrors an increasing enzymatic capacity of using and distributing the photochemical energy. The propensity of maintaining a high biomass level in September, together with the growing amounts of carbohydrates and cellular proteins, argument the role of these components in the resistance mechanism under abiotic factors.

La scară globală viața plantelor din zona alpină și subalpină este în principal constrânsă de efectele directe și indirecte ale temperaturii scăzute și, de asemenea, de presiunea redusă a bioxidului de carbon. După *K ö r n e r* [7] aspectele vieții plantelor montane în raport cu schimbările climatice se pot cuprinde în următoarele generalizări: -aclimatizarea termică a proceselor vitale primare; -strategiile de creștere și procesele de dezvoltare; -relația hidrică dintre plantă și habitat; -nutriția minerală și -efectele bioxidului de carbon.

Contrar la ceea ce se crede, asimilația fotosintetică a CO<sub>2</sub> la plantele montane nu este în particular restrictivă prin temperatura scăzută în timpul perioadei de creștere. Plantele montane sunt capabile efectiv de-a utiliza perioadele cu densitate fonică ridicată care sunt perioadele cu cea mai mare încălzire a vegetației. Încălzirea în vegetația îngustă alpină este consecința decuplării aerodinamice pe când temperaturile frunzelor coniferelor sunt mult mai strâns cuplate la temperatura ambientală [3].

---

\**Institutul de Cercetări biologice, 4000015/Cluj-Napoca*  
*E-mail: bercea\_victor@yahoo.com*

Temperatura optimă a absorbției CO<sub>2</sub> de către plantele alpine reflectă această proprietate a microclimatului și nu diferă de cea a plantelor de altitudine joasă. Limitarea actuală a absorbției anuale a CO<sub>2</sub> prin temperaturile zilnice suboptimale sunt de ordinul a 6-7% din absorbția potențială care este similară celei raportate pentru plantele de câmpie și reflectă ajustările fiziologice în utilizarea perioadelor calde care coincid cu radiația superioară.

Temperaturile scăzute din timpul perioadelor cu radiație solară scăzută și din timpul nopții restricționează utilizarea și plasarea fotoasimilatelor. În zona temperată asimilarea și dezasimilarea CO<sub>2</sub> de către plante, cheia importantă a creșterii plantelor, sunt punctele de acțiune unde încălzirea climatului devine efectivă. Temperatura joasă afectează stabilitatea structurilor secundare de ARN și ADN și activitatea enzimelor precum și metabolismul intermediar și fotosinteza [14]. Ca o consecință a efectului direct al temperaturii joase asupra celulelor este scăderea fluidității membranelor [13].

În lucrarea de față s-au studiat componenții metabolici celulari ai diferitelor organe vegetative în diferite stadii fenologice și posibila implicare a acestora în procesul de aclimatizare (rezistență) la arbuștii endemici: *Rhododendron myrtifolium* L. și *Vaccinium myrtillus* L. (fam. Ericaceae), din M-ții Rodnei, masivul Pietrosu (2303 m).

**Material și metode.** Pentru efectuarea cercetărilor au fost selectate trei staționare, așezate diferit altitudinal, respectiv 1660 m, 1825 m și 1930 m (vezi lucrările anterioare).

Pentru analiza componenților metabolici s-au recoltat organele vegetative ale fiecărui individ, respectiv frunze, tulpini și rădăcini, în perioadele de vegetație iunie, iulie și septembrie. Materialul vegetal s-a uscat la 60°C și s-a măcinat mecanic până la obținerea unei pulberi fine care s-a folosit la determinările biochimice. Cantitatea componenților celulari s-a raportat perioadelor de creștere și transectului altitudinal.

Glucidele s-au analizat după metoda descrisă de *Yemm și Willis* [14]. Materialul vegetal uscat (50-100 mg) s-a extras cu alcool etilic 70% pe baie de apă până la evaporarea alcoolului. Reziduul s-a resuspendat în alcool etilic care s-a utilizat în reacția cu reactivul antronă.

Proteinele totale s-au determinat după metoda *Lowry* și colab.[10]. Materialul vegetal uscat s-a hidrolizat pe baie de apă, timp de o oră, cu 0,1 N NaOH. Acest hidrolizat s-a utilizat în reacția cu reactivul Folin. Rezultatele au fost exprimate în mg componenți per g substanță uscată. Rezultatele s-au prelucrat statistic prin sistemul ANOVA. Relația logaritmică între biomasă, glucide și proteine în raport cu altitudinea staționarelor s-a exprimat pentru cele trei perioade de vegetație.

**Rezultate și discuții.** Eficiența de fixare a carbonului la speciile alpine evidențiază o creștere pronunțată a fotosintezei foliare [12]. Procesele fotosintetice și respiratorii joacă un rol central în adaptarea plantelor la habitatele cu condiții



climatice diferite [8] și, deci, este necesar de-a caracteriza componenții și procesele biochimice implicate în procesul de fotosinteză [2].

***Rhododendron myrtifolium* L.** Evoluția conținutului în proteine pe durata celor trei perioade de creștere este prezentată în Fig. 1. Cantitatea proteinelor foliare a scăzut cu mărirea altitudinii cu 33%, tendință care s-a menținut în toate perioadele. În perioada din septembrie cantitatea de proteine foliare acumulate s-a redus semnificativ, comparativ cu perioadele anterioare. La nivelul tulpinii, cantitatea de proteine a prezentat o evoluție diferențiată, iar cantitativ s-au acumulat cele mai mari proporții comparativ cu celelalte organe vegetative ale plantei (Fig. 1). Creșterile de proteine au atins maximum cantitativ în perioada din iulie, fiind proporționale cu mărirea altitudinii. În perioada din septembrie s-a redus cantitatea proteinelor proporțional cu mărirea altitudinii.

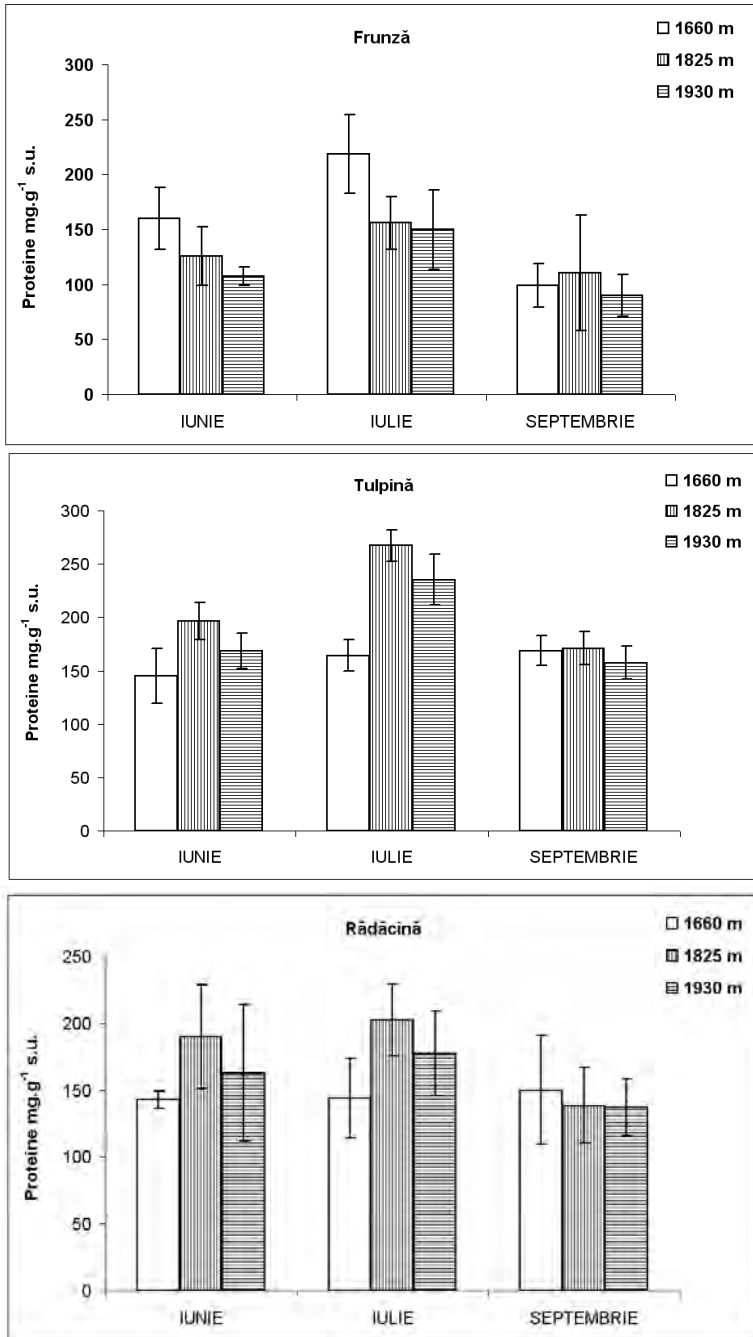
La nivelul rădăcinii, evoluția conținutului în proteine a fost asemănătoare evoluției de la nivelul tulpinii (Fig. 1). Astfel, acumularea proteinelor s-a făcut progresiv până în perioada din iulie și direct proporțional cu altitudinea. În septembrie a scăzut cantitatea proteinelor în raport cu altitudinea. Cu toate acestea cantitatea de proteine acumulate la nivelul rădăcinii și tulpinii în perioada din septembrie a fost mai mare decât la nivelul frunzelor, deci se poate vorbi de o translocare și distribuție rapidă a asimilatelor de la nivelul cloroplastelor fotosintetizatoare. Utilizarea azotului celular este afectată de schimbările de mediu care determină scăderea azotului foliar. Această diminuare se poate compensa prin reducerea suprafeței foliare afectând capacitatea fotosintetică [11]. Pe durata ciclului vegetativ, acumularea proteinelor s-a intensificat în perioada din iulie când s-au înregistrat cantitățile cele mai ridicate și a scăzut în perioada din septembrie. În raport cu transectul altitudinal, acumularea proteinelor în organele vegetative de depozitare s-a intensificat la plantele situate în staționarele de altitudine.

Starea fiziologică a membranei celulare, respectiv activitatea proteinelor reglatoare sunt importante în mecanismul de toleranță a temperaturilor joase [13].

Acumularea glucidelor (hidrați de carbon) în sezonul de creștere este prezentată în Fig. 2. La nivel foliar s-au înregistrat cele mai ridicate cantități de glucide acumulate. Creșterile de glucide s-au produs în perioada din iunie, au scăzut în perioada din iulie apoi s-au mărit în perioada din septembrie. Atât creșterile cât și scăderile au fost direct proporționale cu altitudinea.

La nivelul tulpinii cantitatea de glucide acumulate este mai redusă (Fig. 2). În perioada din septembrie creșterea cantităților de glucide a fost invers proporțională cu mărirea altitudinii.

La nivelul rădăcinilor, acumularea glucidelor a prezentat o evoluție asemănătoare tulpinilor, respectiv, cu acumulări ridicate în perioada din septembrie, raportate invers proporțional cu mărirea altitudinii.



Fi g. 1. Acumularea proteinelor celulare la nivelul diferitelor organe vegetative de la Rhododendron în raport cu diferitele perioade de creștere și cu altitudinea.

PRODUȘII METABOLICI LA RHODODENDRON ȘI VACCINIUM

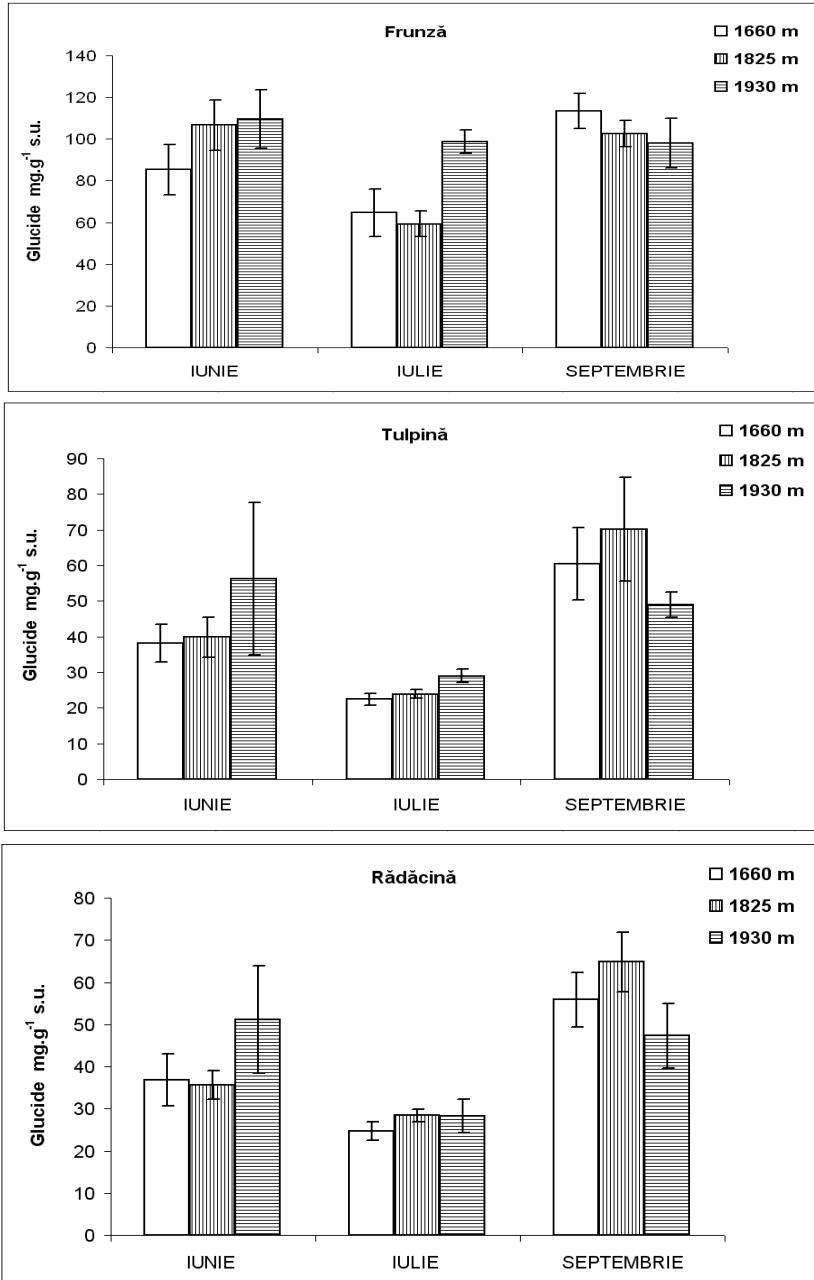


Fig. 2. Conținutul în glucide al diferitelor organe vegetative de la Rhododendron în raport cu perioadele de creștere și cu altitudinea.

*Vaccinium myrtillus* L. Acumularea proteinelor totale în diferite perioade de creștere și la nivelul diferitelor organe vegetative este prezentată în Fig. 3. La nivel foliar, acumularea proteinelor s-a intensificat în perioada din iulie. Dacă în perioada din iunie acumulările au fost invers proporționale cu mărirea altitudinii, în perioada din septembrie cantitatea de proteine s-a mărit proporțional cu creșterea altitudinii. La nivelul tulpinii s-au acumulat cele mai ridicate cantități de proteine, mai semnificativ în perioada din iulie, proporțional cu mărirea altitudinii (Fig. 3). În perioada din septembrie s-au acumulat însemnate cantități de proteine, fără să existe diferențe semnificative în raport cu altitudinea.

La nivelul rădăcinii s-a înregistrat o evoluție similară procesului de acumulare de la nivelul tulpinii cu diferențe semnificative între perioadele de creștere și altitudine, având la bază diferențe semnificative între valorile abaterei standard. În general, acumulările de proteine la acest organ vegetativ au fost însemnate cantitativ.

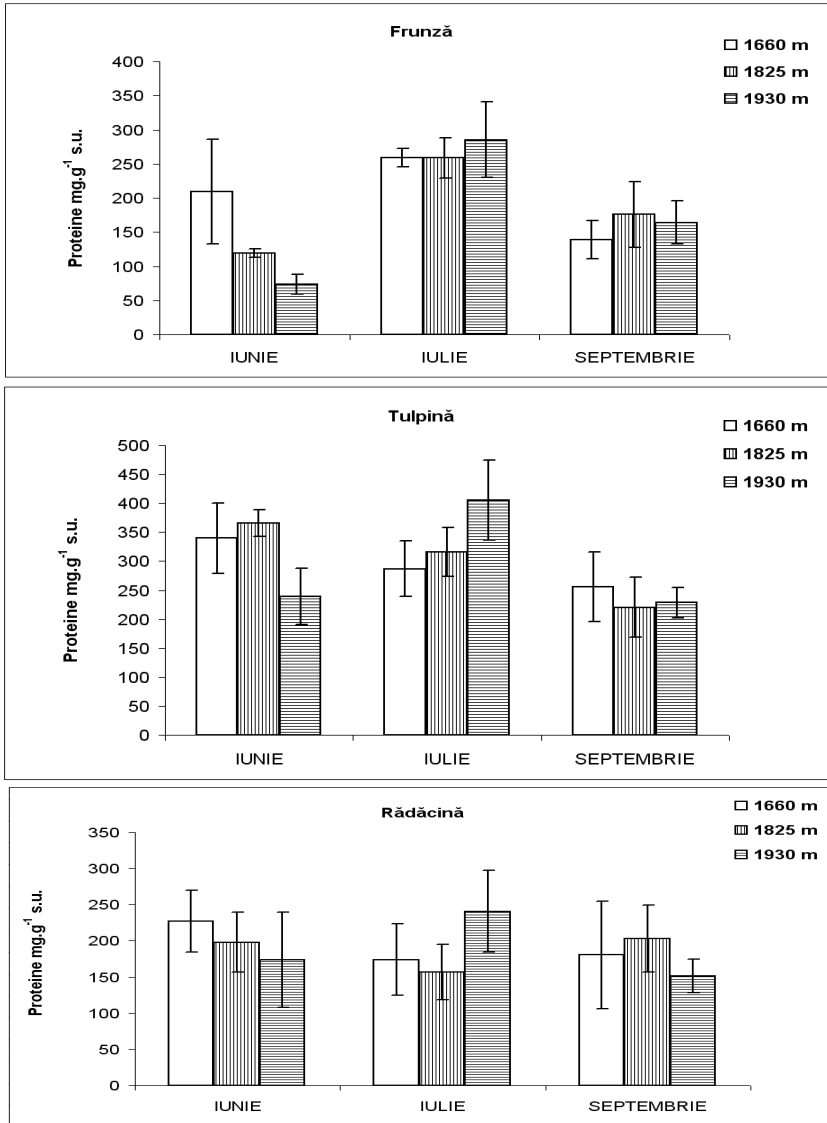
Dacă pentru plantele de la 1660 m acumularea proteinelor a scăzut cu derularea perioadelor de creștere, la plantele de altitudine ridicată aceste acumulări s-au mărit. Diferențele exprimate de abaterea standard au fost semnificative între indivizii populațiilor crescute în diferite staționare. Variația genetică dintre și din interiorul populațiilor se manifestă prin variații genetice în procesele fiziologice [5].

În derularea ciclului vegetativ, acumulările intense de proteine s-au produs în perioada din iulie și au scăzut în perioada din septembrie, cantitățile cele mai ridicate înregistrându-se la altitudinea superioară de 1930 m.

Acumularea glucidelor este redată în Fig. 4. La nivel foliar s-a înregistrat o creștere a cantităților de glucide progresiv cu derularea ciclului vegetativ și proporțional cu mărirea altitudinii. Cele mai ridicate cantități de glucide s-au acumulat în perioada din septembrie. Concentrația carbohidraților nestructurali și a lipidelor în organele arborilor în timpul sezonului de creștere au crescut de-a lungul transectului altitudinal și nu s-a constatat nici o influență a duratei sezonului de creștere asupra proporției carbonului celular [4].

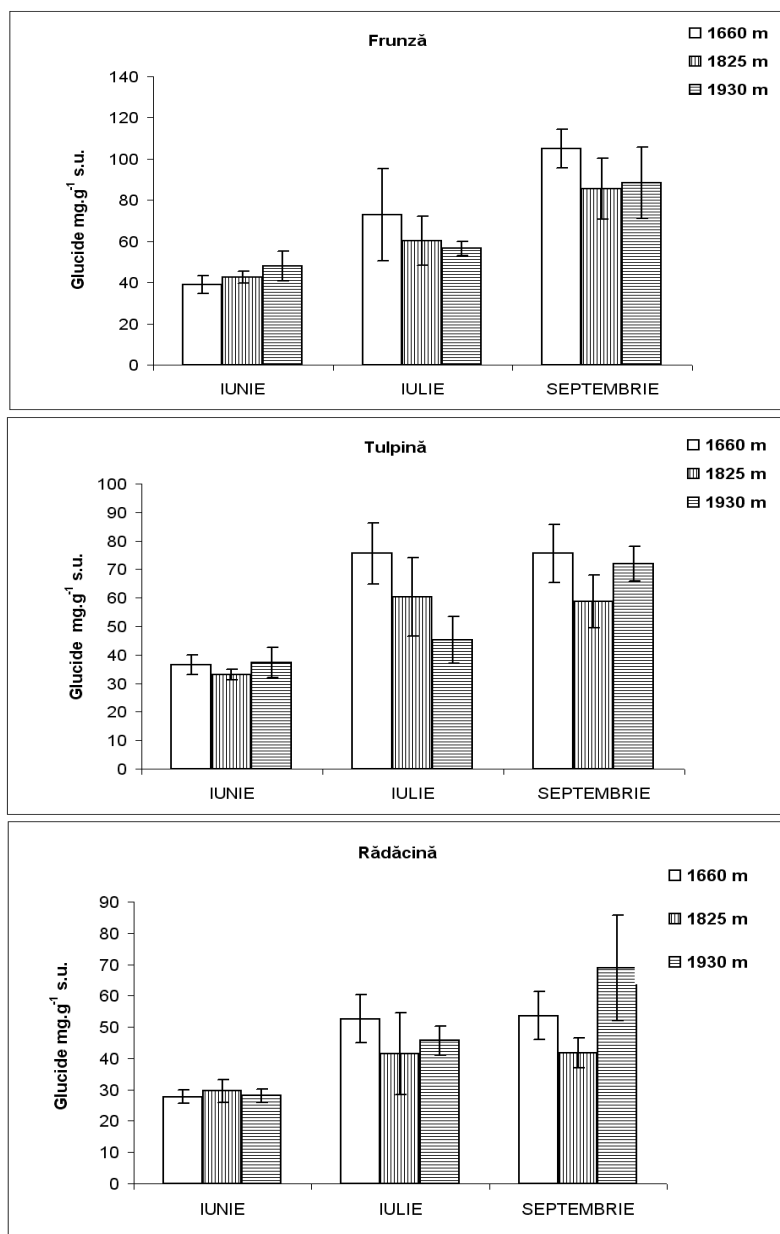
Nivelul cantitativ al glucidelor pentru tulpină și rădăcină a fost aproximativ egal (Fig. 4). Evoluția conținutului în glucide a urmat un drum ascendent pe durata ciclului vegetativ și în relație de proporționalitate cu mărirea altitudinii. În perioada din septembrie s-au depozitat cantitățile cele mai semnificative la nivelul tulpinii și rădăcinii. În perioada din iunie s-au înregistrat cantitățile cele mai reduse de glucide, iar valorile abaterei standard au evidențiat diferențe reduse între indivizi. La cele două specii luate în studiu au existat caracteristici biochimice diferite. Astfel, *Vaccinium* s-a remarcat printr-un conținut ridicat în proteine, iar *Rhododendron* printr-un conținut mai ridicat în glucide. La ambele specii s-a remarcat intensificarea acumulării glucidelor în perioada din septembrie. Conținutul ridicat în proteine exprimă creșterea capacității enzimatică de-a utiliza și dirija energia fotochimică [12]. Concentrația azotului (deci și a azotului proteic) în diferite părți de țesut vegetal este un factor limitativ puternic al creșterii și productivității [11]. Azotul constituie, de asemenea, un factor de control al unor procese fiziologice cum ar fi distribuția biomasei [9] și asimilarea carbonului prin fotosinteză.

PRODUȘII METABOLICI LA RHODODENDRON ȘI VACCINIUM



Fi g. 3. Conținutul în proteine celulare al diferitelor organe vegetative de la *Vaccinium* în raport cu perioadele de creștere și cu altitudinea.

În scopul evidențierii implicării proteinelor și glucidelor în mecanismul de aclimatizare la acțiunea schimbătoare a factorilor de mediu s-a trasat corelația logaritmică între acumularea de biomasă și componenții biochimici, pentru fiecare specie studiată. La tulpina de *Rhododendron* tendința de menținere ridicată a nivelului biomasei în perioada din septembrie concomitent cu creșterea hidraților de carbon

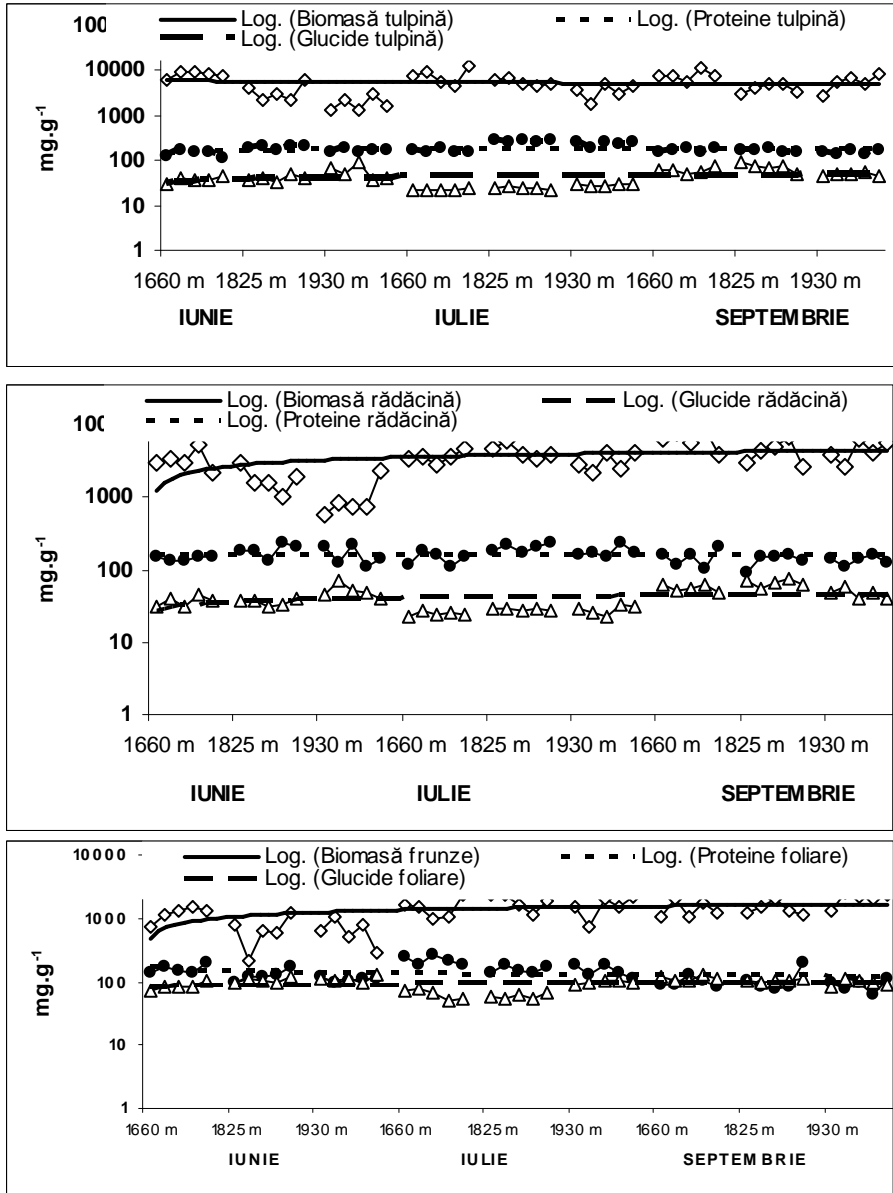


Fi g. 4. Acumularea glucidelor la diferite organe vegetative de la *Vaccinium* în raport cu perioadele de creștere și cu altitudinea.

și a proteinelor justifică rolul acestor componenți în mecanismul de rezistență la acțiunea factorilor abiotici (Fig. 5). La nivelul rădăcinii relația logaritmică a evidențiat un paralelism între biomasă și glucide care tind să se mărească spre finele stadiului

PRODUȘII METABOLICI LA RHODODENDRON ȘI VACCINIUM

de creștere. La nivel foliar s-a evidențiat o evoluție antinomică, respectiv biomasa a crescut spre finele stadiului de creștere, iar proteinele și glucidele s-au redus.



Fi g. 5. Relația logaritmică dintre biomasă, proteine și glucide la nivelul diferitelor organe vegetative de la Rhododendron în raport cu perioadele de creștere și cu altitudinea.

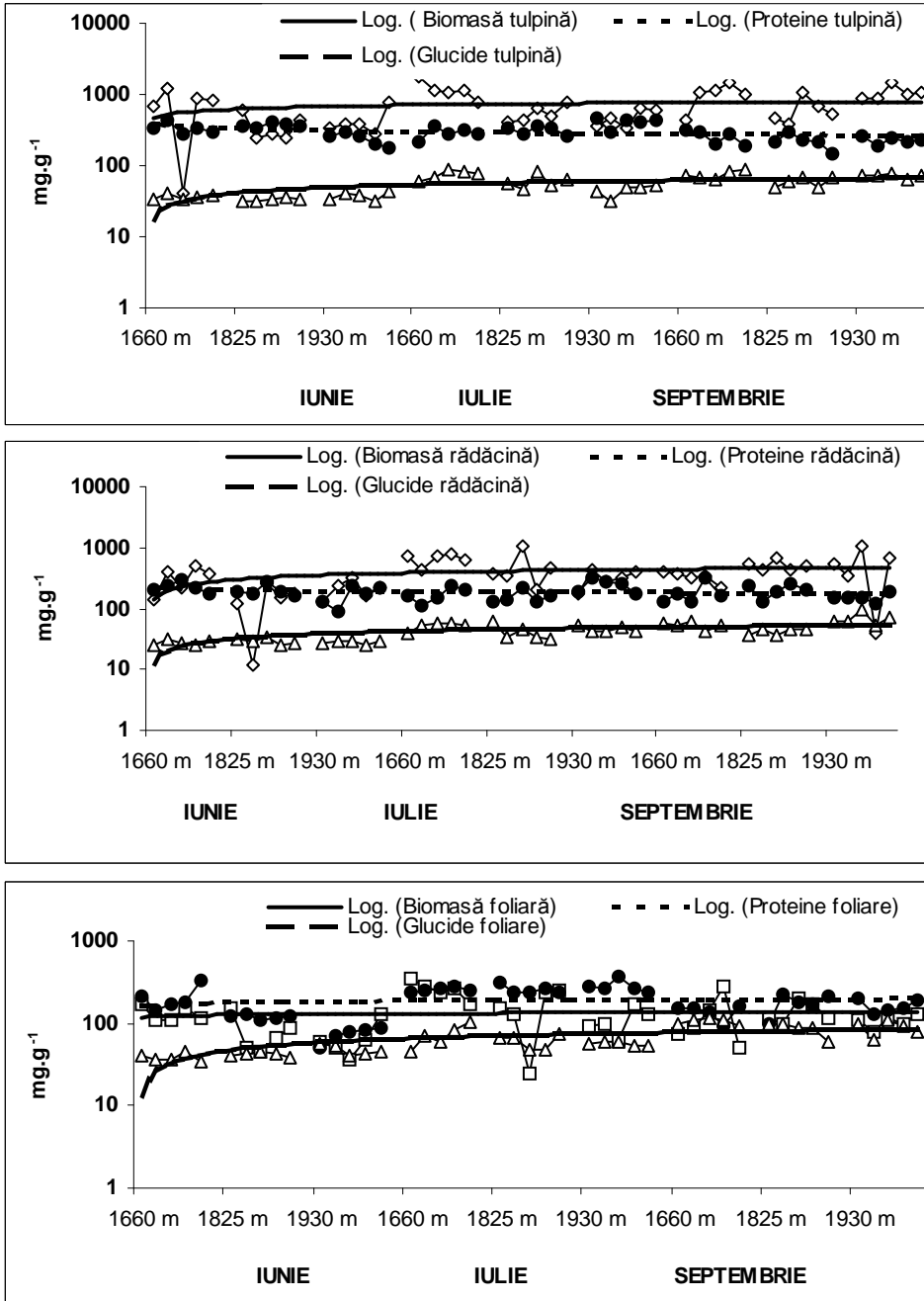


Fig. 6. Relația logaritmică dintre biomasă, proteine și glucide la nivelul diferitelor organe vegetative de la *Vaccinium* în raport cu perioadele de creștere și cu altitudinea.



În scopul ca plantele să producă răspunsuri adaptative adecvate este necesar să se facă perceperea temperaturii scăzute, traducerea acestui semnal în exprimarea activă ori represivă a genelor și utilizarea genelor în combaterea efectelor impuse de factorii de mediu [13].

Pentru plantele de *Vaccinium* parametrii analizați s-au diferențiat prin mărirea valorilor și s-au dezvoltat concomitent la nivelul tulpinii și rădăcinii (Fig. 6). Această evoluție paralelă tinde spre valori ridicate în biomasă, proteine și glucide la sfârșitul stadiului de creștere. La nivel foliar relația logaritmică a evidențiat scăderea biomasei foliare și creșterea conținutului în proteine și glucide spre finele stadiului de creștere.

După *K ö r n e r* [7], biomasă este controlată de modul de plasare a asimilatelor în plantă și de înregistrarea și durata fazelor de dezvoltare. Durata sezonului de creștere este cheia componentă a producției de biomasă vegetală, iar speciile de plante reacționează în funcție de sistemul vital genetic și de strategia de reproducere. Plantele alpine cresc mai încet, dar marea parte a producției de carbon fotosintetic este plasată în organele subpământene. De asemenea, balanța carbonului este, în mare parte, controlată de ecoton, permițând creșterea formelor de viață (de exemplu: arbuștii) cu masă foliară superioară (10-15%).

La finele stadiului de creștere, componenții biochimici tind spre nivele ridicate, respectiv glucidele s-au apropiat de nivelul biomasei foliare. Această raportare logaritmică se datorează faptului că *Vaccinium* fiind o plantă cu frunze căzătoare, în perioada analizată încă se desfășura la intensitate ridicată capacitatea fotosintetică de absorbție și utilizare a luminii, pe de o parte, iar pe de altă parte, translocarea asimilatelor era întârziată.

După *K a r l s s o n* și *N o r d e l l* [6], plantele sempervirescente au o mare cantitate de biomasă foliară, iar raportul ariei foliare este redus din cauza reducerii ariei foliare specifice ceea ce diminuează circuitul nutrienților și ratele fotosintetice.

Corelațiile între durata de viață, aria foliară specifică, concentrația azotului intracelular și ratele de asimilare a carbonului la plante constituie strategii fiziologice în mecanismul de rezistență la acțiunea factorilor de mediu [1].

**Concluzii.** 1. La *Rhododendron* cantitatea proteinelor foliare a scăzut cu mărirea altitudinii, tendință care s-a menținut în toate perioadele. Proteinele din tulpinii și rădăcini au crescut semnificativ, atingând maximul în perioada din iulie, proporțional cu mărirea altitudinii. În perioada din septembrie s-a redus cantitatea proteinelor din organele vegetative, proporțional cu mărirea altitudinii. Cantitatea de proteine acumulate în rădăcinii și tulpinii în perioada din septembrie a fost mai mare decât la nivelul frunzelor, deci se poate vorbi de o translocare și distribuție rapidă a asimilatelor de la nivelul cloroplastelor. În raport cu transectul altitudinal, acumularea proteinelor în organele vegetative de depozitare s-a intensificat la plantele situate în staționarele de altitudine.

2. Acumularea glucidelor în frunzele de *Rhododendron* s-a intensificat în perioada din iunie, a scăzut în perioada din iulie apoi s-a mărit în perioada din septembrie în relație directă cu altitudinea. La tulpinii și rădăcini cantitatea de glucide a fost mai redusă, exceptând perioada din septembrie, fiind raportate invers proporțional cu mărirea altitudinii.

3. La *Vaccinium* acumularea proteinelor în frunze, s-a intensificat în perioada din iulie. Dacă în perioada din iunie acumulările au fost invers proporționale cu mărirea altitudinii, în perioada din septembrie cantitatea de proteine s-a mărit proporțional cu creșterea altitudinii. În tulpinii și rădăcini s-au acumulat cantități ridicate de proteine, în special în iulie, proporțional cu mărirea altitudinii. În derularea ciclului vegetativ, acumulările intense de proteine s-au produs în perioada din iulie și au scăzut în perioada din septembrie, cantitățile cele mai ridicate înregistrându-se la altitudinea superioară de 1930 m.

4. La nivelul frunzelor de *Vaccinium* s-a înregistrat o creștere a glucidelor progresiv cu derularea ciclului vegetativ și proporțional cu mărirea altitudinii. Cele mai ridicate cantități de glucide s-au acumulat în perioada din septembrie. Nivelul cantitativ al glucidelor pentru tulpină și rădăcină a fost aproximativ egal. În septembrie s-au depozitat cantitățile cele mai mari în tulpinii și rădăcinii. În perioada din iunie s-au înregistrat cantitățile cele mai reduse de glucide.

5. La cele două specii au existat caracteristici biochimice diferite. Astfel, *Vaccinium* s-a remarcat printr-un conținut ridicat în proteine, iar *Rhododendron* printr-un conținut mai ridicat în glucide. La ambele specii s-a remarcat intensificarea acumulării glucidelor în perioada din septembrie.

6. Corelația logaritmică între acumularea de biomasă și componenții biochimici, pentru tulpina de *Rhododendron* a evidențiat tendința de menținere ridicată a nivelului biomasei în perioada din septembrie concomitent cu creșterea hidraților de carbon și a proteinelor, ceea ce justifică rolul acestor componenți în mecanismul de rezistență la acțiunea factorilor abiotici. La nivelul rădăcinii relația logaritmică a evidențiat un paralelism între biomasă și glucide care tind să se mărească spre finele stadiului de creștere. La nivel foliar s-a evidențiat o evoluție antinomică, respectiv biomasa a crescut spre finele stadiului de creștere, iar proteinele și glucidele s-au redus.

7. Pentru plantele de *Vaccinium* parametrii analizați s-au diferențiat prin mărirea valorilor și s-au dezvoltat concomitent la nivelul tulpinii și rădăcinii. Această evoluție paralelă tinde spre valori ridicate în biomasă, proteine și glucide la sfârșitul stadiului de creștere. La nivel foliar relația logaritmică a evidențiat scăderea biomasei foliare și creșterea conținutului în proteine și glucide spre finele stadiului de creștere.

Cunoașterea caracteristicilor fiziologice și metabolice precum și influența mediului asupra acestor caracteristici este esențială pentru înțelegerea mecanismelor ecofiziologice ce stau la baza supraviețuirii speciilor în habitatele aspre.

## BIBLIOGRAFIE

1. A c k e r l y, D.D., R e i c h, P.B., *Convergence and correlations among leaf size and function in seed plants: a comparative test using independent contrasts*, "Am.J.Bot.", **86** (9), 1999, 1272-1281.
2. C h u n g, H. H., B a r n e s, R. L., *Photosynthate allocation in Pinus taeda.I. Substrate requirement for synthesis of shoot biomass*, "Can.J.For.Res.", **7**, 1977, 106-111.
3. G r a c e, J., *The functional significance of short stature in montane vegetation*, in: *Plant Form and Vegetation Structure*, (W e r g e r, M. J. A., V a n d e r A a r t, P. J. M., D u r i n g, H. J., V e r h o e v e n, J. T. A., eds.). SPB Acad.Publ, The Hague, The Netherlands, 1988, pp. 201-209.
4. H o c h, G., K ö r n e r, C., *The carbon charging of pines at the climatic treeline: a global comparison*, "Oecologia", **135**, 2003, 10-21.
5. J o h n s e n, K. H., S e i l e r, J. R., *Growth, shoot phenology and physiology of diverse seed sources of black spruce:I. Seedling responses to varied atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations and photoperiods*, "Tree Physiol.", **16**, 1996, 367-373.
6. K a r l s s o n, P. S., N o r d e l l, K. O., *Growth of Betula pubescens and Pinus sylvestris seedlings in a subarctic environment*, "Funct.Ecol.", **1**, 1987, 37-44.
7. K ö r n e r, C., *Impact of Atmospheric Changes on High Mountain Vegetation* in: *Mountain environments in changing climates* (B e n i s t o n, M., ed.). Routledge.London, New York, 1994, pp. 155-166.
8. L a n c e, C. J., G u y, C. L., *Changes in pigment levels, Rubisco and respiratory enzyme activity of Ficus benjamina during acclimation to low irradiance*, "Physiol.Plant.", **86**, 1992, 630-638.
9. L e v i n, S. A., M o o n e y, H. A., F i e l d, C., *The dependence of plant root:shoot ratios on internal nitrogen concentration*, "Ann.Bot.", **64**, 1989, 71-75.
10. L o w r y, O. H., R o s e b r o u g h, N. J., F a r r, A. L., R a n d a l l, R. J., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, "J.Biol.Chem.", **193**, 1951, 265-275.
11. N i j s, I., B e h a e g h e, T., I m p e n s, I., *Leaf nitrogen content as a predictor of photosynthetic capacity in ambient and global change conditions*, "J.Biogeog.", **22**, 1995, 177-183.
12. S c h ä p p i, B., K ö r n e r, C., *Growth respons of an alpine grassland to elevate CO<sub>2</sub>*, "Oecologia", **105**, 1996, 43-52.
13. S m a l l w o o d, M., B o w l e s, D. J., *Plants in a cold climate*, "Phil.Trans.R.Soc.Lond. B", **357**, 2002, 831-847.
14. Y e m m, E. W., W i l l i s, A. J., *The determination of carbohydrates in plant extracts by anthrone*, "Biochem. J.", **57**, 1954, 508-514.

## METABOLIC OUTCOME OF RAPAMYCIN ADMINISTRATION IN TYPE 1 DIABETES MELLITUS

**GIANLUCA PERSEGHIN\***, **LUCIA PICENI-SERENI\***,  
**CAMELIA LANG\*\*** and **LIVIO LUZI\***

**SUMMARY.** – In order to assess metabolic effects of rapamycin, 9 insulin-dependent diabetic patients were studied in the basal postabsorptive state and during euglycemic hyperinsulinemia, before (PRE) and after (POST) 45 days of rapamycin administration. Labeled glucose and leucine were infused to assess whole-body rates of glucose metabolism and proteolysis. In the basal state, POST demonstrated with respect to PRE: (a) lower glucose plasma concentration ( $226.92 \pm 30.72$  vs.  $293.15 \pm 17.11$  mg/dl;  $p \leq 0.05$ ); (b) higher plasma c-peptide ( $0.06 \pm 0.01$  vs.  $0.04 \pm 0.00$  ng/ml;  $p \leq 0.05$ ) and leucine concentration ( $175.08 \pm 17.44$  vs.  $134.25 \pm 9.30$   $\mu$ mol/l;  $p \leq 0.05$ ), and (c) similar MCR ( $1.82 \pm 0.17$  vs.  $1.65 \pm 0.10$  mg/kg/min) and ELF ( $138.41 \pm 11.08$  vs.  $131.26 \pm 10.61$   $\mu$ mol/kg/h). During hyperinsulinemia, rapamycin did not affect in any way hepatic glucose production and muscle proteolysis. The results of present study indicated that rapamycin (1) in the absence of insulin is able to lower plasma glucose concentration by enhancing residual insulin secretion; (2) rapamycin tends to emphasize diabetic catabolic state through stimulation of proteolysis (3) in insulin stimulated condition, rapamycin ameliorated muscle insulin resistance through enhancing glucose uptake.

Pancreatic islet transplantation has previously been attempted in patients with type 1 diabetes mellitus who have inadequate glucose control despite maximal medical therapy with exogenous insulin. Historically, sustained insulin independence for more than 1 year was achieved in only 8.2% of 267 patients who underwent transplantation with pancreatic islet allografts between 1990 and 1999 [3]. Current potent immunosuppressant regimens using sirolimus, tacrolimus, and glucocorticoids have resulted in excellent allograft survival rates and low rates of rejection in liver, kidney, and whole-organ pancreas transplantation [12]. However, it has previously been shown that glucocorticoids induce peripheral insulin resistance and directly damage pancreatic islet beta cells [19].

Recently, Shapiro *et al.* [14] have demonstrated a dramatic improvement in pancreatic allograft survival. In their study, seven consecutive patients with type 1 diabetes mellitus achieved insulin independence for greater than 1 year after allogeneic pancreatic islet transplantation. The authors felt that their improved results were a result of several factors, including a glucocorticoid-free immunosuppressive protocol that included sirolimus, low-dose tacrolimus, and the interleukin 2 receptor monoclonal antibody daclizumab.

---

\* Department of Nutrition and Metabolism, San Raffaele Scientific Institute, Via Olgettina 60, 20132 Milan, Italy

\*\* Department of Biology, Babes-Bolyai University, 400006 Cluj-Napoca, Romania.  
Email: camelia\_lang@web.de

Sirolimus (rapamycin, RAPA) is a macrolide antibiotic, produced by *Streptomyces hygroscopicus* isolated from an Easter-Island soil sample in 1975 [13] that was originally described as an antifungal agent. RAPA is also a strong immunosuppressant that is 10- to 100-fold greater than cyclosporine A (CsA) in preventing rejection of vascularized allografts in animal models [4, 16, 17]. It is also effective in alleviating ongoing rejection of the kidney, pancreas, and heart allografts in the rat [6, 7]. RAPA has a strong antiproliferative effect on T cells stimulated via the T-cell receptor/CD3 pathway.

The aim of present study was to examine the metabolic effects of rapamycin with special regard to intermediary metabolism and pancreatic peptides. The study was initiated for at least two reasons (a) the Edmonton group [14] suggested that the withdrawal of steroids and the use of rapamycin greatly improves the long-term success of transplanted islets but no metabolic explanation for this improvement has been provided up to date; (b) patients undergoing islet transplantation today must exchange insulin for chronic immunosuppressive therapy, and therefore is important to recognize the potential toxic risks of the drug.

**Materials and methods.** *Chemicals.* Most of chemicals used were purchased from Sigma Aldrich (Germany). L-[1-<sup>13</sup>C]leucine and D-[6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]glucose were purchased from MassTrace (Woburn, MA). Chemical and isotopic purity of the tracers was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Before every infusion study, sterile solutions of the tracers were prepared using aseptic technique. Accurately weighed amounts of the labelled compounds were dissolved in weighed volumes of sterile, pyrogen-free saline and filtered through a 0.22 µm Millipore filter before use. An aliquot of the sterile solution was initially verified to be pyrogen free before administration to human subjects. Solutions were prepared no more than 24 h before use and were kept at 4°C before administration.

*Subjects.* 9 insulin-dependent diabetic patients (4 females and 5 males, age 34.3±2.2 yr, body weight 61.5±2.9 kg, body mass index 21.8±0.9 kg/m<sup>2</sup>), candidate of receiving islet transplantation, were studied prior (PRE) and after (POST) 45-days of pre-treatment period with rapamycin and statin. Rapamycin was given at a dose of 3-5 mg/m<sup>2</sup>/day orally and adjusted weekly to a target serum level of 3-7 ng/ml. In order to avoid hyperlipidemia, usually caused by rapamycin, patients received sinvacor (10 mg/day) or atorvastatin (20 mg/day). Informed consent was obtained from all subjects after the purposes, nature, and potential risks of the study were explained to them. The protocol was approved by the Ethical Committee of the San Raffaele Scientific Institute.

*Experimental protocol.* All study subjects were admitted to the ward at 7:00 A.M. after a 10-h period overnight fast. They were maintained on a diet of at least 250 g of carbohydrates and 70-80 g of proteins per day for the 2 weeks preceding the study. Patients on subcutaneous insulin treatment received the last doses of intermediate and short-acting insulin 18 and 12 h, respectively, before the experimental procedure.

A Teflon catheter was inserted into an antecubital vein for infusions, and an additional one was inserted retrogradely into a wrist vein for blood sampling. The hand was kept in a heated box (50°C) throughout the experiment to allow sampling of venous blood. Labelled glucose and leucine were infused to assess whole-body rates of glucose metabolism and proteolysis. A bolus of [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]glucose (5 mg/kg body wt) and of [1-<sup>13</sup>C]leucine (0.5 mg/kg body wt) was followed by a continuous infusion ([6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]glucose: 0.05 mg/kg body wt/min and [1-<sup>13</sup>C]leucine: 0.007 mg/kg body wt).

After a 150-min tracer equilibration period, a euglycemic-hyperinsulinemic clamp was performed as previously described [10]. Insulin was infused at a rate of 40 mU/m<sup>2</sup>/min to reach a plasma insulin concentration of ~100 µU/ml and the plasma glucose concentration was kept at ~110 mg/dl for an additional 150 min by means of a variable infusion of 20% dextrose. Blood samples were drawn every 15 min in the last 45 min of equilibration period and throughout the glucose/insulin infusion for the measurement of tracer enrichments as well as plasma free fatty acids and hormone concentrations.

*Analytical determinations.* Plasma glucose was measured bedside by the glucose oxidase method on a Beckman glucose analyzer (Boehringer Mannheim, Germany). The deuterated glucose enrichments were measured by GC-MS (Hewlett Packard Instrumentation, model 5970A, Palo Alto, CA) using electron impact ionization after preparation of the butyl-boronate derivatives of plasma specimens [1]. Plasma amino acid concentrations and enrichments were measured by GC-MS after derivatization to *tris-t*-butyldimethylsilyl derivative [1]. The  $\alpha$ -ketoisocaproic acid (KIC) enrichments and concentrations were measured after derivatization to the trimethylsilyl-quinoxalinol derivative [1].

Plasma levels of free-insulin, C-peptide, and glucagon were measured by radioimmunoassay using commercial kits (Linco Research, Italy). Plasma free fatty acids were measured spectrophotometrically with a commercial kit (NEFA C; Wako Chemicals, Germany) according to the manufacturer's recommendations.

*Calculations.* Glucose turnover was calculated in the basal state by dividing the [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]glucose infusion rate by the steady state plateau of plasma [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]glucose enrichment achieved during the last 45 min of the basal period. Glucose kinetics during the insulin clamp was calculated using Steele's equations for the nonsteady state [15]. Endogenous glucose production was calculated by subtracting the glucose infusion rate from the rate of glucose appearance measured with the isotope tracer technique. The metabolic clearance rate of glucose (MCR) was calculated as the ratio between the rate of glucose appearance and plasma glucose levels  $\times 100$ . To define the leucine release from proteolysis (endogenous leucine flux, or ELF), the intracellular leucine enrichments were estimated by the plasma [1-<sup>13</sup>C]ketoisocaproic acid enrichments, which are derived from the intracellular leucine reciprocal pool approach with the standard steady-state equation as previously described [2].

*Statistical analysis.* All data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Comparison between PRE and POST patients was performed using Student *t* test for unpaired data.

**Results and discussion.** *Glucose metabolism in the postabsorptive and clamp conditions.* As shown in Table 1, postabsorptive plasma glucose concentrations were lower in POST patients than in PRE ( $p=0,05$ ). Endogenous glucose production rates (EGP) showed a trend toward inhibition ( $p=0,06$ ), whereas insulin-dependent suppression of glucose output during the clamp was similar in both groups ( $p=0,4$ ) and defective with respect to the normal (normal values: 0.2-0.4 mg/kg/min). In the basal state, metabolic clearance rates (MCR) of glucose were comparable in both groups ( $p=0,2$ ; Table 1). During insulin stimulation, MCR was significantly higher in POST than in PRE (Table 1). The increase of (MCR) was accompanied by the increase in the infusion rate of the glucose necessary to maintain the euglycemia.

*Protein metabolism in postabsorptive and clamp conditions.* Postabsorptive KIC, alanine, phenylalanine, glutamate, and glutamine concentrations were not significantly different between PRE and POST patients (Table 1). By contrast, leucine concentration was significantly higher after rapamycin administration ( $p=0,05$ ; Table 1). Postabsorptive ELF, which represents a parameter of whole-body proteolysis, was similar between groups ( $p=0,3$ ; Table 1). During insulin stimulation, suppression of KIC, amino acid concentrations, except leucine, and ELF were not significantly different between PRE and POST (Table 1).

*Hormone profile and free fatty acids concentrations.* Postabsorptive plasma insulin ( $12,07 \pm 2,70$  and  $11,45 \pm 2,04$   $\mu\text{U/ml}$ ) did not differ significantly between PRE and POST patients, respectively. Despite a lack of difference in basal insulin concentration, plasma c-peptide concentration, an index of insulin secretion, was significantly higher in PRE ( $0,04 \pm 0,00$  ng/ml) than in POST ( $0,06 \pm 0,01$  ng/ml). No statistically differences were recorded in glucagon ( $67,12 \pm 6,25$  and  $82,08 \pm 9,09$  pg/ml), and free fatty acid concentrations ( $0,81 \pm 0,07$  and  $0,96 \pm 0,19$  mM) between groups.

During euglycemic hyperinsulinemia, suppression of glucagon ( $50,24 \pm 3,58$  and  $44,76 \pm 1,94$  pg/ml) and free fatty acids ( $0,19 \pm 0,04$  and  $0,16 \pm 0,03$  mM) concentration was similar in PRE and POST. Plasma c-peptide ( $0,04 \pm 0,00$  and  $0,06 \pm 0,00$  ng/ml) concentration did not change from the basal state in any of the groups.

Increased hepatic glucose production and insulin resistance are common features of insulin-dependent diabetes mellitus [11]. Intraportal islet transplantation normalizes hepatic glucose production and improves glucose utilization [9, 10] which results in restoring normal fasting glycemia. Our data suggest that rapamycin can also participate to this process because in the basal state, even if the plasma glucose concentration remained at a supraphysiological level, it has decreased significantly (Table 1). This decrease might have several causes: a decrease of EGP, an increase of residual insulin secretion, an increase of hepatic or/and peripheral insulin sensitivity.

As shown in Fig. 1, in the postabsorptive state, EGP showed a tendency toward inhibition after rapamycin treatment, but had no statistical significance. These findings, therefore, demonstrate that the glycemia decrease might only partially

be due to the EGP decrease. In healthy subjects, during insulin stimulation, EGP decreases until near-zero values. In this study, during the clamp, the insulin-induced EGP inhibition was similar in both groups and greatly reduced from normal (Table 1). The rapamycin doses administered to the patients in this study were reduced doses which are usually administered beginning three month post transplant. Thus, it is unclear that rapamycin does not negatively influence the hepatic glucose metabolism, but only that decreased dosage does not affect even more the hepatic function.

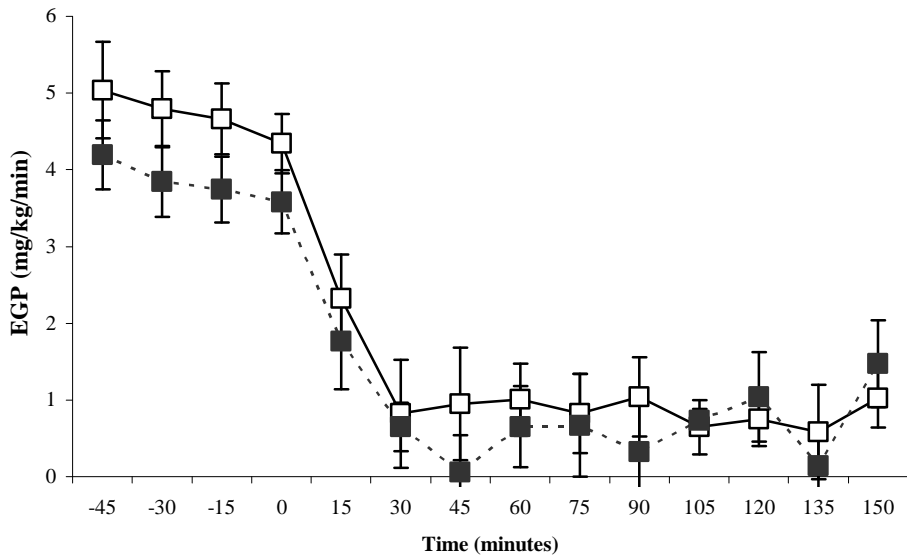


Fig. 1. Kinetics of endogenous glucose production (EGP) prior (PRE – white squares) and after (POST – black squares) rapamycin treatment.

Postabsorptive plasma insulin remained practically unchanged (Table 1). It is possible that, due to hepatic alterations induced by diabetes, the insulin absorption by the liver might be defective. Moreover, we are not certain that the patients followed the instructions concerning the administration of the last insulin dose. For this reason, we saw fit the dosing of c-peptide. Indeed, plasma c-peptide concentration, an index of insulin secretion, was significantly higher in POST than in PRE patients. This finding indicates that rapamycin has no diabetogenic effect. Surprisingly, plasma c-peptide concentration was relatively constant during insulin stimulation in both groups. The data showing the lack of c-peptide inhibition were previously reported in patients with transplanted pancreas [8]. The explanation may be the existence of a hepatic insulin resistance which causes the extraction and degrading of c-peptide to be defective.



Table 1

## Glucose and protein metabolism in the postabsorptive (basal) and insulin-stimulated conditions

	Basal		%	p	Insulin		%	p
	PRE	POST			PRE	POST		
Glucose metabolism								
Plasma glucose (mg/dl)	293.15±17.11	226.92±30.72	-22.59	<0.05*	139.08±14.54	110.24±9.20	-20.73	NS
EGP (mg/kg/min)	4.63±0.49	3.35±0.55	-27.64	NS	0.76±0.43	0.76±0.34	0.00	NS
MCR (mg/kg/min)	1.65±0.10	1.82±0.17	10.30	NS	2.57±0.47	4.62±1.01	79.76	<0.05*
GIR (mg/kg/min)	-	-	-	-	3.77±0.95	4.47±1.40	18.56	NS
Protein metabolism								
Leucine (μmol/l)	134.25±9.30	175.08±17.44	30.41	<0.05*	74.94±6.77	97.36±9.66	29.91	<0.05*
KIC (μmol/l)	47.18±5.32	54.44±6.32	15.38	NS	22.55±3.46	32.24±3.89	42.97	NS
Alanine (μmol/l)	253.35±27.13	247.59±22.89	-2.27	NS	220.20±19.54	226.26±11.53	2.75	NS
Phenylalanine (μmol/l)	50.88±2.20	56.44±2.84	10.92	NS	38.92±2.07	40.89±3.07	5.08	NS
Glutamate (μmol/l)	59.39±5.10	62.74±6.71	5.64	NS	53.60±5.54	53.23±4.95	-0.69	NS
Glutamine (μmol/l)	439.75±31.36	509.55±27.17	15.87	NS	347.30±35.01	458.42±48.71	31.99	NS
ELF (μmol/kg/h)	131.26±10.61	138.41±11.08	5.44	NS	102.71±10.09	118.92±9.35	15.78	NS

All data are mean ± SEM of determinations in the last 45 min of equilibration period and the last 45 min of the clamp.  
n = 9 type 1 diabetic patients.

\* Significantly different from rapamycin untreated (PRE) patients (Student's unpaired *t* test).

Diabetic patients have a reduction of ~40% of insulin sensitivity. Insulin resistance is located mainly at muscle tissue [18]. The main factors which are involved in the appearance of insulin resistance are high plasma glucose and/or fatty acid concentrations. We did not find any effect of rapamycin on postabsorptive MCR (Fig. 2). High plasma glucose (Table 1) and fatty acids concentrations can explain constant maintaining of MCR. During insulin stimulation, MCR increased considerably after rapamycin treatment (Table 1) and it was followed by the increase of glucose infusion rate necessary to maintain euglycemia. These data suggest that rapamycin is able to improve peripheral insulin sensitivity. We dare say that rapamycin acts synergically, at least in muscle, and/or complementary to insulin.

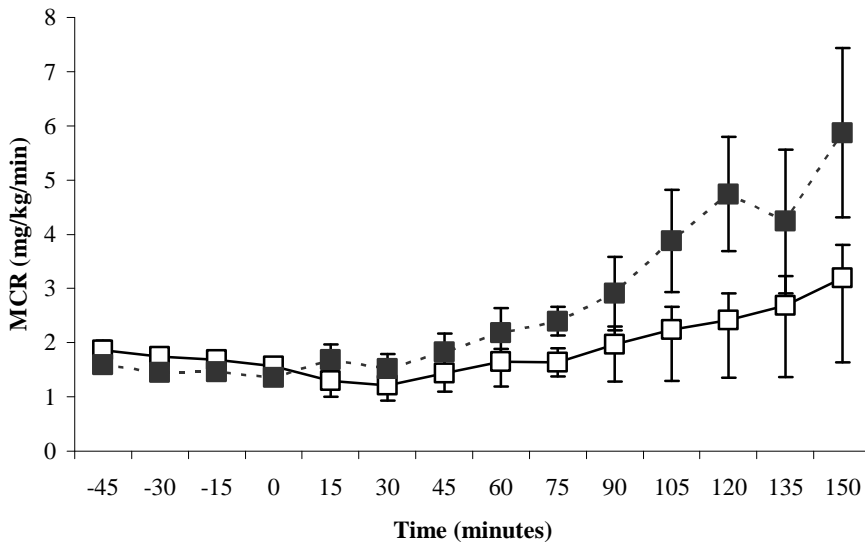


Fig. 2. Metabolic clearance rate (MCR) of glucose in postabsorptive state and insulin-stimulated conditions, before (PRE – white squares) and after (POST – black squares) rapamycin administration.

Diabetes is recognized as a protein catabolic state. The net change in whole-body protein balance occurs largely as a result of intensification in protein breakdown in muscle [5]. In the basal state, the increase in KIC and amino acids concentration after rapamycin administration (Table 1) indicates a slight tendency for proteolysis. This statement seems to thwart the finding that ELF did not suffer any change in the same conditions (Fig. 3). It must be kept in mind that the protein synthesis and proteolysis are slow processes and we measured ELF only 45 min before the beginning of the insulin infusion. For this reason we consider that the amino acids and KIC concentrations reflects much more accurately the rate of proteolysis.

During the clamp, ELF and concentration of KIC and amino acids decreased in a similar manner in POST as in PRE patients (Table 1). These results support the idea that antiproteolytic action of insulin is not affected by rapamycin.

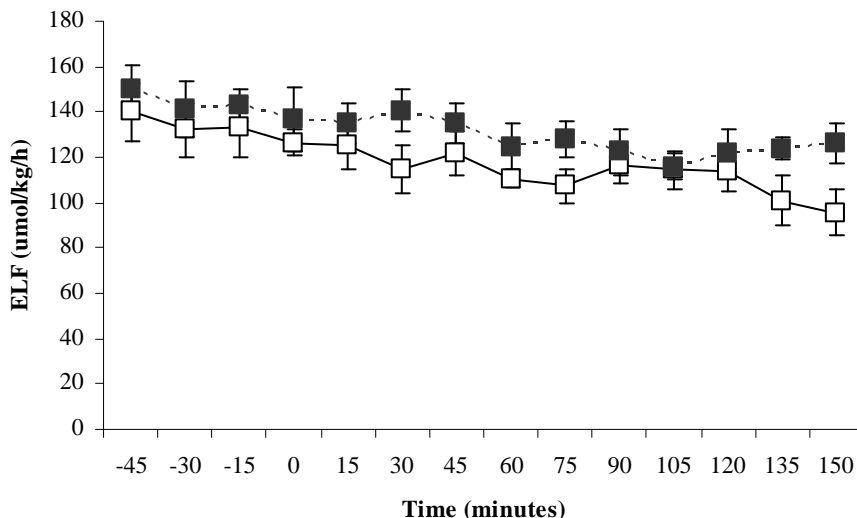


Fig. 3. Kinetics of endogenous leucine flux (ELF) before (PRE - white squares) and after (POST - black squares) rapamycin administration.

**Conclusions.** The main conclusion of this work is that rapamycin improves residual insulin secretion and insulin sensitivity. All other effects of rapamycin on glucose and protein metabolism are relatively modest.

In the postabsorptive conditions, as well as in the absence of insulin, rapamycin decreased plasma glucose concentration, probably by enhancing residual insulin secretion and slightly lowering EGP, since rapamycin did not affect the rate of glucose uptake. In the same conditions, rapamycin tends to enhance diabetic catabolic state through stimulation of proteolysis.

During hyperinsulinemia, rapamycin did not affect in any way hepatic glucose production and muscle proteolysis. The increase of MCR, along with the increase in glucose infusion rate to maintain euglycemia, indicates an amelioration of muscle insulin resistance.

## REFERENCES

1. Battezzati, A., Benedini, S., Fattorini, A., Piceni Sereni, L., Luzi, L., Effect of hypoglycemia on amino acid and protein metabolism in healthy humans, "Diabetes", **49**, 2000, 1543-1551.

2. Battezzati, A., Benedini, S., Fattorini, A., Losa, M., Mortini, P., Bertoli, S., Lanzani, R., Testolin, G., Biolo, G., Luzi, L., Insulin action on protein metabolism in acromegalic patients, "Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.", **284**, 2003, E823-E829.
3. Brendel, M., Hering, B., Schulz, A., Bretzel, R., International Islet Transplant Registry report, Giessen, Germany, 1999, 1-20.
4. Calne, R.Y., Collier, D. S. J., Lim, S., *et al.*, Rapamycin for suppression in organ allografting, "Lancet", **2**, 1989, 227.
5. Charlton, M., Nair, K. S., Protein metabolism in insulin-dependent diabetes mellitus, "J. Nutr.", **128** (2 Suppl.), 1998, 323S-327S.
6. Chen, H. F., Wu, J. P., Luo, H. Y., Daloz, P. M., The immunosuppressive effect of rapamycin on pancreaticoduodenal transplants in the rat, "Transplant. Proc.", **23**, 1991, 2239-2240.
7. Chen, H. F., Wu, J. P., Xu, D., Luo, H., Daloz, P., Reversal of ongoing heart, kidney, and pancreas allograft rejection and suppression of accelerated heart allograft rejection in the rat by rapamycin, "Transplantation", **56**, 1993, 661-666.
8. Luzi, L., Battezzati, A., Perseghin, G., Bianchi, E., Terruzzi, I., Spotti, D., Vergani, S., Secchi, A., LaRoca, E., Ferrari, G., Combined pancreas and kidney transplantation normalizes protein metabolism in insulin-dependent diabetic-uremic patients, "J. Clin. Invest.", 1994, **93**, 1948-1958.
9. Luzi, L., Hering, B.J., Soggi, C., Raptis, G., Battezzati, A., Terruzzi, I., Falqui, L., Brandhorst, D., Brandhorst, H., Regalia, E., Brambilla, E., Secchi, A., Perseghin, G., Maffi, P., Bianchi, E., Mazzaferro, V., Gennari, L., DiCarlo, V., Federlin, K., Pozza, G., Brezel, R.G., Metabolic effects of successful intraportal islet transplantation in insulin-dependent diabetes mellitus, "J. Clin. Invest.", **97**, 1996, 2611-2618.
10. Luzi, L., Perseghin, G., Brendel, M.D., Terruzzi, I., Battezzati, A., Eckhard, M., Brandhorst, D., Brandhorst, H., Friemann, S., Soggi, C., DiCarlo, V., PiceniSereni, L., Benedini, S., Secchi, A., Pozza, G., Bretzel, R.G., Metabolic effects of restoring partial beta-cell function after islet allotransplantation in type 1 diabetic patients, "Diabetes", **50**, 2001, 277-282.
11. May, R. C., Clark, A. S., Goheer, A., Mitchell, W. E., Specific defects in insulin-mediated glucose metabolism in acute uremia, "Kidney Int.", **28**, 1985, 490-497.
12. McAlister, V. C., Gao, Z., Peltekian, K., Dominguez, J. *et al.*, Sirolimus-tacrolimus combination immunosuppression, "Lancet", **355**, 2000, 376-377.
13. Sehgal, S. N., Baker, H., Vezina, C., Rapamycin (AY-22, 989), a new anti-fungal antibiotic: II. Fermentation, isolation and characterization, "J. Antibiot.," **28**, 1975, 727-732.
14. Shapiro, A. M. J., Lakey, J. R. T., Ryan, E. A., Korbutt, G. S., Toth, E., Warnock, G. L., Kneteman, N. M., Rajotte, R. V., Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppression regimen, "New England J. Med.", **343**, 2000, 230-238.
15. Steele, R., Influence of glucose loading and of injected insulin on hepatic glucose output, "Ann. NY Acad. Sci.", **82**, 1959, 420-431.
16. Stepkowski, S. H., Chen, H., Daloz, P., Kahan, B., Rapamycin, a new potent immunosuppressive drug for vascularized heart, kidney, and small bowel allografts, "Transplantation", **52**, 1991, 22-26.

17. Vu, M. D., Qi, S., Xu, D., Wu, J., Peng, J., Daloz, P., Sehgal, S., Leduc, B., Chen, H., Synergistic effects of mycophenolate mofetil and sirolimus in prevention of acute heart, pancreas, and kidney allograft rejection and in reversal of ongoing heart allograft rejection in the rat, "Transplantation", **66**, 1998, 1575-1580.
18. Yki-Jarvinen, H., Sahlin, K., Ren, J.M., Koivisto, V.A., Localization of rate-limiting defect for glucose disposal in skeletal muscle of insulin-resistant type 1 diabetic patients, "Diabetes", 1990, **39**, 157-167.
19. Zeng, Y.C., Ricordi, C., Lendinore, J., et al., The effect of prednisone on pancreatic islet autografts in dogs, "Surgery", **113**, 1993, 98-102.

## PREVENTION OF SPONTANEOUS AUTOIMMUNE DIABETES IN NON OBESE DIABETIC MICE BY RAPAMYCIN AND RAPAMYCIN-IL-10 COMBINATION

**CAMELIA LANG\***, **ELENA DRĂGHICI\*\*** and **CORNELIU TARBA\***

**SUMMARY.** – Rapamycin is an immunosuppressive drug that prevents rejection of pancreatic islet allografts transplanted into patients with Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. This study aimed to determine if rapamycin and/or rapamycin- IL-10 combination can indeed prevent diabetes incidence or only produce a delay in onset of diabetes. Rapamycin alone and rapamycin-IL-10 combination were given separately and together to female non-obese diabetic (NOD) mice for 15 weeks beginning with 11 weeks of age. Diabetes incidence was determined and plasma glucose and insulin concentrations were measured. Rapamycin prevented diabetes in female NOD mice (9.09% incidence in rapamycin and rapamycin-IL-10 treated mice vs. 66.66% in vehicle-treated mice). However, although we showed an improvement of plasma glucose and insulin concentrations after rapamycin administration, these changes were due to an improvement in insulin sensitivity and not to an improvement in beta-cell function. These findings suggest that rapamycin and rapamycin-IL-10 combination only delay diabetes onset.

Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus is the result of selective destruction of pancreatic islet beta cells by an immune process. A variety of therapy and procedures that delete, suppress or modulate function of immune system cells can block the autoimmune response against islet beta cells and prevent destruction of beta-cells and Type 1 diabetes. Immunotherapy can even reverse established diabetes in the NOD mouse, a model of human Type 1 diabetes [11]. In human Type 1 diabetes, there is also more potential for restoration of endogenous insulin secretion and reversal of diabetes than has been assumed. For example, patients receiving immunosuppressive drug cyclosporine experienced more frequent and longer duration remissions than control patients [5]. However, the risk-to-benefit ratio of treating patients with newly diagnosed Type 1 diabetes with cyclosporine does not justify widespread clinical use.

Identification of immunosuppressive agents with lower risk-to-benefit ratio has come mainly from the field of organ transplantation. Recent reports have identified immunosuppressive drug combinations that allow reduction of side effects. The major side effects of calcineurine inhibitors, cyclosporine and tacrolimus are nephrotoxicity, neurotoxicity, diabetes mellitus and hyperlypaemia. In contrast, combination of low doses of tacrolimus, which inhibits IL-2 gene transcription, with rapamycin, which inhibits IL-2 induction of T-cell proliferation [13], provided strong synergistic potentiation of efficacy in animal organ allotransplantation [2] and very low rates of rejection of human liver, kidney, and pancreas allografts [7].

---

\* *Department of Biology, Babes-Bolyai University, 400006 Cluj-Napoca, Romania.*

*Email: camelia\_lang@web.de*

\*\* *San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (HSR-TIGET), Via Olgettina 58, 20132 Milan, Italy*

Based on these reports, Shapiro et al. [15] developed a rapamycin-tacrolimus combination immunosuppressive therapy, together with a monoclonal antibody against the IL-2 receptor, to treat Type 1 diabetic patients that received islet allografts. They found that this glucocorticoid-free immunosuppressive regimen can result in insulin independence for over 1 year in 80% of subjects and with no serious side effects [15; 10].

Rapamycin is a macrocyclic fermentation product of *Streptomyces hygroscopicus*, an actinomycete, originally isolated from a soil sample in Rapa Nui (Easter Island) [13]. Rapamycin was initially investigated as an antifungal and antitumor agent. However, its lymphopenic properties heralded its role as an immunosuppressant. Rapamycin has a strong antiproliferative effect on T cells stimulated via the T-cell receptor/CD3 pathway. IL-10 is an immunoregulatory cytokine that has a critical function in inducing T regulatory 1 (Tr1) cells both *in vitro* and *in vivo*. Tr1 cells can suppress undesired immune responses partly through production of IL-10 and TGF- $\beta$  [9].

The purpose of this study was to determine whether rapamycin or combination of rapamycin-IL-10 immunosuppressive therapy can prevent onset of Type 1 diabetes mellitus in female NOD mice and their effects on insulin sensitivity and beta-cell function.

**Materials and methods.** *Animals.* Female NOD mice, 10 weeks of age, were purchased from Charles River Laboratories (Calco, Italy). The mice were housed and fed under specific pathogen-free conditions. Female NOD mice of this colony develop pancreatic islet infiltration beginning at about 4-5 weeks of age.

*Treatments.* NOD mice were treated for 15 weeks with rapamycin and/or IL-10 starting at 11 weeks of age, a time point at which pancreatic-cell immunity is clearly established as judged by insulinitis and insulin-antibodies. Rapamycin (rapamune, Wyeth-Ayerst Research, Pearl River, NY) was diluted in water and administered once a day at a dose of 1 mg/kg by gavage. Human IL-10 (BD Biosciences, Mountain View, CA) was diluted in PBS and administered twice a day at a dose of 0.05 mg/kg intraperitoneally. The mice were killed by sodium pentobarbital overdose after diabetes onset or at 5 weeks after rapamycin was stopped.

*Analytical determinations.* The blood was drawn every 5<sup>th</sup> week of the experiment. Glucose level in tail venous blood was quantified using the Glucometer Elite system (Bayer, Wuppertal, Germany). Plasma level of insulin was measured by radioimmunoassay using a commercial kit (DiaSorin, Italy). A diagnosis of diabetes was made after two sequential glucose measurements higher than 250 mg/dl.

*Calculations.* Insulin sensitivity (IS) and beta-cell function (%B) were estimated using HOMA (homeostasis model assessment). This model was proposed by Matthews (1985) as a simple and inexpensive tool and is based on the product of the fasting plasma insulin and blood glucose concentrations, measured in a single blood sample.

$$\text{HOMA-IS} = \frac{22,5}{G_0 \times I_0}$$

$$\text{HOMA-\%B} = \frac{20 \times I_0}{G_0 - 3,5}$$

Where  $G_0$  (mM) is the fasting glucose concentration,  $I_0$  ( $\mu\text{U/ml}$ ) is the fasting insulin concentration.

*Statistical analysis.* The data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Comparison between the two groups was performed using Student  $t$  test for unpaired data.

**Results and discussion.** Early on 1992 B a e d e r *et al.* [1] have reported that rapamycin is able to prevent diabetes in NOD mice. However only doses greater than (0.6 mg/kg) were effective. R a b i n o v i t c h *et al.* [8] have also reported that rapamycin (1.0 mg/kg) decreased to 30% diabetes incidence after 11 weeks of treatment, but incidence rose to 50% at 13 weeks after rapamycin was stopped.

In our experiment, rapamycin reduced considerably diabetes incidence (Fig. 1), from 66.66% in control mice to 9.09% and protection was maintained for an additional 5 weeks after treatment was stopped. We did not observe any change in diabetes incidence induced by IL-10 (Fig. 1). We consider that the significant difference between our results and those of R a b i n o v i t c h *et al.* [8] (9.09% vs. 30%) might result from the fact that we used animals from different colonies which may have different characteristics.

The effects of rapamycin and rapamycin-IL-10 combination on plasma glucose concentration are depicted in Fig.2. In the first weeks of the study (weeks 11-16), glycemia raised significantly in all groups (from  $78.75 \pm 2.07$  to  $166.27 \pm 35.36$  mg/dl,  $p < 0.05$  in control; from  $81.27 \pm 2.29$  to  $126.72 \pm 7.30$  mg/dl,  $p < 0.05$  and from  $94.09 \pm 7.21$  to  $133.54 \pm 8.18$  mg/dl,  $p < 0.05$  in RAPA-IL-10). In the control and RAPA-IL-10 mice, plasma glucose concentration begun to decrease immediately after this point and reached physiological level at the end of experiment ( $103.50 \pm 1.65$  and  $111.1 \pm 3.50$  mg/dl, respectively). In the next weeks (12-21), glycemia continued to increase significantly in RAPA group ( $153.09 \pm 36.04$  mg/dl) but it also returned toward normal levels ( $114.30 \pm 2.20$  mg/dl). It must be noticed that the association of IL-10 with rapamycin significantly enhances the glucose plasma concentration restoration process.

As shown in Fig. 3, plasma insulin levels were in all groups but especially in the third group, much higher than physiological values even before the beginning of the treatment. These differences were purely haphazard, since the mice's division into groups was random. The glycemia increase was not followed by an increment



in plasma insulin concentration but on the contrary by a decrease, more or less obvious in all groups, except control mice. Only at the end of treatment period a return to the normal values was recorded. This reaction is natural, given the animal model used. In the preclinical stage of diabetes, glycemia increases and determines the occurrence of insulin resistance and reducing of beta-cell function [4]. Subsequently, a phase of apparent remission begins, of 1-6 months, in which the necessity of insulin administration decreases and it is associated with an improvement of beta-cell function. But natural remission is always temporarily and it ends with the gradual or sudden increase of the need for exogenous insulin. In time it has been examined, exactly at this stage, by a treatment with immunosuppressive drugs, the possibility of a percentual increase and the duration of the remission phase. It has been concluded that these are efficient only during the treatment as the destruction of the beta-cells continues and these patients rapidly develop diabetes [15].

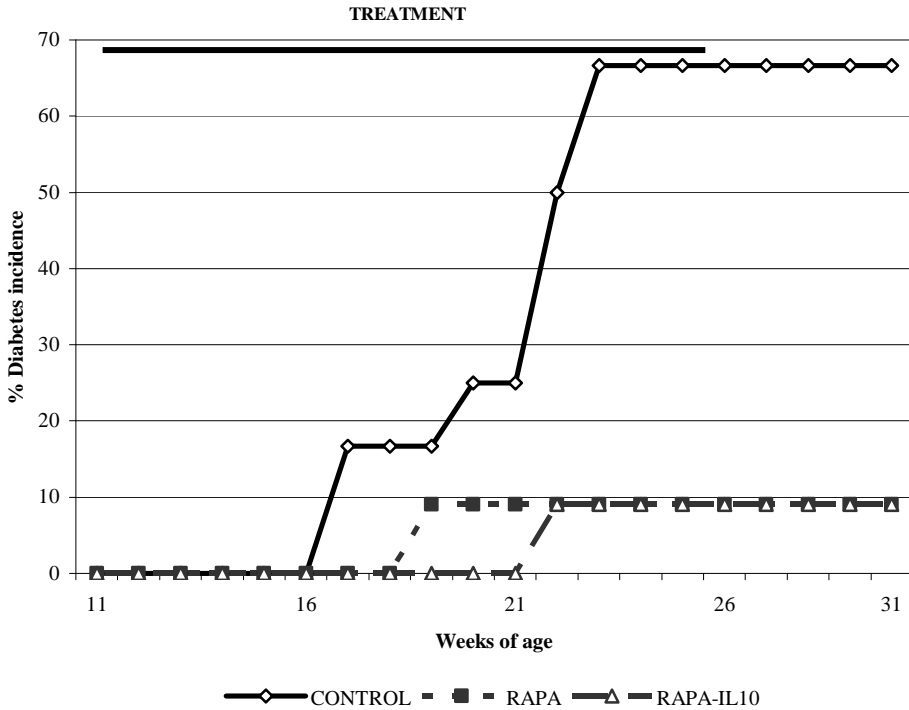


Fig. 1. Diabetes incidence in female NOD mice treated with rapamycin alone or rapamycin-IL-10 combination. The number of mice was n=12, control; n=11, RAPA and n=11, RAPA-IL-10.

PREVENTION OF SPONTANEOUS AUTOIMMUNE DIABETES

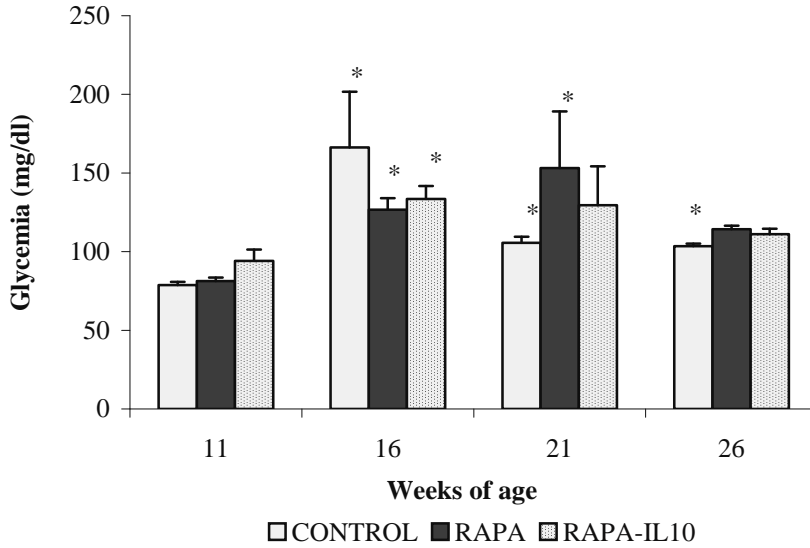


Fig. 2. Plasma glucose concentration in NOD mice during treatment with rapamycin and rapamycin-IL-10.

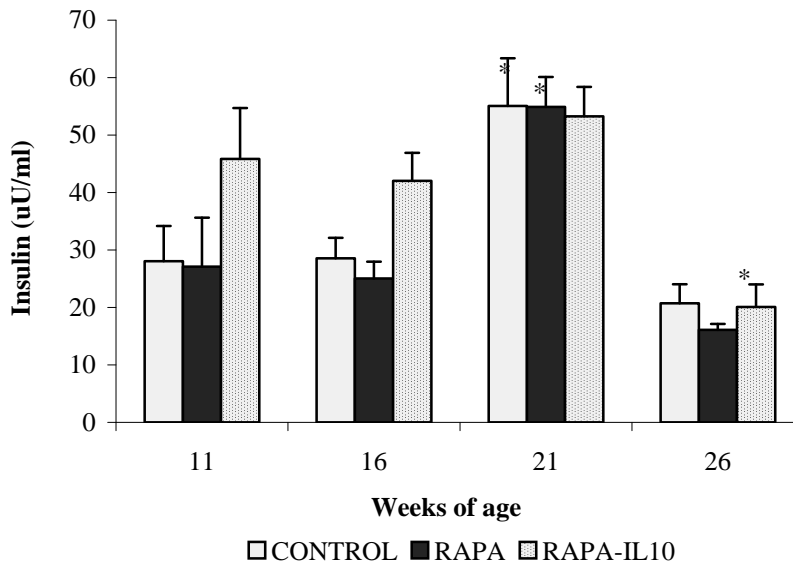


Fig. 3. Plasma insulin concentration in NOD mice during rapamycin and rapamycin-IL-10 administration.

Table 1

**Fasting plasma insulin concentration in NOD mice treated with rapamycin and rapamycin-IL-10 combination**

	Week			
	11	16	21	26
<b>CONTROL</b>	28.04 ± 6.13	28.54 ± 3.58	55.05 ± 8.32	20.72 ± 3.32
D%		1.78	96.32	-26.10
<i>p</i>		NS	<b>&lt;0.05*</b>	NS
<b>RAPA</b>	27.11 ± 8.50	25.02 ± 2.93	54.90 ± 5.20	16.08 ± 1.04
D%		-7.70	102.50	40.68
<i>p</i> vs		NS	<b>&lt;0.05*</b>	NS
<b>RAPA-IL10</b>	45.83 ± 8.86	42.03 ± 4.87	53.24 ± 5.13	20.07 ± 3.92
D%		-8.29	16.16	-56.20
<i>p</i>		NS	NS	<b>&lt;0.05*</b>

\* Significantly different from week 11 (Student's unpaired *t* test).

In order to determine if restoration of normoglycemia and plasma insulin concentration is due to the increase in insulin sensitivity and/or the improvement of the beta-cell function, we made use of homeostasis model assessment (HOMA). The insulin clamp technique [3] is considered the „gold standard” for *in vivo* quantification of insulin sensitivity; however, the method is complex and expensive. HOMA was proposed as a simple and inexpensive alternative. Such a method derives an estimate of insulin sensitivity and beta-cell function from the mathematical modelling of fasting plasma glucose and insulin concentrations.

All groups had a similar evolution (Fig. 4) concerning insulin sensitivity: during the first 10 weeks they showed a decrease in insulin sensitivity and then it significantly increased towards the end of the treatment period. The contribution of IL-10 to this process must, however, be mentioned. The group treated with IL-10 as well showed the lowest decrease in insulin sensitivity. In control and RAPA mice, the differences remained significant during the entire 11 weeks.

The increase in insulin sensitivity was, unfortunately, accompanied by a decrease in beta-cells function (Fig. 5). In this case, the beneficial, protective effect of IL-10 on beta-cells must be noticed. In the first weeks of our experiment, insulin sensitivity decreased significantly in control and RAPA mice, but not in RAPA-IL-10, in which restoration of beta-cell function doubled in week 21. At the end of the study, the lowest value HOMA-%B was recorded in the RAPA group. We concluded that the restoration of normoglycemia in mice treated with rapamycin and rapamycin-IL10 combination is due only to an improvement of insulin sensitivity, since destruction of beta cells continued. We consider that control mice (only 4 survivors at the end of experiment) naturally overcame the disease.

PREVENTION OF SPONTANEOUS AUTOIMMUNE DIABETES

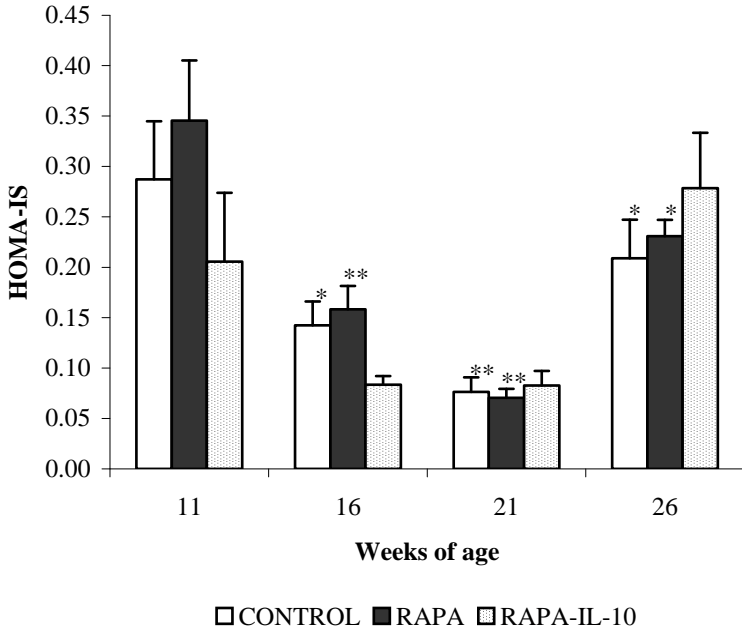


Fig. 4. Variation of HOMA-IS in NOD mice during rapamycin and rapamycin-IL-10 administration

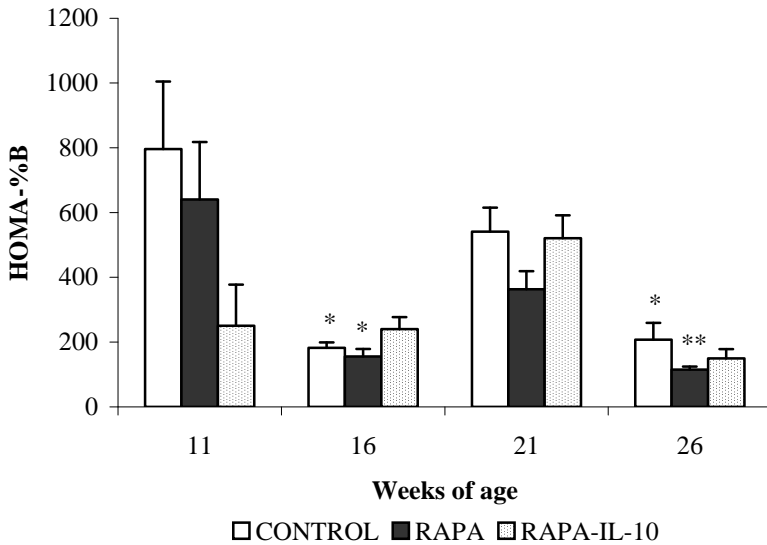


Fig. 5. Variation of beta-cell function in NOD mice treated with rapamycin and rapamycin-IL-10 combination.

**Conclusions.** Our experiment confirms that rapamycin is able to reduce incidence of diabetes in NOD mice. But we cannot assert that adding IL-10 to rapamycin does it too. However, it appears that the rapamycin only delays the onset of diabetes because, although the rapamycin treatment determines the glycemia restoration, it is based on the increase in insulin sensitivity rather than on the improvement of the beta-cell function.

## REFERENCES

1. Baeder, W. L., Sredy, J., Sehgal, S. N., Chang, Y. N., Adams, L. M., Rapamycin prevents the onset of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in NOD mice, "Clin. Exp. Immunol.", **89**, 1992, 174-178.
2. Chen, H., Qi, S., Xu, D. *et al.*, Combined effect of rapamycin and FK506 in prolongation of small bowel graft survival in the mouse, "Transplant. Proc.", **30**, 1998, 2579-2581.
3. DeFronzo, R. A., Tobin, J. D., Andres, R., Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance, Am. J. Physiol.", **6**, 1979, E214-E223.
4. Greenbaum, C., Insulin resistance in type 1 diabetes, "Diabetes Metab. Res. Rev.", **18**, 2002, 192-200.
5. Mahon, J. L., Dupre, J., Stiller, C. R., Lessons learned from use of cyclosporine for insulin-dependent diabetes mellitus: the case for immunotherapy for insulin-dependent diabetics having residual insulin secretion, "Ann. NY Acad. Sci.", **696**, 1993, 351-363.
6. Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. E., Turner, R. C., Homeostasis model assesment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man, "Diabetologia", **28**, 1985, 412-419.
7. McAlister, V. C., Gao, Z., Peltekian, K., Dominguez, J. *et al.*, Sirolimus-tacrolimus combination immunosuppression, "Lancet", **355**, 2000, 376-377.
8. Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W. L., Shapiro, A. M., Rajotte, R. V., Power, R., Combination therapy with sirolimus and interleukin-2 prevents spontaneous and recurrent autoimmune diabetes in NOD mice, "Diabetes", **51**, 2002, 638-645.
9. Roncarolo, M. G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Naula, S., Levings, M. K., Type 1 T regulatory cells, "Immunol. Rev.", **2**, 2001, 389-400.
10. Ryan, E. A., Lakey, J. R. T., Rajotte, R. V., Korbutt, G. S., Kin, T., Ims, S., Rabinovitch, A., Elliott, J. F., Bigam, D., Kneteman, N. M., Warnock, G. L., Larsen, I., Shapiro, A. M. J., Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol, "Diabetes", **50**, 2001, 710-719.
11. Ryu, S., Kodama, S., Ryu, K., Schoenfeld, D. A., Faustman, D. L., Reversal of established autoimmune diabetes by restoration of endogenous  $\beta$  cell function, "J. Clin. Invest.", **108**, 2001, 63-72.
12. Scherthner, G., Progress in the immunointervention of type-1 diabetes mellitus, "Horm. Metab. Res.", **27**, 1995, 547-554.
13. Sehgal, S. N., Baker, H., Veina, C., Rapamycin (AY-22, 989), a new anti-fungal antibiotic: II. Fermentation, isolation and characterization, "J. Antibiot.", **28**, 1975, 727-732.
14. Sehgal, S., Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus). Mechanisms of action: immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression, "Clin. Biochem.", **31**, 1998, 335-341.
15. Shapiro, A. M. J., Lakey, J. R. T., Ryan, E. A., Korbutt, G. S., Toth, E., Warnock, G. L., Kneteman, N. M., Rajotte, R. V., Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppression regimen, "New England J. Med.", **343**, 2000, 230-238.

## COMPARATIVE STRUCTURAL AND ULTRASTRUCTURAL ASPECTS OF THE TOXIC EFFECT OF CARBOPLATIN AND CISPLATIN AT THE LEVEL OF THE THYMUS OF THE WHITE WISTAR RATS

**CRISTINA PAȘCA\*, VICTORIA-DOINA SANDU\*  
and MARIA GORDAN\*\***

**SUMMARY.** – Carboplatin and Cisplatin, cytostatics belonging to the platinum drugs family, widely and efficiently used in the cancer treatment, have a different toxic effect on the rat thymus when they are administered in equivalent doses, in monochemotherapy. Carboplatin seems to possess a higher and longer toxic activity compared to Cisplatin, which appears immediately, aggravates progressively, but has a reversible character. Carboplatin determines a significant necrosis, necrobiosis and agglutination of the thymocytes, especially in the cortical areas, inducing an atrophied aspect of many thymic lobules. Besides, moderate vascular disturbances appear, consisting of: stasis, congestion, massive haemorrhages and diffuse intravascular coagulation phenomena. Ultrastructurally, both the epithelio-reticular cells and especially thymocytes are affected by some degenerative processes (these cells have a vacuolised cytoplasm, pyknotic or altered nuclei, swollen and greatly modified mitochondria, and, zonally, broken cell membranes which allow the cell constituents to split out). As a consequence of the Carboplatin administration, both in the cortex and medulla of the lobules, a large number of apoptotic bodies appears. In the spaces created by the lysis processes and in some perivascular areas, a massive collagen proliferation could be noticed. The involution and fibrosis of the thymus were correlated with a marked increase of the eosinophil, macrophage and mastocyte number. The toxic effect of the Cisplatin at the level of the thymus seems to be similar but the structural and ultrastructural alterations were less grave, and did not aggravate significantly during the whole experimental period, affected temporary especially the cellular and more discrete the vascular component in the thymus, had a zonal and a reversible character, the recovery process being more intense than in the groups treated with Carboplatin.

Platinum drugs (including Cisplatin and Carboplatin) remain a cornerstone of present day chemotherapy regimens not only for epithelial malignancies (lung, ovarian, bladder, testicular, head and neck) but also against a number of metastatic or advanced malignancies including cancers of the breast, melanoma, prostate, mesothelioma, nasopharyngeal, pancreatic, leiomyosarcomas and most other advanced cancers. According to their success in the cancer treatment, it mainly comes from the ability of these platinum compounds to form bulky adducts on the DNA and cross-links within the

---

\* Babeș-Bolyai University, Department of Experimental Biology, 400006 Cluj-Napoca, Romania.  
E-mail: cpasca@biolog.ubbcluj.ro

\*\* "Gheorghe Șincai" Highschool, 450051 Zalău, Romania

same strand or between the two strands. Understanding details on activation of signal transduction by Cisplatin and Carboplatin leading to apoptosis, mostly responsible for the toxic adverse reactions of these platinum compounds, is likely to reveal novel strategies and improve combination therapies and efficacy [1, 4, 7, 12, 14, 16, 18, 22, 25, 28, 33].

Cisplatin (cis-diaminedichloro-platinum(II)) is one of the most widely used and most effective cytotoxic agents, but, unfortunately, its continuous clinical use is impeded by its severe side effects including renal toxicity, gastrointestinal toxicity, peripheral neuropathy, asthenia, ototoxicity and hematological toxicity [6, 15, 22, 37]. Carboplatin (Paraplatin) (cis-diamine-1,1-cyclobutanedicarboxylatoplatinum(II)) is an analogue of Cisplatin, which retains an equivalent antitumor activity, but proved markedly less toxic effect to the kidney and nervous system, and caused less nausea and vomiting, while the hematological adverse effects seemed to be more frequent and graver [2- 4, 11].

Nowadays, in many situations, Carboplatin is the drug of choice in view of the improved quality of life that it offers to the patients compared to Cisplatin, but the debate „Carboplatin versus Cisplatin” continues, usually, the decision of the medical oncologist being affected by the patient cases, more exactly, by the features of the kidney, or liver, or heart, or bone marrow function. Unfortunately, so far, the dynamics, structural and ultrastructural aspects of the toxic effects of these two platinum compounds at the level of the hematopoietic structures (including bone marrow, central and peripheral lymphoid organs), and the dose-effect correlation are incompletely known. Therefore, our studies intended to complete the previous investigations, revealing comparatively the effect of some equivalent therapeutic doses of Cisplatin, respectively Carboplatin (administered intravenously) on the rat thymus, the features, dynamics and reversible or irreversible character of the alterations induced by these antitumoral drugs.

**Materials and methods.** Our experiments were carried out with the following twelve groups of healthy adult male Wistar rats, weighing  $190 \pm 10$  g, fed with a standard diet and maintained under conventional (standard) bioclimatic laboratory conditions, starved for 18 hours before the treatment, but having water *ad libitum*:

- groups U<sub>1</sub>, U<sub>2</sub>, U<sub>3</sub> and U<sub>4</sub> - untreated (control) groups;
- groups: P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> and P<sub>4</sub> treated intravenously with a single dose of Carboplatin (Paraplatin) (LD50), and sacrificed 24 hours, 4, 11 and 18 days after the treatment,
- groups: C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> treated intravenously with a single dose of Cisplatin (LD50), and sacrificed 24 hours, 4, 11 and 18 days after the treatment.

Having sacrificed the animals, we took fragments from the thymus. For microscopic examination, the fragments were fixed in 10% neutral formol, processed by the paraffin technique and the sections of 6 μm were stained by the hematoxylin-eosin, and Masson-Goldner trichrome [26]. For ultrastructural investigations, fragments of

thymus were prefixed in 2.7% glutaraldehyde solution and postfixed in 2% osmic acid solution. The fragments were dehydrated in acetone and then embedded in Vestopal W. The ultrathin sections were obtained using an LKB III ultramicrotome and were contrasted with uranyl acetate. Examination of the ultrathin sections was performed using a transmission electron microscope [5, 20, 29].

On the stained and contrasted sections we studied, by light and electron microscopic examinations, the histological and ultrastructural modifications induced by this drug at the level of thymus, in concordance with the moment of the sacrifice.

**Results and discussion.** Light microscopy and electronmicroscopic investigations of the thymus sections obtained from the rats treated with the two alkylating agents (Cisplatin or Carboplatin) revealed the appearance of certain histological and ultrastructural modifications, the intensity, extension, gravity and reversibility of which were different, depending on the type of cytostatic and the moment of the sacrifice.

Concerning the toxic effect exerted by Cisplatin on the thymus, it could be observed that discrete histological alterations already appeared 24 hours after the treatment, consisting of the presence of a significant number of smaller thymic lobules as compared to the untreated group, while the two zones of the lobules (the cortex and medulla) could not be clearly distinguished because of a drastic decrease of the lymphocyte (thymocyte) number in the outer part of the most of the lobules. This thymocyte depletion seemed to be a consequence of the antimetabolic and necrotic phenomena of the cells induced by Cisplatin, these processes determining a less compact aspect and a decreased dimension of the cortical area (Fig. 1).

Three, respectively ten days later, the histological aspect of the thymus demonstrated a moderate increased toxic effect of this alkylating agent, materialized in the appearance of a more drastic cell depletion of the cortical zone, where a certain homogeneity tendency could be observed, so that in many thymic lobules the two areas could not be distinguished any more. Besides, the lobules were smaller. All over the section surface of the lobules, necrotic, necrotic and packing phenomena of the thymocytes could be seen (Fig. 2). In addition, at the level of the lysis areas (both in the cortex and medulla) many macrophages appeared, which were responsible for the phagocytosis of the cell debris. No cell was seen in mitosis in the cortex of the thymic lobules, so that we could deduce that the cell division had been stopped. Also, the blood vessels appeared affected by the cytostatic. Thus, grave enough congestions, stasis, perivascular oedemas and just here and there discrete microhaemorrhages accompanied the degenerative processes which affected the cells (Fig. 3).



Eighteen days after the treatment, the thymus was in an obvious recovery process, the lobules had almost the same dimensions as in the control group, the two areas of the lobules could be definitely distinguished, but the thymocyte density in the cortex was still low as compared to the untreated group (Fig. 4). The congestion, stasis and perivascular oedemas persisted, but they were discrete, and the microhaemorrhages had completely disappeared.

The electron microscopy investigations confirmed and completed the histological data. Thus, we could observe that this alkylating agent affected immediately and seriously both the cellular and the vascular components of the thymus. Then, the toxic effect of the drug seemed to aggravate progressively until the 11th day of the experiment, the recovery phenomena occurring and increasing in the next seven days. Thus, both in the cortex and medulla, the vessels seemed to be affected by a severe congestion and stasis correlated with a moderate modification of the vascular permeability which determined a discrete extravasation of the erythrocytes. These vascular changes contributed in the maintaining and aggravating of the degenerative processes which affected the cellular component of the thymus. Between the thymocytes and epithelio-reticular cells, the first ones seemed to be more sensitive to this cytostatic. Thus, the thymocytes, initially between the cortex and medulla and then in cortex, appeared to be affected by some drastic degenerative processes consisting of the appearance of some modified nuclei, most of them being pyknotic, retracted, having a chromatin with a peculiar disposition and aspect (cortical hyperchromatosis). The cytoplasm of many thymocytes was vacuolised, and the mitochondria appeared swollen, vacuolised and possessed altered cristae. The antimitotic effect of this dose of cytostatic could be demonstrated by the absence of any cells in division. The necrobiotic and necrotic phenomena were correlated with a discrete apoptosis process demonstrated by the presence of a small number of apoptotic bodies both in the cortex and medulla (Fig. 5). Only in some thymic lobules, at the level of the lysis areas, a moderate collagen proliferation could be seen (Fig. 6). In addition, the epithelio-reticular cells seemed to be affected by the alterative phenomena, too. They appeared swollen, had a vacuolised cytoplasm, and their mitochondria were swollen and had disorganized matrix and cristae (Fig. 7 and 8). These massive degenerative processes in the thymic lobules were correlated with a discrete increase of the eosinophil and macrophage number (Fig. 8 and 9).

Concerning the groups of rats treated with Carboplatin, we could noticed that it seemed to possess a higher and longer toxic activity on the thymus compared to Cisplatin, which appeared immediately, aggravated progressively and significantly, and, fortunately, started decreasing at the end of the 18 days of this experiment, having a reversible character.

Thus, histological modifications already appeared 24 hours after the treatment, they consisting of a thymocyte depletion in the cortex of the thymic lobules correlated with many packing phenomena of the thymocytes. All these processes determined a less compact aspect of the thymic cortex and, at the same time, the cortex had a decreased dimension (Fig. 10). In addition, a discrete congestion and stasis could be seen all over the section surface.

Four days after the chemotherapy, the depletion of the cortex was more severe as a consequence of the drastic necrotic and necrobiotic phenomena, the thymic lobules had a certain homogeneous tendency, the two areas of the lobules could not be distinguished any more because of a drastic decrease of the lymphocyte number in the outer portion of the most of the thymic lobules, and also, the lobules were smaller (Fig. 11). Besides, discrete haemorrhages appeared, they maintaining and aggravating the degenerative processes which affected the thymocytes and epithelio-reticular cells.

After 11 days from the treatment, a more marked toxic effect of Carboplatin on the thymus could be noticed, when, besides an increased depletion of the cortex of the thymic lobules, a very significant congestion correlated with massive intralobular and interlobular haemorrhages could be seen (Fig. 12). In addition, here and there, the stasis and congestion were correlated with diffuse intravascular coagulation phenomena. As a consequence of the thymocyte depletion, most of the thymic lobules appeared atrophied and, at the same time, a perilobular fibrosis tendency became obvious (Fig. 13).

At the end of the experiment, the toxicity of Carboplatin on the thymus seemed to decrease, but only very discretely recovery tendency of this central lymphatic organ was observed. Although the thymic lobules were still smaller than with the control group, the packing and lysis phenomena of the thymocytes decreased, and a small number of normal lymphocytes appeared all over the thymic lobule surface. The two areas of the thymic lobules (cortex and medulla) could be distinguished, this histological aspect demonstrating that in this group the divisions in the cortical area were comparable with those in the control group, although the density of the thymocytes in the cortex was still low as compared to the untreated group. Besides, the congestion, stasis, haemorrhages and diffuse intravascular coagulation phenomena persisted, but were more discrete and had a zonal character (Fig. 14 and 15).

The electron microscopy confirms the histological data mentioned above. Thus, both the vascular and cellular components of the thymus seemed to be seriously affected by Carboplatin. The vessels of the thymic lobules appeared to be affected both in the cortex and medulla, where we could see a severe congestion, stasis, a change of the vascular permeability which determined a massive extravasation of the erythrocytes after a few days from the drug administration. In addition, after 11 days from the treatment, some vessels seemed to have a thickened wall, as a consequence of a massive collagen proliferation.

The most affected by this drug seemed to be the thymic cells, especially the thymocytes in the cortex, but also in the medulla (Fig. 16). Thus, they appeared affected by some degenerative processes (necrosis and necrobiosis), consisting of the appearance of some modified nuclei, most of them being retracted or pyknotic, having a chromatin with a peculiar disposition and aspect (cortical hyperchromatosis). The cytoplasm of many thymocytes was vacuolised, the mitochondria appeared swollen and vacuolised and had a rarefied matrix and cristae. In some areas of the lobules a few thymocytes had a broken cell membrane, and the intracellular structures were split out between the remaining cells. In the spaces which were created by the drastic lysis processes, a massive collagen proliferation could be noticed, which demonstrates the obvious fibrosis tendency induced by this drug dose (Fig. 17). The involution of the thymus was correlated with a marked increase of the eosinophil and mastocyte number (Fig. 18). The necrotic and necrobiotic processes were correlated with certain apoptotic phenomena both in the cortex and medulla, where we could see a moderate number of apoptotic bodies (Fig. 19). The degenerative processes seemed to affect a moderate number of epithelio-reticular cells, too (Fig. 20); these cells had a vacuolised cytoplasm and modified nuclei and cellular organelles. In the two areas of the thymic lobules, the number of macrophages was significantly increased, demonstrating a more intense phagocytic activity. In addition, the Hassall corpuscles were numerous, had small dimensions and a newly formed cell structure.

The first platinum cytostatics introduced into the clinic were Cisplatin and its somewhat less toxic analog – Carboplatin, both of them having the same wide spectrum of anti-tumor activity. Unfortunately, the therapeutic efficacy of these two anticancer drugs is diminished by intrinsic and acquired tumor resistance, and by some adverse reactions (including hematological toxicity) induced by the administration of therapeutic doses. Because of these limitations, there is still an intense effort to know exactly all the features and dynamics of the gravest side effects, which is myelotoxicity for Carboplatin treatment and nephrotoxicity for Cisplatin treatment [3, 4, 6, 15, 17, 19].

The cytopenias, the most common and serious complication of the patients with malignancies, can be often attributed to the toxicity of the anticancer therapy. Concerning the platinum-containing products, the cytopenias seem to be a secondary complication of the nutritional deficiencies, blood loss, hyperplenism, autoimmune haemolytic phenomena and disseminated intravascular coagulation. According to the previous studies, Carboplatin is much more hematotoxic than Cisplatin, inducing a drastic thrombocytopenia (its dose limiting effect), leukopenia and haemolytic anemia, while Cisplatin determines only a moderate leukopenia and anemia [8, 9, 17, 23, 24, 31, 35, 36].

Our investigations indicate that Carboplatin possesses higher toxic activity compared to Cisplatin at the level of the thymus – a very important central lymphoid organ, confirming and completing other previous studies concerning this aspect.

The light and electron microscopic studies evidenced the fact that both these two cytostatics (but especially Carboplatin) had a significant toxic effect on the thymus, which interested principally the cellular component (lymphocyte populations and the reticulo-epithelial cells) in this lymphoid organ, but, also the vascular component.

Concerning the cellular component of the thymus, our results demonstrate that the sensitivity of the lymphocytes seems to depend on their age, the most affected being the lymphoblasts, which usually occur in a large number in the cortex of the thymic lobules. This explains the severe decrease of the cell number in the cortex of the thymic lobules, so that the two distinct areas of the lobules could not be distinguish any more at a short period after the administration of the cytostatics. The mature lymphocytes were also affected by the drugs, but not so fast and severely.

The toxic action of these two cytostatics on the lymphocytes in the thymus was determined by their antimitotic activity, correlated with a significant necrosis and apoptosis, this fact being demonstrated by a drastically decreased number of cells in the thymus, by the appearance of a large number of necrotic remains of the lymphocytes and macrophages with an intense phagocytic activity, and by the presence of the apoptotic corpuscles, especially in the groups treated with Carboplatin. Apoptosis, which is characterized by morphological and functional changes, could be noticed at the level of the thymus of the rats treated with both these platinum-containing products, but is more intense at the animals treated with Carboplatin. The apoptotic cells detached from the neighboring tissular components and suffered cell and nuclear shrinkage, nuclear condensation, membrane blebbing and cell and nuclear fragmentation. Cell membrane integrity was preserved until advanced stages of the apoptotic process. Besides, our ultrastructural investigations reflected a serious disturbance of the mitochondrial integrity and structure (graver in the thymus of the rats treated with Carboplatin). These mitochondrial alterations have been possibly contributed to the apoptotic effect of these two cytostatics, because, according to the other studies, mitochondria are key participants in apoptosis that are not triggered by death receptors, and may also contribute to cell death after death receptor activation [4, 10, 13, 28].

Generally, apoptosis seems to be responsible for the characteristic toxicities of the drugs (including Cisplatin and Carboplatin) (nephrotoxicity, ototoxicity, mielotoxicity etc.) [4, 28]. Cell death through apoptosis has been documented in the course of thymus injury both in animal models and clinical thymus diseases. According to the previous studies, initiation of Cisplatin- or Carboplatin-induced apoptosis may need to be coupled to a cell cycle-mediated event [10, 28]. Apoptosis seems to affect both the epithelio-

reticular cells, but especially the thymocytes. *In vitro* experiments demonstrated that the latter ones can die through apoptosis both inside and outside the thymus (into the blood stream) [13]. Our results suggest that both necrosis and apoptosis can be a significant cause of thymus damage, a mechanism for the appearance, persistence and progression of structural and ultrastructural thymus injury.

Apoptosis of lymphocytes plays a fundamental role in the control of the immune response. As a consequence of the toxic action on the lymphocyte populations, these cytostatics have an immunomodulatory effect, which, so far, are not completely elucidated. However, it is known that most T-lymphocytes (which are severely affected by Carboplatin and Cisplatin), through their association with epithelio-reticular cells (also affected by these two drugs), recognize non-self antigens when these antigens are associated on the cell surface with membrane glycoproteins encoded in the major histocompatibility complex (MHC). The MHC glycoproteins are thought to serve as antigen-binding receptors that activate the appropriate T-cell response to a specific non-self antigen [21]. Besides, it is now known that platinum compounds (because of their toxic effect on the lymphoid organs), have an immunomodulatory effect, because they inhibit the proliferation of peripheral lymphocytes in response to mitogens or allogeneic cells, as well as the growth of T and B-cells in culture [27]. Sfrikakis *et al.* [32] showed that Carboplatin, the same as Cisplatin, may inhibit lymphocyte activation and subsequent proliferation and modulate immune function *in vivo*, by directly suppressing the expression of IL-2 and IL-2R $\alpha$  genes. Binding of IL-2 on its specific, high-affinity, surface receptor results in vigorous lymphocyte proliferation [30, 34].

As we already mentioned, our ultrastructural investigation demonstrated that both Cisplatin but especially Carboplatin exerted a significant toxic effect on the epithelio-reticular cells, too. This fact could contribute to the immunomodulatory action of this drug, because it is known that the thymus has a humoral effect upon other lymphoid tissues, particularly with regard to the stimulation of lymphocyte production and development of immunological competence. These substances (thymosin, thymoprotein, thymic humoral factor and serum thymic factor) are believed to be synthesized by the epithelio-reticular cells [21].

The disturbance of the vascular component (consisting of: congestion, stasis, oedemas, microhaemorrhages and disseminated intravascular coagulation) seem to contribute significantly in the appearance, maintaining and aggravating the degenerative processes which affect the cell in the thymus (lymphocytes and reticulo-epithelial cells). Our study reflect that the haemodynamics disturbances (which are graver at the level of the groups treated with Carboplatin) correlated with cytopenias seem to induce, maintain and amplify the cellular alterations in the thymus. This explains partially why Carboplatin determined much more serious structural and ultrastructural modifications of the thymus than Cisplatin.

Disseminated intravascular coagulation is characterized by widespread systemic activation of the coagulation system, consumption of coagulation factors, occlusion of small vessels by a coat of fibrin and a hypocoagulation state with bleeding. Besides, disseminated intravascular coagulation and thrombotic microangiopathy (which, according to our results, appear only in case of Carboplatin treatment) may produce thrombotic or haemorrhagic complications, and can contribute to the amplification of the haemolytic anemia – characteristic for the Carboplatin treatment.

Finally, we could affirm that our researches demonstrated that, although both cytostatics (but especially Carboplatin) induced significant histological and ultrastructural damages in thymus, which appear immediately after the administration of the drugs and developed progressively, generally, they were reversible, a recovery process being noticed in the last period of the experiment, especially in the groups treated with Cisplatin.

**Conclusions.** 1. Both Cisplatin but especially Carboplatin, administered in a single dose (equivalent to the LD50), have a significant toxic effect on the thymus of the white Wistar rats.

2. The toxic effect materialized in the appearance of some structural and ultrastructural modifications which affect both the cellular component (especially the lymphocyte (thymocyte) populations and more discrete the epithelio-reticular cells) and the vascular component in thymus.

3. The drastic decrease of the thymocyte number induced by these cytostatics seemed to be a consequence of their antimitotic activity, correlated with a drastic necrobiotic, necrotic and apoptotic effect.

4. Sensitivity of the thymocytes depends on their age, the most affected being the lymphoblasts in the cortex of the thymic lobules.

5. The vascular component of the thymus seemed to be more affected by the treatment with Carboplatin because of its direct toxic effect correlated with thrombocytopenia and haemolytic anemia induced by this cytostatic.

6. The congestion, stasis, oedemas and haemorrhages induce, maintain and aggravate the degenerative processes which affect the cellular component of the thymus.

7. At the level of the areas affected by serious degenerative and alterative processes, especially in the thymus of the rats treated with Carboplatin, a discrete and zonal sclerosis tendency could be noticed .

8. The toxic effect of Carboplatin on the thymus appeared immediately, developed progressively, but allowed an obvious recovery processes, which could be noticed at the end of the experiment.

9. The structural and ultrastructural alterations induced by Cisplatin were less grave, and they did not aggravate significantly during the experimental period,

affecting temporary especially the cellular and more discrete the vascular component in the thymus, while the recovery process was more intense.

## REFERENCES

1. Arquilla, M., Thompson, L. M., Pearlman, L. F., Simpkins, H., *Affect of platinum antitumor agents on DNA and RNA investigated by terbium fluorescence*, „Cancer Res.”, **43**, 1983, 1211-1216.
2. Belani, C. P., *Docetaxel in combination with platinum (cisplatin or carboplatin) in advanced and metastatic non-small cell lung cancer*, “Semin. Oncol.”, **29**, 2002, 4-9.
3. Boulikas, T., Vougiouka, M., *Recent clinical trials using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs*, “Int. J. Oncol.”, **21**, 2002, 1347-1352.
4. Boulikas, T., Vougiouka, M., *Cisplatin and platinum drugs at the molecular level*, “Oncol. Reports”, **10**, 2003, 1663-1682.
5. Brenda, S. W., *A Beginner's Handbook in Biological Transmission Electron Microscopy*, Butler & Tanner, London, 1981.
6. Caglar, K., Kinalp, C., Arpacı, F., Turan, M., Sağlam, K., Öztürk, B., Komurku, S., Yavuz, I., Yenicesu, M., Özet, A., Vural, A., *Cumulative prior dose of cisplatin as a cause of the nephrotoxicity of high dose chemotherapy followed by autologous stem-cell transplantation*, “Nephrol. Dial. Transplant”, **17**, 2002, 1931-1935.
7. Calvert, A. H., *Dose optimization of carboplatin in adults*, “Anticancer Res.”, **14**, 1994, 2273-2278.
8. Cascinu, S., Fedeli, A., DeFerro, E., *Recombinant human erythropoietin treatment in cisplatin-associated anemia: a randomized, double-blind trial with placebo*, “J. Clin. Oncol.” **12**, 1994, 1058-2062.
8. Dunphy, F. R., Dunleavy, T. L., Harrison, B. R., *Erythropoietin reduces anemia and transfusion requirements after chemotherapy with paclitaxel and carboplatin*, “Cancer”, **79**, 1997, 1623-1628.
10. Evans, D. L., Dive, C., *Effects of cisplatin on the induction of apoptosis in proliferating hepatoma cells and nonproliferating immature thymocytes*, “Cancer Res.”, **53** (9), 1993, 2133-2139.
11. Farrell, N., *Structurally novel platinum antitumor compounds. In Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*, (Howell, S. B., ed), 81-91. Plenum Press, New-York, 1991.
12. Farrell, N., Qu, Y., Feng, L., VanHouten, B., *Comparison of chemical reactivity, cytotoxicity, interstrand cross-linking and DNA sequence specificity of bis (platinum) complexes containing monodentate or bidentate coordination spheres with their monomeric analogues*, “Biochemistry”, **29**, 1990, 9522-9531.
13. Feng, J. M., Wu, J. S., *Morphological evidence for thymocytes apoptosis outside the thymus*, “Shi Yan Sheng Wu Xue Bao.”, **31** (1), 1998, 29-39 (Abstract).
14. Grigg, A., Szer, J., Skov, K., Barnett, M., *Multi-organ dysfunction associated with high-dose carboplatin therapy prior to autologous transplantation*, “Bone Marrow Transplantation”, **17**, 1996, 67-74.

15. Hill, J. M., Speer, R. J., *Organo-platinum complexes as antitumor agents*, "Anticancer Res.", **2**, 1982, 173-186.
16. Hoeschele, J. D., Kraker, A. J., Qu, Y., VanHouten, B., Farrell, N., *Bis (platinum) complexes, chemistry, antitumor activity and DNA-binding*. In *Molecular Basis of Specificity in Nucleic Acid-Drug Interactions* (Pullman, B., Jortner, J., eds.), pp. 301-321. Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, 1990.
17. Hruban, R. H., Sternberg, S. S., Meyers, P., Fleisher, M., Menendez-Botet, C., Boitnott, J. K., *Fatal thrombocytopenia and liver failure associated with carboplatin therapy*, "Cancer Invest." **9**(3), 1991, 263-268.
18. Johnson, N. P., Butour, J. L., Villani, G., Wimmer, F. L., Defais, M., Pierson, V., Brabec, V., *Metal anti-tumor compounds : the mechanism of action of platinum complexes*, "Prog. Clin. Biochem. Med.", **10**, 1989, 1-24.
19. Karpova, G. V., Fomina, T. I., Voronova, O. L., Abramova, E. V., Loskutova, O. P., *Early and delayed effects of Carboplatin on the blood system*, "Bull. Exp. Biol. Med." **132** (5), 2001, 1065-1069.
20. Kay, D., *Techniques for Electron Microscopy*, Alden & Mowbray, Oxford, 1967.
21. Leeson, C. R., Leeson, T. S., Paparo, A. A., *Textbook of Histology*, W.B. Saunders, Philadelphia, 1985.
22. Loskutova, H., Brabec, V., *DNA interactions of cisplatin tethered to the DNA minor groove binder distamycin*, "Eur. J. Biochem." **266**, 1999, 392-402.
23. Marani, T. M., Trich, B. M., Armstrong, K. S., Ness, P. M., Smith, J., Minniti, C., Sandler, S. G., *Carboplatin-induced immune haemolytic anemia*, "Transfusion", **11-12**, 1996, 1016-1018.
24. Miller, C. B., Plataniias, L. C., Mills, S.R., *Phase I-II trial of erythropoietin treatment in cisplatin-associated anemia*, "J. Natl. Cancer Instit." **84**, 1997, 98-103.
25. Millward, M. J., Webster, L. K., Toner, G. C., Bishop, J. F., Rischin, D., Stokes, K. H., Johnston, V. K., Hicks, R., *Carboplatin dosing based on measurement of renal function – experience at the Peter MacCallum Cancer Institute*, "Cancer Res." **26**, 1996, 372-379.
26. Mureșan, E., Gaboreanu, M., Bogdan, A. T., Băba, A. I., *Tehnici de histologie normală și patologică*, Ed. Ceres, București, 1974.
27. Ohnuma, T., Arkin, H., Minowada, J., Holland, J. F., *Differential chemotherapeutic susceptibility of human T-lymphocytes and B-lymphocytes in cultures*, "J. Cancer." **60**, 1978, 749-752.
28. Ortíz, A., Lorz, C., Catalan, M. P., Justo, P., Egido, J., *Role and regulation of apoptotic cell death in the kidney*. *Y2K Update*, "Frontiers in Bioscience", **5**, 2000, 735-749.
29. Ploaie, P. G., Petre, Z., *Introducere în microscopia electronică cu aplicații la biologia celulară și moleculară*, Ed. Acad. R.S.R., București, 1979.
30. Schwartz, R. H., *Costimulation of T lymphocytes: The role of CD28, CTLA-4 and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy*, "Cell", **71**, 1992, 1065 - 1068.
31. Siakantaris, M. P., Samaras, I. T., Angelopoulou, M. K., Kontopidou, F. N., Pangalis, K. A., *The use of cytokines in the supportive care of oncology patients*, "Haema". **2** (2), 1999, 64-82.
32. Sfikakis, P. P., Souliotis, V. L., Katsilambros, N., Markakis, K., Vaiopoulos, G., Tsokos, G. C., Panaiotidis, P., *Downregulation of interleukin-2 and  $\alpha$ -chain interleukin-2 receptor biosynthesis by Cisplatin in human peripherallymphocytes*, "Clin. Immunol. Immunopathol.", **79**, 1996, 43-49.



33. Sundquist, W. I., Lippard, S. J., *The coordination chemistry of platinum anticancer drugs and related compounds with DNA*, "Coord. Chem. Rev.", **100**, 1990, 293-322.
34. Taniguchi, T., Minami, Y., *The IL-2/IL-2 receptor system: A current overview*, "Cell", **73**, 1993, 5-8.
35. Vadhan – Raj, S., Verschraegen, C., McGarry, L., *Recombinant human thrombopoietin (rhTPO) attenuates high-dose carboplatin (C)-induced thrombocytopenia in patients with gynecologic malignancy*, "Blood", **90**, 1997, 580 (Abstract).
36. Walker, R. W., Rosenblum, M. K., Kempin, S. J., Christian, M. C., *Carboplatin associated thrombotic microangiopathic hemolytic anemia*, "Cancer", **64** (5), 1989, 1017-1020.
37. Zamble, D. B., Lippard, S. J., *The response of cellular proteins to cisplatin-damaged DNA*, in *Cisplatin Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug* (Lippert, B., ed.), 73-110. VHCA, Wiley-VCH, Zurich, 1999.

### List of the figures

- Fig. 1. *Homogeneous tendency of the thymic lobules, thymocytolysis and packing phenomena especially in the cortical areas.*
- Fig. 2. *Thymic atrophy correlated with an obvious homogeneity of the lobules and thickening of the perilobular capsule.*
- Fig. 3. *Congestion of the intralobular vessels and zonal microhaemorrhages.*
- Fig. 4. *Structural recovery of the thymic lobules with moderate packing phenomena and thymocytolysis.*
- Fig. 5. *Thymocytes with modified nuclei and condensed chromatin and a few apoptotic bodies in the medulla of the thymic lobules.*
- Fig. 6. *Intralobular collagen proliferation, cortical hyperchromatosis and swelling of the mitochondria of the thymocytes.*
- Fig. 7. *Intracytoplasmic vacuolisation and nuclear modifications of the epithelio-reticular cells.*
- Fig. 8. *Ultrastructural modifications of the epithelio-reticular cells and thymocytes, rare apoptotic bodies and an eosinophilic infiltrate in the cortex of the thymic lobules.*
- Fig. 9. *Macrophage with an intense phagocytic activity in thymus.*
- Fig. 10. *Severe depletion and agglutination of the thymocytes in the cortex of the thymic lobules.*
- Fig. 11. *Homogeneous tendency of the thymic lobules.*
- Fig. 12. *Intralobular haemorrhages in the thymus.*
- Fig. 13. *Atrophied thymic lobule having a vestigial aspect.*
- Fig. 14. *Zonal intralobular haemorrhages in the thymus.*
- Fig. 15. *Stasis, congestion, and diffuse intravascular coagulation phenomena in the cortex of the thymic lobule.*
- Fig. 16. *Thymocytes with nuclear modifications and vacuolisation of their cytoplasm, in the cortex of the thymic lobules.*
- Fig. 17. *Obvious fibrosis tendency of the thymus – massive collagen proliferation.*
- Fig. 18. *Mastocytes nearby the vessels in the thymus, vessels with thickened walls, and collagen proliferation.*
- Fig. 19. *Depletion of the thymocytes, and apoptotic bodies in the cortex of a thymic lobule.*
- Fig. 20. *Mitochondrial modifications and vacuolisation of the cytoplasm of the epithelio-reticular cells in the thymus.*

THYMIC TOXICITY OF CARBOPLATIN AND CISPLATIN

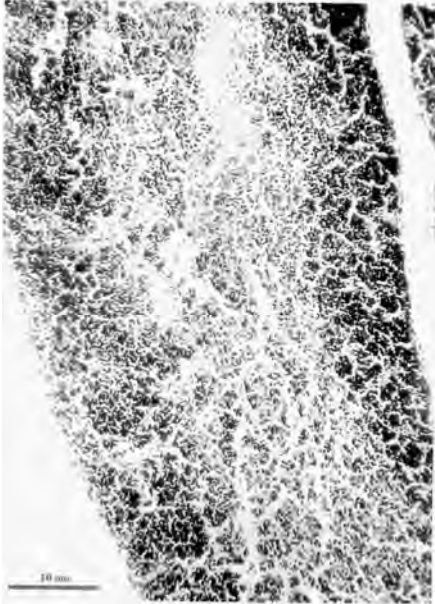


Fig. 1



Fig. 2

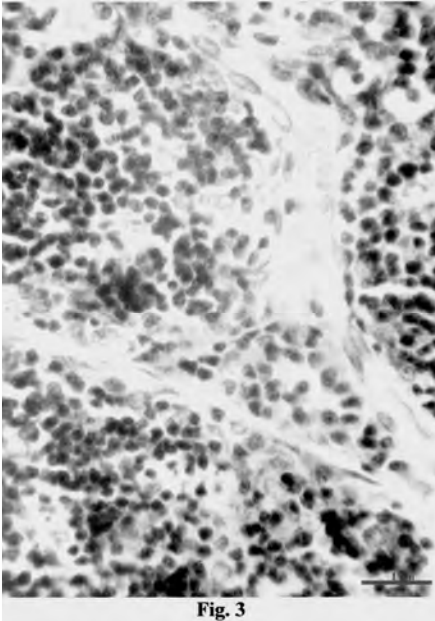
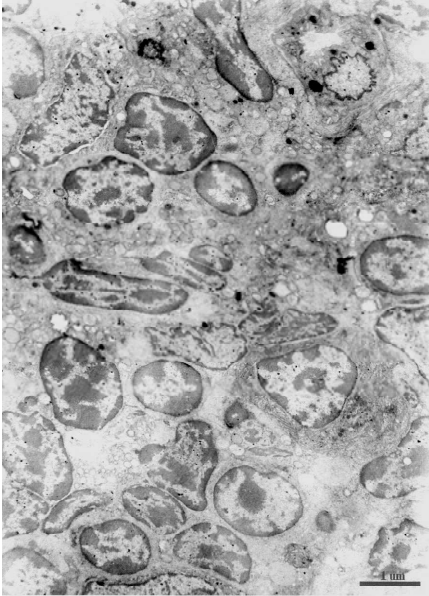


Fig. 3



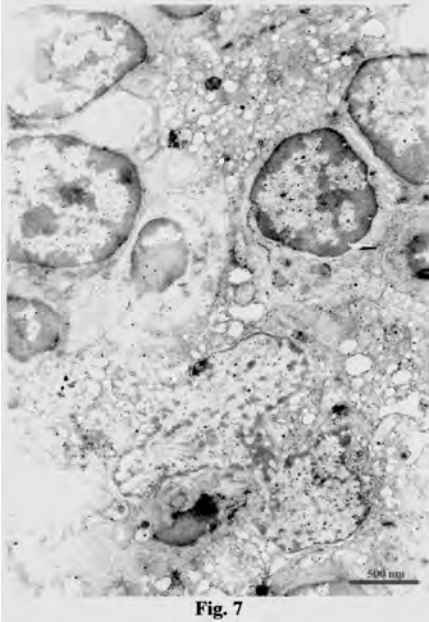
Fig. 4



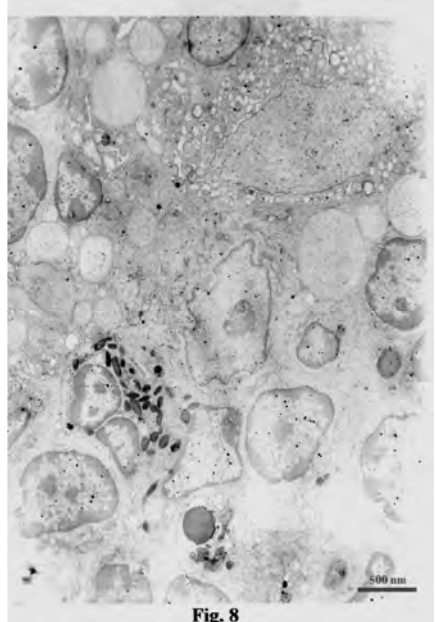
**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Fig. 7**



**Fig. 8**

THYMIC TOXICITY OF CARBOPLATIN AND CISPLATIN

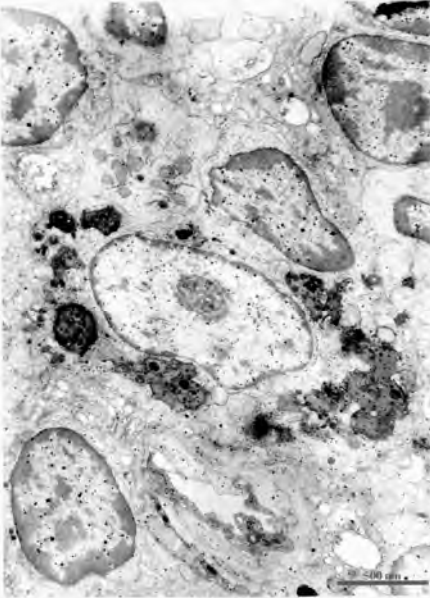


Fig. 9

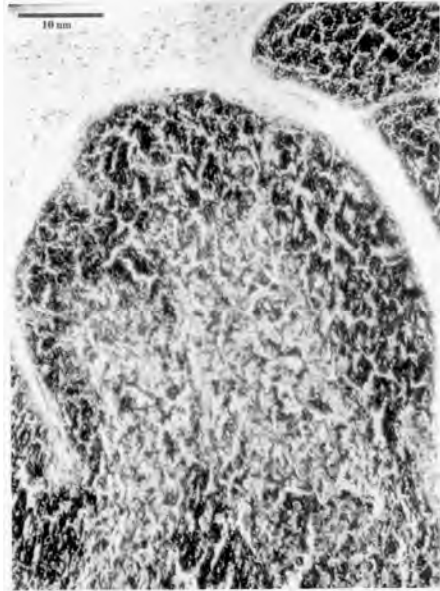


Fig. 10

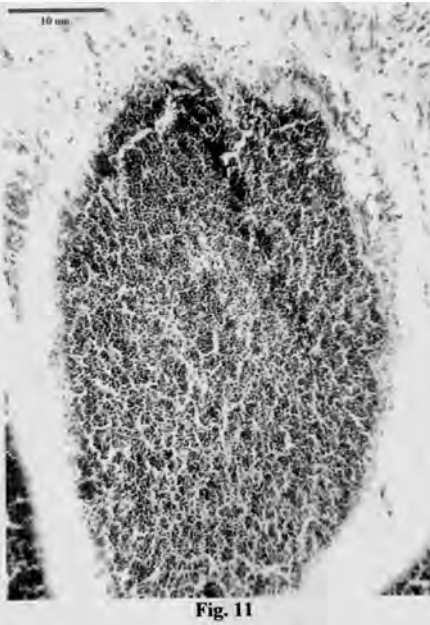


Fig. 11

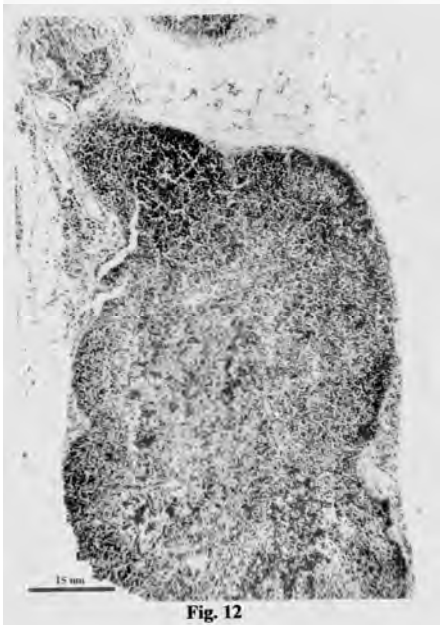


Fig. 12

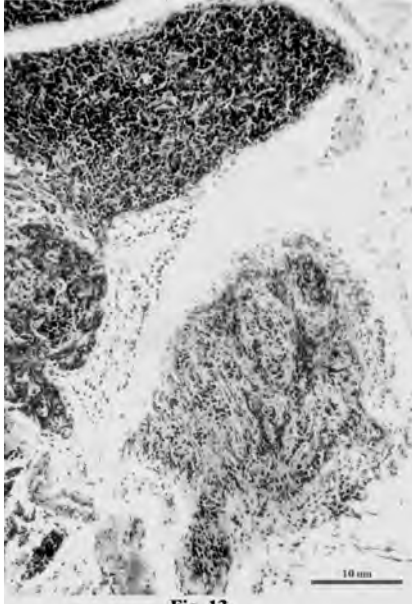


Fig. 13

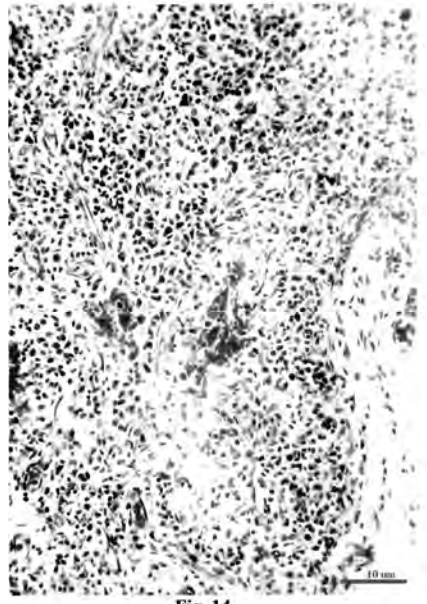


Fig. 14

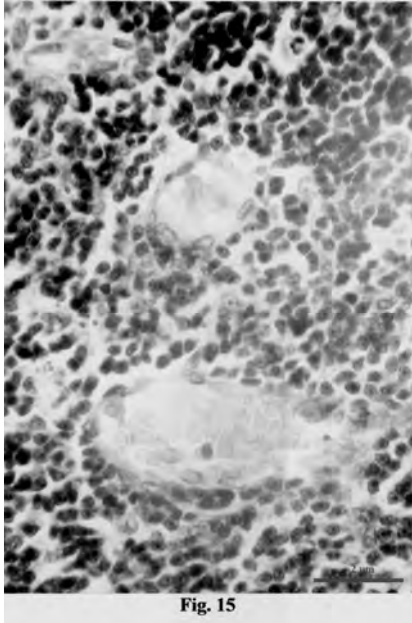


Fig. 15

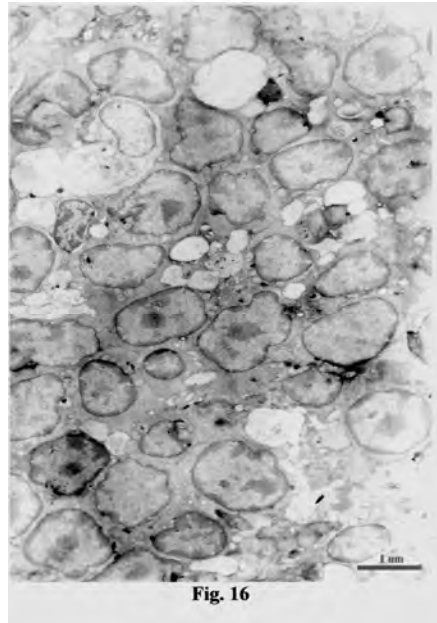


Fig. 16

THYMIC TOXICITY OF CARBOPLATIN AND CISPLATIN

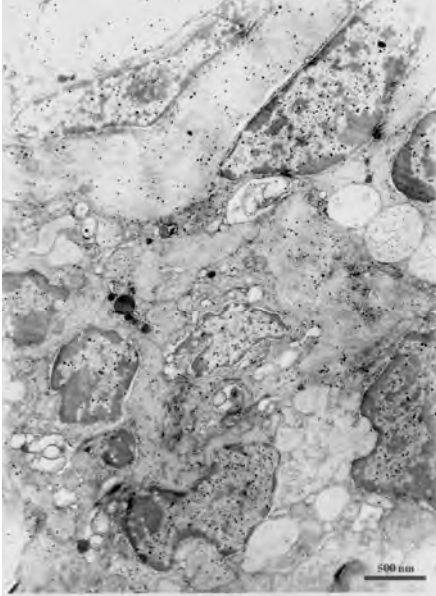


Fig. 17

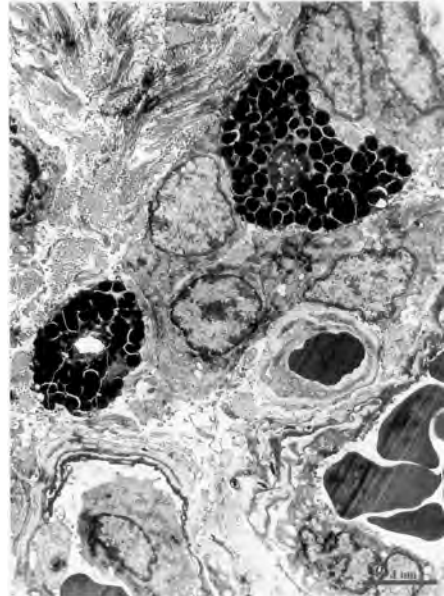


Fig. 18

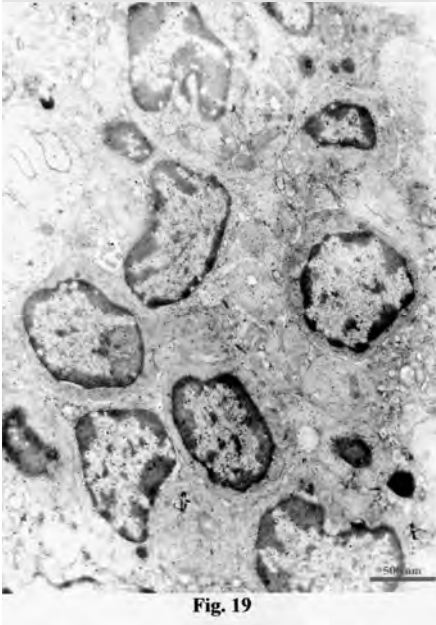


Fig. 19

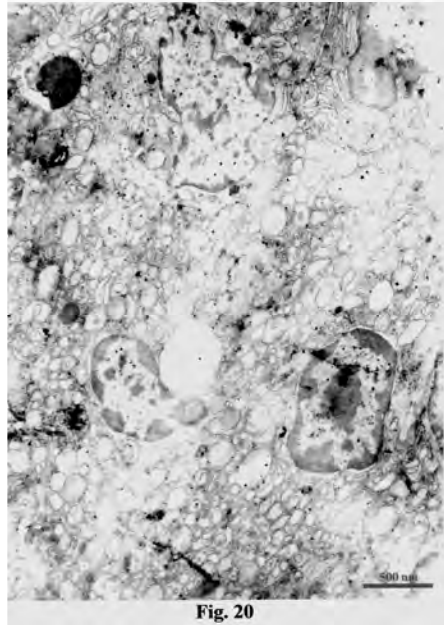


Fig. 20

## STRUCTURAL AND ULTRASTRUCTURAL ASPECTS OF THE NEPHROTOXICITY AND CARDIOTOXICITY OF CARBOPLATIN (PARAPLATIN) IN WHITE WISTAR RATS

**VICTORIA-DOINA SANDU\*, CRISTINA PAȘCA\*  
and MARIA GORDAN\*\***

**SUMMARY.** – Carboplatin, administered intravenously in a single therapeutic dose of 65 mg/kg body weight, induces significant but reversible structural and ultrastructural alterations both at the level of the rat kidney and myocardium. All the modifications induced by this anticancer drug seem to be due to the grave circulatory disturbances (stasis, congestion, microhaemorrhages, diffuse intravascular coagulation, oedemas) and the thrombocytopenia, factors that induce and aggravate the alteration of the cellular components of the kidney and myocardium. The cardiotoxicity seemed to be graver, and consisted of granular myocarditis correlated with myolysis microfoci, congestion, oedemas, haemorrhages and an obvious collagenous proliferation with a zonal character, myocyte swelling, disorganisation of their ultrastructure, especially at the periphery (lysis of the sarcolemma and myofibrils, breaking of the Z-lines, increasing of the interfibrillar spaces, nuclear modifications, swelling and degeneration of the mitochondria). The nephrotoxicity was less severe and consisted of an oedema of the Bowman' space correlated with the appearance of a polymorphous granular material inside it, glomerular and interstitial stasis and diffuse intravascular coagulation phenomena; the uriniferous tubules appeared dilatated, with necrosis processes of the epithelial cells, and full of a hyaline material. Ultrastructurally, Carboplatin induced grave nuclear alterations (peculiar shape or an obvious pycnosis tendency), a complete vacuolisation of the apical cytoplasm, intracellular lysis, while the mitochondria were swollen and had a rarefied matrix. Many epithelial cells in the uriniferous tubules had a seriously affected brush border, the microvilli being swollen and destroyed here and there, and the basal infoldings appeared hypertrophied.

Carboplatin (Paraplatin) is an alkylating agent belonging to the family of platinum-containing products, widely used in the chemotherapy of many types of malignant diseases in humans including: small cell and non small cell lung cancer, ovarian, testicular, head, neck, bladder cancer etc. The primary cellular target of Carboplatin is DNA. The linkers which result inside or between the two DNA strands, following interaction with Carboplatin, mainly account for its antitumoural action [3, 9, 16]. However, the administration of Carboplatin frequently results in clinically important toxicities, including kidney, bone marrow and heart toxicity, that pose certain risks and adversely affect the quality of life of the patients. Nowadays, the investigations try to safely increase the total dose

---

\* Babeș-Bolyai University, Department of Experimental Biology, 400006 Cluj-Napoca, Romania.

E-mail: cpasca@biolog.ubbcluj.ro

\*\* "Gheorghe Șincai" Highschool, 450051 Zalău, Romania

or the dose frequency of this platinum drug which would lead to an increase in tumour response rates and could result in a substantial patient benefit. According to the previous studies, high doses of Carboplatin determine some histological and ultrastructural modifications of the kidney and cardiac tissue, which, unfortunately, are incompletely known. Therefore, our studies intended to reveal the effect of a single therapeutic dose of 65 mg Carboplatin/kg body weight administered intravenously on the rat kidney and myocardium.

**Materials and methods.** Our experiments were carried out with the following five groups of healthy adult male Wistar rats, pathogen/free, weighing  $190 \pm 10$  g, fed with a standard diet and maintained under conventional (standard) bioclimatic laboratory conditions, starved for 18 hours before the treatment, but having water *ad libitum*:

-group U – untreated (control) group;

-group C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> treated intravenously with a single dose of 65 mg Carboplatin/kg body weight (LD50), and sacrificed 24 hours, 4, 11 and 18 days after the treatment.

Having sacrificed the animals, we took fragments from the kidney and left ventricle's myocardium. For microscopic examination, the fragments were fixed in 10% neutral formol, processed by the paraffin technique and the sections of 6  $\mu$ m were stained by the hematoxylin-eosin, Masson-Goldner trichrome and PAS method [17]. For ultrastructural investigations, fragments of myocardium were prefixed in 2.7% glutaraldehyde solution and postfixed in 2% osmic acid solution. The fragments were dehydrated in acetone and then embedded in Vestopal W. The ultrathin sections were obtained using an LKB III ultramicrotome and were contrasted with uranyl acetate. Examination of the sections was performed in a transmission electron microscope Jeol JEM 1010 [1, 13, 18].

On the stained and contrasted sections we studied, by light and electron microscopic examinations, the histological and ultrastructural modifications induced by this drug at the level of kidney and myocardium in the left ventricle, in concordance with the moment of the sacrifice.

**Results and discussion.** The microscopic and electronmicroscopic investigations of the kidney and myocardium sections obtained from the rats treated with this cytostatic showed the appearance of certain histological and ultrastructural modifications, the intensity, gravity and extension of which were different, depending on the organ and the moment of the sacrifice.

Thus, according to the nephrotoxic effect, some discrete changes already could be noticed by light microscopy investigations 24 hours after the treatment, both in the cortex and medulla of the kidney, but they had just a zonal character. In some



renal corpuscles a PAS-negative polymorphous granular material appeared, demonstrating a slight alteration of the ultrafiltration of the plasma with the appearance of the proteins in urine. In some renal tubules, especially in the proximal convoluted tubules in the cortex, incipient necrosis processes of the tubular cells appeared and, in addition, a PAS-negative hyaline granular material was also evident (Fig. 1)

Three days later, in group C<sub>2</sub>, it could be observed that the granular material in the Bowman's space had increased slightly, the amount of this material not being very significant. Besides, an obvious glomerular and interstitial stasis correlated with diffuse intravascular coagulation phenomena appeared (Fig. 2). Such phenomena of diffuse intravascular coagulation appeared in the capillaries in the medulla, too (Fig. 3). Big PAS-positive hyaline thrombi could be seen especially in the tubules between the cortex and medulla.

After 11 days from the treatment, the intravascular coagulation phenomena had disappeared, but it could be noticed a mesangial oedema and, in some areas, a mesangial hypercellularity correlated with some necrobiosis processes at the level of endothelial and mesangial cells. Most of the renal corpuscles appeared lobated and a few of them were atrophied (Fig. 4). The areas occupied by affected renal tubules were not significantly larger than in the group sacrificed after 4 days from the treatment, but some tubules were a little dilated, as a consequence of the urinary stasis, and the epithelium of these tubules was more affected.

Seven days later, in group C<sub>4</sub>, it could be observed a significant sclerosis process which affected many glomeruli correlated with an alteration of their contour, with the appearance of some interstitial lymphocyte infiltrations, with sclerosis at the level of the arterioles and interstitial nephritis. The cylindrical thrombi inside the renal tubules appeared hyaline, some of them including the tubular epithelium which detached from the basal membrane as a consequence of the necrosis processes of these epithelial cells (Fig. 5). The PAS reaction showed the presence of a PAS-positive material inside the mesangium, the glomerules appearing retracted and lobated. The Bowman's capsule was irregutate, thickened with a PAS-positive material, and, in many renal corpuscles, it had a "double outline" aspect.

The electron microscopy investigations of the kidney demonstrated the presence of some ultrastructural modifications which appeared immediately – 24 hours from the treatment – got worse during the next 10 days, and then decreased. They consisted in the appearance at the level of the nephrocytes in the proximal convoluted tubules of grave alterations of the nucleus, organelles, cytoplasm and cellular membrane. Thus, the nucleus got a peculiar shape or an irregular contour, or had an obvious pycnosis tendency, or its chromatin appeared condensed to the periphery. Some cells appeared vacuolised in their upper cytoplasm, contained many vesicles and large areas of

intracellular lysis. The number of lysosomes decreased, and the mitochondria were swollen and had a rarefied matrix. Simultaneously, many epithelial cells in the uriniferous tubules had a seriously affected brush border, the microvilli being swollen and destroyed here and there (the cellular components being discharged into the lumen of the renal tubules, where it contributed to the formation of the thrombi), while the basal infoldings appeared hypertrophied (Fig. 6-10)

Our investigations demonstrate that Carboplatin has a nephrotoxic effect, affecting both the structures involved in the ultrafiltration process (arterioles, capillaries of the glomerules, mesangium, Bowman's capsule) and the epithelium of the uriniferous tubules which has important absorptive and secretory functions. Our results bring new informations according the nephrotoxicity of this drug, incompletely known. The previous investigations are completely insufficient and sustain that Carboplatin has just a minimal toxic effect on the kidney, when it is administered in low doses, while high doses induce a glomerular and tubular toxicity, which could affect the structure and function of this vital organ [2, 5, 6, 8, 11, 15, 19].

Concerning the cardiotoxic effect, by light microscopy it could be seen that Carboplatin, in our experimental conditions, determined certain histological modifications which already appeared 24 hours after the treatment. They consisted of a slight congestion and a diffuse oedema which was not correlated with the presence of a cellular infiltrate. Many myocytes had nuclear modifications consisting of: hypertrophy, an increased number of nucleoli and a peculiar arrangement of chromatin in groups. A few nuclei were round shaped and very intensely stained, all these aspects being very well pointed out on the sections stained with hematoxylin-eosin, and the oedema was obvious on the sections stained with Masson-Goldner dye.

All the modifications got worse progressively, so that 4 days after the treatment the stasis, congestion, oedema were more serious and, in addition, many interfascicular haemorrhages appeared. Groups of myocytes were affected by anisocaryocytosis and anisochromy processes (Fig. 11).

The circulatory disturbances correlated with a significant perivascular and interfascicular oedema persisted in the group sacrificed 11 days after the treatment (Fig. 12). Here and there, microfocuses of myolysis could be noticed. A small number of myocytes were affected by a granulo-hyaline dystrophy.

The electron microscopy investigations showed that Carboplatin induced certain ultrastructural alterations consisting of the appearance of a serious modification of the vascular and sarcolemmal permeability correlated with a modified flux of electrolytes and water, leading to cell swelling, disorganisation of the cell ultrastructure, especially at the periphery of the myocytes, lysis of the sarcolemma and myofibrils (Fig. 13), breaking of the Z-lines, increasing of the interfascicular spaces, swelling and degeneration

of the mitochondria (whose cristae appeared destroyed and whose matrix was rarefied) (Fig. 14), and swelling of the nucleus (Fig. 15). The massive oedema between the myofibrils determined a myocyte disorganisation. In the areas with an advanced lysis process, an obvious collagenous proliferation appeared (Fig. 16). The granular myocardosis persisted, too.

At the end of the 18 days of the experiment, the granular myocardosis correlated with myolysis microfocuses, congestion, stasis, oedema and haemorrhages had just a zonal character and were very discreet, an obvious recovery process of the myocardium being noticed.

The histological and ultrastructural aspects confirm the cardiotoxic effect of this anticancer drug, which, according to the previous studies, appears after high doses of Carboplatin or after a long chemotherapy and consists of the appearance of certain histological modifications: congestion, stasis and haemorrhages at the level of the capillaries, very grave microvascular disturbances and a slight hypertrophy of the myocardium mass [10, 20, 21]. In case of severe Carboplatin treatment, muscle cells are irreversibly damaged, the sarcolemmal permeability being seriously affected. The functional consequences of the altered sarcolemmal permeability involve a modified flux of electrolytes and water, leading to cell swelling and increased transport of  $\text{Ca}^{2+}$  from the extracellular space to the cardiac muscle cell [6]. Besides, dilatation of the tubules of the sarcoplasmic reticulum, increased numbers of irregularly shaped lysosomes containing heterogenous deposits of electron-dense material, dehiscence of intercalated discs, mitochondria with destroyed cristae, and intramitochondrial amorphous inclusion bodies were observed [4, 12, 14]. Thus, a myocardial  $\text{Ca}^{2+}$  overload developed and the ultrastructural modifications of the myocytes were correlated with certain devastating effects on the cardiac cell functions.

The histological and ultrastructural modifications noticed by us demonstrated that Carboplatin, administered intravenously in a single therapeutic dose of 65 mg/kg body weight, had a significant cardiotoxic effect, which already appeared 24 hours after the treatment, aggravated progressively, but after 11 days started decreasing; at the end of the 18 days of our experiment an obvious recovery tendency was noticed, all the modifications having a zonal character and affected especially isolated myocytes and only a small number of groups of myocardial cells.

**Conclusions.** 1. A single therapeutic dose of 65 mg Carboplatin/kg body weight has a moderate toxic effect especially on the rat myocardium and a less severe nephrotoxicity consisting of the appearance of certain histological and ultrastructural modifications.

2. All the modifications induced by this anticancer drug seem to be due to the grave circulatory disturbances (stasis, congestion, microhaemorrhages, diffuse intravascular coagulation, oedemas) and the thrombocytopenia; these two factors induce and aggravate the alteration of the cellular components of the kidney and myocardium.

3. The ultrastructural modifications induced by Carboplatin in the kidney and myocardium consist of cell swelling, disorganization of the whole cell ultrastructure which interests the cellular membrane, cytoplasm with some cellular organelles (especially mitochondria and lisosomes), nuclei and nucleoli.

4. Generally, the structural and ultrastructural alterations induced by Carboplatin both at the level of the myocardium and kidney have a zonal and reversible character, at the end of the experiment a natural recovery process, with no protective or regenerative drugs being possible.

## REFERENCES

1. Brenda, S. W., *A Beginner's Handbook in Biological Transmission Electron Microscopy*, Butler & Tanner, London, 1981.
2. Brock, N., Pohl, J., Stekar, J., *Detoxification of urotoxic oxazaphosphorines by sulfhydryl compounds*, "J.Cancer Res. Clin. Oncol.", **10**, 1981, 311-320.
3. Calvert, A. H., *Dose Optimization of carboplatin in adults*, "Anticancer Res." **14**, 1994, 2273-2278.
4. Dietrich, W. S., *The ultrastructure of cardiac muscle in health and disease*, "Micron" **24** (1), 1993, 47-73.
5. Etienne, M. C., Leger, F., Pivot, X., Chatelut, E., Bensadoun, R. J., Guardiola, E., Renee, N., Magne, N., Canal, P., Milano, G., *Pharmacokinetics of low-dose carboplatin and applicability of a method of calculation for estimating individual drug clearance*, "Ann. Oncol." **4**(4), 2003, 643-647.
6. Ettinger, L. J., Krailo, M. D., Gaynon, P. S., Hammond, G. D., *A phase I study of carboplatin in children with acute leukemia in bone marrow relapse. A report from the children's cancer group*, "Cancer", **72**, 1993, 917-922.
7. Fleckenstein, A., Janke, J., Doring, H. J., Pachinger, O., *Calcium overload as the determinant factor in the production of catecholamine-induced myocardial lesions*, "Cardiomyopathies", **2**, 1973, 455-466.
8. Frenkel, J., Kool, G., Kraker, J., *Acute renal failure in high dose carboplatin chemotherapy*, "Med. Pediatr. Oncol.", **25**, 1995, 473-477.

9. Grigg, A., Szer, J., Skov, K., Barnett, M., *Multi-organ dysfunction associated with high-dose carboplatin therapy prior to autologous transplantation*, "Bone Marrow Transplantation.", **17**, 1996, 67-74.
10. Hruban, R. H., Sternberg, S. S., Meyers, P., Fleisher, M., Menendez - Botet, C., Boitnott, J. K., *Fatal thrombocytopenia and liver failure associated with carboplatin therapy*, "Cancer Invest.", **9**(3), 1991, 263-268.
11. Husain, K., Jagannathan, R., Zeshan, H., Trammel, G. L., Rybak, L. P., Hazelrigg, S. R., Somani, S. M., *Dose Response of Carboplatin-induced nephrotoxicity in rats*, "Pharmacol. & Toxicol.", **91**, 2002, 83-89.
12. Katz, A. M., Freston, J. W., Messineo, F. C., Herbette, L. G., *Membrane damage and the pathogenesis of cardiomyopathies*, "J. Molec. Cell. Cardiol.", **17**, 1985, 11-20.
13. Kay, D., *Techniques for Electron Microscopy*, Alden & Mowbray, Oxford, 1967.
14. Kino, M., *Chronic effects of some drugs under partial inhibition of catalase activity in the rat heart: light and electron microscopic observation*, "J. Molec. Cell. Cardiol.", **13**, 1981, 5-21.
15. Knox, R. J., Friedlos, F., Lydall, D. A., Roberts, J. J., *Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum (II) and cis-diammine- (1, 1-cyclobutanedicarboxylato)platinum (II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA*, "Cancer Res.", **46**, 1979, 1972-1979.
16. Millward, M. J., Webster, L. K., Toner, G. C., Bishop, J. F., Rischin, D., Stokes, K. H., Johnston, V. K., Hicks, R., *Carboplatin dosing based on measurement of renal function – experience at the Peter MacCallum Cancer Institute*, "Cancer Res." **26**, 1996, 372-379.
17. Mureșan, E., Găboreanu, M., Bogdan, A. T., Băbă, A. I., *Tehnici de histologie normală și patologică*, Ed. Ceres, București, 1974.
18. Ploaie, P. G., Petre, Z., *Introducere în microscopia electronică cu aplicații la biologia celulară și moleculară*, Ed. Acad. R.S.R., București, 1979.
19. Sakai, T., Yoshikawa, K., Nosaka, S., Takenoshita, M., *A case report of cardiac failure caused by the new anti-neoplastic agent, carboplatin*, "Masui", **42** (5), 1993, 756-760.
19. Skretkiewicz, J., Sekulska, M., Danielwicz, M., WagrowskaDanielwicz, M., Polakowski, P., *Effect of some anticancer drugs and combined chemotherapy on renal toxicity*, "Biol. Signals", **5** (1), 1996, 51-58.
20. Villalona-Calero, M. A., Eder, J. P., Toppmeyer, D. L., Allen, L. F., Fram, R., Velagapudi, R., Myers, M., Amato, A., Kagen-Hallet, K., Razvillas, B., Kufe, D. W., VonHoff, D. D., Rowinsky E. K., *Phase I and Pharmacokinetic Study of LU79553, a DNA Intercalating Bisnaphthalimide, in Patients With Solid Malignancies*, "J. Clin. Oncol.", **19** (3), 2001, 857-869.
21. Walker, R. W., Rosenblum, M. K., Kempin, S. J., Christian, M. C., *Carboplatin associated thrombotic microangiopathic hemolytic anemia*, "Cancer", **64** (5), 1989, 1017-1020.

### **List of the figures**

- Fig. 1. *Granular material inside the proximal convoluted tubules.*
- Fig. 2. *Glomerular stasis correlated with diffuse intravascular coagulation phenomena.*
- Fig. 3. *Phenomena of diffuse intravascular coagulation in capillaries in the medulla.*
- Fig. 4. *Two lobated renal corpuscles and one atrophied corpuscle in the cortex.*
- Fig. 5. *Big hyaline thrombus which includes the tubular epithelium.*
- Fig. 6. *Congestion in the renal capillaries, serious swelling of the mitochondria and disorganisation of their matrix and cristae.*
- Fig. 7. *Vacuolisation of the cytoplasm of the epithelial cells in the uriniferous tubules, swelling and disorganisation of the mitochondrial and nuclear structure.*
- Fig. 8. *Serious necrosis process of the epithelial cells in the renal tubules between the cortex and medulla and a hypertrophied aspect of the cell basal infoldings.*
- Fig. 9. *Basal infoldings of some tubular cells appear significantly swollen.*
- Fig. 10. *Swollen microvilli of the tubular cells in the proximal convoluted tubules.*
- Fig. 11. *Haemorrhages, oedemas and myolysis in the rat myocardium.*
- Fig. 12. *Significant interfascicular oedemas and stasis in the myocardial capillaries.*
- Fig. 13. *Congestion, lysis of the sarcolemma and myofibrils, especially in the periphery of the myocytes, and interfascicular oedema.*
- Fig. 14. *Severe disorganisation of the myocytes, breaking of the Z-lines, swelling of the myocytes and mitochondria.*
- Fig. 15. *Swelling of the nucleus and mitochondria in the myocytes and a peculiar arrangement of the nuclear chromatin.*
- Fig. 16. *Obvious disorganisation of the myocytes at the periphery and a collagenous proliferation in the areas with an advanced lysis process.*

NEPHROTOXICITY AND CARDIOTOXICITY OF CARBOPLATIN

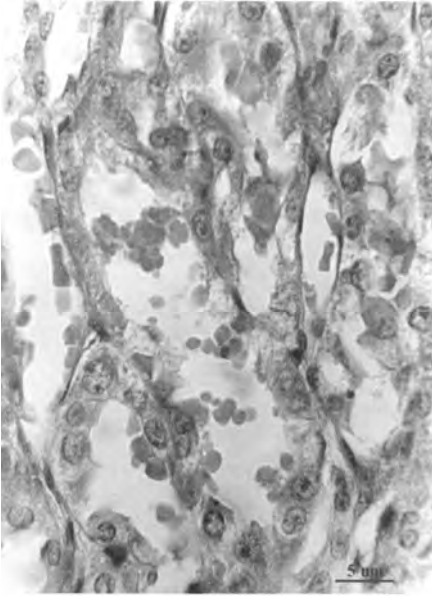


Fig. 1

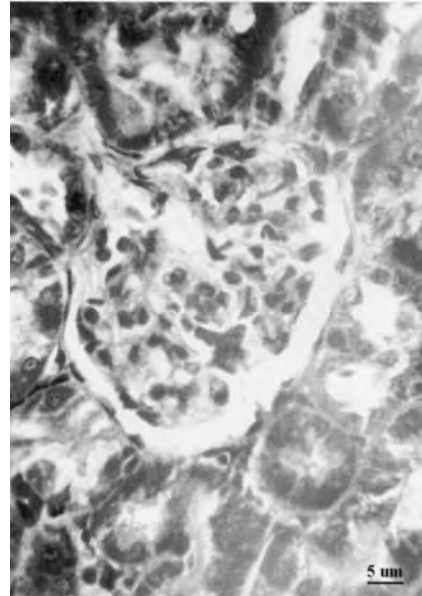


Fig. 2

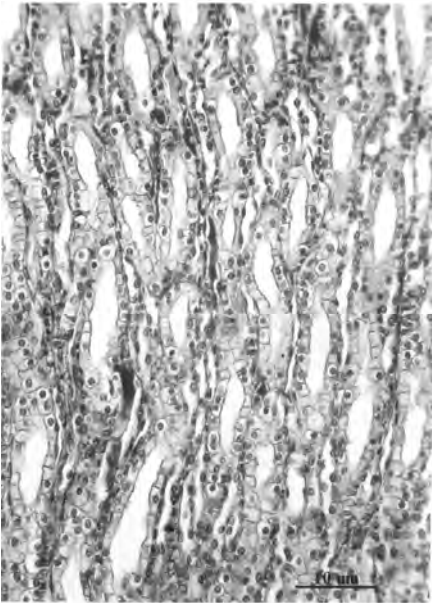


Fig. 3

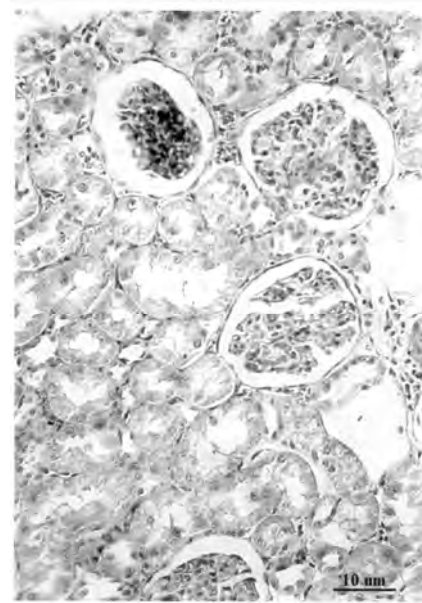


Fig. 4

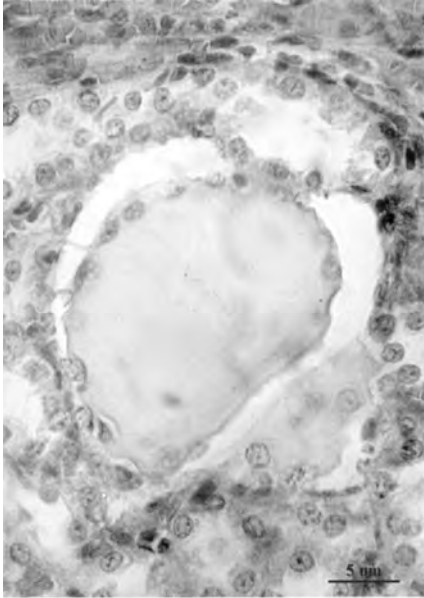


Fig. 5

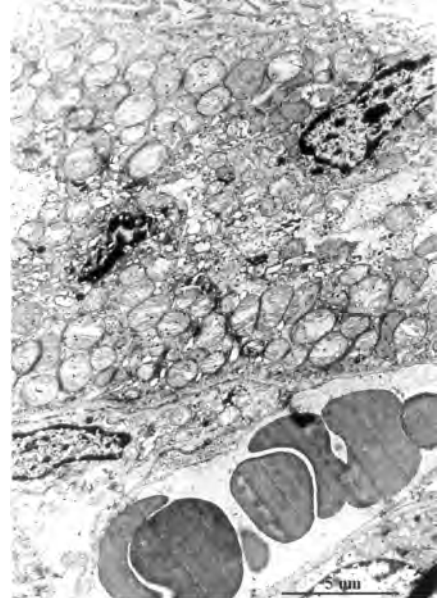


Fig. 6

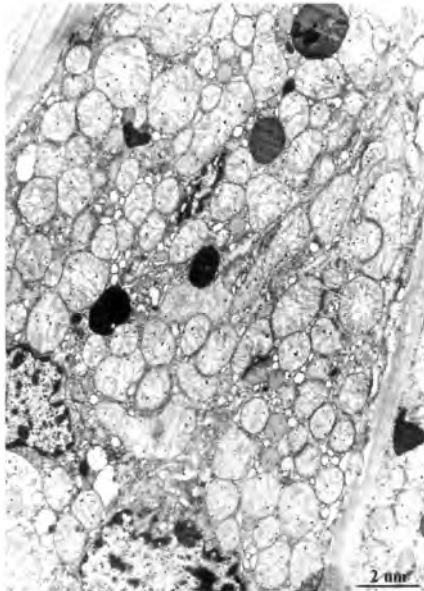


Fig. 7

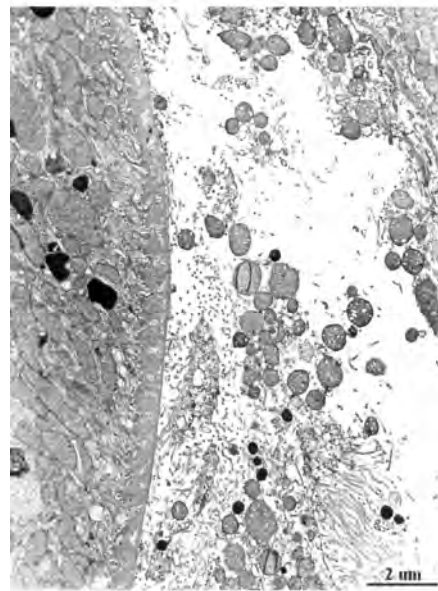


Fig. 8



NEPHROTOXICITY AND CARDIOTOXICITY OF CARBOPLATIN

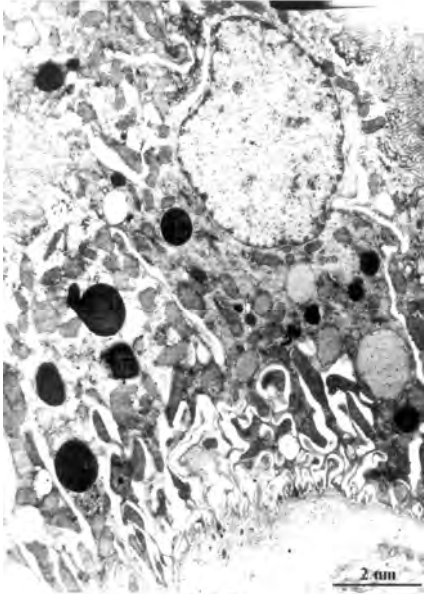


Fig. 9

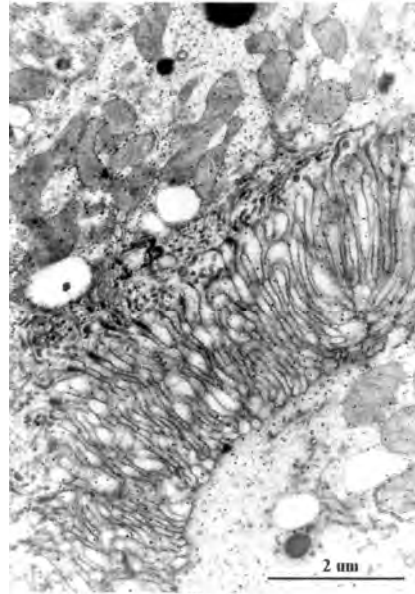


Fig. 10

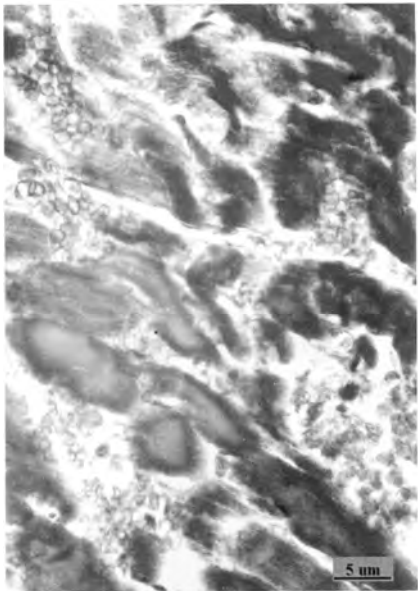


Fig. 11

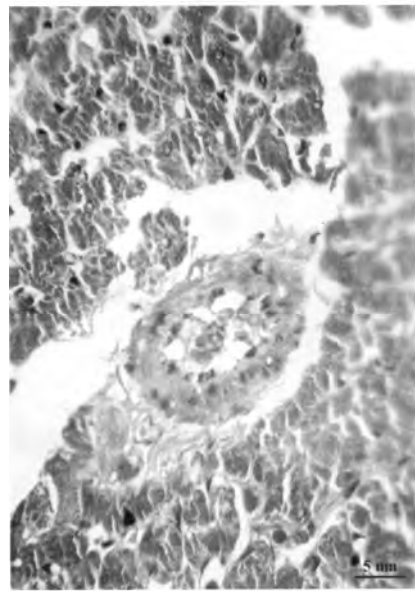


Fig. 12

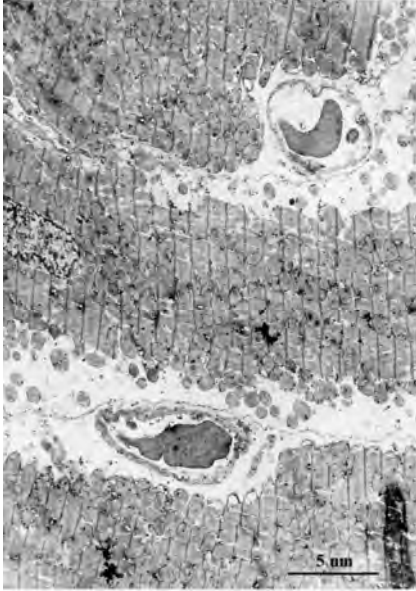


Fig. 13

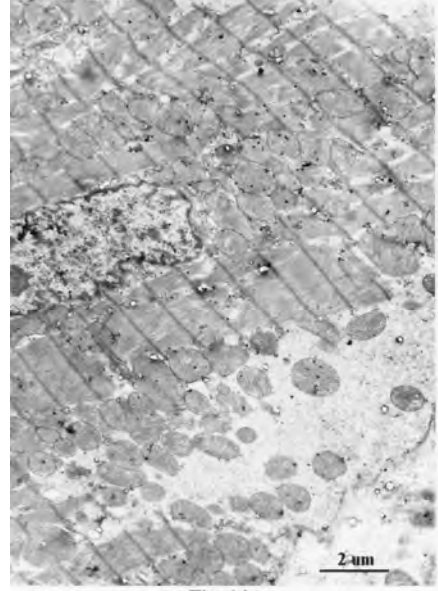


Fig. 14

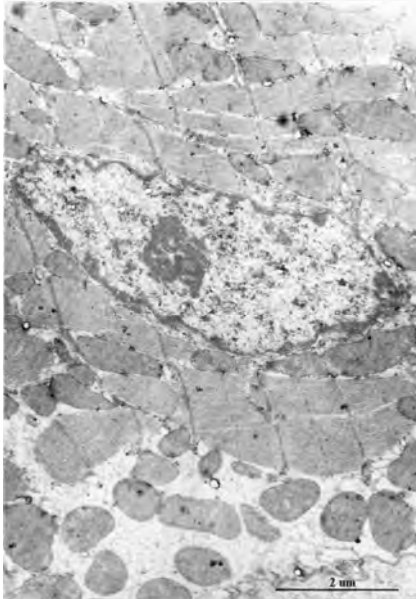


Fig. 15

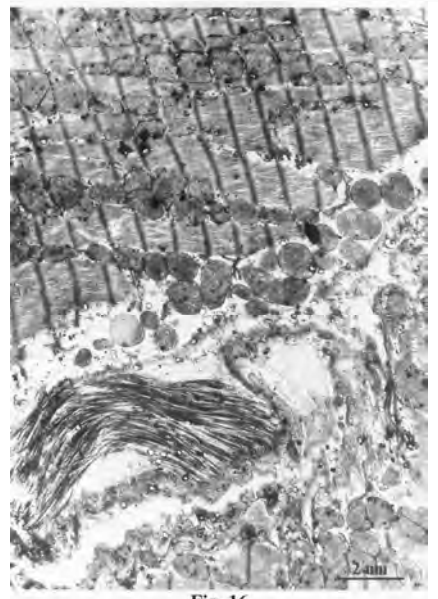


Fig. 16

MODIFICĂRI STRUCTURALE ȘI ULTRASTRUCTURALE PRODUSE  
ÎN GLANDELE SUPRARENALE DUPĂ ADMINISTRAREA  
EXPERIMENTALĂ A VENINULUI DE ALBINE (*Apis mellifera* L.)  
I. GLANDELE CORTICOSUPRARENALE

ADRIAN FLOREA \*, CONSTANTIN CRĂCIUN \*\*  
și CONSTANTIN PUICĂ \*\*\*

**SUMMARY.** – **Structural and Ultrastructural Changes Produced in Adrenal Glands Consequently to the Honey Bee Venom Experimental Administration. I. The Adrenal Cortex.** We have previously reported significant changes produced in different tissues including hypothalamus after the honey bee (*Apis mellifera* L.) venom subchronic treatments. In this study we investigated the histological and ultrastructural aspects of the adrenal cortex after the venom administration in the same conditions. The histological results indicate an important impairment of the gland, particularly of zona fasciculata, associated with hyperemia, zonal necrosis, and a general disturbance of cells pattern, aspect and their sizes. A wide range of alterations, from small morphological changes to cell lysis, also occur in the fine ultrastructure of the secretory cells. However, the main features of these cells are the decreased number of the secretory vesicles and their heterogenous aspect. The general aspect is characteristic for the prolonged stress conditions and indicates a sustained activity of hormone secretion. Most of the capillaries are dilated and endothelial cells damaged. These findings provide evidence that the enhancement of secretory activity in hypothalamus, induced by the bee venom, is reflected upon the structure and physiology of the adrenal cortex, but also a direct action of the venom molecules on this gland is obvious.

Rezultatele noastre publicate anterior relevă că administrarea subcronică a veninului de albine este urmată de modificări morfo-fiziologice semnificative în diferite țesuturi [11, 12, 14], mergând, în unele cazuri, până la apariția zonelor de necroză celulară. Una din principalele modalități prin care organismul răspunde la diferitele condiții de stres o constituie sinteza și eliberarea hormonilor steroizi din glandele corticosuprarenale, în special a glucocorticoizilor. Pe acest efect se fundamentează utilizarea cu succes a veninului de albine în terapie [20], ca alternativă la produșii hormonali de sinteză. Datele din literatură [3, 7], precum și unele dintre rezultatele noastre anterioare, au evidențiat faptul că excitarea sistemului limbic (hipocamp, nucleii amigdalieni, hipotalamus), ca urmare a administrării de xenobiotice, determină un efect de stimulare al centrilor hipotalamici, la nivelul cărora are loc sinteza și secreția factorilor de eliberare a hormonilor hipofizari. Sub

---

\*Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", Facultatea de Medicină, Catedra de Biologie Celulară și Moleculară, 400349 Cluj-Napoca, România. E-mail: aflorea@personal.ro

\*\*Universitatea "Babeș-Bolyai", Facultatea de Biologie și Geologie, Centrul de Microscopie Electronică, 400006 Cluj-Napoca, România

\*\*\*Institutul de Cercetări Biologice, 400015 Cluj-Napoca, România

efectul numeroșilor constituenți ai veninului de albine, în special a apaminei [17, 33], intensificarea activității secretorii înregistrate la nivelul nucleilor paraventriculari hipotalamici [15] cu eliberarea masivă a corticoliberinei, implică inevitabil reacții ale întregii axe neuroendocrine – modificări în adenohipofiză (biosinteza și secreția ACTH-ului – date în curs de publicare) și în glandele corticosuprenale (CSR). Astfel, scopul acestui studiu a fost acela de a urmări reacțiile histologice și ultrastructurale ale CSR în condițiile administrării subcronice a veninului de albine, iar pe baza lor să apreciem nivelul activității secretorii a acestor glande în condițiile experimentale stabilite. De asemenea, am urmărit stabilirea eventualelor corelări cu datele obținute de noi în cazul hipotalamusului, în aceleași condiții de lucru.

**Materiale și metode.** *Animale.* Experimentele s-au realizat în două etape pe 4 loturi de șobolani albi Wistar (în total 26 animale), crescuți în condiții standard, fără restricții în ce privește hrana, apa, sau mișcarea.

*Veninul de albine.* Am utilizat venin de albine pur cristalizat, recoltat de noi prin metoda stimulării albinelor cu impulsuri electrice [16, 29]. În vederea injectării veninul a fost resuspendat într-o soluție izotonă (150 mM NaCl, 5,5 mM glucoză, 5 mM HEPES, la pH 7,4) și păstrat la frigider, ferit de acțiunea luminii. Soluția injectabilă s-a preparat în 3 etape, de fiecare dată doar pentru câte 10 zile, pentru a preveni alterarea veninului.

*Tratament.* Animalele din două loturi – TS1 și TS2 (6, respectiv 12 animale), au fost tratate subcronic, timp de 30 de zile cu o doză zilnică, echivalentă unei înțepături de albină (700 μg venin de albine/kg corp/zi). Injectarea veninului de albine s-a făcut subcutan, în zona dorso-laterală posterioară. La sacrificarea animalelor la sfârșitul perioadei de tratament am recoltat glandele suprarenale și s-a realizat prelucrarea lor corespunzător tehnicilor histologice (pentru primul lot) microscopiei electronice de transmisie (animalele din celălalt lot). Pentru evidențierea eventualelor efecte ale veninului de albine, în paralel s-au recoltat și prelucrat glandele suprarenale de la două loturi martor (MS1, MS2 – câte 4 șobolani), corespunzătoare fiecărui lot de animale tratate.

*Histologie.* Pentru realizarea preparatelor histologice, probele biologice recoltate au fost fixate în fixator Bouin, deshidratate, incluse în parafină și apoi secționare la microtomul Reichert. După etalarea pe lame și deparafinare, s-a făcut colorarea prin metoda Hurduc (pe bază de orange G, albastru de metil, xilidină și acid acetic glacial) [25]. Examinarea preparatelor s-a realizat la un microscop Olympus BX51, iar fotografierea imaginilor cu o cameră digitală Roper Scientific Photometrics prin programul de achiziție și prelucrare Image-ProPlus 4.1-4.5.

*Microscopie electronică de transmisie.* Fragmentele de țesut recoltate în vederea studierii la microscopul electronic de transmisie au fost prefixate în soluție de glutaraldehidă 2,7%, postfixate în acid osmic 2%, spălate și deshidratate în acetonă, apoi incluse în Epon 812 și secționare la un ultramicrotom LKB-III. Secțiunile preluate

pe grile electrolitice au fost contrastate cu acetat de uranil și citrat de plumb [18, 28]. Examinarea s-a realizat la microscopul electronic de transmisie Jeol JEM 1010. Imaginile au fost preluate prin intermediul unei camere video digitale Mega VIEW III și stocate într-o bază de date, prin programul Soft Imaging System.

### **Rezultate și discuții. Aspectul CSR la loturile martor.**

**Studiul histologic al CSR la animalele din lotul MS1** evidențiază dispunerea caracteristică, dimensiunile specifice și aspectul normal al celulelor din cele trei zone: glomerulară – subcapsulară, fasciculată, cea mai bine reprezentată și zona reticulară, localizată profund, adiacent medulosuprarenalei (Fig. 1, 3) [2, 30, 31]. Rețeaua capilară este bogată convergând spre medulară. Se consideră că la nivelul zonei glomerulare are loc secreția hormonilor mineralcorticoizi. Celulele zonei fasciculate elaborează hormonii glucocorticoizi sau “catabolizanți”, care participă la metabolismul proteic și glucidic, cu importante efecte antiinflamatorii, antialergice și antitoxice. Zona reticulară elaborează hormoni sexuali.

**Sudiul secțiunilor ultrafine** prin corticosuprarenalele lotului MS2 arată ultrastructura normală a celulelor zonei fasciculate (Fig. 5-8). O caracteristică a celulelor corticosuprarenalei este aspectul specific al mitocondriilor, rotunde, având crestele longitudinale, sub formă de tuburi.

Un alt aspect caracteristic îl constituie prezența numeroaselor vezicule electronotransparente – vezicule de secreție conținând materialul lipidic. Sunt prezenți și relativ numeroși lisosomi primari și secundari (Fig. 5-8), implicați în crinofagie (Fig. 7, 8).

**Aspectul CSR după tratamentul subcronic cu venin de albine.** La lotul TS1, se poate observa, la microscopul optic, o reducere semnificativă a grosimii corticalei, îndeosebi a zonei fasciculate, asociate unei proliferări a medulosuprarenalei. Astfel, raportul corticală / medulară, este net în favoarea medulei (Fig. 2). Corticala, sediul biosintezei hormonilor glucocorticoizi, prezintă dilatări ale capilarelor sinusoide, precum și unele infiltrate limfocitare. Se remarcă în primul rând deranjarea dispunerii în cordoane paralele a celulelor, dintre care unele și-au pierdut caracterul spongicitar. Un număr variabil de celule spongicitare sunt distrofice, hipertrofiate, prezentând un aspect globulos. Citoplasma celulelor este agranulară, intens vacuolizată, iar nucleii hiperchromi și picnotici sunt dispuși excentric. În interiorul unor celule și în zonele pericelulare se remarcă prezența unor spații rotunde, de dimensiuni diferite, care sugerează o încărcare lipidică moderată a zonei fasciculate. La limita dintre zona fasciculată și cea glomerulară unele spongicite sunt, de asemenea, crescute în volum, atrofice, cu nucleii hipertrofiați. Printre cordoanele celulare spongicitare ale zonei fasciculate se intercalează mici focare necrotice, precum și grupări celulare intens colorate, având un aspect compact, așa numitele “dark cells”. Acestea prezintă citoplasma condensată, hiperchromă, nucleii fiind picnotici, intens colorați. Se remarcă dilatări ale capilarelor sanguine, precum și mici focare infiltrative cu elemente sanguine (Fig. 4).

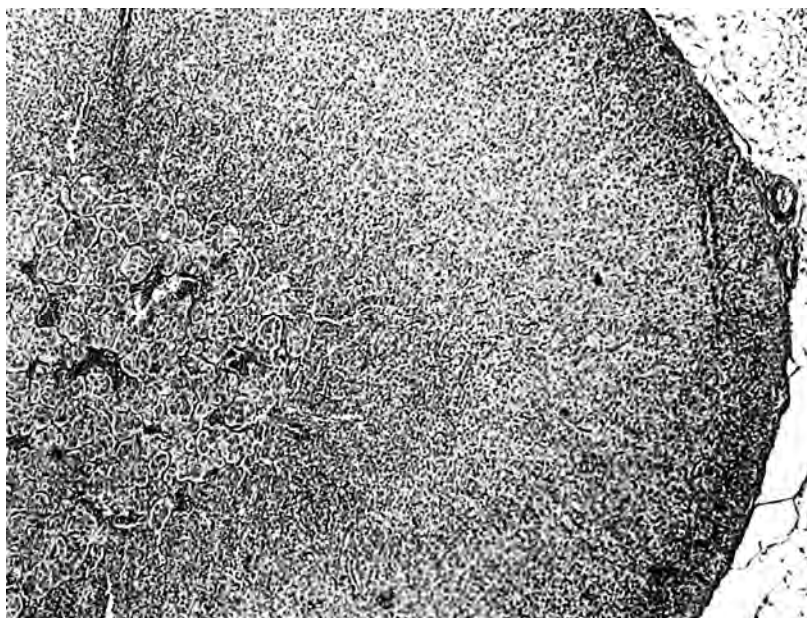


Fig. 1. Aspect de ansamblu al glandelor suprarenale: corticila (CSR) și medulara (MSR) – lotul MS1 (Ob. 6×).



Fig. 2. Reducerea CSR cu proliferarea MSR – lotul TS1 (Ob. 6×).

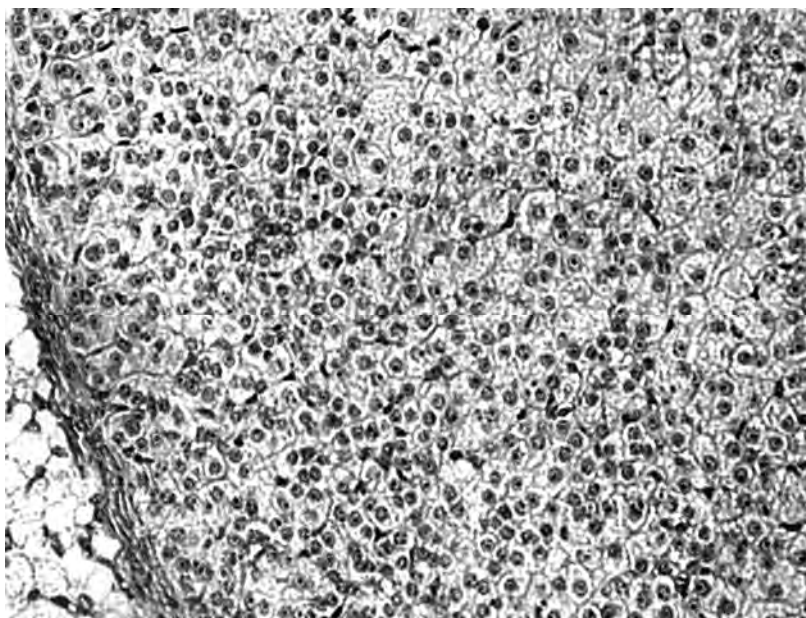


Fig. 3. Zona fasciculată a CSR – lotul MSI (Ob. 40×).

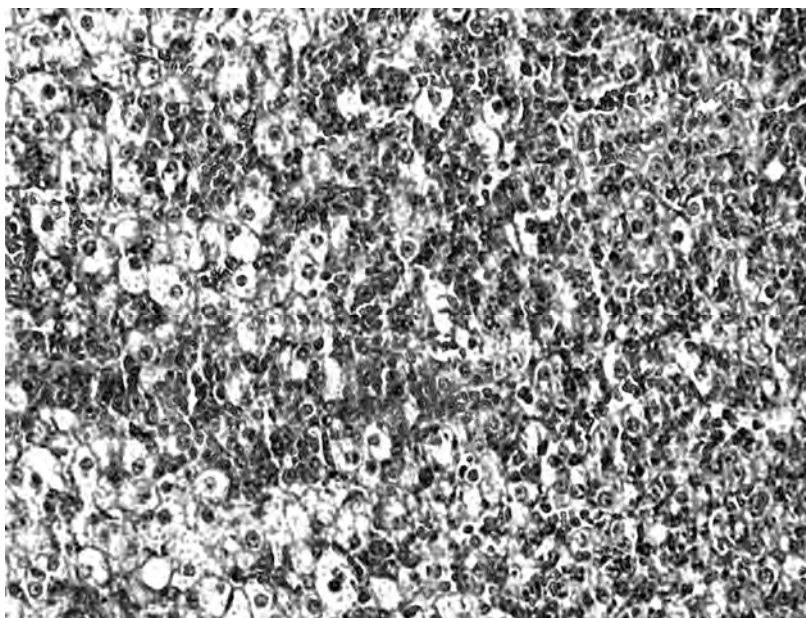


Fig. 4. Zona fasciculată a CSR – lotul TSI (Ob. 40×).

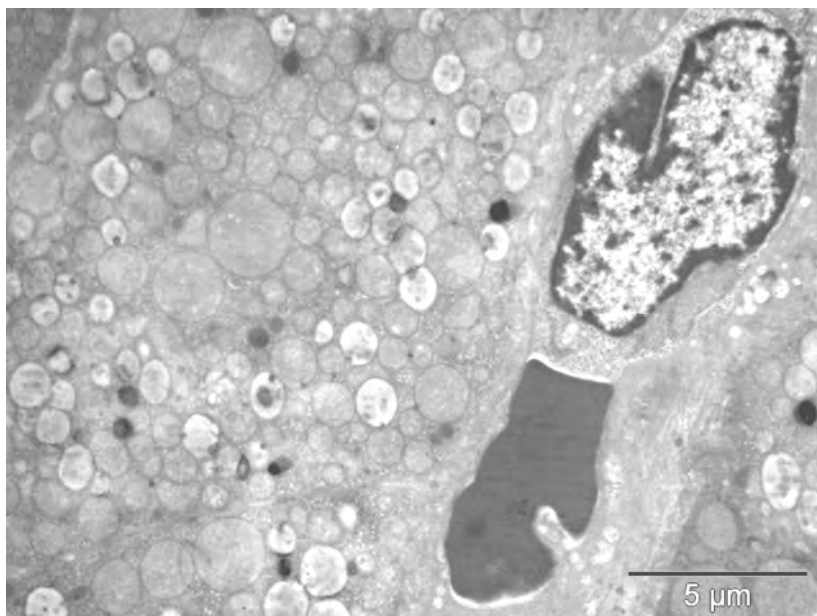


Fig. 5. Celule cu activitate normală, în apropierea capilarului – CSR lotul MS2.

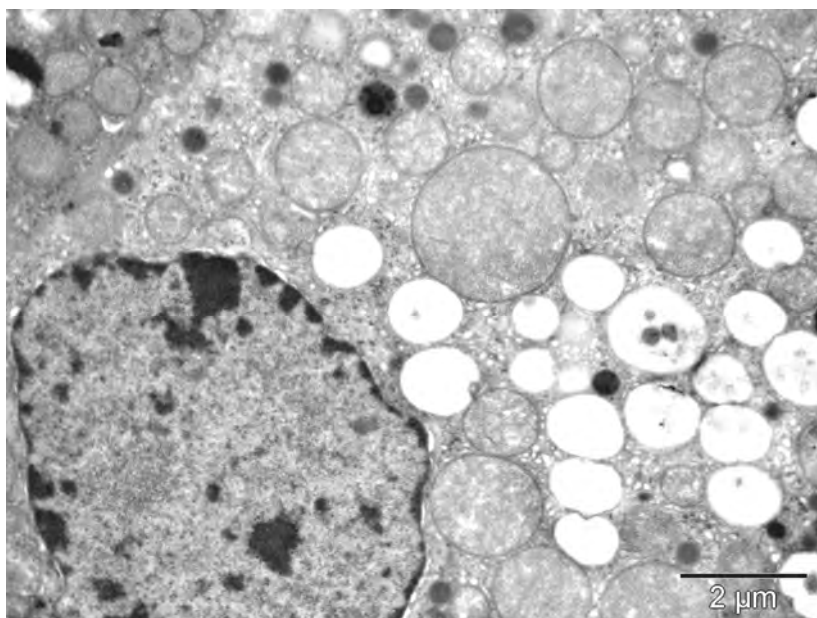


Fig. 6. Celule cu activitate secretorie normală din zona fasciculată a corticosuprarenalei – CSR lotul MS2.



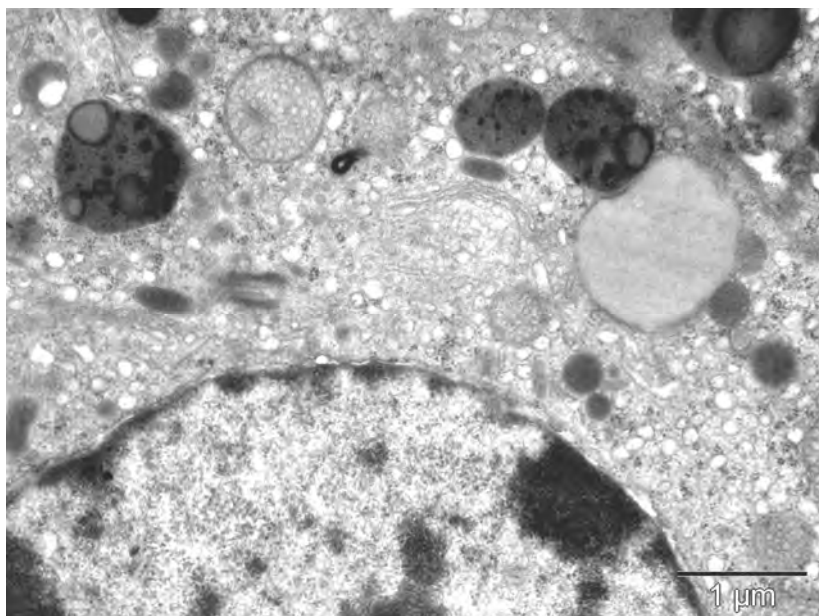


Fig. 7. Detaliu: nucleul, REN, aparat Golgi, centrul celular, lisosomi, mitocondrii – CSR lotul MS2.

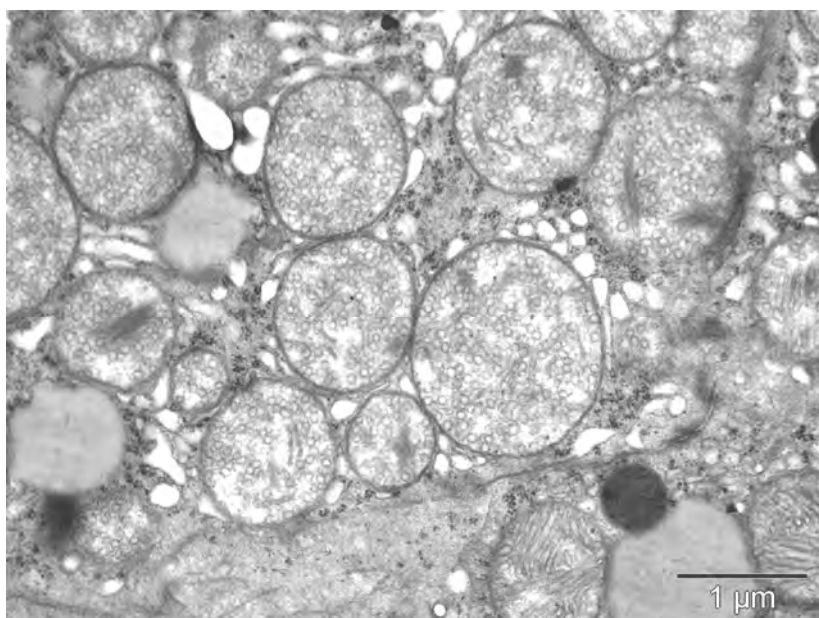


Fig. 8. Aspectul catacteristic al mitocondriilor din corticosuprarenală – CSR lotul MS2.

**Examinarea la microscopul electronic** a secțiunilor de la **lotul TS2** arată o reacție diferențiată a celulelor CSR, de la apariția de ușoare modificări morfologice, până la apariția zonelor de liză pe anumite arii restrânse. Cele mai multe celule examinate prezintă nuclei cu aspect aproape normal, excepție făcând dilatarea spațiului perinuclear (Fig. 9, 10). Nucleolii proeminenți (Fig. 9) indică însă o intensă activitate metabolică. În citoplasmă, reticulul endoplasmic este puternic dilatat sau/și fragmentat, dar mitocondriile nu sunt vizibil afectate (Fig. 9-12). Veziculele de secreție însă se găsesc în număr scăzut, ca urmare a mobilizării activității secretorii. Ele apar cu un conținut heterogen (Fig. 9-12), sugerând alterări în procesele de sinteză și prelucrare a materialelor de secreție, sau chiar acțiunea directă a moleculelor veninului (în special a fosfolipazelor) asupra acestor substrat.

Unele celule au un aspect intermediar, sugerând o reacție mai avansată – citoplasma lor fiind rarefiată.

Capilarele sanguine sunt semnificativ afectate, având endoteliul distrus (Fig. 14); se pot observa acumulări importante de collagen la polul vascular al unor celule, în spațiul dintre endoteliu și celulă (Fig. 12-13). În zonele din imediata apropiere a capilarelor sanguine sunt grav afectate și celulele secretorii – lizate (Fig. 14), având plasmalema distrusă și citoplasma dezorganizată, cu eliberarea unor componente în spațiul intercelular sau în capilare. Acesta este motivul pentru care macrofagele apar foarte încărcate cu detritusuri celulare (Fig. 13).

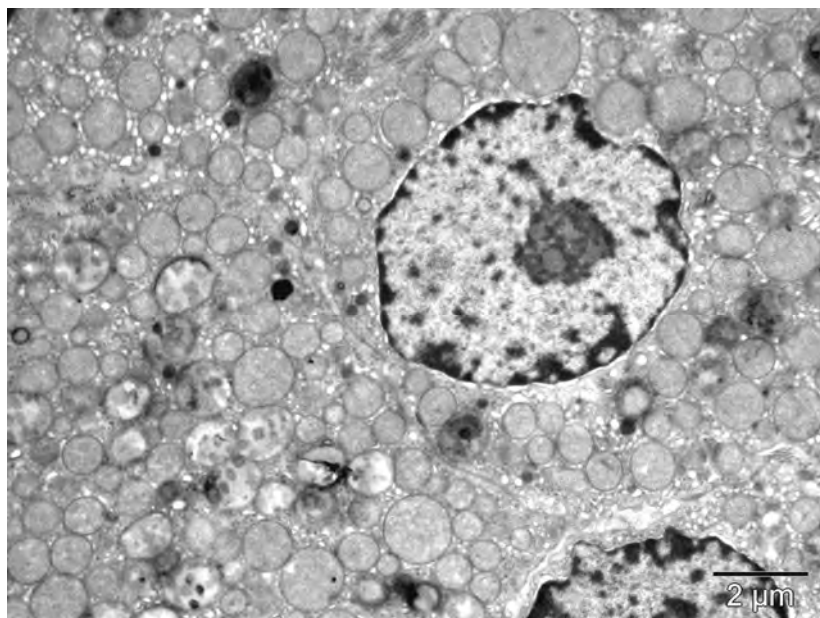


Fig. 9. Număr redus de vezicule secretorii cu aspect heterogen – CSR lotul TS2.

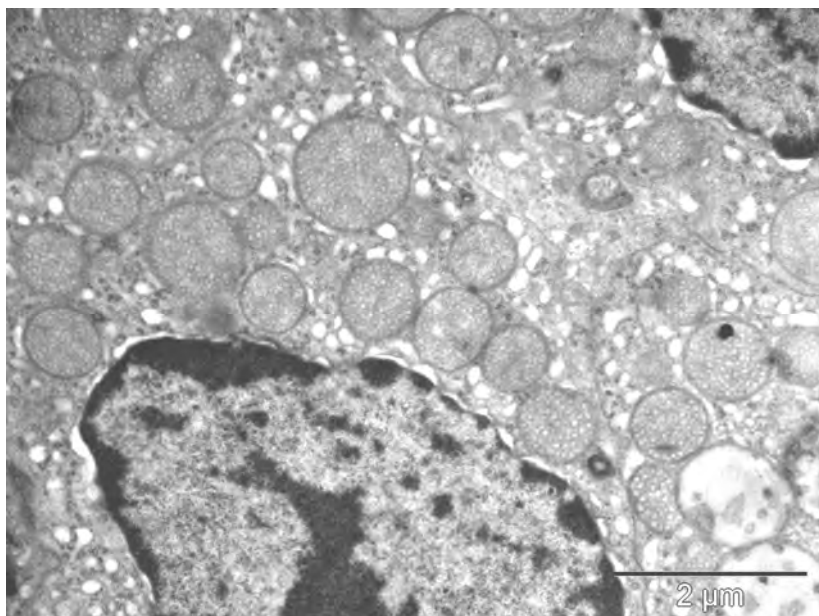


Fig. 10. Dilatarea spațiului perinuclear și a REN – CSR lotul TS2.

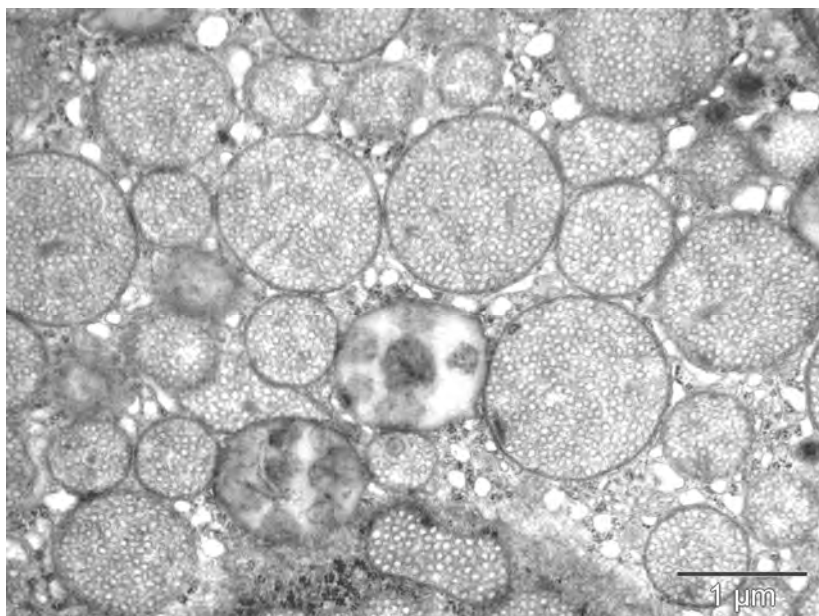


Fig. 11. Vezicule cu aspect heterogen și mitocondrii normale – CSR lotul TS2.

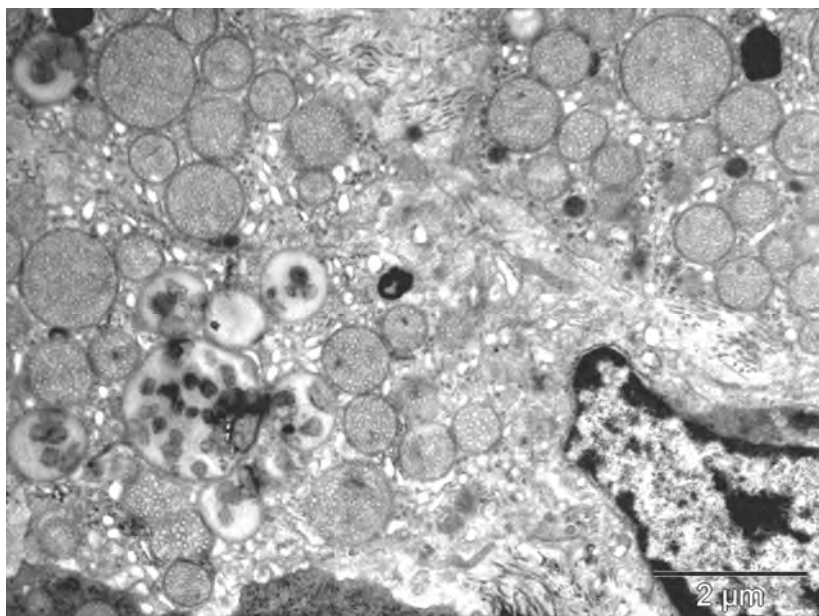


Fig. 12. Creșterea conținutului intercelular de colagen și granule de secreție cu aspect heterogen – CSR lotul TS2.

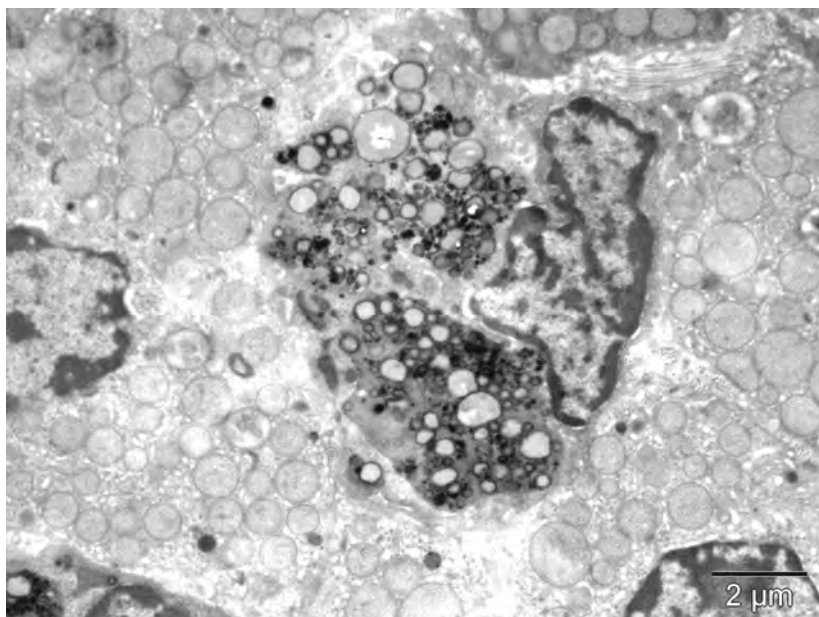


Fig. 13. Creșterea activității macrofagelor – CSR lotul TS2.

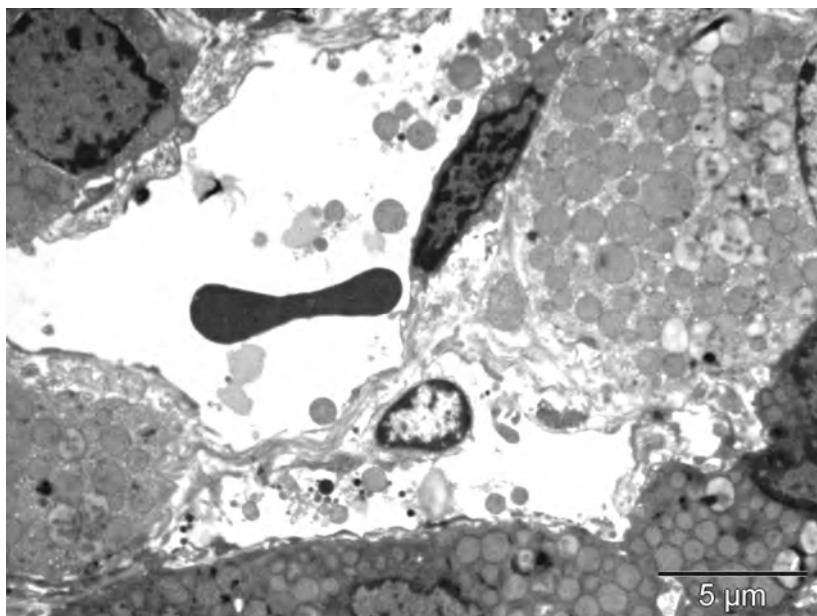


Fig. 14. Endoteliu distrus și leziuni celulare perivasculare – CSR lotul TS2.

Rezultatele acestui studiu arată că, în urma tratamentului subcronic cu venin de albine, apar modificări importante la nivel celular în CSR, asociate cu reducerea atrofică a glandei. Rezultate similare în ce privește aspectul histologic al CSR dar și reducerea numerică a veziculelor de secreție au fost raportate [4, 5] în tratamentul experimental cu glucocorticoizi, funcția de secreție fiind discret restabilă la aplicarea consecutivă a unui agent blocant al  $\beta$ -adrenoreceptorilor [5]. Alți cercetători au demonstrat că în primele faze ale expunerii organismelor la condiții de stres, suprarenala reacționează rapid prin hipertrofia corticalei, îndeosebi a zonei fasciculate, iar hormonii glucocorticoizi, ce exercită inițial un rol antiinflamator și de mobilizare a resurselor organismului (gluconeogeneză și lipoliză), ajung să atingă nivele foarte ridicate. Stimularea CSR este urmată, la nivel molecular de o rarefiere coordonată a rețelei de actină, mai ales prin depolimerizarea microfilamentelor. Acesta este mecanismul care face posibilă eliberarea, în timp scurt a unor importante cantități de hormoni [34]. Datele din literatura de specialitate arată existența unei corelații între activitatea de secreție hormonală a CSR și fluxul sanguin în capilare, pe de o parte (crescut în cazul experimentului nostru, datorită atât moleculelor veninului, dar și a ACTH) și a semnalelor paracrine venite de la celulele medulare sau de la celulele endoteliale (endotelina) [9] ce pot fi afectate sau chiar distruse. Nivelul seric crescut al glucocorticoizilor este, în general, însoțit de efecte adverse, inclusiv alterarea excitabilității neuronale și a activității metabolice la nivelul întregului organism [19, 23]. Studiile *in vitro* și *in vivo* [8], au relatat că neuronii din nucleul arcuat, nucleul ventromedian hipotalamic, o parte a nucleului paraventricular,

aria laterală a regiunii preoptice, precum și eminența mediană, conțin un mare număr de receptori pentru hormonii glucocorticoizi, iar lezarea acestor neuroni ca urmare a expunerii la excitotoxine determină leziuni și dereglări ale hipofizei anterioare, precum și un răspuns exagerat al corticalei suprarenaliene. Receptori pentru acești hormoni au fost evidențiați însă în aproape toate tipurile celulare, modularea balanței de glucocorticoizi fiind urmată de răspunsuri la nivelul întregului organism [19]. Levine [21] arată că administrarea cronică de glucocorticoizi la animalele de laborator, cu începere imediat după naștere, are ca efect întârzierea dezvoltării organismului prin reducerea ratei mitozelor, alterarea mielinizării în neuromorfogeneză etc. Aceste animale vor avea un conținut redus de ADN cerebral și creierul de dimensiuni mai mici, cu dereglări ale funcțiilor neuroendocrine și de comportament la vârsta adultă. Excesul glucocorticoidic consecutiv stresului cronic are ca efect reducerea numărului de prelungiri dendritice ale neuronilor din sistemul nervos central, în special din hipocamp (zona CA3), la nivelul cărora a fost evidențiat un număr mare de receptori pentru glucocorticoizi [24]. Aceste modificări pot merge până la distrugerea completă a unora dintre neuronii cei mai expuși [15, 32]. Levine [21] mai subliniază faptul că și absența cortizonului după suprarenalectomie afectează dezvoltarea sistemului nervos central. Deci, nivele joase dar constante de glucocorticoizi sunt esențiale în cursul creșterii animalelor. Noi am lucrat cu animale tinere, aflate în perioada de creștere, iar efectul cumulat al acțiunii moleculelor veninului, respectiv al nivelelor ridicate de corticosteroizi produși sub efectul factorului stresant se reflectă atât în creșterea animalelor (masă corporală medie scăzută la animalele injectate cu venin [15]), dar și în procesele de învățare (date în curs de publicare). Este importantă mențiunea că acest fapt este corelat cu alterări structurale și metabolice la nivelul altor organe vitale [11, 12, 14, 27].

În condițiile expunerii prelungite la stres, are loc un fenomen de epuizare fiziologică a glandei, manifestat prin reducerea grosimii corticalei, îndeosebi a zonei fasciculate [10] și reducerea activității de sinteză a CSR [22], dar și prin creșterea caracterului lacunar al medulei. În experimentul nostru, reducerea zonei fasciculate este determinată în mare parte și de fenomenele necrotice induse direct prin acțiunea veninului la acest nivel. Deoarece multe celule și-au pierdut integritatea, ca efect al acțiunii vasodilatatoare și citolitice a componentelor veninului [1], celulele mai puțin afectate sunt solicitate să producă o cantitate sporită de hormoni ca reacție la prezența îndelungată a veninului de albine în organism. Modificările morfologice sunt însoțite de o scădere treptată a nivelului hormonilor glucocorticoizi, care prin mecanisme de feed-back negativ, determină reactivitatea neurosecretoare și implicarea adenohipofizei. Suprastimularea acestei glande prin mecanismul de feed-back pozitiv indus de hipotalamus, poate determina la rândul său, epuizarea fiziologică a adenohipofizei, fenomen întâlnit și în experimentele noastre. Hormonii corticosteroizi, reglează, pe de altă parte, prin feed-back negativ și activitatea sistemului imun [2, 6, 26], nivelele lor crescute putând reprezenta, de asemenea o explicație pentru numărul mai mic de limfocite circulante înregistrat de noi [13].

Analizele biochimice efectuate de noi în aceleași condiții experimentale [13] au înregistrat o scădere semnificativă a nivelului seric al colesterolului (cu 58,3%,  $p=0,04$ ). Această scădere se datorează, pe de o parte inhibării sintezei sale în ficat, unde REN este implicat preponderent în activitatea de detoxifiere, pe fondul creșterii glicemiei cu aproape 19% ( $p=0,009$ ). Pe de altă parte, hepatocitele sunt profund afectate de moleculele veninului – nivelul ALAT este crescut cu +73,29% ( $p=0,02$ ) și al ASAT cu +60,87% ( $p=0,05$ ) față de martori. Desigur, nivelul scăzut al colesterolului seric se explică și prin reducerea absorbției în intestin, dar mai ales prin utilizarea sa în corticosuprarenală.

**Concluzii.** Stimularea nervoasă indusă de veninul de albine în etajele superioare ale sistemului nervos se repercutează asupra structurii și activității CSR, dar este evidentă și o acțiune directă a moleculelor veninului la nivelul acestor glande. Aspectul general al celulelor este caracteristic stărilor prelungite de stres și indică o activitate susținută de secreție hormonală, modificările evidențiate arătând un nivel scăzut al conținutului celular în hormoni. Aceste rezultate impun limitarea în timp a perioadelor de tratament medical cu venin de albine, pentru evitarea serioaselor tulburări endocrino-metabolice.

## BIBLIOGRAFIE

1. Artemov, N. M., *Efectul veninului de albine asupra permeabilității capilarelor și asupra cantității albuminelor din sânge*, in XXII Congr. Apimond., p.361-365, 1969.
2. Bloom, W., Fawcett, D. W., *A Textbook of Histology*. 10<sup>th</sup> Ed., Saunders, Philadelphia, 1975.
3. Chang, L. W., *Selected histopathological and histochemical methods for neurotoxicity assessment*. 1995, p. 5-27.
4. Crăciun, C., Kis, E., Sandu, V.-D., Pașca C., Puică, C., Crăciun, V., Madar, J., *Comparative studies of the adrenal cortex structure and ultrastructure in prepubertal rats treated with topical dermocorticosteroids*. "Curr. Probl. Cell Mol. Biol.", IV, 1999, 305-314.
5. Crăciun, C., Ardelean A., Crăciun, V., Miclăuș V., Barbu-Tudoran L., *Structural and ultrastructural modifications induced by simultaneous treatments with dermocorticoids and propranolol in the adrenal glands*, "Curr. Probl. Cell Mol. Biol.", V, 2000, 225-245.
6. Dan, G., Lall S. B., *Neuroendocrine modulation of immune system*, "Ind. J. Pharmacol.", 30, 1998, 129-140.
7. Darlington, D. N., Miyamoto, M., Keil, L. C., Dallmann, M., *Paraventricular stimulation with glutamate elicits bradycardia and pituitary responses*, "Am. Physiol. J.", 45, 1989, R112-R119.
8. Dawson, R., Pelleymounter, M. A., Millard, M. J., Liu, S., Eppler, B., *Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate (MSG)-induced arcuate nucleus damage*, "Am. J. Physiol.", 273, 1997, E202-E206.

9. Ehrhart-Bornstein, M., Hinson J. P., Bornstein, S. R., Scherbaum, W. A., Vinson, G. P., *Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis*, "Endocr. Rev." **19** (2), 2005, 101-143.
10. Feldman, D., Funder, J. W., Edelman, J. S., *Subcellular mechanisms in the action of adrenal steroids*, "Am. J. Med.", **53**, 1972, 545-560
11. Florea, A., C., Puică, Crăciun, C., Gherghel, P., Oprea, M. C., *Modificări histologice și ultrastructurale induse experimental la nivelul rinichiului prin administrarea veninului de albine în diferite doze*, "An. Soc. Naț. Biol. Cel.", **7** (1), 2002, 327-341.
12. Florea, A., Crăciun, C., Puică, C., Gherghel, P., Oprea, M. C., *Hepatotoxicitatea veninului de albine. Studiu histologic și ultrastructural*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **48** (1), 2003, 49-66.
13. Florea, A., Pure, D., Oprea, M. C., Gherghel, P., Crăciun, C., *Blood changes in experimental subchronic rat envenomation with honey bee (Apis mellifera L.) venom*, "Bull. Mol. Med.", **15-17**, 2003, 19-26.
14. Florea, A., Oprea, M. C., Puică, C., Gherghel, P., Crăciun, C., *Efecte structurale și ultrastructurale determinate de veninul de albine în miocard*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **48** (2), 2003, 89-102.
15. Florea, A., Gherghel, P., Puică, C., Crăciun, C., Oprea, M. C., *Aspecte histologice și ultrastructurale ale hipotalamusului de la șobolanii albi de laborator consecutiv tratamentului subcronic cu venin de albine*, "An. Soc. Naț. Biol. Cel.", **8**, 2003, 159-168.
16. Gelderblom, R., *Collecting bee venom – The other way*, "Hivelights", **13** (4), 1997, 12-13.
17. Habermann, E., *Bee and wasp venoms. The biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed*, "Science", **177**, 1972, 314-322.
18. Hayat, M. A., *Principles and techniques of electron microscopy – Biological applications*. 4<sup>th</sup> Ed., Cambridge University Press, Cambridge, 2000.
19. Johansson, M., *Interaction of xenobiotics with the glucocorticoid hormone system in vitro*, "Acta Univ. Uppsalensis", Uppsala, 2002, 1-48.
20. Kang S. S., Pak S. C., Choi S. H., *The effect of whole bee venom on arthritis*. "Am. J. Chin. Med.", **30**, 2002, 73-81.
21. Levine, S., *Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat*, "Physiol. Behav.", **73**, 2001, 255-260.
22. McBeth, J., Chiu, Y. H., Silman, A. J., Ray, D., Morriss, D., Dickens, C., Gupta, A., and Macfarlane, G. J., *Hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis function and the relationship with chronic widespread pain and its antecedents*, "Arthritis Res. Ther.", **7** (5), 2005, R992-R1000.
23. McEwen B. S., *The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance*, "Brain Res.", **886**, 2000, 172-189.
24. McEwen, B. S., *Plasticity of the hippocampus: Adaptation to chronic stress and allostatic load*, "Ann. New York Acad. Sci.", 2001, 265-277.
25. Mureșan, E., Gaboreanu, M., Bogdan, A. T., Baba, A. I., *Tehnici de histologie normală și patologică*, Ed. Ceres, București, 1974.
26. Murray, S. E., Lallman, H. R., Heard, A. D., Rittenberg, M. B., Stenzel-Poore M. P., *A genetic model of stress displays decreased lymphocytes and impaired antibody responses without altered susceptibility to Streptococcus pneumoniae*, "J. Immunol.", **167**, 2001, 691-698.



27. Ownby, C. L., Powel, J. R., Jiang, M. S., Fletcher, J. E., *Melittin and phospholipase A2 from bee (Apis mellifera) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo*, "Toxicon", **35**, 1997, 67-80.
28. Ploaie, P. G., Petre, Z., *Introducere în microscopia electronică cu aplicații în biologia celulară și moleculară*. Ed. Acad. Rom. București, 1979.
29. Popescu, N., *Unele măsuri necesare pentru menținerea purității și calității veninului de albine*. "Apic. România", **1**, 1990, 13-14.
30. Rîmniceanu, C., Miclea, C., Dincă, C., Drăgan, M., Litvac, E., Tudor, L., *Histologie*, Ed. Did. și Pedag., București, 1965.
31. Ross, M. H., Romrell, L. J., Kaye, G. I., *Histology – A Text and Atlas.*, Williams & Wilkins, Baltimore, 1995.
32. Sandi, C., Merino, J. J., Cordero, M. I., Touyarot, K., Venero, C., *Effects of chronic stress on contextual fear conditioning and the hippocampal expression of the neural cell adhesion molecule, its polysialylation, and LI*, "Neuroscience", **102** (2), 2001, 329-339.
33. Schmidt, J. O., *Bee products: Chemical composition and application*, în Mizrahi, A., Lensky, Y. (Eds.), *Bee Products*, p. 15-26, Plenum Press, New York, 1996.
34. Tchakarov, L. E., Zhang, L., Rosé, S. D., Rainy Tang, R., Trifaró, J. M., *Light and electron microscopic study of changes in the organization of the cortical actin cytoskeleton during chromaffin cell secretion*, "J. Histochem. Cytochem.", **46** (2), 1998, 193-203.

MODIFICĂRI STRUCTURALE ȘI ULTRASTRUCTURALE PRODUSE  
ÎN GLANDELE SUPRARENALE DUPĂ ADMINISTRAREA  
EXPERIMENTALĂ A VENINULUI DE ALBINE (*Apis mellifera* L.)  
II. GLANDELE MEDULOSUPRARENALE

ADRIAN FLOREA \*, CONSTANTIN CRĂCIUN \*\*  
și CONSTANTIN PUICĂ \*\*\*

**SUMMARY.** – **Structural and Ultrastructural Changes Produced in Adrenal Glands Consequently to the Honey Bee Venom Experimental Administration. II. The Adrenal Medula.** An important aspect of the organism reaction to stressors involves the sympathoadrenal system, with the release of catecholamines from the adrenomedullary chromaffin cells. We reported here the histological and ultrastructural aspects of the epinephrine-secreting cells from adrenal medulla after the honey bee (*Apis mellifera* L.) venom subchronic treatment. We found hypertrophic cells, and dilatation of capillaries on the background of the hypertrophy of the entire gland. At ultrastructural level, a high number of mature secretion granules was emphasized, as well as numerous immature granules widespread in the cytoplasm. Nuclei have an irregular shape, prominent nucleoli, and a very dilated perinuclear space. The endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are also dilated. Small necrosis areas were observed besides capillaries with a compromised endothelium. All these changes prove that the bee venom is a powerful stressor agent generating an important reaction of the chromaffin cells. These cells have a general aspect characteristic to prolonged stress conditions, but they still keep an increased secretory activity. However, the high number of immature granules suggest an imminent physiological depletion of this gland..

Glandele medulosuprenale (MSR) au origine embriologică diferită de cea a corticosuprenalelor (CSR); ele fac parte din sistemul nervos simpatic, fiind implicate în reacțiile de apărare nespecifică a organismului [5] în diferite situații de stres sau de modificare a homeostaziei organismului. Studii efectuate pe animale de laborator, au arătat că melitina, principalul peptid din compoziția veninului de albine, stimulează indirect suprarenalele, determinând creșterea cortizolului plasmatic, dar și a catecolaminelor prin intensificarea secreției de ACTH din hipofiză [17]. În suprarenale, sistemele celulare ale medulei și corticalei sunt conectate anatomic și funcțional, glucocorticoizii reglând expresia și activitatea enzimelor implicate în sinteza hormonilor MSR [2, 7]. Rezultate obținute de noi anterior au evidențiat o eliberare crescută a glucocorticoizilor din CSR la administrarea subcronică a veninului de albine [11].

---

\*Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", Facultatea de Medicină, Catedra de Biologie Celulară și Moleculară, 400349 Cluj-Napoca, România. E-mail: aflorea@personal.ro

\*\*Universitatea "Babeș-Bolyai", Facultatea de Biologie și Geologie, Centrul de Microscopie Electronică, 400006 Cluj-Napoca, România

\*\*\*Institutul de Cercetări Biologice, 400015 Cluj-Napoca, România

În acest studiu am urmărit aspectele histologice și ultrastructurale ale MSR în condițiile administrării veninului de albine și stabilirea nivelului activității secretorii a acestor glande în aceleași condiții experimentale. Deoarece este cunoscut faptul că celulele producătoare de noradrenalină reprezintă doar aproximativ 10% din celulele glandei [4], dar și că secreția noradrenalinei în stresul cronic se menține la nivele crescute chiar la intervale mari după dispariția agentului stresant [5], ne-am concentrat asupra urmării activității secretoare a celulelor producătoare de adrenalină.

**Materiale și metode.** *Animale.* Experimentele s-au realizat în două etape pe 4 loturi de șobolani albi *Wistar* (în total 26 animale), crescuți în condiții standard, fără restricții în ce privește hrana, apa, sau mișcarea.

*Veninul de albine.* Am utilizat venin de albine pur cristalizat, recoltat de noi prin metoda stimulării albinelor cu impulsuri electrice [12, 24]. În vederea injectării veninul a fost resuspendat într-o soluție izotonă (150 mM NaCl, 5,5 mM glucoză, 5 mM HEPES, la pH 7,4) și păstrat la frigider, ferit de acțiunea luminii. Soluția injectabilă s-a preparat în 3 etape, de fiecare dată doar pentru câte 10 zile, pentru a preveni alterarea veninului.

*Tratament.* Animalele din două loturi – TS1 și TS2 (6, respectiv 12 animale), au fost tratate subcronic, timp de 30 de zile cu o doză zilnică, echivalentă unei înțepături de albină (700 μg venin/kg corp/zi). Injectarea veninului de albine s-a făcut subcutan, în zona dorso-laterală posterioară. La sacrificarea animalelor la sfârșitul perioadei de tratament am recoltat glandele suprarenale și s-au prelucrat corespunzător tehnicilor histologice (pentru primul lot) și microscopiei electronice de transmisie (animalele din celălalt lot). Pentru evidențierea eventualelor efecte ale veninului de albine, în paralel s-au recoltat și prelucrat glandele suprarenale de la două loturi martor (MS1, MS2 – câte 4 șobolani), corespunzătoare fiecărui lot de animale tratate.

*Histologie.* Pentru realizarea preparatelor histologice, probele biologice recoltate au fost fixate în fixator Bouin, deshidratate, incluse în parafină și apoi secționate la microtomul Reichert. După etalarea pe lame și deparafinare, s-a făcut colorarea prin metoda Hurduc (pe bază de orange G, albastru de metil, xilidină și acid acetic glacial) [21]. Examinarea preparatelor s-a realizat la un microscop Olympus BX51, iar fotografierea imaginilor cu o cameră digitală Roper Scientific Photometrics prin programul de achiziție și prelucrare Image-ProPlus 4.1-4.5.

*Microscopie electronică de transmisie.* Fragmentele de țesut recoltate în vederea studierii la microscopul electronic de transmisie au fost prefixate în soluție de glutaraldehidă 2,7%, postfixate în acid osmic 2%, spălate și deshidratate în acetona, apoi incluse în Epon 812 și secționate la un ultramicrotom LKB-III. Secțiunile preluate pe grile electrolitice au fost contrastate cu acetat de uraniu și citrat de plumb [14, 23]. Examinarea s-a realizat la microscopul electronic de transmisie Jeol JEM 1010. Imaginile au fost preluate prin intermediul unei camere video digitale Mega VIEW III și stocate într-o bază de date, prin programul Soft Imaging System.

**Rezultate și discuții. Aspectul medulosuprarenalei la loturile martor.**

**Studiul histologic** al MSR [1, 25, 27] la animalele din **lotul MS1** (Fig. 1) evidențiază celule mari, cubice sau poliedrice, dispuse în cordoane scurte și având citoplasma bazofilă, încărcată cu granulații cromafine. Și printre cordoanele corticalei se întrepătrund zone de țesut limfoid, care înglobează insule medulosuprareneliene formate din celule mai mici, care prezintă de asemenea, un caracter bazofil. Cordoanele celulare sunt separate prin capilare; sunt prezente și numeroase terminații nervoase.

**La lotul MS2** pot fi diferențiate **electronmicroscopic** cele două tipuri celulare ale medulosuprarenalei (Fig. 3), responsabile pentru secreția celor două tipuri de catecolamine: adrenalina și noradrenalina. Principalul criteriu îl constituie granulele de secreție care apar sub formă de vezicule numeroase, cu diametrul cuprins între 100-300 nm, asemănătoare ca aspect celor întâlnite la hipofiză [1, 25]. În celulele secretoare de adrenalină, granulele pot fi mai dense sau mai puțin dense, sferice, având un aspect omogen și o distribuție uniformă în celulă (Fig. 4). Celulele producătoare de noradrenalină au granule de mărimi și forme variate și care conțin o zonă centrală mai electrodensă. De cele mai multe ori acestea apar grupate, având deci o repartizare neuniformă în citoplasmă.

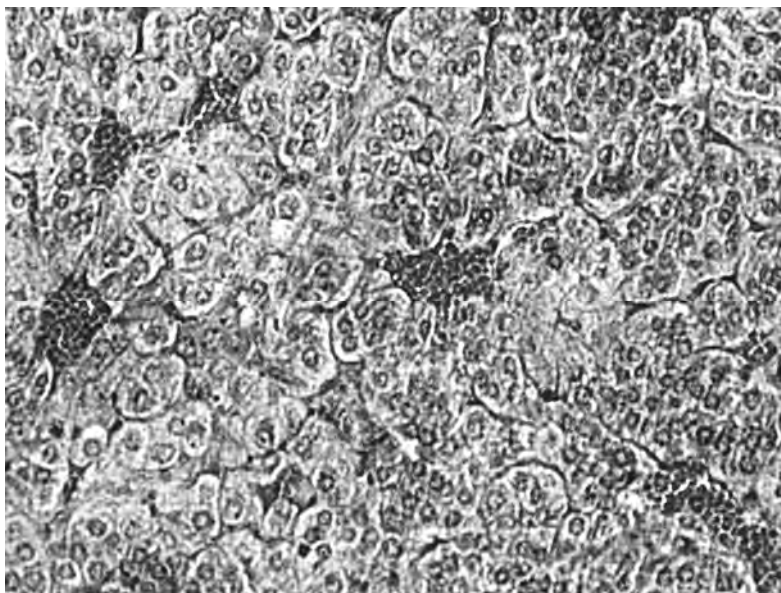
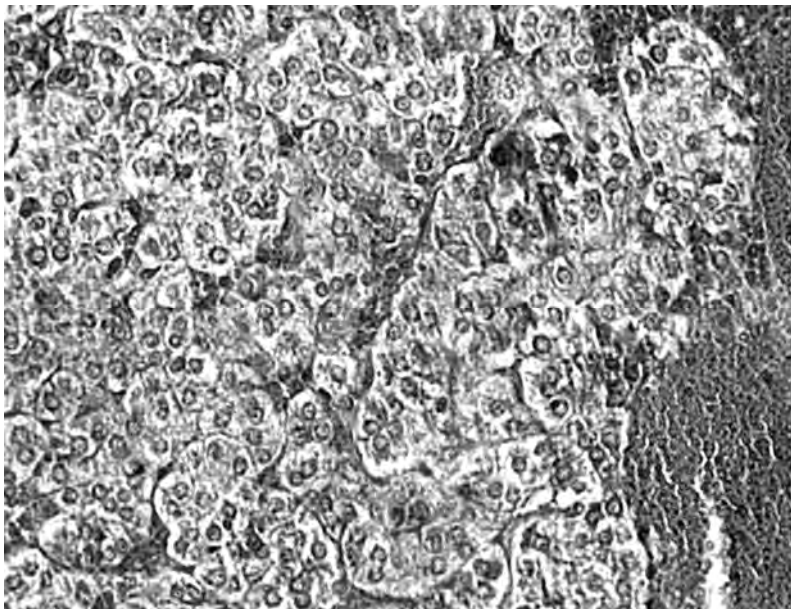


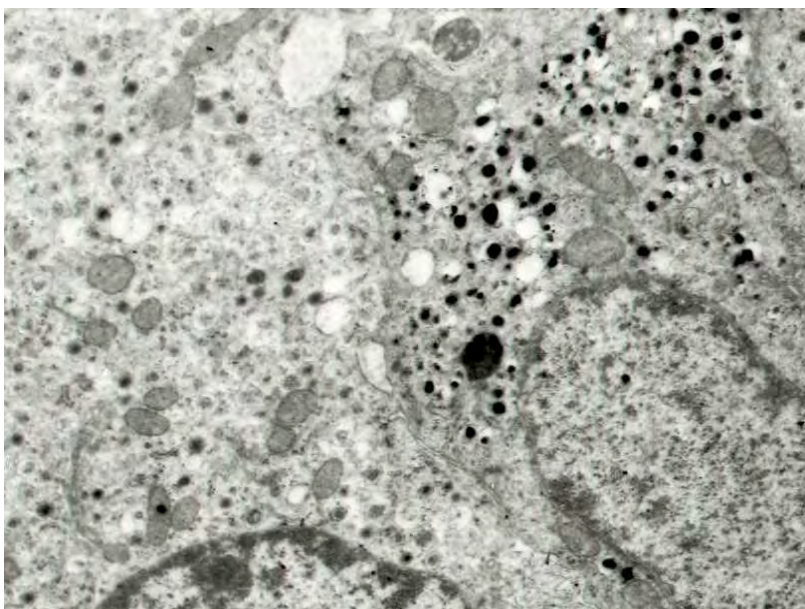
Fig. 1. Aspectul normal al MSR – lotul MS1 (Ob. 40×).

**Aspectul MSR după tratamentul subcronic cu venin de albine.**

La **lotul TS1**, se remarcă **histologic** (Fig. 2) celule cromafine în general hipertrofiate, grupate în cordoane celulare separate de spații lacunare de diferite dimensiuni, pe fondul unei proliferări a întregii glande [11]. În unele zone am evidențiat dilatări ample ale capilarelor și congestie vasculară.



*F i g. 2. Celule cromafine hipertrofiat, cu citoplasma rarefiată; zone de congestie vasculară – MSR, lotul TS1 (Ob. 40×).*



*F i g. 3. Aspectul și distribuția normală a veziculelor secretorii în celulele producătoare de adrenalină (stânga) și noradrenalină (dreapta) – MSR lotul MS2.*

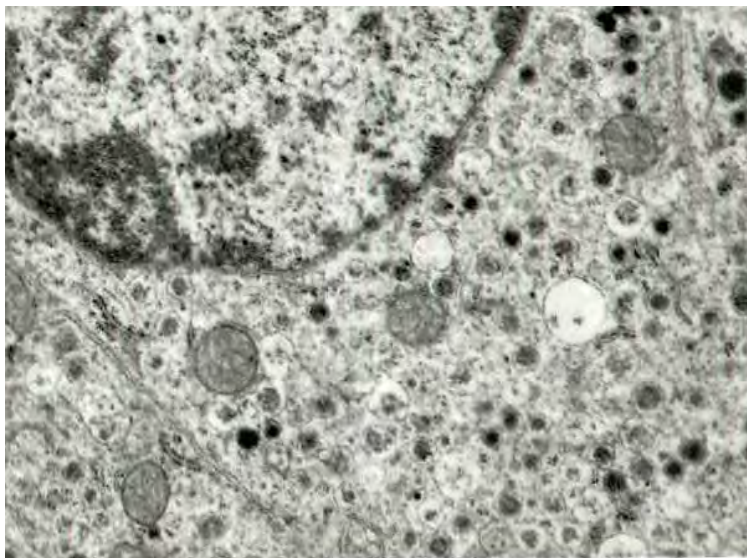


Fig. 4. Detaliu: nucleul, RER, mitocondrii și numeroase vezicule secretorii conținând adrenalina – MSR lotul MS2.

La examinarea secțiunilor ultrafine obținute de la **lotul TS2**, se observă, în primul rând, numărul foarte mare al granulelor de secreție conținând adrenalina, cu o distribuție uniformă în întreaga celulă (Fig. 5). Majoritatea acestor granule apar foarte electrondense, semn al maturității lor, dar printre ele pot fi remarcate și numeroase granule imature, având de asemenea o distribuție uniformă. În ce privește nucleii, aceștia

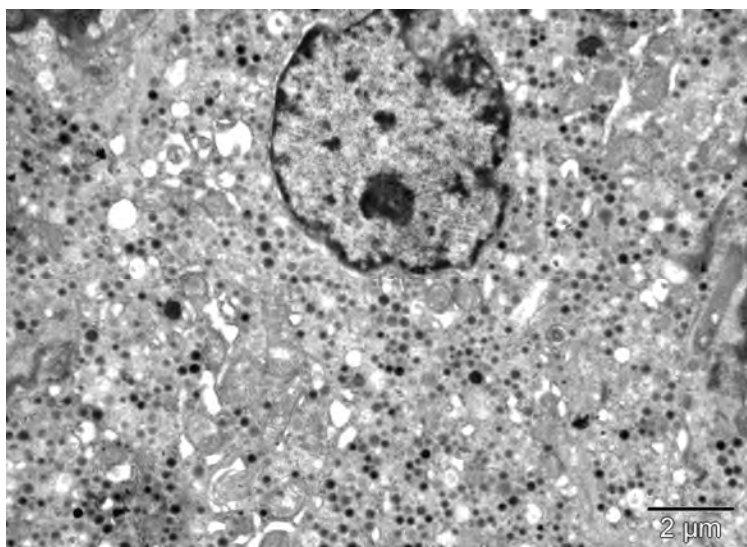


Fig. 5. Celula producătoare de adrenalina: contur nuclear neregulat; numeroase granule secretorii (mature și imature); dilatarea RE – MSR lotul TS2.

prezintă un contur puternic neregulat (Fig. 5-7), conținut normal de eucromatină și nucleoli proeminenți. Un alt aspect important îl reprezintă dilatarea excesivă a spațiului perinuclear (Fig. 6), a reticulului endoplasmic (RE) rugos (Fig. 5-7) și a cisternelor aparatului Golgi (Fig. 8). Majoritatea mitocondriilor au ultrastructura normală, dar sunt și cazuri în care se observă matricea lor ușor rarefiată (Fig. 5-7), sau mitocondrii distruse în întregime (Fig. 7). Și în cazul MSR am întâlnit mici focare zonale de necroză, localizate mai ales în apropierea unor capilare cu endoteliul compromis, unde este prezentă și extravazarea elementelor figurate sanguine.

În condiții de stres, răspunsul organismului implică, pe lângă eliberarea de corticosteroidi, ca urmare a stimulării axului hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenalian, și activarea sistemului nervos vegetativ simpatic. Sub influența stimulilor nervoși, dar și ca reacție la nivelul crescut de glucocorticoizi eliberați din CSR [2, 7], se declanșează răspunsul MSR, concretizat prin intensificarea sintezei și eliberarea catecolaminelor care se acumulează în granulele de secreție [19] în mod diferențiat pe categorii celulare încă din primele luni de viață intrauterină [18]. Stimularea nervoasă generală indusă de apamina din venin [10, 13], a determinat, în cazul particular al tratamentului subcronic efectuat de noi, o proliferare a MSR în raport cu CSR și un aspect hipertrofic al celulelor secretorii. Acestea, alături de numărul mare de vezicule mature, dau o imagine de ansamblu ce reflectă o activitate secretorie intensă. Studii relativ recente arată că veziculele de secreție nu se contopesc integral cu plasmalema, ci vin în contact cu sisteme proteice inelare de atașare la membrană, formând așa-numiții pori de fuziune. Astfel ele își descarcă conținutul, printr-un mecanism molecular ce implică aquaporina 1 și se reîntorc în citoplasmă pentru a fi reîncărcate [15, 16].

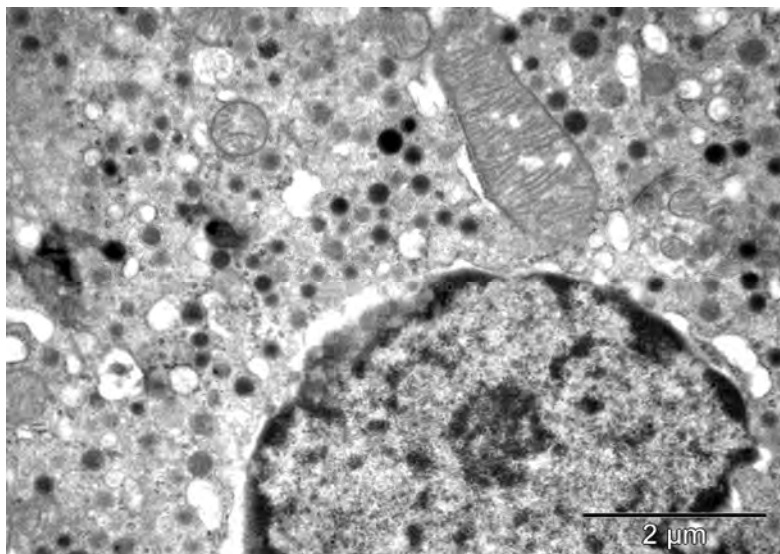


Fig. 6. Celulă producătoare de adrenalină: dilatarea excesivă a RE și spațiului perinuclear; granule secretorii în diferite stadii de acumulare – MSR lotul TS2.

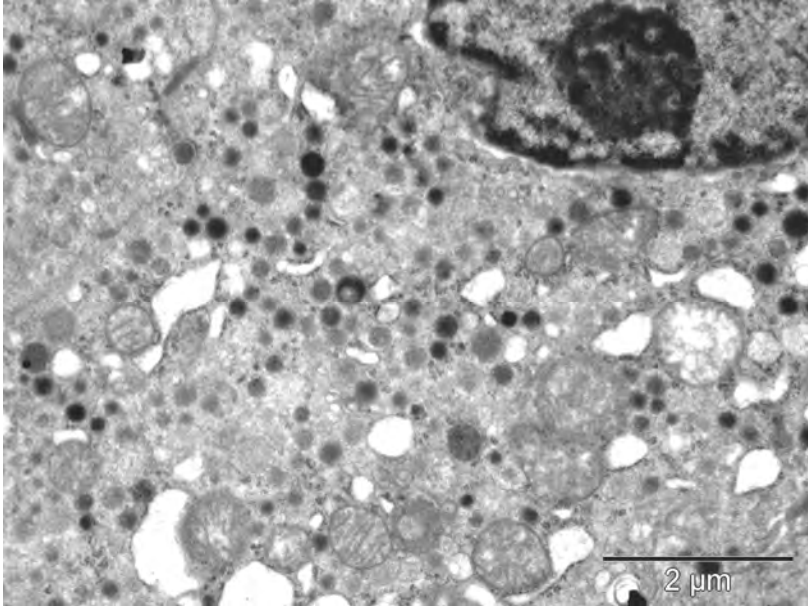


Fig. 7. Celulă producătoare de adrenalină: Nucleol proeminent; dilatarea RE; mitocondrii cu matricea rarefiată; multe granule sunt imature – MSR lotul TS2.

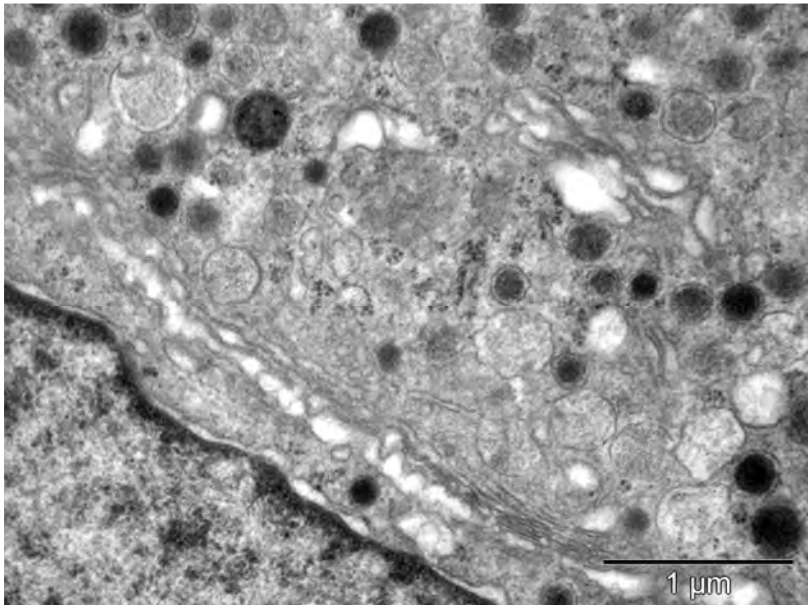


Fig. 8. Celulă producătoare de adrenalină: dilatarea RE; granule mature și vezicule fără conținut sau imature lângă aparatul Golgi – MSR lotul TS2.



Aceasta este o explicație a faptului că în imaginile noastre, în celulele cu activitate secretorie intensă apar și vezicule goale, lipsite de conținut, alături de granulele electrodense. Pe de altă parte, chiar dacă forma aberantă a nucleului semnifică de multe ori o suferință celulară, nucleolii proeminenți, alături de dilatarea reticulului endoplasmic rugos și a aparatului Golgi confirmă prezența unei activități metabolice încă intense la 30 de zile de administrare a veninului de albine.

Eliberarea catecolaminelor din MSR este vitală pentru adaptarea circulației vasculare la consumul energetic pe care îl presupun reacțiile metabolice de răspuns la stres. Deși adrenalina răspunde de vasodilatație și implicit pentru creșterea fluxului sanguin doar în principalele organe vitale [1], apare și efectul direct al componentelor veninului, generând o dilatație generală pe vasele mici [13]. Catecolaminele eliberate ca răspuns la agentul stresant produc modificări ale activității secretorii în celelalte glande endocrine, dar și efecte directe în majoritatea țesuturilor întrucât receptorii specifici pentru catecolamine ( $\alpha$  și  $\beta$ -adrenergici) sunt repartizați diferențiat în organism. Dintre aceste efecte sunt importante de menționat inhibarea secreției de insulină (prin receptori  $\alpha$ ) și stimularea metabolismului prin mobilizarea rezervelor de energie prin glicogenoliză hepatică (prin intermediul ambelor tipuri de receptori  $\alpha$  și  $\beta$ ) și [5]. Datele noastre biochimice arată o creștere a glicemiei cu 18,9% ( $p=0,009$ ) [9], dar în schimb am întâlnit o valoare foarte redusă a colesterolului [11].

Deși stimularea MSR este persistentă, aspectul per ansamblu al granulelor de secreție, dar mai ales numărul mare de granule imature poate avea și semnificația unui debut al epuizării fiziologice a glandei. Acest fapt se datorează, pe de o parte, afectării ultrastructurii mitocondriale sub impactul moleculelor din venin [6, 13], ce va fi urmată de reducerea necesarului de ATP indispensabil reacțiilor biochimice de conversie tirozină-dihidroxifenilalanină (dopa), dopa-dopamină, dopamină-noradrenalină și noradrenalină-adrenalină, dar și de o scădere a producției de dopa la nivel mitocondrial [4]. Pe de altă parte, pe lângă prezența Mg-ATP, reacția este stimulată și de acidul ascorbic la concentrații milimolare [20], biosinteza noradrenalinei în MSR depinzând de concentrația acidului ascorbic din citoplasmă. Aceste aspecte sunt importante în cazul studiului nostru, deoarece veninul de albine administrat subcronic afectează activitatea normală a întregului organism, Ca urmare, modificările morfo-fiziologice determinate în intestin la administrarea îndelungată a veninului de albine (rezultate preliminare) sunt urmate de o reducere a absorbției vitaminei C. Acest fapt va tinde să afecteze producția de hormoni atât în CSR dar și în MSR (organe recunoscute pentru unele dintre cele mai ridicate nivele de vitamină C din organism), procese pentru care acidul ascorbic este indispensabil [3, 22]. Trebuie menționat în același context și faptul că în urma tratamentului subcronic cu venin de albine este afectat și ficatul [8, 9], la nivelul căruia se va reduce treptat producția de tirozină, punctul de plecare pentru sinteza noradrenalinei și adrenalinei în medulosuprarenală [27]. Astfel, în condiții de stres prelungit, va scădea treptat rata conversiei precursorilor la catecolamine și implicit, tot mai multe vezicule vor persista imature pentru o perioadă mai îndelungată de timp. Numărul mare de granule

imature este justificat și prin epuizarea fiziologică a celulelor corticotrope din adenohipofiză (date în curs de publicare) unde am observat prezența lor predominantă, alături de rare granule mature. Consecința o reprezintă reducerea nivelului plasmatic al ACTH. Yoshida-Hiroi și colaboratorii [26] au raportat scăderea nivelului plasmatic al adrenalinei și prezența în celulele cromafine a veziculelor goale, lipsite de conținut la animale deficiente în ce privește receptorul pentru CRH, tratamentul cu ACTH fiind urmat de o revenire, fără a se atinge însă nivelele normale. În cazul nostru, deși semnalizarea paracrină prin hormonii glucocorticoizi se reduce, stimularea MSR se menține la un nivel înalt sub influența nervoasă.

**Concluzii.** Veninul de albine constituie un puternic factor stresant pentru organismul animal, administrarea subcronică a acestuia declanșând o reacție importantă de răspuns a glandelor medulosuprenale. Aspectul celulelor secretoare de adrenalină este caracteristic stărilor prelungite de stres, dar activitatea lor secretorie se menține la un nivel crescut. Prezența într-o proporție mare a granulelor imature arată o iminentă epuizare fiziologică a glandei care s-ar putea instala în condițiile prelungirii tratamentului.

## BIBLIOGRAFIE

1. Bloom, W., Fawcett, D. W., *A Textbook of Histology*. 10<sup>th</sup> Ed., Saunders, Philadelphia, 1975.
2. Bornstein, S. R., Tian, H., Haidan, A., Bottner, A., Hiroi, N., Eisenhofer, G., McCann, S. M., Chrousos, G. P., and Roffler-Tarlovi, S., *Deletion of tyrosine hydroxylase gene reveals functional interdependence of adrenocortical and chromaffin cell system in vivo*, "PNAS", **97** (26), 2000, 14742-14747.
3. Bornstein, S. R., Yoshida-Hiroi, M., Sotirou, S., Levine, M., Hartwig, Nussbaum, R. L., and Eisenhofer, G., *Impaired adrenal catecholamine system function in mice with deficiency of the ascorbic acid transporter (SVCT2)1*, "FASEB J.", **17**, 2003, 1928-1930.
4. Coculescu, M. G., Ștefănescu, A. M., *Medulosuprenală*, în Teodorescu Exarcu, I. (sub red.), *Fiziologia și fiziopatologia sistemului endocrine. Partea I*, p. 614-639, Ed. Medicală, București, 1989.
5. Coculescu, M. G., Antipa, C., *Fiziologia medulosuprenalei și catecolaminelor circulante*, în Teodorescu Exarcu, I. (sub red.), *Fiziologia și fiziopatologia sistemului endocrine. Partea I*, p. 640-666, Ed. Medicală, București, 1989.
6. Diaz-Achirica, P., *Permeabilization of the mitochondrial inner membrane by short cecropin-A-melittin hybrid peptides*, "Eur. J. Biochem.", **224**, 1994, 257-263.
7. Ehrhart-Bornstein, M., Hinson J. P., Bornstein, S. R., Scherbaum, W. A., Vinson, G. P., *Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis*, "Endocr. Rev." **19** (2), 2005, 101-143.
8. Florea, A., Crăciun, C., Puică, C., Gherghel, P., Oprea, M. C., *Hepatotoxicitatea veninului de albine. Studiu histologic și ultrastructural*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **48** (1), 2003, 49-66.

9. Florea, A., Pure, D., Oprea, M. C., Gherghel, P., Crăciun, C., *Blood changes in experimental subchronic rat envenomation with honey bee (Apis mellifera L.) venom*, "Bull. Mol. Med.", **15-17**, 2003, 19-26.
10. Florea, A., Crăciun, C., *Neuromodulatori din veninul de albine*, "Farmacia", **LII** (6): 2004, 23-34.
11. Florea, A., Crăciun, C., Puică, C., *Modificări structurale și ultrastructurale produse în glandele suprarenale după administrarea experimentală a veninului de albine (Apis mellifera L.) II. Glandele corticosuprarenale*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **50** (2), 2005, 111-126.
12. Gelderblom, R., *Collecting bee venom – The other way*, "Hivelights", **13** (4), 1997, 12-13.
13. Habermann, E., *Bee and wasp venoms. The biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed*, "Science", **177**, 1972, 314-322.
14. Hayat, M. A., *Principles and techniques of electron microscopy – Biological applications*. 4<sup>th</sup> Ed., Cambridge University Press, Cambridge, 2000.
15. Jena, B. P., Cho, S. J., Jeremic, A., Stromer, M. H., and Abu-Hamdah, R., *Structure and composition of the fusion pore*, "Biophys. J.", **84**, 2003, 1337-1343.
16. Jeremic, A., Kelly, M., Cho, S. J., Stromer, M. H., and Jena, B. P., *Reconstituted fusion pore*, "Biophys. J.", **85**, 2003, 2035-2043.
17. Kang S. S., Pak S. C., Choi S. H., *The effect of whole bee venom on arthritis*. "Am. J. Chin. Med.", **30**, 2002, 73-81.
18. Laroche, S. M., Pinxteren, J. A., Van Reempts, P. J., De Potter, W. P., Weyns, A. A., Verhofstad, A. A., Van Acker, K. J., *Ontogeny of epinephrine, norepinephrine, dopamine-beta-hydroxylase, and chromogranin A in the adrenal gland of pigs*, "Am. J. Vet. Res.", **57** (7), 1996, 1074-1079.
19. McEwen B. S., *The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance*, "Brain Res.", **886**, 2000, 172-189.
20. Morita, K., Levine, M., Pollard, H. B., *Stimulatory effect of ascorbic acid on norepinephrine biosynthesis in digitonin-permeabilized adrenal medullary chromaffin cells*, "J. Neurochem.", **46** (3), 1986, 939-945.
21. Mureșan, E., Gaboreanu, M., Bogdan, A. T., Baba, A. I., *Tehnici de histologie normală și patologică*, Ed. Ceres, București, 1974.
22. Patak, P., Willenberg, H. S, Bornstein, S. R., *Vitamin C is an important cofactor for both adrenal cortex and adrenal medulla*, "Endocr. Res.", **30** (4), 2004, 871-875.
23. Ploaie, P. G., Petre, Z., *Introducere în microscopia electronică cu aplicații în biologia celulară și moleculară*. Ed. Acad. Rom. București, 1979.
24. Popescu, N., *Unele măsuri necesare pentru menținerea purității și calității veninului de albine*. "Apic. România", **1**, 1990, 13-14.
25. Stevens, A., Lowe, J. S., *Human Histology*, Ed. Mosby, Baltimore, 1997.
26. Yoshida-Hiroi, M., Bradbury, M. J, Eisenhofer. G., Hiroi, N., Vale, W. W, Novotny, G. E, Hartwig, H. G, Scherbaum, W. A, Bornstein, S, R., *Chromaffin cell function and structure is impaired in corticotropin-releasing hormone receptor type 1-null mice*, "Mol. Psychiatry", **7** (9), 2002, 967-974.
27. Zranca E., Mogoș V., Găleşanu C., Vulpoi C., Preda C., Brănișteanu D., Ungureanu C., Gălușcă B., *Endocrinologie. Ghid de diagnostic și tratament în bolile endocrine*, Ed. Polirom, Iași, 1999.

## CERCETĂRI PRIVIND DINAMICA CREȘTERII ȘI A FERMENTĂRII GLUCIDELOR LA O TULPINĂ DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* UTILIZATĂ ÎN INDUSTRIA SPIRTULUI

MIHAIL DRĂGAN-BULARDA<sup>\*</sup>, GABRIEL PILCĂ<sup>\*\*</sup>  
și EMESE TUROS<sup>\*\*\*</sup>

**SUMMARY.** - **Researches Concerning the Growth Dynamic and Glucides Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* Strains Used in Spirit Industry.** We have determined the dynamic of the growth and the fermentation of glucides in four natural media (hopsless malt wort, apple juice, cyder and maize mash) on a spirit strain of *Saccharomyces cerevisiae*. The fermentation speed was estimated depending on the quantity of formed CO<sub>2</sub> related to the volume unit (g CO<sub>2</sub> released by 1 l medium in one hour). The alcohol quantity was calculated. In order to determine the multiplication speed, the Km coefficient was calculated. It indicates the number of new cells formed during one hour. It was determined also, the glucose consumption. It was established that among the 4 natural media indicated above, the highest alcohol production was obtained on the hopsless malt wort, followed by the cyder and the maize mash, respectively. The fewest alcohol production was obtained in the apple juice medium. As it concerns the glucose consumption, the medium with 8.4% glucose provided an appreciable growth of spirit yeast, while for the other two concentrations (2.1% and 21.5%) an inadequate growth was observed, that means a complete consumption after 24 hours or that it produced a substrate inhibition phenomenon.

În fermentația alcoolică a diferitelor sucuri zaharate naturale, în condiții industriale, prezintă interes în special drojdiile de spirt din speciile *Saccharomyces cerevisiae* sau *Sacch. uvarum*. Caracteristicile procesului industrial de fermentație alcoolică depinde într-o foarte mare măsură de tulpina de drojdie utilizată ca agent de fermentație [1, 5-7].

În alegerea unor tulpini de drojdie pentru un proces fermentativ sunt luate în considerație câteva caracteristici ale acestora cum sunt rata înaltă de creștere și iar fermentația capacitatea fermentativă ridicată, să fie glucozo- și etanolotolerantă, respectiv osmotolerantă, să aibă randamente bune la temperaturi cât mai ridicate și să nu fie sensibile la factori fizici și chimici [2, 4, 8-10]

În lucrarea de față au fost efectuate cercetări asupra unei tulpini de drojdie utilizate în industria spirtului, la care s-a urmărit dinamica creșterii și fermentarea unor produse naturale zaharate, precum și gradul de utilizare a glucozei.

---

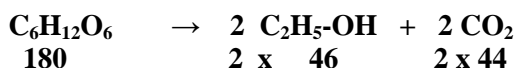
<sup>\*</sup> Universitatea „Babeș-Bolyai”, Catedra de Biologie Experimentală, 400084 Cluj-Napoca, România.  
E-mail: draganb@bioge.ubbcluj.ro

<sup>\*\*</sup> Reghin, str. Cosminului nr.30; e-mail: pilcagabriel2003@yahoo.com

<sup>\*\*\*</sup> Universitatea „Babeș-Bolyai”, Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică;

**Material și metode.** S-a întreprins un studiu, în cadrul laboratorului de Microbiologie și Biotehnologii microbiene, în care s-a urmărit dinamica creșterii unei tulpini de *Saccharomyces cerevisiae* utilizată în industria spirtului, în procesul de fermentație alcoolică desfășurat pe patru medii naturale zaharate (must de malț nehameiat, suc de mere Reghin, cidru și borhot de porumb). Tulpina de drojdie utilizată a fost o cultură pură de *Saccharomyces cerevisiae* folosită în industria spirtului (tulpina Arad), a cărei puritate a fost verificată și realizată pe mediul Saburaud.

Fermentația alcoolică a mediilor naturale zaharate s-a realizat la 28°C timp de 9 zile, în vase de fermentație cu ventil [3]. Volumul mediului lichid natural a fost de 250 ml (sterilizat în prealabil prin autoclavare la 105°C, timp de 30 minute, în două zile consecutive). Inoculul s-a preparat din cultura pură de *Saccharomyces cerevisiae* tulpina de spirt Arad pe mediul solid, transpusă în eprubete cu 10 ml must de malț cu concentrație de 6° Balling steril, termostată 24 de ore la 28°C. Pentru fiecare variantă de lucru s-au folosit trei vase de fermentație, calculându-se valoarea medie pentru fiecare parametru determinat. Viteza de fermentație s-a apreciat în funcție de cantitatea de CO<sub>2</sub> format, raportată la unitatea de volum a mediului (g CO<sub>2</sub> eliberat de 1 L mediu într-o oră). Cantitatea de alcool etilic formată s-a calculat prin conversia în alcool a pierderilor în CO<sub>2</sub> acumulate în perioada de fermentație, conform ecuației globale a fermentației alcoolice:



Din acest bilanț, se calculează:

$$A = Q_t \cdot 46/44 = 1,045 \cdot Q_t \text{ [g] alcool absolut}$$

În același mod se poate calcula cantitatea de zahăr fermentat:

$$Z = Q_t \cdot 180/88 = Q_t \cdot 2,045 \text{ [g] zahăr fermentat.}$$

Se poate deduce și intensitatea fermentației exprimată prin cantitatea de zahăr fermentat (Zf) în procente față de zahărul inițial (Zi), după un anumit interval de fermentație:

$$R = (Z_f / Z_i) \cdot 100$$

[20]

Dinamica creșterii s-a realizat prin determinarea numărului de celule cu ajutorul camerei Thoma. Numărul de celule prezente într-un ml de lichid analizat s-a calculat pe baza următoarei formule :  $N = n \times 4000 \times 1000 \times k$

unde, n - numărul mediu de celule pe microcelulă

4000 - volum microcelulă (mm<sup>3</sup>)

1000 - factor de transformare în ml (cm<sup>3</sup>)

k - coeficient de diluție

[20]

Pentru stabilirea vitezei de înmulțire s-a calculat coeficientul  $K_m$ , care exprimă numărul de celule noi ce se formează pentru fiecare celulă existentă, în timp de o oră, cu ajutorul formulei:

$$K_m = 2,3 (\log N_2 - \log N_1) / t_2 - t_1, \text{ unde}$$

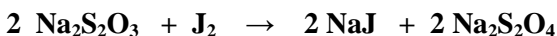
$N_1$  - numărul inițial de celule introduse prin inocul sau existent la timpul  $t_1$  al determinării;

$N_2$  - numărul de celule format în intervalul  $t_2-t_1$ .

În plus, s-a determinat și consumul de glucoză, tot în vase de fermentație, după metodologia descrisă mai sus, folosind 3 concentrații de glucoză : 2,1, 8,4 și 21,5 % . Glucoza s-a adăugat la mediul mineral De Donder [3] cu următoarea compoziție:  $(NH_4)_2 SO_4$  3,3 g,  $K_2HPO_4$  12,25 g,  $KH_2PO_4$  4,08 g,  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  0,123 g,  $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$  0,0022 g,  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$  0,0144 g,  $Fe_2(SO_4)_3$  0,02 g,  $Ca Cl_2$  siccum 0,183 g,  $H_2O$  distilată ad 1000 ml. Sterilizarea mediului s-a efectuat la  $105^{\circ}C$ , 30 de minute în 3 zile consecutive. Dozarea glucozei s-a realizat prin oxidarea cu iod în condiții alcaline. În mediul alcalin, glucoza este oxidată de către iod la acid gluconic, care trece în glucono- $\gamma$ -lactonă:



Excesul de iod din mediu este titrat cu tiosulfat de Na, rezultând tetrionat de Na:



Ca indicator se folosește amidonul. Concentrația glucozei în proba de analizat se exprimă în g/L.

**Rezultate și discuții.** Datele experimentale obținute sunt prezentate în Tabelele 1-4, respectiv în fig. 1- 6.

În tabelul 1 sunt trecute datele privind creșterea celulelor de drojdie din specia *Saccharomyces cerevisiae* tulpina de spirt Arad pe mediu cu malț nehameiat. Se poate constata că degajarea de bioxid de carbon crește până în ziua a 3-a de fermentație (72 de ore) după care scade progresiv până în ziua a 9-a (192 de ore). În paralel cu creșterea cantității de  $CO_2$  degajat crește și numărul de celule numărate și de la sine-nțeleș și numărul total de celule, înregistrându-se valoarea maximă după 72 de ore ( $15,780 \cdot 10^6$  celule). Tot la intervalul de 72 de fermentare se înregistrează și cantitatea cea mai ridicată de alcool format, respectiv cantitatea cea mai însemnată de zahăr fermentat. De asemenea, se constată un paralelism între cantitatea de alcool format și cea de zahăr fermentat.

Dacă urmărim dinamica formării  $CO_2$ , pe mediu cu malț nehameiat (Fig.1) respectiv dinamica creșterii celulelor drojdiei de spirt Arad (Fig.2) se pot evidenția toate fazele de creștere enumerate de Monod. Când fermentația a atins maximul de intensitate (72 de ore) se poate constata și micșorarea numărului de celule care scade foarte mult până aproape la zero.

Creșterea celulelor de *Saccharomyces cerevisiae* tulpina de spirt Arad pe mediu de fermentație cu suc demere Reghin diluat în proporție de 1: 10 este prezentat în Tabelul 2.

Tabel 1.

**Evoluția creșterii celulelor de drojdie de spirt (*Saccharomyces cerevisiae*) tulpina Arad, pe mediu cu malț neameiat**

Ziua	Timp [h]	28 °C									
		CO <sub>2</sub> [g]	nr. celule numărate	nr. celule total	log nr. celule (N) total	LogN2-LogN1	T2-t1	Km=2,3* (logN2-logN1) / (t2-t1)	Qt (g)	A (g) alcool format	Z (g) zahăr fermentat
1	0	0	1,43	0,640*10 <sup>6</sup>	5,8041				0	0	0
2	24	0,5	2,8	1,250*10 <sup>6</sup>	6,0949	0,29	24	0,027792	0,5	0,5225	1,0225
3	48	3,71	34,25	15,250*10 <sup>6</sup>	7,1824	1,09	24	0,104458	3,71	3,877	7,587
4	72	5,21	35,5	15,780*10 <sup>6</sup>	7,27	0,09	24	0,008625	5,21	5,4445	10,654
5	96	1	30	13,340*10 <sup>6</sup>	7,26	-0,01	24	-0,00096	1	1,045	2,045
6	120	0,3	22,5	10,000*10 <sup>6</sup>	7,1	-0,16	24	-0,01533	0,3	0,3135	0,6135
7	144	0,23	20,83	9,260*10 <sup>6</sup>	6,81	-0,29	24	-0,02779	0,23	0,2404	0,4704
8	168	0,1	1,75	0,780*10 <sup>6</sup>	5,8908	-0,92	24	-0,08817	0,1	0,1045	0,2045
9	192	0,07							0,07	0,0732	0,1432
10	216	0							0	0	0

pH = 4,5

Tabel 2.

**Evoluția creșterii celulelor de drojdie de spirt *Saccharomyces cerevisiae* tulpina Arad pe mediu cu suc de mere – Reghin**

Ziua	Timp [h]	28 °C									
		Greutate [g]	CO <sub>2</sub> [g]	nr. celule numărate	Nr. celule total (N)	log nr. celule	LogN2-LogN1	t2-t1	Km=2,3* (logN2-logN1) / (t2-t1)	A (g) alcool format	Z (g) zahăr fermentat
1	0	738,08	0	1	4,4450*10 <sup>5</sup>	5,6478				0	0
2	12	738	0,08	1	4,4450*10 <sup>5</sup>	5,6478	0	24	0	0,0836	0,1636
3	24	737,79	0,21	2	8,8890*10 <sup>5</sup>	5,9488	0,30103	24	0,02885	0,2195	0,4295
4	48	736,25	1,54	3	13,340*10 <sup>5</sup>	6,1249	0,17609	24	0,01688	1,6093	3,1493
5	72	734,3	1,95	2,3	10,230*10 <sup>5</sup>	6,0095	-0,1154	24	-0,0111	2,0378	3,9878
6	96	733,33	0,97	1	4,4450*10 <sup>5</sup>	5,6478	-0,3617	24	-0,0347	1,0136	1,9836
7	120	733,2	0,13	1	4,4450*10 <sup>5</sup>	5,6478	0	24	0	0,1358	0,2658
8	144	733,07	0,13								
9	168	732,89	0,18								
10	192	732,8	0,09								

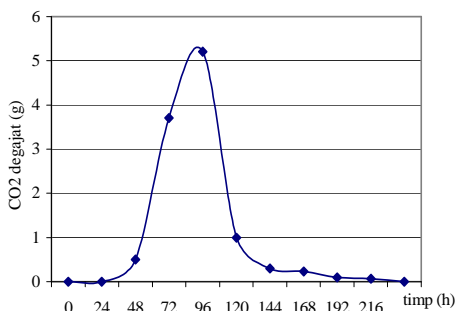


Fig.1 Dinamica formării CO<sub>2</sub>

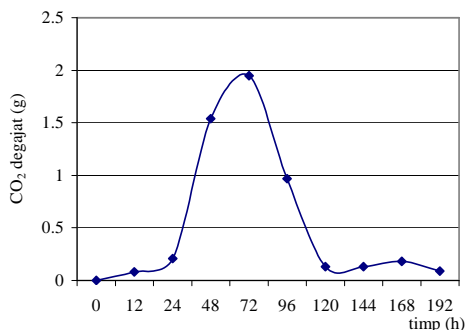


Fig.3 Dinamica formării CO<sub>2</sub> pe mediu cu suc de mere

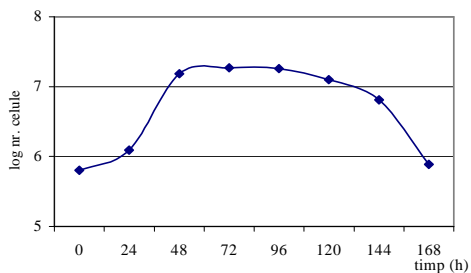


Fig.2 Dinamica creșterii celulelor de drojdie de spirt (*Saccharomyces cerevisiae*) la 28°C

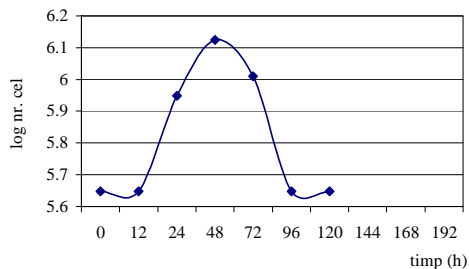


Fig. 4 Dinamica creșterii celulelor de *Saccharomyces cerevisiae* pe mediu cu suc de mere

Se constată că fermentația alcoolică a decurs aproximativ în mod asemănător cu ceea ce s-a prezentat în cazul folosirii mustului de malț nehameiat, în sensul că intensitatea fermentației se înregistrează tot după 3 zile dar cu o intensitate mai redusă (o cantitate mai mică de bioxid de carbon degajat, respectiv un număr mult mai mic de celule de drojdie) (Fig. 3 și 4) ceea ce se repercutează și asupra cantității de alcool format, respectiv asupra cantității de zahăr fermentat.

Este de adăugat că o cauză ar putea fi și gradul de diluție mai puțin corespunzător, respectiv existența în suc de mere a unor eventuale substanțe conservante care să influențeze creșterea celulelor de drojdie. De asemenea, nu am dispus de o concentrație a glucidelor totale din suc și nici a celor fermentescibile. Numai în acest mod putem explica reducerea celor doi parametri amintiți mai sus, comparativ cu ceea ce s-a înregistrat la mediul cu malț nehameiat.

Un alt mediu natural zaharat a cărei fermentație alcoolică a fost urmărită l-a constituit cidrul preparat tot de o firmă din Reghin. Datele obținute de noi în urma utilizării tulpinii Arad de *Saccharomyces cerevisiae* sunt redată în tabelul 3.



Tabel 3

**Evoluția creșterii celulelor de drojdie *Saccharomyces Cerevisiae* tulpina Arad pe mediu cu cidru (Reghin)**

Ziua	Timp [h]	28 °C									
		Greutate [g]	CO <sub>2</sub> [g]	nr. celule numărate	Nr. celule total (N)	log nr. celule	LogN <sub>2</sub> -LogN <sub>1</sub>	t <sub>2</sub> -t <sub>1</sub>	Km=2,3* (logN <sub>2</sub> -logN <sub>1</sub> ) / (t <sub>2</sub> -t <sub>1</sub> )	A (g) alcool format	Z (g) zahăr fermentat
1	0	574,04	0	1	4,4450·10 <sup>5</sup>	5,6478				0	0
2	12	573,91	0,13	5,83	25,920·10 <sup>5</sup>	6,4134	0,76567	24	0,07338	0,1358	0,2658
3	24	571,92	1,99	8,40	37,340·10 <sup>5</sup>	6,5720	0,15861	24	0,0152	2,0796	4,0696
4	48	569,32	2,60	8,02	35,650·10 <sup>5</sup>	6,5519	-0,0201	24	-0,0019	2,7170	5,3170
5	72	568,99	0,33	6,20	27,560·10 <sup>5</sup>	6,4402	-0,1118	24	-0,0107	0,3449	0,6749
6	96	568,75	0,24	4,00	17,780·10 <sup>5</sup>	6,2498	-0,1903	24	-0,0182	0,2508	0,4908
7	120	568,64	0,11	2,00	8,8890·10 <sup>5</sup>	5,9488	-0,3010	24	-0,0288	0,1150	0,2250
8	144	568,52	0,12	1,05	4,6670·10 <sup>5</sup>	5,6690	-0,2798	24	-0,0268	0,1254	0,2454
9	168	568,22	0,30	1,00	4,4450·10 <sup>5</sup>	5,6478	-0,0212	24	-0,0020	0,3135	0,6135

Se constată rezultate mai bune privind producția de alcool și a cantității de zahăr fermentat, comparativ cu cele înregistrate la utilizarea mediului cu suc de mere. Dar și de această dată, parametrii urmăriți sunt mai reduși în comparație cu cei găsiți la fermentarea mustului de malț nehamaiat. Nici la acest mediu nu s-a cunoscut concentrația în glucide fermentescibile. Oricum, este de remarcat că în cazul folosirii cidrului fermentația alcoolică este maximă după 44,4 ore, cantitatea de alcool format fiind totuși însemnată, iar numărul de celule fiind și el destul de ridicat (Fig. 5 și 6).

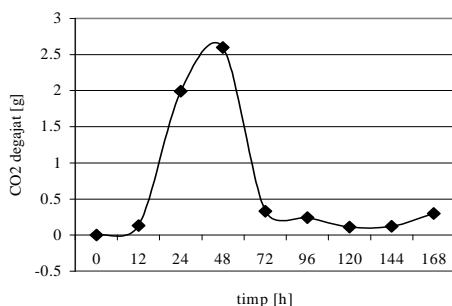


Fig.5 Dinamica formării CO<sub>2</sub> pe mediu cu cidru

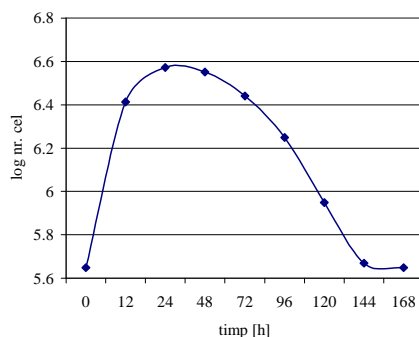
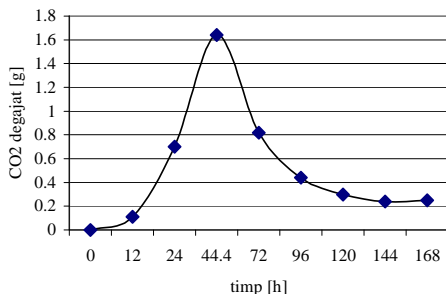
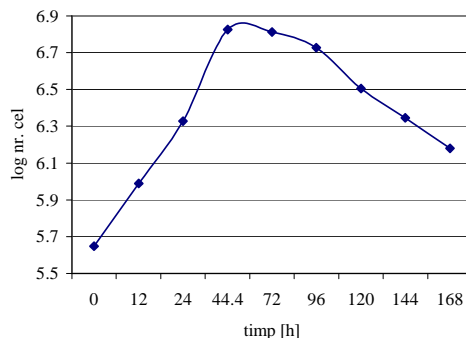


Fig. 6 Dinamica creșterii celulelor de *Saccharomyces cerevisiae* pe mediu cu cidru

DINAMICA CREȘTERII TULPINII DE SPIRT SACCH. CEREVISIAE ARAD



Fi g. 7. Dinamica formării CO<sub>2</sub> pe mediu cu borhot de porumb



Fi g. 8 Dinamica creșterii celulelor de Saccharomyces cerevisiae pe mediu cu borhot de porumb

Rezultatele obținute în urma fermentării borhotului de porumb (de la Fabrica de spirt Gherla) cu drojdia de spirt *Saccharomyces cerevisiae* tulpina Arad sunt trecute în tabelul 4. Din analiza datelor reiese că și acest mediu natural zaharat permite obținerea unei producții de alcool asemănătoare cu cea înregistrată la fermentarea sucului de mere. Intensitatea fermentației alcoolice s-a înregistrat după 44,4 ore, după care scade atât cantitatea de alcool formată, cât și cea de zahăr fermentat (vezi și fig. 7 și 8). Se constată un paralelism între producția de alcool și cea de zahăr fermentat, cu o singură excepție, cele calculate după 8 zile de fermentație.

Tabel 4

**Evoluția creșterii celulelor de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* tulpina Arad pe mediu cu borhot de porumb (Gherla)**

Ziua	Timp [h]	28 °C									
		Greutate [g]	CO <sub>2</sub> [g]	nr. celule numărate	Nr. celule total (N)	log nr. celule	LogN2-LogN1	t2-t1	Km=2,3*(log N2-logN1) / (t2-t1)	A (g) alcool format	Z (g) zahăr fermentat
1	0	605,13	0	1	4,450·10 <sup>5</sup>	5,6478				0	0
2	12	605,02	0,11	2,2	9,780·10 <sup>5</sup>	5,9902	0,34242	24	0,03282	0,115	0,225
3	24	604,32	0,70	4,8	21,340·10 <sup>5</sup>	6,3290	0,33882	24	0,03247	0,7315	1,4315
4	44,4	602,68	1,64	15,1	67,120·10 <sup>5</sup>	6,8267	0,49774	24	0,0477	1,7138	3,3538
5	72	601,86	0,82	14,6	64,890·10 <sup>5</sup>	6,8121	-0,0146	24	-0,0014	0,8569	1,6769
6	96	601,42	0,44	12,0	53,340·10 <sup>5</sup>	6,7269	-0,0852	24	-0,0082	0,4598	0,8998
7	120	601,12	0,30	7,2	32,000·10 <sup>5</sup>	6,5051	-0,2218	24	-0,0213	0,3135	0,6135
8	144	600,88	0,24	5,0	22,230·10 <sup>5</sup>	6,3467	-0,1584	24	-0,0152	0,2508	0,4908
9	168	600,63	0,25	3,4	15,120·10 <sup>5</sup>	6,1792	-0,1675	24	-0,0161	0,2613	0,5113

**Determinarea consumului de glucoză la *Saccharomyces cerevisiae* tulpina Arad**

timp (h)	2,1 %	8,4 %	21,5 %
0	21	84	215
6	6	78	212
24	0	65	198
48	0	39	180
72	0	11	161
118	0	0	146
142	0	0	120
168			106
192			98
216			85
240			80

Consumul de glucoză în timpul fermentației alcoolice cu cele 3 concentrații de glucoză de către celulele drojdiei de spirt *Saccharomyces cerevisiae* tulpina Arad este trecut în tabelul 5.

Se constată că la concentrația substratului fermentescibil de 2,1 %, toată glucoza se consumă foarte rapid, în 24 de ore. Acest rezultat demonstrează că drojdia studiată nu poate să producă mult alcool, glucoza fiind epuizată după 24 ore de cultivare. O altă constatare importantă este aceea că la concentrații mari cum este cea de 21,5 % apare fenomenul de inhibiție de substrat, creșterea și activitatea drojdiilor fiind inhibate, în principal din cauza presiunii osmotice ridicate, iar glucoza rămâne practic neconsumată. La concentrația de 8,4 % evoluția consumului de glucoză este optimă, așa după cum se poate observa și în fig. 9. Practic după 118 ore, glucoza a fost epuizată din mediul de fermentație.

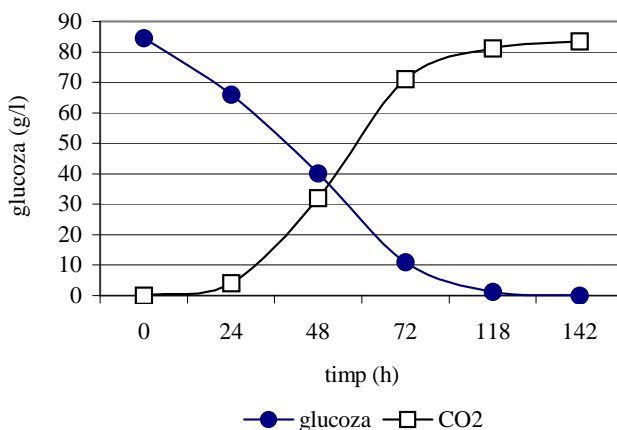


Fig. 9 Consumul de glucoză și formarea CO<sub>2</sub>

Se mai poate constata că pe măsură ce descrește cantitatea de glucoză, crește cantitatea de CO<sub>2</sub> degajat. Se poate aprecia că în funcție de cantitatea de substrat fermentescibil tulpina Arad a drojdiei de spirt *Saccharomyces cerevisiae* poate fi utilizată cu succes în industria spirtului, producția de alcool fiind influențată de natura mediului natural zaharat.

**Concluzii.** 1. Drojdia de spirt studiată, *Saccharomyces cerevisiae* tulpina Arad, s-a dovedit a fi bună producătoare de alcool în funcție de mediul natural zaharat fermentat (must de malț nehameiat, suc de mere- Reghin, cidru-Reghin și borhot de porumb-Gherla).

2. Cea mai bună producție de alcool s-a obținut în urma fermentării mustului de malț nehameiat, după care a urmat cea obținută prin fermentația cidrului și a borhotului de porumb, pe ultimul loc situându-se producția obținută la fermentarea sucului de mere.

3. Pe baza consumului de glucoză din mediu de fermentație s-a constatat că numai concentrația de 8,4 % a permis creșterea corespunzătoare a drojdiei de spirt *Saccharomyces cerevisiae* tulpina Arad, celelalte două concentrații (2,1 și 21,5 % glucoză) fiind necorespunzătoare. În cazul primei concentrații (2,1 %), glucoza fiind epuizată după 24 de ore, nu a permis creșterea drojdiei, iar în al doilea caz, concentrația de 21,5 % a fost prea ridicată și a determinat fenomenul de inhibiție de substrat, creșterea și activitatea drojdiei fiind inhibată.

## BIBLIOGRAFIE

1. Anghel, I., Toma, N., Voica, C., Cojocaru, I., *Biologia și tehnologia drojdiilor, Vol.II.*, p.303-324, Ed. Tehn., București, 1989.
2. Banu, C., Vasu, S., Stoicescu, A., Rotaru, G., Borde I, D., Enache, A., Ionescu, A., Mircea, C., *Biotehnologii în industria alimentară (Folosirea enzimelor și microorganismelor în industria alimentară)*, p.80-95, Ed. Tehn., București, 1987.
3. Drăgan – Bularda, M., *Microbiologie generală. Lucrări practice*, Univ. "Babeș-Bolyai", Cluj-Napoca, 2000.
4. Ismail, A. A., Ali, A.M.M., *Selection of high ethanol yielding tolerance and the effect of training on Saccharomyces cerevisiae Hansen*, Folia Microbiol., **16**, 346-349, 1971.
5. Kiss, S., *Microbiologie generală, Vol.II*, p.1-16, Univ. "Babeș-Bolyai", Cluj, 1975.
6. Oprean, L., *Studiul comparativ al însușirilor tehnologice ale unor tulpini de drojzii industriale*, Acta Oecol., Univ. "Lucian Blaga" Sibiu, III,3-4, 63-69, 1996.
7. Oprean, L., *Capacități alcooligene și de multiplicare ale unor tulpini de drojzii industriale*, Stud. Univ. "Babeș-Bolyai", Biol., **41**(1-2),165-168, 1996.
8. Oprean, L., *Drojzii industriale*, p. 180-196, Univ. "Lucian Blaga", Sibiu, 2002.

9. Ribéreau – Gayon, J., Peynaud, E., *Traité d'oenologie : Maturation du raisin. Fermentation alcoolique. Vinification, Vol.I*, p.36-42, Dunod, Paris, 1969.
10. Rose, H. A., Harrison, J. S., *The Yeasts. Vol.II. Physiology and Biochemistry of Yeasts*, Acad. Press, London, 1971.

## THE QUANTITATIVE DISTRIBUTION OF SOME ECOLOGICAL GROUPS OF BACTERIA FROM THE TARNITA DAM RESERVOIR – CLUJ COUNTY

MANUELA CURTICĂPEAN\* and MIHAIL DRĂGAN-BULARDA\*\*

**SUMMARY.** - The Tarnita dam reservoir takes part from big dam reservoirs disposed in a „water fall” system, in upper basin of the Someșul Mic river. The reservoir has the following functions: mainly - energetics, the averting of the floods, to attenuate the floods waves and, in the future, supply with drinking water for Cluj-Napoca city. The study consists in determination of ten ecophysiological groups of bacteria from water and sediment of the lake, involved in recirculation of different organic residue and also in transformation of some mineral substances, from water and sediment of the lake. From both water and sediment of the lake have been established the following ecophysiological groups of bacteria: ammonizing, nitrifying, denitrifying, aerobic and anaerobic sulfur-reducing, sulfur-oxidizing, anaerobic sulfate-reducing, iron-reducing and amilolitic. The samples (fourteen water samples and seven sediment samples) were collected seasonally, from different points and depths. The results of the analyses shown that the number of bacteria from each group showed seasonally variations and variations depending on sampling site. For global establishing of the microorganisms abundance from the water lake and for appreciation of the microbial potential of the sediment, there was elaborated a method for calculation the bacterial indicator of water quality (BIWQ), respectively the sediment quality (BISQ). For obtaining an ensemble image of the complex processes that happen in these habitats with a special signification, the indicators of the quality have been statistically correlated.

The conceptual understanding of the bacteria role in the dam reservoir ecosystems and in the biogeochemical cycles is closely connected with the knowledge of the way in that is checked the growth speed, abundance and their diversity. Although, the bacteria diversity in the dam reservoirs is quite high, but is mostly unknown because of the tracing, measurement, quantification and synthetic methodology difficulties, that appear at all levels from these kind of studies. Taking into consideration the Ward theory from 1976, that each lake has its own characteristics determining the particulate effects, knowledge of the microorganism communities from these media is necessary, their diversity, abundance, and their role in the biochemical processes, for guarantee of some qualitative water reserve, used in a complex way and in a durable development perspective [6].

From the current concerns of the limnology researches, the microbiological and ecological studies of the dam reservoirs have been imposed like an urgent

---

\* *Universitatea de Medicină și Farmacie, Facultatea de Farmacie, Catedra F<sub>1</sub>, Disciplina de Botanică Farmaceutică și Biologie Celulară, str. Gh. Marinescu, nr. 38, 540139, Târgu-Mureș, România, E-mail: manuela\_claudia@yahoo.com*

\*\* *Universitatea „Babeș-Bolyai”, Facultatea de Biologie și Geologie, Catedra de Biologie Experimentală, str. M. Kogălniceanu, nr. 1, Cluj-Napoca, România, E-mail: draganb@bioge.ubbcluj.ro*

necessity, through the fundamental limnology interest and through several aspects with applicative character towards water quality supervision and evolution in time of the big dam reservoirs.

Since 2001, once with registration in the alignment process to the UE Water Framework Directive [28] and with its strategy by lasting development, the biological and microbiological analyses of waters have become a priority comparatively with the physico-chemical ones.

Thus, the dam reservoirs water destined to drinking have to fulfill some quality conditions, before entering in the treatment station. Therefore, according with the Water Framework Directive demands, is essential the thoroughly study of these waters, especially from biological and microbiological point of view, in order to find the impact ways and to apply the suitable control methods for rehabilitation and maintaining of the water quality at a good and very good potential.

The Tarnita dam reservoir, is positioned in the Somesul Mic upper basin that has an area of 3804 km<sup>2</sup> and a length of 167 km [27]. In upper basin of the Somesul Mic river have been build a dam reservoirs succession (big dam reservoirs disposed in a „water fall” system), most important one Fantanele - Tarnita - Somesul Cald - Gilau. The dam of the Tarnita reservoir, positioned upstream the Gilau lake, has been placed into the Somesul Cald valley's narrowing sector. The reservoir depression is sculptured in crystalline schists covered with quaternary sands and gravels [25].

The Tarnita artificial lake, that was opened for use in 1973, represent one of the most severe anthropic effect on the natural course of the Somesul Mic river. The reservoir, with a capacity of 77,4 million m<sup>3</sup> water (220 ha surface, 8 km length) [25], has the following functions: mainly - energetics, the averting of the floods, to attenuate the floods waves and, in the future, supply with drinking water for Cluj-Napoca city [29].

The aquatic microorganisms have a main role in conversion of the animal and vegetal substances in inorganic material, from mineralization processes that restitute the essential nutrients to the photosynthetic organisms, in order to continue their activities. On the global scale, these products make part from the biogeochemical cycles that ensure transformations and recirculation of the biogenic elements in nature (C, N, S, P, Fe, Mn) [12, 18].

The sediments are a very heterogeneous system where the different physical phases (solid, liquid and gases) and numerous biotic (microorganisms, the small organisms, enzymes) and abiotic (minerals, humus materials, organo-minerale aggregate) components are involved in physical, chemical and biological processes. All the biochemical transformations from sediments are depended on the enzymes presence [11].

The sediments constitute a key link in the biogeochemical cycle of the elements in the aquatic systems. There are finalized the mineralisation processes of the organic substances that were not degraded in the water column [20]. The microbiological researches of the bacteria involved in the biogeochemical cycle of

the elements from the sediment of Tarnita dam reservoir, followed the knowledge completion about the complex processes that happen in these habitats, with a special semnification, especially for the ecosystems with an ecological value, like the dam reservoir that suply with drinking water, needs an increased exigency for bacteriological water quality.

The study consists in determination of ten ecophysiological groups of bacteria involved in recirculation of different organically rests and also in transformation of some mineral substances, from water and sediment of the lake.

**Materials and methods.** The bacteriological study was performed on water and sediment samples collected in 2004 from Tarnita dam reservoir.

The water samples were taken seasonally (April, July and October), from surface but also from different depths in a vertical profile of the lake's water. Also, there were taken into account the areas of lakes: dam, middle and tail of the lake. The fourteen sampling sites of the water samples were: Dam-0 m (1), Dam-5 m (2), Dam-10 m (3), Dam-15 m (4), Dam-right border 0 m (5), Dam-left border 0 m (6), Middle lake-0 m (7), Middle lake-5 m (8), Middle lake-10 m (9), Middle lake-beach I right border (10), Middle lake-beach I left border (11), Middle lake-beach II right border (12), Tail lake-right border 0 m (13) and Tail lake-left border 0 m (14). The seven sediment samples were taken also seasonally, in the same time with water samples, at 0-10 cm depth: Dam-right border (1), Dam-left border (2), Middle lake-beach I right border (3), Middle lake-beach I left border (4), Middle lake-beach II right border (5), Tail lake-right border (6) and Tail lake-left border (7).

In order to determine the bacteria number from ten ecophysiological groups (ammonizing, nitrifying, denitrifying, aerobe and anaerobe sulfur-reducing, sulfur-oxidizing, anaerobe sulfate-reducing, iron-reducing and amilolitic) from water and sediment samples of the Tarnita dam reservoir, there were used the elective nutritive media and methods according to Cusa [7] and Dragan-Bularda [8]. Due to the fact that the sediment categories may have a variable water content, that can influence the expression of the microbial charge reporting to the sediment weight, the humidity of each sediment sample was established during their preparation for the analyses [7].

For global determination of the microorganisms abundance from the water lake, for appreciation of the microbial potential of the sediment, for establishing the seasonally evolution of the microorganisms and also for estimating the biological quality of some habitats, there were elaborated methods for calculation of the bacterial indicator of water quality (BIWQ), respectively of sediment quality (BISQ). The methods consist in calculation of the bacteria number that make part to several ecophysiological groups and also the use of the following formula [19]:

$$BIWQ, BISQ = \frac{1}{n} \cdot \sum \log_{10} N,$$

where: BIWQ = the bacterial indicator of water quality; BISQ = the bacterial indicator of sediment quality; n = the number of ecophysiological groups; N = the bacteria number belonging to each ecophysiological group.



By using the GraphPad InStat software demo version 3.05 (2000), the quality indicators have been statistically correlated.

**Results and Discussions.** *The ammonizing bacteria activity.* In water, the number of the ammonizing bacteria was higher with depths and in the beach zones (Fig. 1), being as high as thousands bacteria cells. This may be explained by “biological rain” (residue of the dead organisms) from trophogenic layers until depth zones of the lake [14], that demonstrate the existence of a high quantity of the ammonium substrate [12]. Quite the same distribution has been presented for the following lakes Vaduri, Siriu and Serbanesti [1, 2, 14].

The organic material due to dead organisms is partially degraded in water (the structures easy assimilated), the most intense processes being in sediments.

Seasonally, a general characteristic of the ammonizing bacteria, is an explosive development in autumn, in both water and sediment (Fig. 1). The quantitative increase of them, especially in autumn, resulted by the accumulation of the vegetable and animal detritus material or organic pollutes from discharges, demonstrate the existence of a high quantity of the ammonium substrate [12].

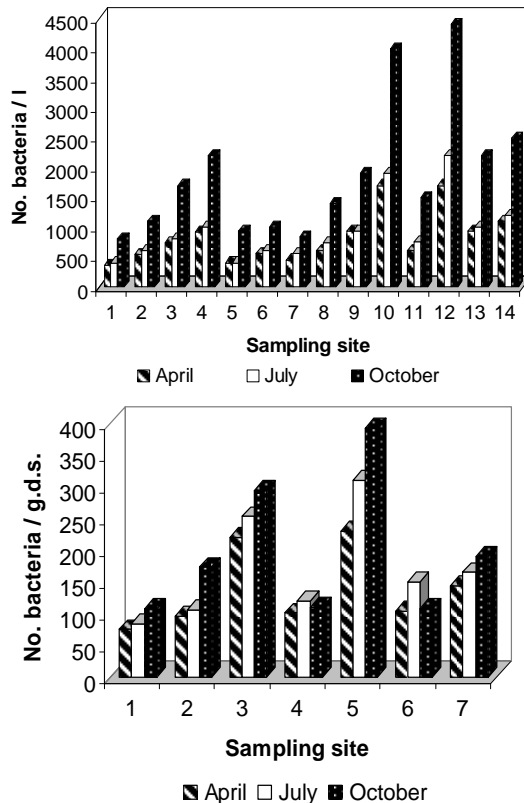


Fig. 1. Representation of the ammonizing bacteria from Tarnita dam reservoir water (left) and sediment (right) (g.d.s. = gram dry sediment)

*The nitrifying bacteria activity.* The nitrifying bacteria (nitrite- and nitrate-bacteria) have a higher activity in surface water and especially in the beach zones. The values at level of thousands, were decreased with depths in water of the lake (Fig. 2 and 3). The nitrifying process represents the final stage of mineralization of the organic ammonium substances. But, not all the organic remains are transformed in nitrates, a big part is stored in sediment form. Because, the nitrifying bacteria are exigent to the water oxygenation degree, is necessary a good water circulation in aquatic basins [21]. The nitrifying bacteria have a higher activity especially in spring and summer (Fig. 2 and 3), both in water and sediment [7, 10].

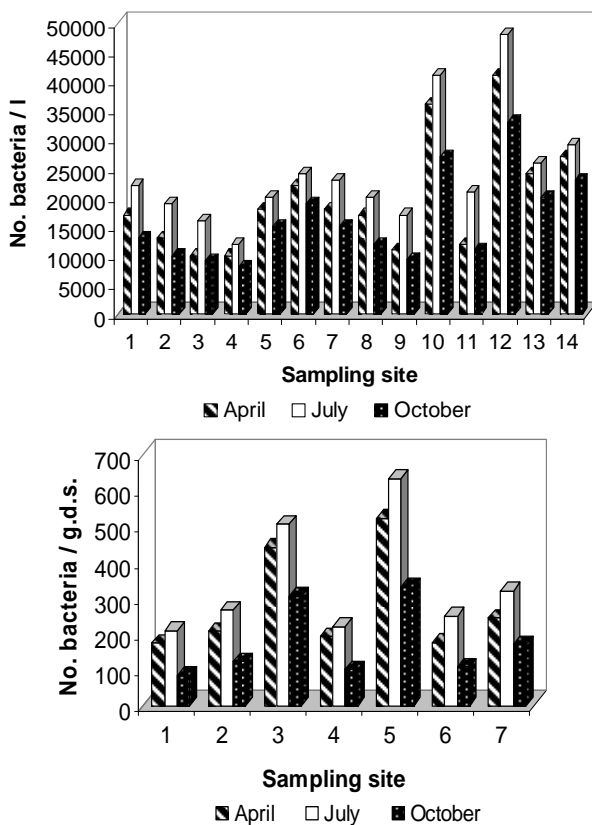


Fig. 2. Representation of the nitrite bacteria from Tarnita dam reservoir water (left) and sediment (right)

*The denitrifying bacteria activity.* The denitrification takes place in mediums with a low aeration, where accumulates big quantities of the organic substances, especially nitrates [24]. Because of this, the denitrification is often present in the dam reservoirs where the aeration degree is lower. But, the denitrification processes are present in water and sediment with a good aeration, because the denitrifying microorganisms are facultative anaerobe.

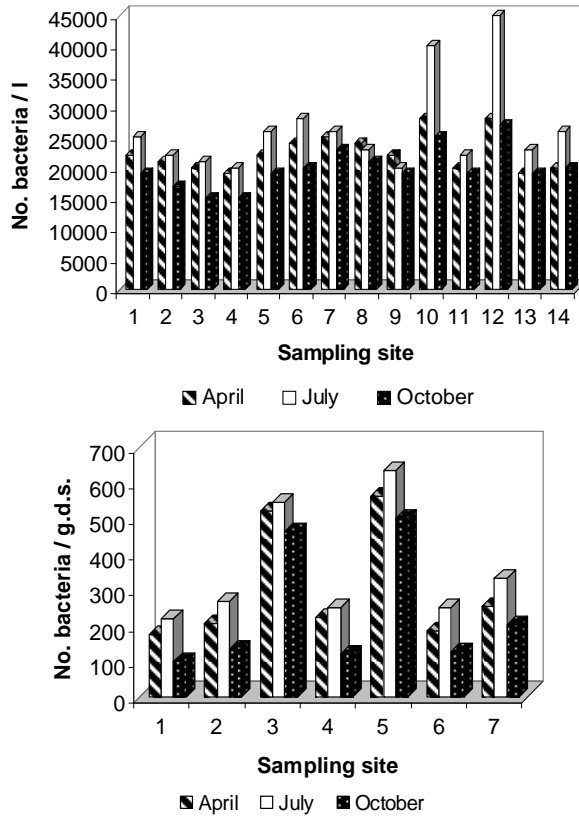


Fig. 3. Representation of the nitrate bacteria from Tarnita dam reservoir water (left) and sediment (right)

In water, the number of the denitrifying bacteria was higher with depths (Fig. 4), presenting variation between hundred of cells to thousands cells in the bottom layers. In addition, the denitrifying bacteria have higher values in the beach zones from the right border of the lake. The denitrifying bacteria, being anaerobe, have a more intense activity in sediment, where have been established values of hundreds cells (Fig. 4). The denitrifying bacteria have a seasonally evolution with higher values in summer and autumn (Fig. 4), especially in sediment, probably due to the detritus deposition [1, 7, 21].

In Tarnita dam reservoir sediment (Fig. 1, 2, 3 and 4) it has been established that all the groups of bacteria involved in the ammonium cycle have shown higher values especially in the peripheral zones from the middle of the lake, in the beach areas (ex. Middle lake-beach I right border and beach II right border). It was appreciated that in the beaches from the peripheral zones of the lake, there are sources that can contribute to pollution of the lake with inorganic substances - nitrates. Moreover, there are human establishments and for the summer the recreational activities are enhanced.

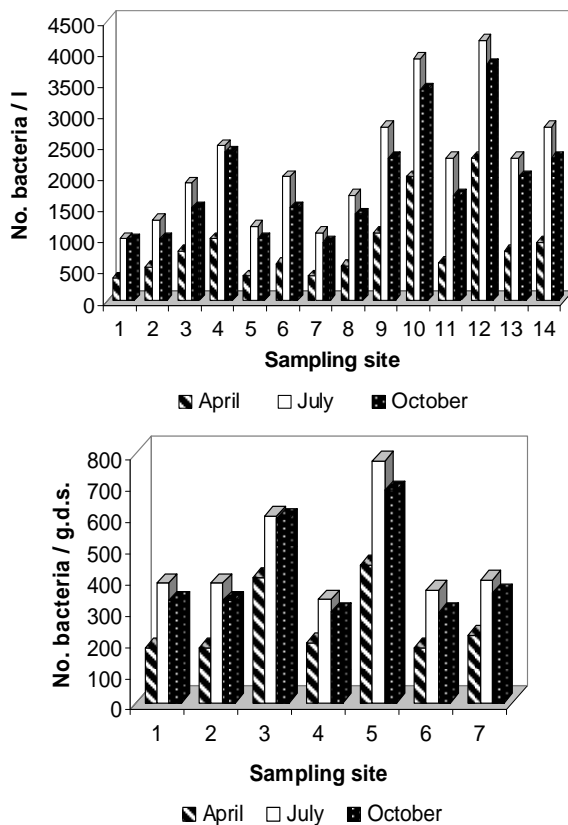


Fig. 4. Representation of the denitrifying bacteria from Tarnita dam reservoir water (left) and sediment (right)

Important for the sediment having a predominant organic component, is emphasizing the reduction processes of the nitrate substances, that determine increase of ammonium concentrations. This fact accentuates the bacterial anaerobic reduction processes and higher concentrations of nitrate substances, resulted from discharged water - domestic and industrial [4, 7, 9]. In Tarnita dam reservoir there is an horizontal distribution, that shows, in general, the number of bacteria involved in the nitrogen bacterial cycle was decreased from tail to dam of the lake, that reflects auto-purification capacity of the analyzed ecosystem.

*The aerobic (ASRB) and anaerobic sulfur-reducing (ANSRB), sulfur-oxidizing (SOB) and anaerobic sulfate-reducing (ANSATRB) activity.* In the Tarnita dam reservoir water, the bacteria involved in sulfur bacterial cycle haven't shown quantifiable values for all the analyzed sections and for all sampling periods. The bacteria involved in sulfur bacterial cycle have a quite uniform seasonally distribution in sediment, presenting higher activity especially in summer and in autumn. Horizontally, the bacteria involved

in sulfur bacterial cycle have higher values especially in the peripheral zones of the lake (Fig. 5), in the beach zones, where anthropogenic factor is enhanced (ex. Middle lake-beach I and beach II right border).

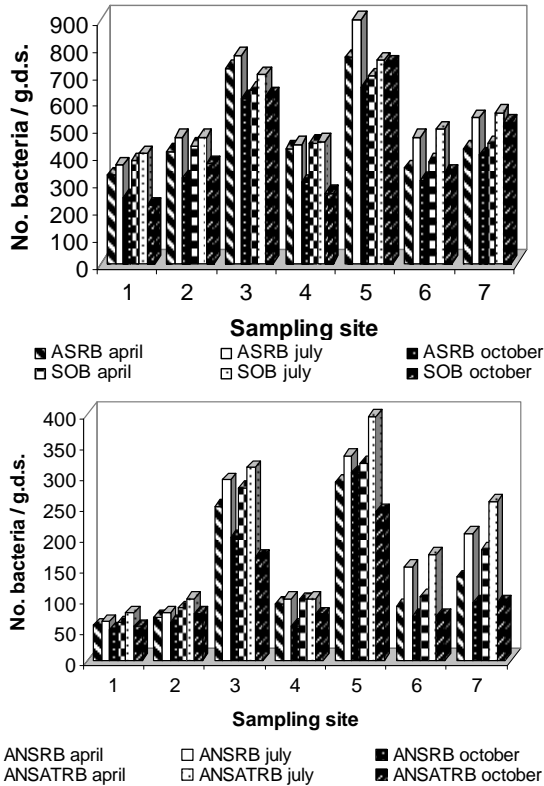


Fig. 5. Representation of the aerobic sulfur-reducing and sulfur-oxidizing bacteria (left) and the anaerobic sulfur- and sulfate-reducing bacteria (right) from Tarnita dam reservoir sediment

The bacteria involved in sulfur bacterial cycle were quantified differently in the seven analyzed sediment samples. The aerobic bacteria (ASRB and SOB), that get energy necessary for vital processes from sulfur, sulfurate hydrogen, thiosulfates, sulfurs and sulfites oxidation, have been quantitatively determined more than anaerobe bacteria (ANSRB and ANSATRB). The late ones decompose the proteins and amino acids with sulfur, resulting sulfurate hydrogen. All the investigated groups of bacteria showed higher values to the middle of the lake, in the beach zones from right border.

There has been established that in the investigated lake sediment, there are organic compounds with sulfur, due to the presence of the anaerobe sulfate-reducing bacteria although they are in very low numbers [12]. This fact may be a beginning consequence of the investigated ecosystem eutrophization and indicates the pollution

of the sediments from studied zones, especially with carbohydrates, from natural and accidental wastes. On the other hand, the sulfate-reducing bacteria have an important ecological role in the lacustrine ecosystem, being involved in the biodegradation and bioremediation processes, mechanisms that remove from the contaminated mediums the toxic compounds from human wastes [22, 26].

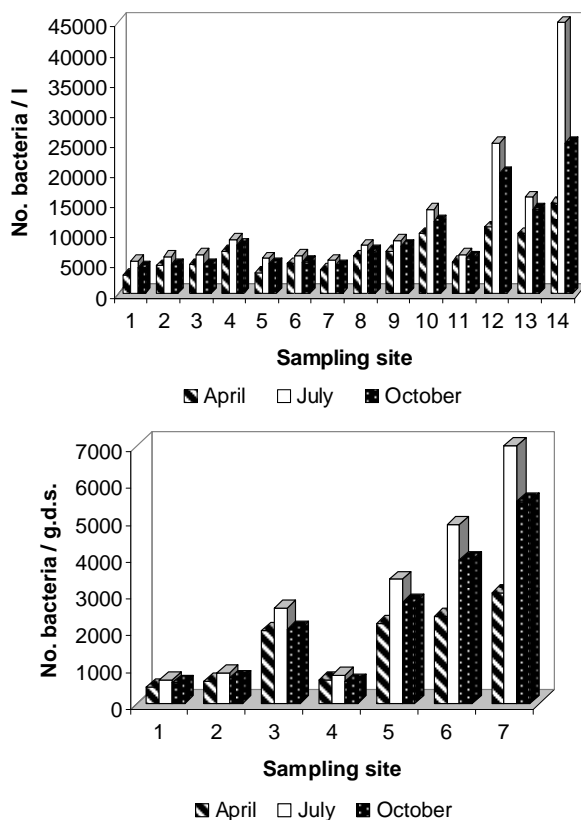


Fig. 6. Representation of the iron-reducing bacteria from Tarnita dam reservoir water (left) and sediment (right)

The massive reduction of the sulfates in nature is resulted from the activity of the sulfate-reducing bacteria and it is obvious in the stage before final one, of the organic environmental pollution [23].

*The iron-reducing bacteria activity.* The iron-reducing bacteria are responsible for reduction of the iron in presence of the organic substances (glucose) and for creation of a low oxidizing potential in the environment [3]. In present, initiation of the iron cycle in the lacustrine ecosystems takes place by involving the biological components from ecosystem. However, is already known that the iron has an

important role in plants and animals metabolism [3]. But, in higher quantity may create an unbalance in ecosystem functionality and may affect the existing organisms. The seasonally distribution of the iron-reducing bacteria may be observed in Fig. 6, where it was emphasized that the number of these bacteria increased especially in summer, in both water and sediment.

In water, the number of the iron-reducing bacteria was higher with depths, the recorded values being lower, at level of thousands and ten thousands cells/l. Higher activity was observed in the section Tail lake-left border, probably due to the contribution of the organic substances from the Somesul Cald tributary river (Fig. 6). Horizontally, the number of the iron-reducing bacteria decreased from tail to dam of the lake, in both water and sediment. Also, there can be observed that these bacteria have shown higher values (Fig. 6) especially in the peripheral zones from the middle of the lake, where are the beaches on the right border. Quite the same results were determined for the Bicaz lake in 1999 [3].

*The amilolitic bacteria activity.* Seasonally, the amilolitic bacteria showed higher activity in summer and autumn, in both water and sediment of the Tarnita dam reservoir. Horizontally, there have been established that the number of these bacteria decreased from center to peripheral zones of the lake, both in water and sediment samples (Fig. 7). The higher dynamics of the amilolitic bacteria is due either to the fact that a number of microorganisms have amylase but also to permanent production of starch by planktonic algae with fast succession and subaquatic macrophytes [1, 2, 3, 7].

Vertically, in water, the number of the amilolitic bacteria was low by tens level of cells, but it was higher with depths. The higher activity has been established in the sections from middle of the lake, in the beach zones from the right border (Fig. 7). In sediment, the amilolitic bacteria were more numerous, by hundreds and thousands cells level. Higher values have been recorded in the peripheral sections from middle of the lake (middle lake-beach I right border and beach II right border) (Fig. 7). This variation of the amilolitic bacteria density is in relation with algal development from summer period and with other vegetable components, that are purveyor of some important quantities of amidone containing substances.

The amilolitic bacteria are part from structure of the heterotrophic bacteria communities. There have been found that the phyto- and zoo- planktonic excretions and corpses represent the basic sources of the proteins, peptides and amino acids that are the main components of the organic material [16]. The heterotrophic bacteria present a higher activity for proteins and amino acids than carbohydrates [5]. This may be a possible explanation for lower values registered for the amilolitic bacteria. The participation of the microorganism to the degradation of the compounds with carbon represents a modality for restore in the cycle of the block carbon in these complex structures.

ECOLOGICAL GROUPS OF BACTERIA FROM THE TARNITA DAM RESERVOIR

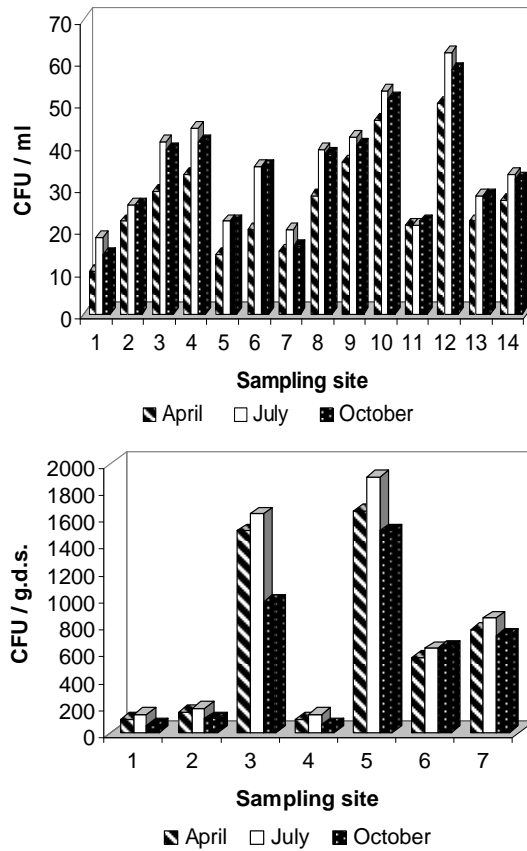


Fig. 7. Representation of the amilolitic bacteria from Tarnita dam reservoir water (left) and sediment (right)

There have been calculated the bacterial indicators of water and sediment quality for estimating the biological quality of Tarnita dam reservoir water and sediment [19].

It has been found that the microbial potential of the Tarnita dam reservoir water was increased proportionally with depths in the important zones of the lake: dam, middle and tail (Fig. 8). Also, horizontally, the microbial potential was higher at middle of the lake comparatively with that one recorded at dam and tail of the lake. The presence of the studied bacterial populations at all the analyzed depths (0 m, 5 m, 10 m and 15 m) demonstrates that the degradation processes take place in full water column and the superficial layer of sediment is the place with the most intense degradation bacterial activities.



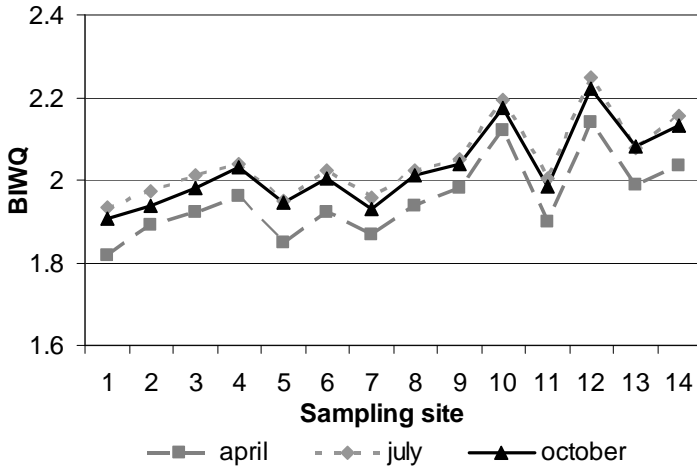


Fig. 8. Representation of the bacterial indicator of water quality from Tarnita dam reservoir

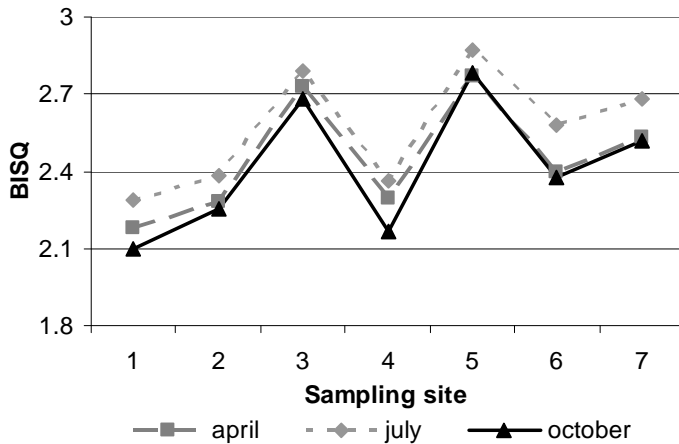


Fig. 9. Representation of the bacterial indicator of sediment quality from Tarnita dam reservoir

Generally, the values of the bacterial indicator of sediment quality were lower, but anyway higher than that ones recorded for water of the lake. The highest microbial potential has been recorded in the peripheral zones from middle of the lake – beach I and II from the right border, where the bacterial abundance was higher. This fact confirms the results obtained for the water of the lake. In Fig. 9 it may be observed that the microbial potential of Tarnita dam reservoir sediment was increased in the peripheral zones of the middle lake.

In sediment, the concentration of the studied bacteria decreased from peripheral zones to center. This fact could be explained by the presence of some local environmental factors. The majority of the organic compounds present in the lacustral ecosystems have a polymeric structure. They cannot be directly taken over by bacteria because, they must be hydrolyzed by exo- and endo-bacterial enzymes action.

The different environmental factors (temperature, pH) affect the kinetics of the enzymatic reactions and in consequence, biodegradability of the organic material [13, 15]. The presence of bacteria in higher number at the peripheral zones of the lake is influenced by water dynamics and especially by the presence of some organic contamination sources. Lower values from left border zone of the beach I from middle of the lake, could be explained by the absence of the human establishment and recreational activities, respectively by the absence of the negative influences on the water and sediment of the lake.

For obtaining an ensemble image of the complex processes that happen in these habitats with a special signification, the indicators of the quality have been statistically correlated. For this purpose, there have been used the ANOVA test (One-way Analysis of Variance), for correlating BISQ from each sediment section with BIWQ from water section.

To emphasize which one of the factors essentially influence the resulted characteristics there has been used the spread analysis. The spread analysis, introduced by the statistician R.A. Fisher is also known as the variance (variation) analysis too (ANOVA). By this method there could be checked if the real values of some characteristics divert from the theoretical values, calculated by average or regression equations and, also if these variations are or not dependent on the grouping factor. ANOVA is the method used when are compared more than two averages. Based on the logical interpretation of variation of two or more studied variations, it can be established the cause-effect relations. The spread analysis is based on the grouping method. Based on the number of factors that influence on the variation of the resulted characteristic, there are: the unifactorial analysis methods (with one variable parameter), bifactorials and multifactorials [17].

In this study, there has been used unifactorial ANOVA, when were compared the BISQ values from one point of sampling with BIWQ values from several points of sampling. The results are presented in the tables below, where q is the grouping factor, with other words, the typical values that are formed for entire statistically collectivity and that is higher than 2.890. P is the probability that the association could be accidental or not. The values of P are lower than 0.05 that show the results are extremely significant.

#### Dunnett Multiple Comparisons Test

Control column: *Dam-right border*

If the value of q is greater than 2.900 then the P value is less than 0.05.

The P value is 0.0006, considered extremely significant.

Comparison	Mean		P value
	Difference	q	
Dam-right border vs Dam 0 m	0.3027	6.141 **	P<0.01
Dam-right border vs Dam 5 m	0.2557	5.188 **	P<0.01
Dam-right border vs Dam 10 m	0.2167	4.396 **	P<0.01
Dam-right border vs Dam 15 m	0.1787	3.625 *	P<0.05
Dam-right border vs Dam right border 0 m	0.2730	5.539 **	P<0.01

Control column: *Dam-left border*

If the value of q is greater than 2.900 then the P value is less than 0.05.

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.

Comparison	Mean		P value
	Difference	q	
Dam-left border vs Dam 0 m	0.4223	9.760 **	P<0.01
Dam-left border vs Dam 5 m	0.3753	8.674 **	P<0.01
Dam-left border vs Dam 10 m	0.3363	7.773 **	P<0.01
Dam-left border vs Dam 15 m	0.2983	6.895 **	P<0.01
Dam-left border vs Dam left border 0 m 0	0.3247	7.503 **	P<0.01

Control column: *Middle beach I right border*

If the value of q is greater than 2.890 then the P value is less than 0.05.

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.

Comparison	Mean		P value
	Difference	q	
Mid. beach I rb vs Middle 0 m	0.8143	21.574 **	P<0.01
Mid. beach I rb vs Middle 5 m	0.7417	19.649 **	P<0.01
Mid. beach I rb vs Middle 10 m	0.7100	18.810 **	P<0.01
Mid. beach I rb vs Mid. beach I rb 0 m	0.5703	15.110 **	P<0.01

Control column: *Middle beach I left border*

If the value of q is greater than 2.890 then the P value is less than 0.05.

The P value is 0.0003, considered extremely significant.

Comparison	Mean		P value
	Difference	q	
Mid. beach I lb vs Middle 0 m	0.3563	7.021 **	P<0.01
Mid. beach I lb vs Middle 5 m	0.2837	5.589 **	P<0.01
Mid. beach I lb vs Middle 10 m	0.2520	4.965 **	P<0.01
Mid. beach I lb vs Mid. beach I lb 0 m	0.3130	6.167 **	P<0.01

Control column: *Middle beach II right border*

If the value of q is greater than 2.890 then the P value is less than 0.05.

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.

Comparison	Mean Difference	q	P value
Mid. beach II rb vs Middle 0 m	0.8890	21.906 **	P<0.01
Mid. beach II rb vs Middle 5 m	0.8163	20.115 **	P<0.01
Mid. beach II rb vs Middle 10 m	0.7847	19.335 **	P<0.01
Mid. beach II rb vs Mid. beach II rb 0 m	0.6040	14.883 **	P<0.01

With exception of the sections from tail of the lake, the other sections have been significantly correlated, that demonstrates the distribution quite uniform of the ecophysiological bacteria from the investigated lake water and sediment. The nonsignificant statistical results recorded to the tail of the lake illustrate the instability of the bacterial dynamics and distribution, probably due to the fresh water contribution of the Somesul Cald tributary river.

**Conclusions.** 1. The number of bacteria from each studied ecological group had seasonal variations and also, variations depending on sampling site.

2. The bacterial indicators of water and sediment quality showed higher values in the peripheral zones and at tail of the lake. The presence of the bacteria in a higher number at the peripheral zones is influenced by the dynamics of water and especially by presence of some organic contamination sources. Lower values from left border zone of the beach I from middle of the lake could be explained by the absence the human establishment and recreational activities, respectively by the absence of negative influences on the lake's water and sediment.

3. The explanation for increase of the microbial potential evolution in warm season consists by substantial contribution of the organic material sedimented in summer and autumn, as a result of the development of the specific biota in the lake. The organic material stimulates development of the benthic microbiota, especially of the aerobe heterotrophic bacteria involved in mineralization.

4. With exception of the sections from tail of the lake, the other sections have been significantly correlated, that demonstrates the distribution quite uniform of the ecophysiological bacteria from the investigated lake's water and sediment. The nonsignificant statistical results recorded to the tail of the lake illustrate the instability of the bacterial dynamics and distribution, probably due to the fresh water contribution of the Somesul Cald tributary river. At the same time, it has been found the presence of a strong connection between the bacteria distribution from the water and respectively from the sediment of the lake.

**Acknowledgements.** We would like to thank to Miss Carmen Nap (S.C. Hidroelectrica S.A., Sucursala Hidrocentrale Cluj), for her support for samples collecting from the Tarnita dam reservoir. Also, to Dr. Marius Marusteri (UMF Tg. Mures, Faculty of Pharmacy) for statistical calculations guidance.

## REFERENCES

1. Ailiese i, O., Jâ p a, F., *Microbiological characteristics of the Vaduri dam lake in the natural conditions and under the influence of salmonid aquaculture*, "An. Şti. Univ. Al. I. Cuza", Iaşi, **41** (II), 1995, 97-104.
2. Ailiese i, O., Nimiţ an, E., Jâ p a, F., D u n c a, S., *Ecology of some bacterial populations in the Şerbăneşti dam lake*, "An. Şti. Univ. Al. I. Cuza", Iaşi, **44** (II), 1998, 163-175.
3. Ailiese i, O., Jâ p a, F., Nimiţ an, E., D u n c a, S., *Aspects of the microbiological iron cycle in the Bicaz dam lake*, "An. Şti. Univ. Al. I. Cuza", Iaşi, **44** (II), 1999, 167-170.
4. A w a d a l l a h, R. M., S o l t a n, M. E., S h a b e b, M. S. A., M o a l l a, S. M. N., *Bacterial removal of nitrate, nitrite and sulphate in wastewater*, "Wat. Res.", **32** (10), 1998, 3080-3084.
5. B i l l e n, G., *Protein degradation in aquatic environments*, In: Microbial enzymes in aquatic environments, Chrost, R.J. (ed.), Springer-Verlag, New York, 1991, 123-143.
6. B u r i a n, P., *Lacul de acumulare-analiza biologică*, Edit. Universităţii de Medicină şi Farmacie, University Press, Târgu-Mureş, 2002, 13-16, 117.
7. C u ş a, V., *Instrucţiuni metodologice pentru analiza microbiologică a sedimentelor din ecosistemele acvatice*, Inst. Cercet. Ing. Mediului, Bucureşti, **4**, 1996, 14-20.
8. D r ă g a n - B u l a r d a, M., *Lucrări practice de microbiologie generală*, Univ. "Babeş-Bolyai", Cluj-Napoca, 2000, 175-180.
9. F é r a y, C., M o n t u e l l e, B., *Competition between two nitrite-oxidizing bacterial populations: a model for studying the impact of wastewater treatment plant discharge on nitrification in sediment*, "FEMS Microb. Ecol.", **42**, 2002, 15-23.
10. G e l d a, R. K., B r o o k s, C. M., E f f e r, S. W., A u e r, M. T., *Interannual variations in nitrification in a hypereutrophic urban lake: occurrences and implications*, "Wat. Res.", **34** (4), 2000, 1107-1118.
11. G i a n f r e d a, L., B o l l a g, J - M., *Influence of natural and anthropogenic factors on enzyme activity in soil*, In: Soil Biochemistry, Vol.9, ed. by S t o t z k y, G. and B o l l a g, J-M., Marcel Dekker, Inc., New York, 1996.
12. H e r l e a, V., L a z ă r, V., C a n j a, D., C i o l a c - R u s s u, A., P o p e s c u, V., *Caracterizarea unor aspecte ale diversităţii microbiotei râului Prahova, cu implicaţie în biodegradarea poluanţilor deversaţi*, "An. Univ. Bucureşti", **44**, 1995, 77-88.
13. H o w l i n g, D., *Mechanism of starch enzymolysis*, "Inter. Biodegradation", Elsevier Pub. Ltd. England, **25**, 1989, 15-19.
14. J â p a, F., A i l i e s e i, O., *The quantitative distribution of the main ecophysiological groups of bacteria involved in the biogenic elements cycle from the Siriu lake*, "An. Şti. Univ. Al. I. Cuza", Iaşi, **45** (II), 1999, 161-166.

15. Karner, M., Rassoulzadegan, F., *Extracellular enzyme activity: Indications for high short-term variability in a marine ecosystem*, "Microb. Ecol.", **30**, 1995, 143-156.
16. Little, A. G., Sjogern, R. B., Carson, C. R., *Measurement of proteolysis in natural waters*, "Appl. Environ. Microbiol.", **64**, 1979, 2691-2696.
17. Marusteri, M., [www.umftgm.ro/info/carte\\_statistica.pdf](http://www.umftgm.ro/info/carte_statistica.pdf) (Notiuni fundamentale de biostatistica).
18. Millea, L. C., Drăgan-Bularda, M., Lengyel, J., Muntean, V., *Studiul bacteriologic al unor probe de ape din orașul Aiud*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", Cluj-Napoca, **38** (1-2), 1993, 111-117.
19. Muntean, V., *Bacterial indicator of mud quality*, "Contr. Bot.", Cluj-Napoca, 1995-1996, 73-76.
20. Muntean, V., Crișan, R., Pașca, D., *Cercetări enzimologice asupra nămolului din balta sărată Alunei-Târnăveni*, "Stud. Cercet. Biol.", Bistrița, **6**, 2001, 7-12.
21. Nicolescu, C., *Microbiologia apei și a produselor acvatice*, Edit. „Cetatea de Scaun”, Târgoviște, 2002, 171-271.
22. Rabus, R., Nordhaus, R., Ludwig, W., Widdel, F., *Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium*, "Appl. Environ. Microbiol.", **59**, 1993, 1444-1451.
23. Stoica, E., Drăgan-Bularda, M., Kuever, J., *The presence of sulphate-reducing bacteria in the bottom sediments of the Romanian Black Sea area*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", Cluj-Napoca, **47** (2), 2002, 59-71.
24. Strong, D. T., Filler, I. R. P., *Denitrification response to nitrate concentration in sandy soils*, "Soil Biol. and Biochem.", **34** (7), 2002, 945-954.
25. Șerban, G., *Lacurile de acumulare din bazinul superior al Someșului Mic (partea I)*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Geographia", Cluj-Napoca, **43** (2), 1999, 10-19.
26. Widdel, F., Pfennig, N., *Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. Isolation of new sulfate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environment. Description of *Desulfobacter postgatei* gen. nov., sp. nov.*, "Arch. Microbiol.", **129**, 1981, 365-400.
27. \*\*\* *Atlasul Cadastrului Apelor din România*, Ministerul Mediului, București, 1992.
28. \*\*\* *Water Framework Directive*, 2001.
29. \*\*\* *Regulamente de exploatare a lacurilor*, Direcția Apelor Someș-Tisa, Cluj-Napoca, 2002.

## ANALIZA GERMENILOR COLIFORMI DE-A LUNGUL RÂULUI MUREȘ, PE SECTORUL RĂSTOLIȚA-ALBA IULIA, ÎN ANUL 2003

LIDIA CORINA ȘTEF\*, M. DRĂGAN-BULARDA\*\*  
și VASILE MUNTEAN\*\*

**SUMMARY.** – **Analysis of Coliform Germs along the Mures River, between Răstolița and Alba Iulia, during 2003.** Eight water samples from the Mureș river between Răstolița and Alba Iulia were studied microbiologically, during the four seasons of the year 2003. The coliform germs were studied and their presence in the water samples was related with the presence of the pathogen germs in the Mureș river waters. A special attention was paid to faecal pollution. A general view on the coliform germs (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* and *Enterobacter*) is given. The impact of coliforms in some human diseases is also presented. Some modern methods of detecting the presence of coliforms in faecal polluted waters are evaluated. There were identified two genera belonging to the **Enterobacteriaceae** family: *Escherichia* and *Citrobacter*.

Scopul lucrării de față este de a determina prezența germenilor coliformi în apa râului Mureș, pe sectorul Răstolița-Alba Iulia, în anul 2003. Grupul coliformilor este larg răspândit în natură. Deși nu este exclusiv de origine fecală, grupul coliformilor este prezent în mare cantitate în materiile fecale ale omului și animalelor homeoterme, ceea ce permite decelarea lui chiar și după o diluare considerabilă. Decelarea coliformilor totali și fecali (termotoleranți) și în special a bacteriei *Escherichia coli* este dovada unei poluări fecale incontestabile.

Termenul "germeni coliformi" desemnează o categorie de bacterii aparținând familiei *Enterobacteriaceae*, caracterizate printr-o serie de proprietăți comune, dintre care esențiale pentru definirea lor sunt capacitatea de fermenta lactoza la 35-37°C cu producere de acid și gaz în timp de 24-48 de ore și de a se dezvolta în prezența sărurilor biliare și a altor agenți cu acțiune de suprafață. Prezența lor în mediile naturale indică o contaminare recentă cu materii fecale.

Coliformii care prezintă caracteristicile metabolice anterior menționate și la temperatura de 44±0.5°C sunt numiți fecali sau termotoleranți. Acești coliformi fecali care determină fermentarea lactozei la 44±0.5°C cu producere de acid și gaz și care formează indol la 44±0.5°C pornind de la triptofan sunt considerați ca fiind *Escherichia coli* [6].

---

\* Colegiul Tehnic Aiud, Strada Ion Creangă, nr. 14, RO-515200 Aiud

\*\* Universitatea "Babeș-Bolyai" Cluj-Napoca, Facultatea de Biologie și Geologie, Catedra de Biologie Experimentală, str. M. Kogălniceanu, nr. 1, RO-400084 Cluj-Napoca

În vederea identificării germenilor coliformi se mai urmărește prezența a numeroase însușiri morfologice și biochimice, cu ajutorul diferitelor teste. Conform caracteristicilor morfologice și biochimice, grupul germenilor coliformi cuprinde bacteriile care aparțin genurilor *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* și *Enterobacter* [2].

Conform manualului de bacteriologie sistematică a lui Bergey, grupul coliformilor este cuprins în Ordinul XIII *Enterobacteriales*, Familia *Enterobacteriaceae* care include 41 de genuri între care cităm genurile *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella* și *Serratia* [4].

Speciile genurilor anterior citate nu sunt propriu-zis patogene, dar în anumite condiții pot provoca adesea boli diareice sau infecții ale tractului urinar. Boala diareică produsă de ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigen) apare la toate grupele de vârstă, dar cauzează frecvent mortalitatea la copii. Boala diareică la copii poate fi însoțită sau nu de febră. Sediul infecției bacteriene este colonul, unde aderența bacteriei este rapidă, fiind apoi urmată de invazia celulelor epiteliului intestinal. Răspunsul inflamator urmat de distrugerea țesuturilor produc o diaree săracă în lichid, cu mult sânge și mucus, conținând neutrofile [1].

Din aceste motive, speciile acestor genuri sunt considerate patogeni oportuniști. Dar prezintă o importanță deosebită pentru aprecierea calității sanitare a mediului, prin asocierea lor frecventă cu speciile genurilor *Shigella* și *Salmonella*. Datorită acestui fapt, germenii coliformi sunt organisme indicator de cea mai mare importanță. Cu cât numărul lor este mai mare într-un mediu natural, cu atât crește probabilitatea prezenței microorganismelor patogene în mediul respectiv.

*Escherichia coli* este neîndoiește de origine fecală, ca și membrii grupului coliformilor larg răspândiți în natură.

**Materiale și metode.** În vederea efectuării analizelor pentru determinările colimetrice au fost prelevate sezonier probe de apă din 8 puncte diferite situate de-a lungul râului Mureș, în anul 2003; poziția punctelor de prelevare este specificată în Tab. 1.

Tabel 1

Punctele de prelevare a probelor de apă

Nr. crt.	Locul prelevării
1	Răstolița
2	Deda
3	Târgu Mureș
4	Iclânzul
5	Ocna Mureș
6	Aiud
7	Mihalț Pod
8	Alba Iulia



Probele de apă au fost prelevate sezonier (în lunile aprilie, iulie, octombrie și decembrie ale anului 2003), în condiții sterile și analizate în cadrul Laboratorului de microbiologie de la Institutul de Cercetări Biologice din Cluj-Napoca și în laboratorul de bacteriologie al Spitalului Municipal din Aiud. Pentru determinarea numărului germenilor coliformi au fost respectate prevederile din metoda standardizată [8]. Am utilizat pentru determinarea coliformilor totali mediu bulion lauryl sulfat simplu și dublu concentrat pentru testul de prezumție și mediu geloză lactoză eozină albastru de metilen (mediu GEAM) pentru testul de confirmare, iar în vederea determinării coliformilor fecali am folosit mediu bulion bilă lactoză verde brilliant (BBLV).

În vederea identificării genurilor bacteriene probele de apă au fost supuse îmbogățirii pe mediu bulion selenit de sodiu, 72 ore la 37°C și apoi s-au realizat subculturi pe plăci cu mediu selectiv diferențial Levine și Leifson. Culturile obținute au fost supuse etapei de confirmare biochimică, prin testele pe mediile cu citrat, acetat și malonat, TSI (Triple-Sugar-Iron), MILF (Mobilitate-Indol-Lizindecarboxilază-Fenilalanindezaminază), MIU (Mobilitate-Indol-Uree), ADCL (Agar-Dezoxicolat-Citrat-Lactoză), reacția Voges-Proskauer, reacția la roșu de metil [3].

Pentru identificarea genurilor coliformilor fecali (termotoleranți) am procedat la cultivarea acestora în bulion lactozat la 44±0.5°C în vederea detectării producerii de acid și gaz, a izolării în cultură pură din tuburile pozitive și a efectuării altor teste necesare diferențierii din grupul coliformilor, care vin să completeze seria IMVIC.

**Rezultate.** Determinările colimetrice sezoniere au fost sintetizate în Tab. 2 și 3, iar în Fig. 1 și 2 este ilustrată distribuția numărului germenilor coliformi totali și fecali (termotoleranți) de-a lungul celor 8 puncte de prelevare studiate.

Tabel 2

**Rezultatele determinării sezoniere ale numărului germenilor coliformi totali în cele 8 puncte de prelevare de-a lungul râului Mureș (exprimate în nr. germeni/100 ml)**

Sezon	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Primăvara	1700	1300	1700	4600	4900	16100	16100	16090
Vara	1700	2200	2600	6300	10900	16100	16100	16100
Toamna	1400	1300	1200	4300	4600	7000	5420	10900
Iarna	700	700	900	2200	3100	2600	1720	5420

Analizând Tabelul 2 putem observa valorile maxime și minime ale numărului germenilor coliformi totali determinați. Astfel, cea mai mică valoare a numărului germenilor coliformi totali, 1300 germeni/100 ml înregistrată primăvara a fost semnalată în punctul de prelevare P2, care corespunde localității Deda, iar cea mai mare valoare peste 16090 germeni/100 ml înregistrată primăvara a fost obținută în punctele de prelevare P6 și P7, corespunzătoare localităților Aiud și Mihalț Pod.

Vara, cea mai mică valoare, 1700 germeni/100 ml, a fost semnalată în punctul de prelevare P1 iar valoarea cea mai mare, peste 16090 germeni/100 ml, în punctele P6, P7 și P8. În luna octombrie a anului 2003 numărul germeilor coliformi se menține scăzut în toate punctele de prelevare, cea mai mică valoare, 1200 germeni/100 ml fiind semnalată în punctul P3, fapt explicat prin scăderea temperaturii în sezonul de toamnă. Valoarea maximă, 10900 germeni/100 ml a fost determinată în punctul P8 unde deversările de apă reziduală și menajeră sunt mult mai mari comparativ cu punctele de prelevare P1 și P2, situate la mică distanță de izvorul râului Mureș. În sezonul de iarnă valoarea cea mai mică, 700 germeni/100 ml s-a determinat în punctele P1 și P2 fapt explicabil prin cursul Mureșului în zona montană unde apa are o viteză mare de curgere (1.1 m/s) și nu stagnează, iar valoarea cea mai mare a fost semnalată în punctul P8 unde viteza de curgere a apei este mult mai mică (0.2 m/s). Valorile obținute sunt comparabile cu cele din literatura de specialitate [7 și 5].

Tabel 3

**Rezultatele determinării sezoniere ale numărului germeilor coliformi fecali (termotoleranți) în cele 8 puncte de prelevare de-a lungul râului Mureș**  
(exprimate în nr. germeni/100 ml)

Sezon	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Primăvara	1200	1200	1100	3300	3450	5420	6300	9400
Vara	900	1400	1700	5420	9400	10900	9400	10900
Toamna	400	400	700	900	4600	6300	700	7900
Iarna	200	200	500	700	2300	5420	5420	3100

Din analiza Tabelului 3 unde sunt cuprinse valorile numărului germeilor coliformi fecali (termotoleranți) determinați sezonier în anul 2003, se constată existența unui număr mic de germeni coliformi fecali iarna în punctele P1 și P2 (200 germeni/100 ml) iar cel mai mare număr de germeni coliformi fecali determinat în același anotimp a fost semnalat în punctele P6 și P7 (5420 germeni/100 ml). În luna octombrie numărul germeilor coliformi fecali atinge cea mai mică valoare în punctul în punctele P1 și P2 (400 germeni/100 ml) iar valoarea cea mai mare în punctul P8 (7900 germeni/100 ml). Vara anului 2003 se caracterizează prin valori mari ale numărului germeilor coliformi fecali în aproape toate punctele de prelevare, cea mai mare valoare fiind obținută în punctul P8 (10900 germeni/100 ml), excepție făcând punctele P1, P2 și P3 unde numărul germeni nu depășește valoare de 1700 germeni/100 ml. În punctul P8 viteza de curgere a apei râului este de 0.2 m/s iar temperatura apei în momentul recoltării probei era 26°C. Primăvara cel mai mic număr de germeni coliformi toatali a fost înregistrat în punctul P3 (1100 germeni/100 ml). Cel mai mare număr a fost semnalat în punctul P8 unde s-a obținut valoarea de 9400 germeni/100 ml, iar temperatura apei în momentul recoltării probei a fost 5°C.

## GERMENI COLIFORMI ÎN RÂUL MUREȘ

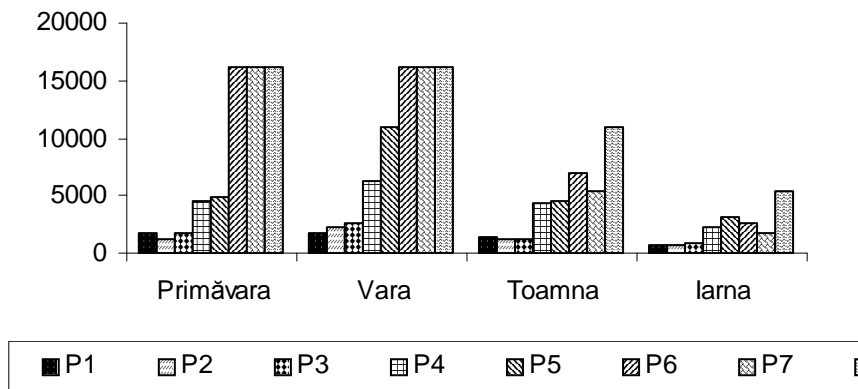


Fig. 1. Variația sezonieră a numărului germenilor coliformi totali de-a lungul râului Mureș în anul 2003 (rezultate exprimate în nr. germeni/100 ml).

Fig. 1 cuprinde variația numărului germenilor coliformi totali de-a lungul râului Mureș în cele patru sezoane ale anului 2003. Din analiza acestei figuri se poate observa o creștere a numărului germenilor coliformi totali în sezoanele primăvara și vara, când temperatura apei este mai apropiată de temperatura optimă de dezvoltare a acestora și o scădere ușoară a numărului germenilor coliformi toamna și mai accentuată iarna, când temperatura apei scade în mod considerabil.

Fig. 2 cuprinde variația numărului germenilor coliformi fecali (termotoleranți) în anul 2003 de-a lungul Mureșului, înregistrându-se o creștere a numărului germenilor coliformi fecali (termotoleranți) primăvara și vara. Toamna și iarna numărul germenilor coliformi fecali (termotoleranți) este în scădere, fapt explicat prin temperatura scăzută a apei râului Mureș în momentul recoltării probei. De asemenea numărul germenilor coliformi totali și fecali urmează o curbă ascendentă dinspre amonte spre aval, valorile minime întâlnindu-se în punctele de prelevare situate în zona montană a Mureșului, iar cele maxime în zona colinară a râului. O abatere de la cele enunțate anterior se constată toamna în punctul de prelevare P7, cauza fiind închiderea fermei de pui din zonă în vederea reorganizării, în sezonul de toamnă.

Apa recoltată din cele 8 puncte de prelevare a fost supusă etapei de îmbogățire pe mediu cu bulion selenit de sodiu timp de 72 de ore și apoi am realizat subculturi cu ansa bacteriologică pe câte două plăci cu mediu selectiv diferențial Levine și Leifson. Plăcile au fost incubate 24 de ore la 37°C.

În toate probele de apă prelevate din cele 8 puncte am obținut următorul tip de colonii: colonii mici de 1-2 mm în diametru, alb-gălbui, netede, lucioase și translucide (I). Apa recoltată din punctele de prelevare 3-8 prezenta, în urma incubării colonii mari, de 3-4 mm în diametru, roșietice, netede, cremoase și umede (II) precum și colonii mari, de același diametru cu cele prezentate anterior, alb-gălbui cu centrul negru, netede, cremoase, umede, opace (III).

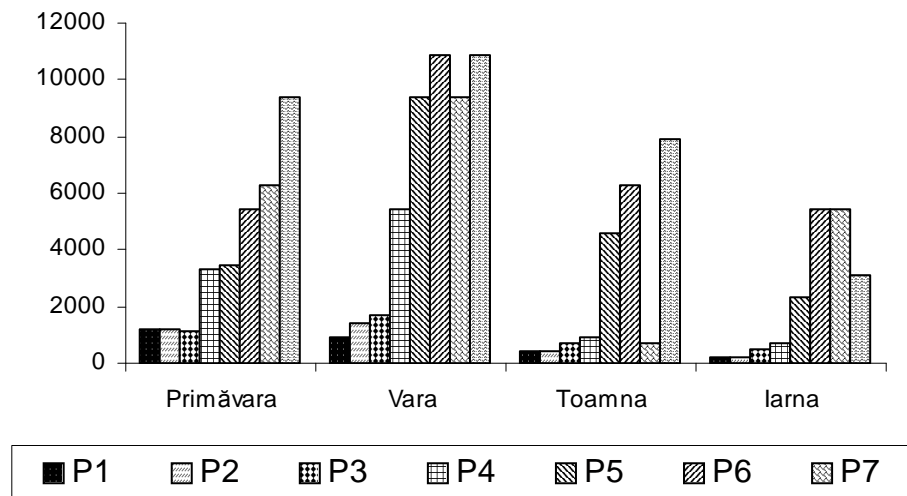


Fig. 2. Variația sezonieră a numărului germeilor coliformi fecali (termotoleranți) de-a lungul râului Mureș în anul 2003 (rezultate exprimate în nr. germeni/100 ml).

Coloniile obținute au fost supuse etapei de confirmare biochimică, prin teste pe mediile TSI, MILF și MIU, reacția la roșu de metil, și reacția Voges-Proskauer. În urma testelor efectuate am ajuns la următoarele rezultate:

Coloniile notate cu I, având diametrul de 1-2 mm, alb-gălbui, netede, lucioase și translucide detectate în toate probele de apă nu aparțin familiei *Enterobacteriaceae*, fapt bazat pe următoarele observații: nu utilizează glucoza, lactoza și zaharoza, nu produc  $H_2S$  pe mediu TSI, nu au mobilitate, nu produc urează, lizină, indol și fenilalanindezaminază și cresc la suprafața mediului de cultură în contact cu aerul.

Coloniile notate cu II, mari, cu diametrul de 3-4 mm, roșietice, netede, cremoase și umede nu aparțin familiei *Enterobacteriaceae* deoarece fermentează glucoza cu producere de gaz, dar nu fermentează lactoza și zaharoza, nu produc  $H_2S$  pe mediu TSI, nu au mobilitate, nu produc indol, urează, fenilalanindezaminază și lizină și nu utilizează acetatul, citratul și malonatul ca sursă de carbon.

Coloniile notate cu III, având diametrul de 3-4 mm, alb-gălbui, cu centrul negru, netede, cremoase, umede, opace, aparțin familiei *Enterobacteriaceae*. Concluzia se bazează pe următoarele observații: fermentează glucoza, lactoza și zaharoza cu producere de gaz pe mediul TSI și partea superioară a acestuia virează din roșu în galben; se dezvoltă în anaerobioză (pe fundul eprubetei), aceste bacterii preferând utilizarea glucozei în anaerobioză, chiar dacă aceasta se găsește și în restul mediului, iar după epuizarea acesteia, folosesc lactoza și apoi zaharoza tot în condiții de anaerobioză; nu produc lizină, indol, urează și fenilalanindezaminază;

sunt mobile; produc  $H_2S$  pe mediu TSI. Neexistând nici un indiciu asupra genului bacteriei decelate (pe baza informațiilor deținute), am recurs la treceri de pe mediul TSI, pe medii cu citrat și malonat precum și la testul Voges-Proskauer și reacția la roșu de metil.

În urma acestor ultime două teste am obținut în plus următoarele afirmații: reacția la roșu de metil este pozitivă, testul Voges-Proskauer este negativ, malonatul nu este utilizat dar este utilizat citratul ca unică sursă de carbon, ceea ce duce la alcalinizarea mediului, fapt evidențiat prin virarea indicatorului albastru de bromtimol din verde în albastru.

Prin însumarea tuturor informațiilor obținute în timpul testelor de confirmare biochimică, am ajuns la concluzia că bacteria studiată aparține genului *Citrobacter*, în conformitate cu manualul de bacteriologie sistematică al lui [4].

Pentru fiecare probă de apă contaminată cu germeni coliformi am făcut treceri ale coloniilor care s-au dezvoltat pe mediul BBLV. După trecerea acestor culturi pe mediu Levine prin tehnica epuizării ansei și după incubarea 24 de ore la  $37^{\circ}C$  s-au obținut colonii de culoare albastru închis, cu luciu metalic, convexe, umede, lucioase, scunde, cu marginile întregi, având un diametru de 3-4 mm. După ce au fost supuse testelor de confirmare biochimică pe mediile TSI, MILF și MIU, reacția Voges-Proskauer, reacția la roșu de metil, mediile cu citrat, acetat și malonat, am obținut următoarele informații: bacteria analizată fermentează lactoza, glucoza și zaharoza cu producere de gaz, produce  $H_2S$  pe mediu TSI, produce indol, nu produce fenilalanindezaminază, urează și lizină. Există situații în care bacteria a crescut doar pe traseul de inoculare iar altele a fost răspândită în toată eprubeta, prezentând mobilitate; de asemenea bacteria utilizează acetatul (nu și malonatul sau citratul) ca unică sursă de carbon, reacția la roșu de metil este pozitivă, iar testul Voges-Proskauer este negativ.

Având în vedere toate informațiile obținute, am concluzionat că bacteria studiată aparține genului *Escherichia*, conform manualului de bacteriologie sistematică a lui Bergey [4]. Rezultatele obținute în ce privește genurile bacteriene detectate sunt comparabile cu cele din literatura de specialitate [7 și 5].

Pentru a distinge *Escherichia coli* de alți coliformi fecali am utilizat pe lângă testul IMVIC și producerea de indol la  $44\pm 0.5^{\circ}C$ , producerea de gaz în BBLV la  $44\pm 0.5^{\circ}C$  și testul Eijkman la  $44\pm 0.5^{\circ}C$ . Vom detalia testul Eijkman care constă în producerea de acid și gaz când crește pe mediu McConkey la  $44\pm 0.5^{\circ}C$ , după o perioadă de incubare de 24 de ore. Culoarea mediului a virat în galben, ceea ce indică prezența coliformilor fecali. Pe baza următoarelor observații: producere de indol la  $44\pm 0.5^{\circ}C$ , reacția la roșu de metil pozitivă, testul Voges-Proskauer negativ și neutilizarea citratului ca unică sursă de carbon, am ajuns la concluzia că bacteria analizată este *Escherichia coli* [6].

În vederea verificării faptului că apa este poluată fecal, am utilizat un test simplu care durează 12-18 ore și care are la bază faptul că prezența coliformilor în apă este în mod constant asociată cu eneterobacteriile producătoare de  $H_2S$  (*Salmonella*,

*Preoteus*, *Citrobacter*, variante ale *E. coli* de origine fecală). Pe o bandă de hârtie de filtru impregnată cu mediu de cultură concentrat și introdusă într-o sticlă s-au introdus în teren 20 ml de apă din fiecare probă de analizat. Probele au fost incubate la 37°C [6]. Poluarea fecală este indicată de virarea culorii mediului în negru. Culoarea mediului de cultură a virat în negru în toate probele cu conținut mare de coliformi fecali (peste 1700 germeni/100 ml) respectiv s-a menținut culoarea inițială a mediului în probele cu un număr mic de germeni coliformi (sub 1400 germeni/100 ml).

**Concluzii.** 1. În toate probele de apă analizate în cele patru anotimpuri a fost detectată prezența germeilor coliformi totali și fecali (termotoleranți). Numărul cel mai scăzut de germeni coliformi a fost detectat în anotimpurile toamna și iarna când temperatura apei în momentul recoltării probelor era scăzută precum și în probele prelevate din punctele P1 și P2 unde apa este puțin poluată fecal. Numărul cel mai mare de germeni coliformi a fost înregistrat în timpul verii anului 2003, când temperatura apei este mai apropiată de cea optimă pentru dezvoltarea germeilor coliformi, precum și în punctele de prelevare P5, P6, P7 și P8 (peste 16090 germeni/100 ml), fapt explicabil prin prezența în zonele respective a unor crescătorii de animale și păsări care își deversează apele reziduale direct în râul Mureș. De asemenea, există foarte multe întreprinderi cu profil alimentar ale căror ape menajere și reziduale ajung de asemenea în apele râului.

2. Există mari variații sezoniere ale numărului germeilor coliformi totali și fecali, cele mai mari valori înregistrându-se în mod firesc vara, iar cele mici valori - iarna. De asemenea, numărul germeilor coliformi totali și fecali urmează o curbă ascendentă dinspre amonte spre aval, valorile minime întâlnindu-se în punctele de prelevare situate în zona montană a Mureșului, iar cele maxime în zona colinară a râului.

3. Testele de confirmare biochimică au dus la identificarea genului *Escherichia* în toate cele 8 probe de apă analizate în cele 4 anotimpuri.

4. În probele de apă recoltate din punctele de prelevare 3-8 (cu un grad mare de poluare fecală) a fost identificat genul *Citrobacter*.

5. Tot pe acest sector al râului Mureș cuprins între punctele P3 și P8 a fost identificată poluarea fecală a apei prin detectarea bacteriei *Escherichia coli* termotolerantă (determină fermentarea lactozei la 44±0.5°C cu producere de acid și gaz și care formează indol la 44±0.5°C pornind de la triptofan).

6. Rezultatele analizelor efectuate demonstrează necesitatea epurării cu eficiență sporită a apelor reziduale și fecaloid-menajere care sunt deversate în râul Mureș, datorită prezenței germeilor patogeni, fapt justificat de numărul mare de germeni coliformi detectați.

**BIBLIOGRAFIE**

1. B a r o n, S., *Medical Microbiology*, University of Texas, Galveston, 2001.
2. B o n d e, G.J., *Bacterial indication of water pollution*, în D r o o p, M.R., J a n n a s c h, H.W., (eds.), *Advances în Aquatic Microbiology*, pp. 273-364, Acad. Press, London, 1977.
3. D r ă g a n-B u l a r d a M., *Microbiologia generală. Lucrări practice*, Universitatea "Babeș-Bolyai", ClujNapoca, 2000.
4. G a r r i t y, G.M., W i n t e r s, M., S e a r l e s, D.B. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second ed., vol. 1, Baltimore, 2001.
5. H a m a r, J., S á r k á n y-K i s s, A., 1995, *The Maros-Mureș river valley. A study of the geography, hydrobiology and ecology of the river and its environment*, Szolnok-Szeged-Târgu Mureș.
6. M ă n e s c u, S., *Microbiologia sanitară*, Ed. Med., București, 1989.
7. M i l l e a, L.C., D r ă g a n-B u l a r d a, M., L e n g y e l, J., M u n t e a n, V., 1993, *Studiul bacteriologic al unor probe de apă din orașul Aiud*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **38** (1-2), 111-117.
8. STAS 3001, *Apa – Analiză bacteriologică*, Ministerul Sănătății, București, 1991.

## CERCETĂRI MICROBIOLOGICE ASUPRA UNOR SEDIMENTE DE PE CURSUL MIJLOCIU AL RÂULUI MUREȘ

VASILE MUNTEAN<sup>\*\*</sup>, LIDIA CORINA ȘTEF<sup>\*\*</sup>  
și MIHAIL DRĂGAN-BULARDA<sup>\*</sup>

**SUMMARY.** – **Microbiological Research on Sediments from the Middle Sector of the Mureș River.** Eight sediments from the Mureș river between Răstolița and Alba Iulia were studied microbiologically, during the four seasons of the year 2001. The following five ecophysiological bacterial groups have been studied: aerobic mesophilic heterotrophs, ammonifiers, denitrifiers, desulphifiers and iron-reducers. The presence of all the five ecophysiological bacterial groups was registered in all the studied sediments. The descending ranking of their abundance was: aerobic mesophilic heterotrophs > ammonifiers > denitrifiers > desulfifiers ≡ iron-reducers. Based on the bacteria number of each ecophysiological groups, the bacterial indicators of sediment quality (BISQs) were calculated. The BISQ values were lower upstream, and increased at the sites located in the hilly sector of the river, between Târgu Mureș and Alba Iulia. The values of the BISQ were also higher in summer and autumn as compared to spring and winter. A positive correlation has been established between the enzymatic indicator, the bacterial indicator and the content of organic matter in the studied sediments.

Descompunerea și mineralizarea materiei organice sunt procese de cea mai mare importanță pentru eliberarea elementelor biogene în mediul acvatic. Compușii organici dizolvați, în special aceia care își au originea în fitoplancton și în zooplancton, intră în componența materiei organice dizolvate. Frația particulată este parțial încorporată de către consumatorii secundari. Restul este convertit în detritus și supus în continuare descompunerii. În funcție de tipul substratului și de enzimele implicate, descompunerea în etape a materiei organice are drept rezultat acumularea monomerilor solubili, oligomerilor sau macromoleculilor. Unii dintre acești compuși sunt încorporați de către bacterii sau microplancton, în timp ce alții suferă în continuare descompunerea enzimatică. Compușii cu greutate moleculară mică, rezultați în urma acțiunii exoenzimelor și nelegați în geopolimeri, sunt rapid metabolizați de către bacteriile heterotrofe, astfel încât se poate considera că rata proceselor degradării materiei organice este, probabil, controlată de prima etapă, aceea a hidrolizei exoenzimatică [8].

Sedimentele constituie o verigă cheie în ciclul biogeochimic al elementelor, locul unde se finalizează procesele de mineralizare a substanțelor organice care n-au fost degradate în coloana de apă. M a l c o l m și S t a n l e y [6] consideră mediul sedimentelor o funcție complexă a mai multor factori, foarte diferiți, cum ar fi matrixul mineral major, textura, cantitatea de carbon organic, localizarea geografică. Conform autorilor citați, sedimentele constau din trei componente majore: material detritic, derivat din eroziune, material biogen, format prin productivitate biologică și material autogen, format *in situ*. Caracterul final al sedimentului este dat de

---

\* Universitatea "Babeș-Bolyai", Facultatea de Biologie și Geologie, Catedra de Biologie Experimentală, str. M. Kogălniceanu, nr. 1, RO-400084 Cluj-Napoca

\*\* Colegiul Tehnic Aiud, str. Ion Creangă, nr 14, RO- 515200 Aiud



proporția relativă a acestor componente. Acțiunea microorganismelor asupra substratelor din mediu se face pe cale enzimatică, prin oxidoreduceri și hidrolize, respectiv prin acțiunea unor produși finali ai metabolismului microbial, în cele din urmă rezultat tot al activității enzimatice a microorganismelor.

Cercetările microbiologice care fac obiectul acestei lucrări au fost efectuate în cadrul unei teme de cercetare mai ample, urmărind activitatea microbială și enzimatică în apa și sedimentele Râului Mureș, pe un tronson situat între Răstolița și Alba Iulia. Lucrarea de față completează cercetările enzimologice efectuate asupra aceluiași sedimente [11], pentru a realiza o imagine de ansamblu privind potențialul microbial și evoluția lui sezonieră în sedimentele râului Mureș între Răstolița și Alba Iulia.

**Materiale și metode.** Au fost efectuate analize microbiologice asupra eșantioanelor de sedimente prelevate din râul Mureș în lunile aprilie, iulie, octombrie și decembrie 2001. S-au analizat sedimente din 8 puncte de prelevare, în următoarea ordine, începând din amonte: Răstolița, Deda, Târgu Mureș, Iclânzul, Ocna Mureș, Aiud, Mihalț Pod și Alba Iulia. Punctele de prelevare au fost alese astfel încât cursul apei să nu fie prea rapid, în zone cu apă stagnantă, iar sedimentele au avut o consistență argiloasă, lipsit de nisip sau pietriș. Prelevarea probelor s-a făcut în condiții sterile. Au fost studiate bacterii implicate în principalele cicluri biogeochimice ale elementelor (C, N, S, Fe). S-au determinat următoarele grupe fiziologice de bacterii: heterotrofe aerobe, amonifcatoare, denitrifcatoare, desulfofcatoare și fier-reducătoare. Numărul bacteriilor heterotrofe aerobe a fost determinat pe un mediu cu bulion de carne agarizat [3]. Numărul bacteriilor amonifcatoare a fost determinat folosind un mediu cu apă peptonată. Numărul bacteriilor denitrifcatoare a fost determinat folosindu-se mediul lui D e B a r j a c [14]. Numărul bacteriilor desulfofcatoare s-a stabilit utilizându-se mediul V a n D e l d e n [2]. Numărul bacteriilor fier-reducătoare s-a stabilit cu ajutorul mediului O t t o w [12], modificat [13]. Cu excepția bacteriilor heterotrofe aerobe, numărul cel mai probabil de bacterii/g nămol umed s-a calculat pe baza tabelului statistic publicat de A l e x a n d e r [1]. Numărul de bacterii se exprimă pe gram sediment substanță uscată. Conținutul în substanță uscată s-a determinat prin uscarea unei cantități din fiecare eșantion analizat microbiologic, trei zile consecutiv, la 105°C. Conținutul în substanță organică s-a determinat prin incinerarea la 600°C, timp de 3 ore, a sedimentului uscat în prealabil trei zile consecutiv la 105°C.

**Rezultate și discuții.** Rezultatele analizelor microbiologice efectuate sunt prezentate în Tab. 1. Conținutul în substanță organică al sedimentelor analizate este cuprins între 36 mg/g sediment substanță uscată (Deda, primăvara) și 99 mg/g sediment substanță uscată (Mihalț Pod, toamna). Oscilațiile sezoniere urmează un traseu ascendent, de-a lungul primăverii, verii și toamnei, iarna înregistrându-se valori mai mici, comparabile cu cele consemnate primăvara. În toate cele 8 puncte de prelevare cel mai înalt conținut în substanță organică a fost înregistrat toamna. Este explicabil, întrucât activitatea biologică în apa și sedimentele râului este mult mai intensă în timpul sezonului cald, iar unul dintre rezultatele acestei activități este creșterea cantității de materie organică depusă în sediment.

În sedimentele analizate au fost detectate toate cele 5 grupe ecofiziologice bacteriene, cu variații sezoniere, respectiv dependente de punctul de prelevare.

După cum se poate observa în Tab. 1, în toate sedimentele analizate a fost decelată prezența tuturor celor 5 grupuri ecofiziologice de bacterii. Cel mai bine reprezentate sunt bacteriile heterotrofe aerobe. Numărul lor este de ordinul  $10^6$ - $10^8$ /g sediment (substanță uscată), cu maximum toamna la Ocna Mureș și minimum iarna la Răstolița. Și bacteriile amonificatoare sunt prezente într-un număr mare ( $10^5$ - $10^6$ /g sediment (substanță uscată)), cel mai mare număr consemnându-se tot toamna la Ocna Mureș, iar cel mai mic primăvara la Mihalț Pod.

Tabel 1

**Numărul de bacterii în sedimentele râului Mureș analizate sezonier în anul 2001**

SO = substanță organică (mg/g sediment substanță uscată); BHA = bacterii heterotrofe aerobe;  
BAM = bacterii amonificatoare; BDN = bacterii denitrificatoare; BDS = bacterii desulfocitoare;  
BFR = bacterii fier-reducătoare; IBCS = indicatorul bacterian al calității sedimentului.

Locul	Sezonul	SO	Bacteriile studiate					IBCS
			BHA	BAM	BDN	BDS	BFR	
Răsto- lița	Primăvara	44	2890043	552314	46768	189	156	4,269
	Vara	52	10552043	439109	36879	469	428	4,507
	Toamna	83	3029723	993575	76121	980	482	4,607
	Iarna	49	1429530	872351	5326	57	718	4,087
Deda	Primăvara	36	7780715	602107	3583	108	243	4,129
	Vara	57	42586570	750821	19714	329	592	4,618
	Toamna	89	82131807	897051	23822	112	718	4,630
	Iarna	52	3192717	709241	2008	88	80	3,901
Târgu Mureș	Primăvara	57	9175038	4380454	3648	116	215	4,313
	Vara	68	128312795	7832919	15820	76	462	4,749
	Toamna	84	362816703	9012398	21534	286	721	5,032
	Iarna	62	6927316	6482390	3015	45	53	4,102
Iclân-zel	Primăvara	52	35612584	6317428	4237	164	193	4,496
	Vara	64	293872381	8192573	17218	404	458	4,977
	Toamna	77	659012879	8570482	24352	53	653	4,936
	Iarna	50	8117303	4285139	2953	117	48	4,152
Ocna Mureș	Primăvara	59	99010462	4371315	3570	83	709	4,592
	Vara	78	529863202	7482117	39361	1373	912	5,258
	Toamna	92	897425306	10983382	45820	97	471	5,063
	Iarna	52	15816911	6872103	2173	523	103	4,421
Aiud	Primăvara	55	87232801	5642382	4675	82	309	4,553
	Vara	84	638217431	7842926	32572	116	529	5,000
	Toamna	98	886382981	8565411	41115	59	783	5,032
	Iarna	47	6977106	6417890	2932	33	65	4,090
Mihalț Pod	Primăvara	60	55821612	4070816	2863	203	512	4,566
	Vara	92	267318020	5565021	23418	173	719	4,927
	Toamna	99	547192873	7823400	38721	89	968	5,031
	Iarna	56	8421509	6070182	3645	112	109	4,271
Alba Iulia	Primăvara	62	65813483	4871245	3125	203	619	4,620
	Vara	88	517297105	7238177	19389	87	817	4,943
	Toamna	95	795207381	9421823	25428	145	973	5,086
	Iarna	58	4853721	5416310	3028	68	72	4,118

Numărul de bacterii care aparțin celorlalte 3 grupe ecofiziologice este mult mai scăzut. În ordinea abundenței, urmează bacteriile denitrificatoare – de ordinul  $10^3$ - $10^4$ /g sediment (substanță uscată), valoarea maximă înregistrându-se toamna la Răstolița, iar cea minimă iarna la Deda. Mai slab reprezentate sunt bacteriile desulfocitoare și fier-reducătoare, ambele prezente într-un număr de ordinul  $10^1$ - $10^2$ /g sediment (substanță uscată), fără diferențe semnificative între cele două grupe ecofiziologice. Doar vara, în sedimentul prelevat de la Ocna Mureș s-a înregistrat un număr de ordinul  $10^3$  bacterii desulfocitoare/g sediment (substanță uscată). Valorile obținute sunt comparabile cu cele întâlnite în literatura de specialitate [4, 5, 7, 15].

Pe baza numărului de bacterii care aparțin celor 5 grupe fiziologice determinate în sedimente, s-a calculat indicatorul bacterian al calității sedimentelor (IBCS) [9]. Indicatorul bacterian al calității sedimentelor oferă o imagine de ansamblu asupra potențialului microbial al acestora. Valorile IBCS variază între 3,901 (singura valoare mai mică de 4, la Deda, iarna) și 5,258 (Ocna Mureș, toamna). În Fig. 1 este prezentată evoluția sezonieră a potențialului bacterian al sedimentelor din cele 8 puncte de prelevare. Se remarcă, înainte de toate, nivelul mai scăzut al potențialului enzimatic al sedimentelor din punctele de prelevare situate în amonte (Răstolița și Deda). Pe parcursul fiecărui sezon valorile IBCS cresc pe măsură ce punctul de prelevare se situează mai în aval. Diferența cea mai mare este consemnată între Deda (punct situat în zona montană) și Târgu Mureș, la câteva zeci de km după intrarea Mureșului în zona colinară. Drept consecință, viteza de curgere a apei scade, favorizând procesele sedimentare. De asemenea, aportul mai substanțial al afluenților favorizează acumularea de substanță organică ce urmează a se sedimenta, toate acestea ducând la intensificarea activității microbiene și enzimactice în sediment.

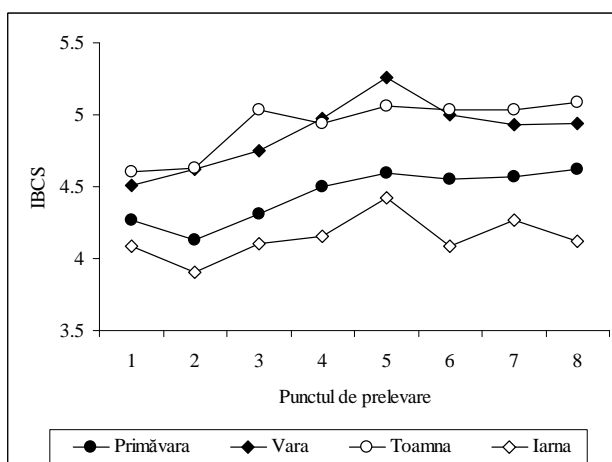


Fig. 1 Evoluția potențialului microbial în sedimentele râului Mureș analizate sezonier pe parcursul anului 2001.

IBCS = indicatorul bacterian al calității sedimentului; 1 - Răstolița; 2 - Deda; 3 - Târgu Mureș; 4 - Iclânzel; 5 - Ocna Mureș; 6 - Aiud; 7 - Mihalț Pod; 8 - Alba Iulia.

Valorile IBCS suferă modificări și în funcție de sezonul când au fost efectuate analizele. Fișec, cele mai mici valori sunt consemnate iarna. Foarte apropiate sunt și valorile înregistrate primăvara. O evoluție paralelă înregistrează potențialul enzimatic vara și toamna, cu valori ale IBCS sensibil mai mari decât cele consemnate iarna și primăvara.

În cadrul temei generale de cercetare au fost efectuate și analize enzimologice asupra aceluiași sedimente studiate din punct de vedere microbiologic [11]. Pentru completarea lucrării de față, din datele enzimologice folosim doar indicatorii enzimatici ai calității sedimentelor (IECS), calculați conform unei formulei propuse anterior [10]. Menționăm că indicatorul enzimatic al calității sedimentelor analizate și din punct de vedere microbiologic, a fost calculat pe baza următoarelor activități enzimice și catalitice neenzimice: activitatea catalazică, scindarea neenzimatică a  $H_2O_2$ , activitatea fosfatazică, activitatea dehidrogenazică actuală și activitatea dehidrogenazică potențială. IECS reflectă fidel potențialul enzimatic, intensitatea activităților enzimice în sedimente fiind direct proporțională cu valoarea indicatorului.

Am urmărit corelația între potențialul enzimatic (reflectat de valorile IECS), potențialul bacterian (reflectat de valorile IBCS) și conținutul în substanță organică al sedimentelor analizate în cele 4 sezoane ale anului 2001. Rezultatele analizei statistice sunt prezentate în Tabelul 2.

Tabel 2

**Corelația între indicatorii bacterieni (IBCS), respectiv enzimatici (IECS) ai calității sedimentului și conținutul în substanță organică (SO)**

	IBCS/IECS	IBCS/SO	IECS/SO
Răstolița	+0,962*	+0,729	+0,739
Deda	+0,775	+0,661	+0,981*
Tg Mureș	+0,921	+0,880	+0,854
Iclânzul	+0,909	+0,847	+0,955*
Ocna Mureș	+0,939	+0,866	+0,967*
Aiud	+0,980*	+0,934	+0,981*
Mihalț Pod	+0,996**	+0,961*	+0,936
Alba Iulia	+0,971*	+0,917	+0,966*

\* -  $p < 0,05$

\*\* -  $p < 0,01$

După cum se poate observa, între cei trei parametri comparați s-au stabilit coeficienți de corelație ( $r$ ) pozitivi. Nu toți au o semnificație statistică deosebită, datorită, în primul rând, numărului mic (4) de eșantioane luate în calcul. Cea mai semnificativă corelație s-a stabilit în cazul sedimentului de la Mihalț Pod. Luând în calcul toate valorile sezoniere din toate cele 8 puncte de prelevare, semnificația statistică a corelației pozitive stabilite între cei trei parametri este foarte ridicată ( $p < 0,001$ ):  $r = +0,845$  (IECS/IBCS);  $r = +0,815$  (IBCS/conținut în substanță organică);  $r = +0,755$  (IECS/conținut în substanță organică). Așadar, corelația cea mai strânsă s-a stabilit între indicatorii enzimatici și cei bacterieni ai calității sedimentelor studiate.

**Concluzii.** 1. În toate sedimentele analizate, pe parcursul fiecărui sezon, a fost consemnată prezența tuturor grupelor ecofiziologice bacteriene studiate. Numărul bacteriilor diferă, ordinea descrescătoare a abundenței lor fiind: heterotrofe aerobe > amonificatoare > denitrificatoare > desulfocatoare ≡ fier-reducătoare. Numărul de bacterii care aparțin fiecărui grup ecofiziologic suferă variații în funcție de punctul de prelevare și de sezon.

2. Au fost consemnate variații ale potențialului microbial al sedimentelor, definit de valorile indicatorilor bacterieni ai calității acestora. Oscilațiile sezoniere scot în evidență intensificarea activității microbiene vara și toamna, când s-au calculat valorile cele mai mari ale IBCS. Primăvara și iarna, aceste valori sunt mult mai mici. De asemenea, potențialul microbial al sedimentelor urmează o curbă ascendentă dinspre amonte înspre aval, valorile cele mai mici ale indicatorilor întâlnindu-se în sedimentele din zona montană a cursului Mureșului.

3. Analiza statistică a rezultatelor stabilește existența unei corelații pozitive între intensitatea activității enzimatică (ilustrată de valorile IECS), a celei bacteriene (ilustrată de valorile IBCS) și conținutul în substanță organică în sedimentele analizate. Observațiile certifică valoarea indicatorilor respectivi, ca modalitate eficientă de estimare a intensității activității enzimatică și microbiene în sedimente.

## BIBLIOGRAFIE

1. Alexander, M., *Most probable-number method for microbial populations*, in Black, C.A., Evans, D.D., White, J.L., Ensminger, L.E., Clark, F.E. (eds.), *Methods of Soil Analysis*, pp. 1467-1472, Ed. Am. Soc. Agron., Madison, 1965.
2. Allen, O.N., *Experiments in Soil Bacteriology*, Third Ed., p. 31, Ed. Burgess, Minneapolis, 1957.
3. Atlas, R.M., *Handbook of Microbiological Media*, 3<sup>rd</sup> edition, CRC Press, New York, 2004.
4. Crișan, R., Muntean, V., Pașca, D., Moldovan, O., Răjka, G., *Studiul microflorei bacteriene de pe paramentul barajului Drăgan (jud. Cluj)*, "An. Univ. Oradea, Biol.", **8**, 2001, 307-314.
5. Kulikov, A.S., Sadcikov, A.P., Maksimov, V.N., *Obščiaia aktivnost bakterii sedimentaționnogo detrita, izmerennaia s pomoșciu fluoresceindiațetata*, "Mikrobiol. J. (Kiev)", Nr. 5, 1989, 7-11.
6. Malcolm, S.J., Stanley, S.D., *The sediment environment*, in Nedwell, D.B., Brown, C.M. (eds.), *Sediment Microbiology*, pp. 1-14, Ed. Acad. Press, London, 1982.
7. Meyer-Reil, L.-A., *Benthic response to sedimentation events during autumn to spring at a shallow water station in the western Kiel Bight. 2. Analysis of benthic bacterial populations*, "Mar. Biol.", **77**, 1983, 247-256.
8. Meyer-Reil, L.-A., *Seasonal and spatial distribution of extracellular enzymatic activities and microbial incorporation of dissolved organic substrates in marine sediments*, "Appl. Environ. Microbiol.", **53**, 1987, 1748-1755.

## CERCETĂRI MICROBIOLOGICE ÎN SEDIMENTE

9. Muntean, V., *Bacterial indicator of mud quality*, "Contrib. Bot.", 1995-1996, 73-76.
10. Muntean, V., Crișan, R., Pașca, D., Kiss, S., Drăgan-Bularda, M., *Enzymological classification of salt lakes in Romania*, "Int. J. Salt Lake Res.", **5** (1), 1996, 35-44.
11. Muntean, V., Ștef, L.C., Drăgan-Bularda, M., *Cercetări enzimologice asupra unor sedimente din râul Mureș*, "Rom. Biol. Sci.", **1** (3-4), 2004, 107-114.
12. Ottow, J.C.G., *Evolution of iron-reducing bacteria in soil and the physiological mechanism of iron reduction in Aerobacter aerogenes*, "Z. Allg. Mikrobiol.", **8**, 1968, 441-443.
13. Pârvu, R., Stanciu, E., Lorinczi, F., Kiss, S., Drăgan-Bularda, M., Rădulescu, D., *Iron-reducing capacity of soil micromycetes*, in *Fourth Symp. Soil Biol.* (Cluj-Napoca, 1977), pp. 149-154, Ed. Ceres, București, 1977.
14. Pochon, J., *Manuel technique d'analyse microbiologique du sol*, pp. 59-60, Ed. Masson, Paris, 1954.
15. Poremba, K., Lochte, K., Rheinheimer, G., *Microbiologische Untersuchungen im norwegischen Sognefjord*, "Ber. Inst. Meereskd. Univ. Kiel", **242**, 1993, 90-99.

## CERCETĂRI ASUPRA POLUĂRII FECALOIDE A APEI RÂULUI SOMEȘ

**CRISTINA BUZAN\* și MIHAIL DRĂGAN-BULARDA\*\***

**SUMMARY.** – **Research on the Faecaloid Pollution of the the Someș River Water.** The study, which started in the spring 2000 and ended in the spring 2003, was focussed on the water at the confluence of Someș and Lăpuș rivers. Three sampling sites were chosen: the first one was on the Lăpuș River right under the pollution point at Bozânta Mare; the second one was on the Someș River, at Buzești, before the confluence with the Lăpuș River and the last one is situated at Pomi, on the Someș River but after the confluence with the Lăpuș River. The presence in high number of the total coliform bacteria indicates a high degree of water pollution at Bozânta Mare and Buzești. At Pomi the water is relatively clean. A high number of faecal coliform enterococci indicates a high pollution degree of the water. The low number of coliform bacteria recorded at Pomi is associated with the relatively low number of the faecal enterococci.

Mediile acvatice naturale sunt sediul unor procese fizico-chimice variate, care influențează metabolismul de sinteză și degradativ al microorganismelor, influențează considerabil populațiile de organisme vegetale și animale, ca și mediul în ansamblul lui [6]. Speciile încadrate în categoria germenilor coliformi nu sunt propriu-zis patogene, dar, în anumite condiții, pot provoca adesea boli diareice sau infecții ale tractului urinar, de aceea sunt considerate patogeni oportuniști. Sunt importanți pentru că sunt considerați organisme indicator de cea mai mare importanță [5].

Cercetările care fac obiectul acestei lucrări au fost efectuate în cadrul unei teme de cercetare mai ample, realizată pe râul Someș. Scopul lucrării este determinarea prezentei germenilor coliformi și a enterococilor fecali. Deși nu sunt exclusiv de origine fecală, germenii coliformi sunt prezenți în cantități mari în materiile fecale ale omului și animalelor cu sânge cald, ceea ce permite decelarea acestui grup și după o diluare considerabilă. Prezența lor în mediile naturale indică o contaminare recentă cu materii fecale [4]. C o o p e r și R a m a d a n [2] analizează raporturile care se stabilesc între coliformii și streptococii fecali și susțin că aceste raporturi pot asigura informații asupra posibilelor surse de poluare.

Spre deosebire de habitatele nepoluate, în care speciile sunt reprezentate de un număr relativ mic de indivizi, poluanții elimină speciile mai sensibile, reduc interacțiunile competitive și favorizează proliferarea speciilor mai tolerante la stres. În felul acesta

---

\* Grupul Școlar de Industrie Ușoară, str. Taberei, nr. 3, RO-400512 Cluj-Napoca

\*\* Universitatea "Babeș-Bolyai", Facultatea de Biologie și Geologie, Catedra de Biologie Experimentală, str. M. Kogălniceanu, nr. 1, RO-400084 Cluj-Napoca

numărul speciilor este diminuat, dar numărul indivizilor din fiecare specie crește. Face excepție cazul în care stresul este foarte sever și determină eliminarea întregii colectivități.

**Materiale si metode.** În vederea efectuării analizelor au fost prelevate probe de apă din 3 puncte de colectare: pe râul Lăpuș imediat sub punctul de poluare cu cianuri și metale grele de la Bozânta Mare, pe Someș (Buzești) la o distanță de 20 km amonte de gura de vărsare a Lăpușului și al treilea tot pe Someș, la 20 km aval de punctul de vărsare a Lăpușului. Probele de apă au fost prelevate în condiții sterile. Pentru determinarea cantitativă a germeilor coliformi totali și a germeilor coliformi fecali (termotoleranți) au fost respectate prevederile conținute în metoda standardizată [3, 8].

Analiza probelor de apă prelevate a constat în efectuarea testului prezumtiv și a testului de confirmare. Testul prezumtiv evidențiază faptul că grupul coliformilor fermentează lactoza cu producere de acid (virarea culorii mediului în galben) și gaz (prin prezența în tuburile de fermentare Durham), sau numai gaz în cazul folosirii bulionului lauryl sulfat. Probele se incubează 48 de ore la 37°C. După 24 de ore se face o prima citire și se efectuează testul de confirmare pentru eprubetele considerate pozitive (probele în care se evidențiază fermentarea lactozei cu producere de gaz, oricât de mică ar fi cantitatea degajată).

Testul de confirmare constă în efectuarea de însămânțări cu ansa, din probele considerate pozitive, pe mediul Levine pentru a preciza dacă germeni care au fermentat lactoza sunt coliformi (și nu aparțin altor specii microbiene dotate cu aceleași proprietăți, cum sunt lactobaciliile). Incubarea are loc la temperatura de 37°C, timp de 24 de ore.

Datorită rezistenței lor deosebite la agenții fizici, chimici și biologici, enterococii fecali, alături de coliformii fecali și totali au o valoare sanitară importantă ca indicatori de poluare fecală a apei. Mai mult, acest indicator al poluării fecale amplifică sensibilitatea metodei de decelare a poluării fecale a apei, făcând-o mai fiabilă prin folosirea a doi indicatori în loc de unul. Pentru determinarea calitativă a enterococilor fecali, s-a aplicat metoda diseminării în placă. Această metodă este folosită mai ales pentru diferențierea coloniilor datorită faptului că pe suprafața mediului geloză nutritivă cresc diferite tipuri de colonii ale microorganismelor existente în probă supusă analizei. Cantitățile de diluții zecimale care se pot folosi sunt foarte mici, sub 0,1 ml.

Din diluțiile pregătite se iau volume stabilite (sub 0,1 ml), care prin mișcări rapide în zig-zag se împrăștie pe toată suprafața mediului. Ar fi preferabil ca plăcile Petri să fie așezate pe o masă rotitoare, care permite rotirea succesivă a plăcii, astfel dispersia făcându-se mai bine. Turnarea mediului agar glucoză-azidă de sodiu-TTC în plăcile Petri trebuie să se facă din timp, iar plăcile cu mediu să fie uscate în momentul diseminării probei.



Cutiile Petri însămânțate sunt introduse cu capacul în jos în termostat la  $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  timp de 44-46 ore. Se numără coloniile caracteristice de streptococi fecali de la suprafața mediului, fiind acceptate doar plăcile cu număr de colonii cuprins între 25-300. Numărul de streptococi fecali se calculează după aceeași formulă ca și în metoda încorporării în placă.

În literatura de specialitate există controverse în ceea ce privește metoda diseminării probei la suprafața mediului. Unii microbiologi recomandă diseminarea cu ajutorul spatulei de sticlă, în timp ce alții susțin că au obținut rezultate bune atât prin folosirea spatulei de sticlă, cât și prin folosirea altor mijloace de diseminare. Clark [1] susține prin studiile sale că diseminarea cu spatula de sticlă duce la pierderea unei părți din volumul de probă care rămâne pe aceasta. De aceea cercetătorul nu recomandă această tehnică de diseminare a probei pe suprafața mediului.

**Rezultate și discuții.** În Tab. 1 sunt prezentate rezultatele determinarilor germenilor coliformi totali, fecali și a enterococilor fecali, în cele trei puncte de prelevare, în perioada anilor 2000-2003. Toate probele de apă analizate s-au dovedit a fi contaminate cu germeni coliformi și enterococi fecali, ceea ce indică o poluare fecaloidă a celor două râuri.

Tabel 1

**Densitategermenilor coliformi totali, fecali și a enterococilor  
în probele de apă analizata (bacterii/100 ml apă)**

Punctele de prelevare: I – Buzești; II – Bozânța Mare; III – Pomi

Anul	Sezonul	Coliformi fecali			Coliformi totali			Enterococi fecali		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III
2000	Primăvara	800	600	400	800	1400	800	200	400	400
	Vara	1100	800	600	1400	4900	900	400	800	600
	Toamna	800	800	600	800	2200	800	200	600	400
	Iarna	600	200	200	900	1100	400	200	400	200
2001	Primăvara	900	900	800	2000	16090	400	400	800	400
	Vara	1200	1400	900	2780	16090	1100	400	800	800
	Toamna	1000	1100	800	1000	2300	1100	200	600	200
	Iarna	400	400	400	1100	1200	600	100	600	100
2002	Primăvara	600	800	500	800	1100	400	200	500	200
	Vara	800	800	800	3300	3480	1100	400	600	400
	Toamna	600	900	600	900	1100	1100	100	400	400
	Iarna	400	500	600	800	900	600	100	600	200
2003	Primăvara	500	500	600	600	600	400	200	600	400
	Vara	1100	1200	1200	1300	1200	800	400	600	600
	Toamna	700	800	900	800	800	600	400	500	400
	Iarna	300	300	400	400	400	400	100	400	100

Figurile 1-3 ilustrează sugestiv variația numărului germenilor coliformi totali, fecali și al enterococilor în probele de apă analizate. Numărul coliformilor totali și fecali este mai mare decât al enterococilor, pe toată perioada studiată, la toate punctele de prelevare.

Se constată o scăderea liniară a numărului coliformilor fecali pe parcursul celor patru sezoane ale anului 2000 (Fig. 1). În ceilalți ani, variația numărului coliformilor fecali nu mai este liniară, ci înregistrează valori aleatorii. Cel mai mare număr de coliformi fecali a fost înregistrat vara, la Bozânta Mare (1400 bacterii/100 ml apă), iar cel mai mic număr (300 bacterii/100 ml apă) a fost consemnat iarna, la Buzești și la Bozânta Mare.

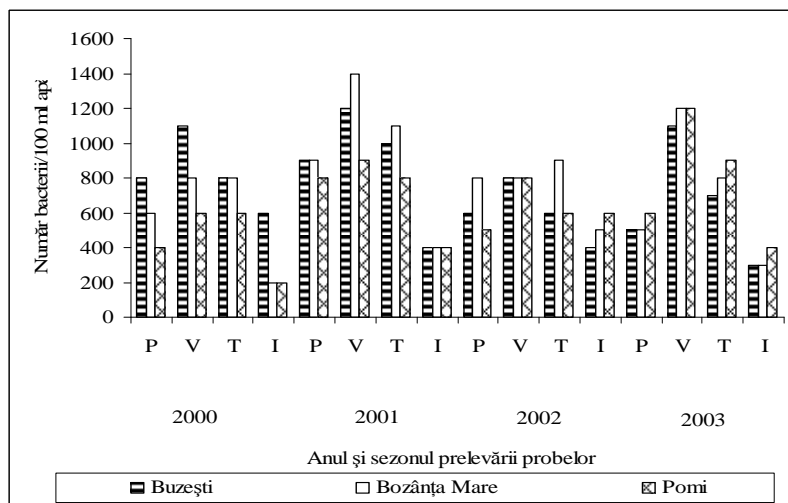


Fig. 1. Variația anuală și sezonieră a numărului germenilor coliformi fecali.

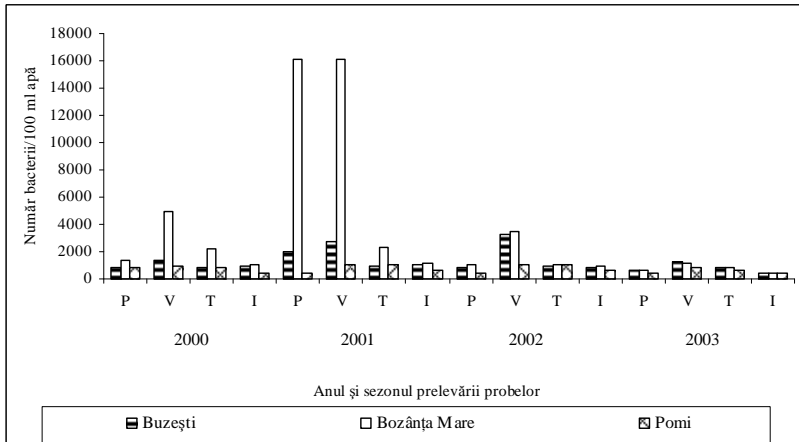
Cel mai mare număr de coliformi totali a fost înregistrat în anul 2001, tot la Bozânta Mare, atât primăvara cât și vara consemnându-se prezența în eșantioanele analizate a 16090 bacterii/100 ml apă. Cu excepția acestor două valori, numărul coliformilor totali nu depășește 5000 în niciuna dintre celelalte probe analizate (Fig. 2).

Enterococii fecali se găsesc în toate eșantioanele analizate, numărul lor variind între 100 și 800 bacterii/100 ml apă.

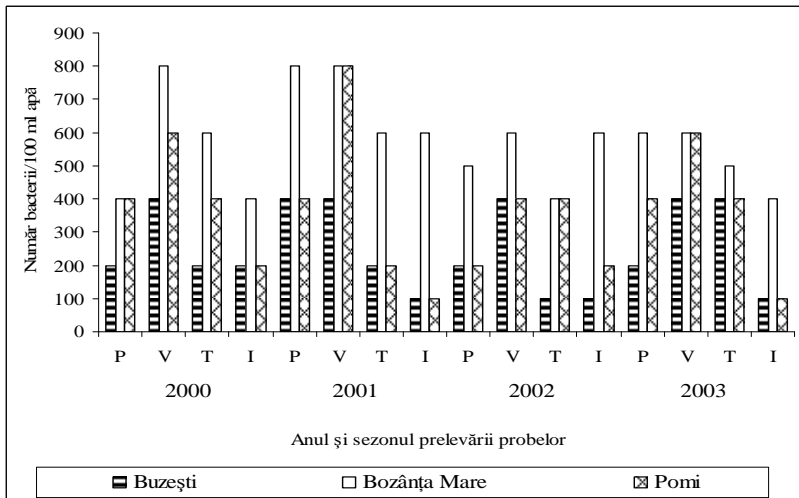
Pe baza analizelor efectuate pe probele prelevate se poate constata că numărul coliformilor totali indică o apă poluată la Bozânta Mare și la Buzești și o apă relativ curată la Pomi. Această observație este valabilă pentru toate perioadele de recoltare.

CERCETĂRI ASUPRA POLUĂRII FECALOIDE A APEI

Cu toate că numărul coliformilor totali și fecali prezintă valori ridicate la Buzești, numărul enterococilor fecali are cele mai mici valori la acest punct de colectare, pe toată perioada de studiu.



Fi g. 2. Variația anuală și sezonieră a numărului germeilor coliformi totali.



Fi g. 3. Variația anuală și sezonieră a numărului enterococilor fecali.

La Pomi, valorile scăzute ale numărului de bacterii coliforme se asociază cu numărul scăzut de enterococi fecali aceste rezultate putând fi explicate prin faptul că pe acest traseu râul are un curs rapid, un nivel mic al apei și apa este bine oxigenată. Există mari oscilații sezoniere ale numărului germeilor coliformi și enterococi fecali, valorile maxime înregistrându-se în sezonul cald, iar cele mici în sezonul rece.

**Concluzii.** 1. Toate probele de apa analizate s-au dovedit a fi contaminate cu germeni coliformi și enterococi fecali, ceea ce indică o poluare fecaloidă a celor două râuri. Numărul coliformilor totali și fecali este mult mai mare decât al enterococilor, pe toată perioada studiată, la toate punctele de prelevare.

2. Pe baza analizelor efectuate pe probele prelevate se poate constata că numărul coliformilor totali indică o apă poluată la Bozânța Mare și la Buzești și o apă relativ curată la Pomi. Această observație este valabilă pentru toate perioadele de recoltare. Cu toate că numărul coliformilor totali și fecali prezintă valori ridicate la Buzești, numărul enterococilor fecali are cele mai mici valori la acest punct de colectare, pe toată perioada de studiu.

3. La Pomi, valorile scăzute ale numărului de bacterii coliforme se asociază cu numărul scăzut de enterococi fecali aceste rezultate putând fi explicate prin faptul că pe acest traseu râul are un curs rapid, un nivel mic al apei și apa este bine oxigenată.

4. Există mari oscilații sezoniere ale numărului germeilor coliformi și enterococi fecali, valorile maxime înregistrându-se în sezonul cald, iar cele mici în sezonul rece.

## BIBLIOGRAFIE

1. C l a r c k, D.S., *Comparison of pour and surface plate methods for determination of bacterial counts*, "Can. J. Microbiol.", 1967, 1409-1415.
2. C o o p e r, K.E., R a m a d a n, F.M., *Studies in the differentiation between human and animal pollution by means of fecal streptococci*, "J. Gen. Microbiol.", 1955, 180-184.
3. D r ă g a n-B u l a r d a M., *Microbiologia generală. Lucrări practice*, Universitatea "Babeș-Bolyai", ClujNapoca, 2000.
4. M ă n e s c u, S., *Microbiologie sanitară*, Ed. Medicală, București, 1989.
5. M e d e m a, G.J., B a h a r, M., S c h e t s, M., *Survival of Cryptosporidium parvum, Escherichia coli, faecal enterococci and Clostridium perfringens in river water: influence of temperature and autochthonous microorganisms*, "Water Science and Technology", 1997, 249-252.
6. M i l l e a, L.C., *Preocupări actuale legate de poluarea apelor*, "Stud. Cercet., Biol.", 2001, 6, 29-34.
7. M i l l e a, L.C., D r ă g a n-B u l a r d a, M., L e n g y e l, J., M u n t e a n, V., *Studiul bacteriologic al unor probe de apă din orașul Aiud*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", 1993, 38 (1-2), 111-117.
8. STAS 3001, *Apa – Analiză bacteriologică*, Ministerul Sănătății, București, 1991.

## CERCETĂRI ENZIMOLOGICE ASUPRA SEDIMENTELOR RÂULUI SOMEȘ LA CONFLUENȚA CU RÂUL LĂPUȘ

**CRISTINA BUZAN\*\* și MIHAIL DRĂGAN-BULARDA\*\***

**SUMMARY.** – **Enzymological Research on Sediments from the Someș at Confluence with the Lăpuș River.** Sediments of the Someș river were studied enzymologically. The following 5 enzymatic and nonenzymatic catalytic activities have been measured: phosphatase, catalase, actual and potential dehydrogenase, nonenzymatic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-splitting capacity. The analyses were carried out seasonally, during the years 2002-2003, in 3 points along the river stream: one of them is Bozanta Mare, the others being situated upstream and downstream of the confluence of the Somes with Lapus river. All the studied activities were detected in all the samples analysed. Based on the analytical data, the enzymatic indicators of sediment quality (EISQs) were calculated. Seasonal differences were registered, with the highest values in autumn and the lowest ones in winter. The chemical pollution at the Bozânta Mare point resulted in lower values of the enzymatic activities, and, consequently of the EISQ. The high values of the EISQ 20 km downstream from the pollution point, closed to that registered upstream, reflects the good autoregenerative capacity of the studied sediments.

În ciclul biogeochimic al elementelor, sedimentele sunt o verigă cheie, la nivelul lor finalizându-se procesul de mineralizare a substanțelor organice care n-au fost degradate în coloana de apă. Compoziția sedimentelor este o funcție complexă a mai multor factori, foarte diferiți, cum ar fi matrixul mineral major, textura, cantitatea de carbon organic, localizarea geografică [9]. Acțiunea microorganismelor asupra substratelor din mediu se face pe cale enzimatică, prin oxidoreduceri și hidrolize, respectiv prin acțiunea unor produși finali ai metabolismului microbial, în cele din urmă rezultat tot al activității enzimatică a microorganismelor. În consecință, determinarea activităților enzimatică în sedimente reprezintă un instrument de cercetare pentru a aprecia diversitatea funcțională a microbiotei, deci a proceselor biochimice în acest mediu natural, în scopul stabilirii unor indicatori ai calității habitatelor.

Dacă implicarea microorganismelor în procesele complexe de transformare a substanțelor în bazinele acvatice este de la sine înțeleasă, nefiind pusă sub semnul întrebării, rolul enzimelor libere în aceste procese a fost demonstrat, după datele de care dispunem, începînd cu deceniul al patrulea al acestui secol. K r e p s (1934) semnalează

---

\* Grupul Școlar de Industrie Ușoară, str. Taberei, nr. 3, RO-400512 Cluj-Napoca

\*\* Universitatea "Babeș-Bolyai", Facultatea de Biologie și Geologie, Catedra de Biologie Experimentală, str. M. Kogălniceanu, nr. 1, RO-400084 Cluj-Napoca

posibilitatea prezenței în apa de mare a unor catalizatori eliberați de către microorganisme, sau provenind din țesuturile moarte ale organismelor superioare. Colectivul din care făcea parte publică rezultatele cercetărilor efectuate în apa și sedimentele coastei Murmansk, într-o lucrare mai amplă, doi ani mai târziu [2].

L e n h a r d și colab. (1962) consideră că depozitele de fund ale lacurilor și râurilor pot fi apreciate ca soluri care s-au dezvoltat în condiții de inundație [8]. Tot astfel, C o s g r o v e (1977) definește sedimentele lacustre drept tipuri speciale de sol, diferind de solurile ordinare prin aceea că sînt permanent inundate și regenerate continuu prin depunere [3]. În ultimul timp, cercetările enzimatice asupra sedimentelor au căpătat o mare amploare. La noi în țară cercetările au vizat în special sedimentele lacurilor saline, dar a fost abordat și domeniul sedimentelor râurilor [10, 11].

În lucrarea de față ne-am propus să urmărim activitatea enzimatică a sedimentelor din râul Someș, la confluența cu râul Lăpuș, după doi ani de la deversarea în acesta a unor cantități importante de cianuri provenite de la întreprinderea Aurul Transgold S.A., situată în amonte de Bozânta Mare. În acest scop au fost selectate 3 puncte de colectare a probelor: unul pe râul Lăpuș imediat sub punctul de poluare cu cianuri și metale grele de la Bozânta Mare, unul pe Someș (Buzești) la o distanță de 20 km amonte de gura de vărsare a Lăpușului și ultimul tot pe Someș, tot pe o distanță de 20 km, aval de punctul de vărsare a Lăpușului.

**Material e și metode.** Analiza enzimologică a sedimentelor râului Lăpuș a fost realizată pe baza probelor prelevate din trei stații. Una dintre ele este Bozânta Mare, celelalte fiind situate în amonte și aval de această localitate. Cercetările au fost efectuate pe parcursul anilor 2002 și 2003, eșantioanele fiind prelevate sezonier: iulie 2002, octombrie 2002 decembrie 2002 și martie 2003. Eșantioanele de sedimente au fost centrifugate, iar după îndepărtarea supernatantului, din fiecare probă s-au efectuat determinări de substanță uscată și analize enzimatice. Au fost determinate următoarele 5 activități enzimatic e și catalitice neenzimatice: activitatea fosfatazică [6], activitatea catalazică și scindarea neenzimatică a  $H_2O_2$  [5] (inactivarea enzimelor s-a făcut prin autoclavarea eșantioanelor), activitatea dehidrogenazică actuală și activitatea dehidrogenazică potențială [2]. Activitatea fosfatazică se exprimă în mg fenol/2,5 g sediment (substanță uscată), activitățile catalazică și de scindare neenzimatică a  $H_2O_2$  se exprimă în mg  $H_2O_2$ /1,5 g sediment (substanță uscată) iar activitatea dehidrogenazică se exprimă în mg formazan/g sediment (substanță uscată).

**Rezultate și discuții.** Rezultatele analizei enzimatice ale sedimentelor analizate sunt prezentate în Tab. 1. După cum se poate observa, toate cele 5 activități enzimatic e și catalitice neenzimatice au fost prezente în toate eșantioanele studiate. Există

variații sezoniere, intensitățile minime fiind consemnate iarna, la fiecare dintre punctele studiate. Valorile absolute ale activităților sunt relativ ridicate, comparabile cu altele din literatura de specialitate [4, 10, 11].

Cea mai intensă activitate fosfatazică (7,15 mg fenol/2,5 g sediment substanță uscată) se înregistrează toamna la punctul Buzești. În același punct și în același sezon este consemnată și cea mai intensă activitate dehidrogenazică potențială (7,25 mg formazan/g sediment substanță uscată). Celelalte valori maxime sunt consemnate tot în sezonul de toamnă, la punctul de prelevare Pomi: activitatea catalazică 30,55 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scindată /1,5g sediment substanță uscată; scindarea neenzimatică a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 19,03 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scindată /1,5g sediment substanță uscată; activitatea dehidrogenazică actuală 5,09 mg formazan/g sediment substanță uscată. Conform așteptărilor, în toate cazurile activitatea dehidrogenazică potențială este mai intensă decât activitatea dehidrogenazică actuală, dar diferențele nu sunt prea mari. Întrucât activitatea dehidrogenazică reflectă fidel intensitatea respirației microbiene în sedimente, diferența mică dintre valorile activității dehidrogenazice actuale și potențiale ilustrează existența unei activități respiratorii microbiene intense în sedimentele analizate, chiar în lipsa unui aport nutritiv suplimentar în amestecurile de reacție.

Tabel 1

Rezultatele analizei enzimologice efectuate asupra sedimentelor din râul Someș							
Punctul de prelevare	Sezonul	Activitatea fosfatazică mg fenol/2,5 g sediment (s.u.)	Activitatea catalitică		Activitatea dehidrogenazică		IECS
			Enzimatică	Ne-enzimatică	Actuală	Potențială	
Buzești (amonte)	Primăvară	6,63	26,45	14,93	5,06	6,25	0,368
	Vară	6,58	28,34	16,82	4,09	6,04	0,362
	Toamnă	7,15	30,15	18,63	5,34	7,25	0,416
	Iarnă	5,03	15,42	10,24	3,44	5,15	0,260
Bozânta Mare	Primăvară	4,25	21,25	9,73	3,4	4,04	0,253
	Vară	5,04	25,2	13,68	4,05	3,83	0,294
	Toamnă	4,61	23,05	11,53	3,21	5,04	0,281
	Iarnă	3,12	15,6	4,08	2,03	2,94	0,168
Pomi	Primăvară	3,45	17,25	5,73	4,48	5,22	0,253
	Vară	5,19	25,95	14,43	4,44	5,01	0,323
	Toamnă	6,11	30,55	19,03	5,09	6,22	0,390
	Iarnă	4,82	24,1	12,58	4,25	4,12	0,291

Pe baza valorilor absolute ale activităților enzimatică și catalitică neenzimatică din fiecare eșantion analizat s-au calculat indicatorii enzimatici ai calității sedimentelor [10]. Indicatorul enzimatic al calității sedimentelor (IECS) oferă o imagine de ansamblu asupra potențialului enzimatic al acestora. În Fig. 1 este prezentată variația potențialului enzimatic al sedimentelor analizate, așa cum este reflectat acesta de către valorile indicatorilor calculați.

Valorile IECS sunt cuprinse între 0,416 (toamna, la Buzești) și 0,168 (iarna, la Bozânta Mare). La Buzești și la Bozânta Mare valorile minime sunt consemnate iarna, iar la Pomi primăvara. Pe punctele de prelevare, valorile cele mai mari ale IECS au fost înregistrate vara la Bozânta Mare (0,294), respectiv toamna la Buzești (0,416) și Pomi (0,390).

Pe ansamblu, comparația între cele trei puncte de prelevare arată un potențial enzimatic mai scăzut la Bozânta Mare, unul superior la Buzești și unul intermediar la Pomi. Situația este explicabilă prin efectul pe care poluanții de natură chimică (cianuri, metale grele) deversați de Transgold S.A. îl au asupra activității microbiene, în general, și implicit asupra celei enzimatică, în sedimente. Reamintim că poziționarea punctelor de prelevare: Buzești la o distanță de 20 km amonte de gura de vărsare a Lăpușului în Someș, Pomi la o distanță de 20 km aval de punctul de vărsare a Lăpușului, iar Bozânta Mare pe râul Lăpuș, la locul deversării apelor poluate de la întreprinderea amintită.

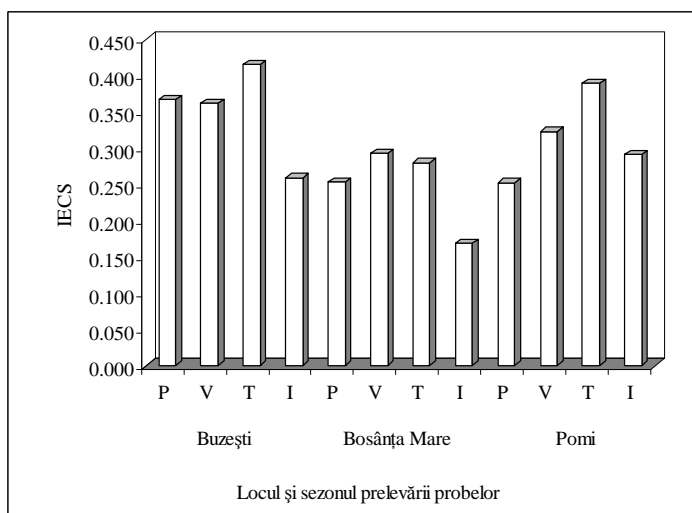


Fig. 1. Potențialul enzimatic al eșantioanelor analizate reflectat de valorile indicatorilor enzimatici ai calității sedimentelor (IECS).

Faptul că la câțiva km aval de locul deversării poluanților potențialul enzimatic al sedimentelor este apropiat de acela consemnat în amonte reflectă buna capacitate autoregenerativă a sedimentelor. Observațiile certifică valoarea indicatorilor enzimatici ai calității, ca modalitate eficientă de estimare a intensității activității enzimatică și, implicit, microbiene în sedimente, de apreciere a efectului pe care poluanții îl exercită asupra acestor habitate naturale.



**Concluzii.** 1. În toate eşantioanele analizate a fost consemnată prezența tuturor celor 5 activități enzimatică și catalitice neenzimatică studiate: fosfatazică, catalazică și de scindare neenzimatică a  $H_2O_2$ , dehidrogenazică actuală și dehidrogenazică potențială. Există variații sezoniere, intensitățile minime fiind consemnate iarna, iar cele maxime vara sau toamna.

2. Întrucât activitățile dehidrogenazice reflectă intensitatea respirației microbiene în sedimente, diferența mică dintre valorile activității dehidrogenazice actuale și potențiale ilustrează existența unei activități respiratorii microbiene intense în sedimentele analizate, chiar în lipsa unui aport nutritiv suplimentar.

3. Indicatorii enzimatici ai calității sedimentelor, calculați pe baza valorilor absolute ale activităților enzimatică și catalitice neenzimatică din fiecare eşantion analizat, au valori cuprinse între 0,416 (toamna, la Buzești) și 0,168 (iarna, la Bozânța Mare). Indicatorul enzimatic al calității sedimentelor (IECS) oferă o imagine de ansamblu asupra potențialului enzimatic al acestora.

3. Comparația între cele trei puncte de prelevare indică un potențial enzimatic mai scăzut la Bozânța Mare, unul superior la Buzești și unul intermediar la Pomi, situație explicabilă prin efectul pe care poluanții de natură chimică (cianuri, metale grele) deversați la punctul Bozânța Mare îl au asupra activității enzimatică în sedimente.

4. Existența unui potențial enzimatic considerabil la câțiva km aval de locul deversării poluanților, apropiat prin valorile IECS de acela consemnat câțiva km amonte, reflectă buna capacitate autoregenerativă a sedimentelor analizate. Se confirmă valoarea indicatorilor enzimatici ai calității, ca modalitate eficientă de estimare a intensității activității enzimatică în sedimente, de apreciere a efectului pe care poluanții îl exercită asupra acestor habitate naturale.

## BIBLIOGRAFIE

1. B o k o v a, E. N., B o r s u k, V. N., V e r j b i n s k a i a, N. A., K r e p s, E. M., L u k i a n o v a, V. S., *Ob organiceskih katalizatorah ili fermentah v morskoi vode*, "Arh. Biol. Nauk", 1936, **43** (2-3), 353-364.
2. C a s i d a, L. E. Jr., K l e i n, D.A., S a n t o r o, T., *Soil dehydrogenase activity*, "Soil Sci.", 1964, **98**, 371-376.
3. C o s g r o v e, D. J., *Microbial transformations in the phosphorus cycle*, în A l e x a n d e r, M. (ed.), *Advances in Microbial Ecology*, vol. 1, pp. 95-134, Plenum Press, New York, 1977.
4. D r ă g a n-B u l a r d a, M., P o p t e l e c a n, I. C., M u n t e a n, V., C r i ș a n, R., P a ș c a, D., *Cercetări enzimologice asupra nămolurilor din lacurile saline de la Bazna și Blaj*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", 2000, **45** (1), 121-128.
5. K a p p e n, H., *Die katalytische Kraft des Ackerbodens*, "Fühlings Landw. Ztg.", 1913, **62**, 377-392.

6. K r á m e r, M., E r d e i, G., *Primenenie metoda opredeleniia aktivnosti fosfatazi v agrohimiceskih issledovaniiah*, "Pocivovedenie", 1959, 9, 99-102.
7. K r e p s, E., *Organic catalysts or enzymes in sea water*, în *James Johnstone Memorial Volume*, p. 193-202, Univ. Liverpool Press, 1934.
8. L e n h a r d, G., R o s s, W.R., d u P l o o y, A., *A study of methods for the classification of bottom deposits of natural waters*, "Hydrobiologia", 1962, **20**, 223-240.
9. M a l c o l m, S.J., S t a n l e y, S.D., *The sediment environment*, in N e d w e l l, D.B., B r o w n, C.M. (eds.), *Sediment Microbiology*, pp. 1-14, Acad. Press, London, 1982.
10. M u n t e a n, V., C r i ș a n, R., P a ș c a, D., K i s s, S., D r ă g a n - B u l a r d a, M., 1996, *Enzymological classification of salt lakes in Romania*, "Int. J. Salt Lake Res.", **5** (1), 1996, 35-44.
11. M u n t e a n, V., Ș t e f, L.C., D r ă g a n - B u l a r d a, M., *Cercetări enzimologice asupra unor sedimente din râul Mureș*, "Rom. Biol. Sci.", 2004, **1** (3-4), 107-114.

## ANALIZA ENZIMOLOGICĂ A UNOR ZĂCĂMINTE DE TURBĂ DIN ROMÂNIA

DANIELA PAȘCA\* și **REMUS PAȘCA\***

**SUMMARY. - Enzymological Analysis of Some Romanian Peatlands** Peats sampled from 5 representative moors belonging to 3 types (highmoor, mesotrophic and low moor) were qualitatively analyzed to determine their enzymatic (invertase, cellobiase, lactase, amylase, carboxymethyl-cellulase, dextranase, innulase, levanase, maltase), activities. The results show that the oligases and polyases activities vary depending on the moor type. The enzymatic activities were found to be higher in the mesotrophic moor than in the high and low moors. Enzymatic activities registered a decreasing tendency with increasing depth of peat sampling and with the process of peat formation. The differences between the 3 moor types were relevant. The air drying of peat samples not determined a decreasing of enzymatic activities, comparatively with native peat samples. Inactivation (destruction of enzymes) produced increasing acidity in highmoor peat samples.

**Introducere.** De la apariția primului tratat despre turbă, publicat de Martin Schook la Groningen (Olanda) în 1658, această resursă naturală, cu complicate particularități structurale a fost din ce în ce mai intensiv investigată, pentru ca în secolul nostru să se găsească în lumina concentrică a unor cercetări multilaterale. Studiul teoretic al turbei, mereu adâncit, a relevat tot mai numeroase posibilități de întrebuințare, iar aplicațiile au generat la rândul lor noi abordări teoretice.

În zonele emisferei nordice, aria imensă a zăcămintelor de turbă, investigarea acestui biolit s-a întemeiat pe diferite concepții urmărind o tematică divergentă determinată de diverse oportunități economice care s-au reflectat în literatura științifică printr-o problematică vastă.

Deși față de imensele zăcăminte de turbă existente în regiunea boreală (Finlanda, Canada, S.U.A., Germania, Anglia, Irlanda, Federația Rusă, Suedia și Polonia), cele din țara noastră au extinderi considerabil mai reduse (sub 1% din stocul mondial), această limitare cantitativă este compensată printr-o importanță fitogeografică excepțională. Diversitatea condițiilor genetice ale turbăriilor din țara noastră are drept complement o varietate tipologică largă de zăcăminte turboase, cu implicații tot atât de complexe și în privința caracteristicilor lor biochimice, implicat a celor enzimologice.

Este cunoscut că studiul turbei ridică probleme care sunt cu totul deosebite de cele întâlnite în cercetarea rocilor organogene ca și a solurilor, iar procesele implicate în formarea acestor zăcăminte sunt într-o mare măsură diferite de cele care intervin în geneza altor sedimente organogene.

În această privință este de relevat că rolul microorganismelor este mult mai important în geneza și evoluția turbei.

---

\* *Universitatea Tehnică din Cluj-Napoca, Facultatea de Construcții și Instalații  
Str. C-tin Daicoviciu Nr. 15, RO-3400 Cluj-Napoca*

Cu toate că, datorită acțiunii sale antimicrobiene, inițial turba a fost considerată un mediu complet abiotic, în ultimele decenii cercetarea microbiologică și enzimologică a turbei s-a intensificat.

Cunoașterea acțiunii biocatalizatorilor din aceste zăcăminte a necesitat numeroase studii enzimologice întreprinse în diferite tipuri de turbă. S-a arătat că datorită condițiilor de formare și de evoluție, distincte pentru fiecare tip de turbă, există diferențe și în privința calității și intensității proceselor enzimatică [3-5].

Prin analogie cu solul, am presupus că activitatea enzimatică a turbei constituie rezultatul activității enzimelor acumulate și a enzimelor microorganismelor proliferante. În această privință este cunoscut că enzimele acumulate provin din resturile vegetale și celulele microorganismelor. În zăcămintul turbos enzimele se acumulează atât ca enzime libere (exoenzime eliberate din celulele vii + endoenzime eliberate din celulele dezintegrate) cât și ca enzime legate de constituenții celulari: ca enzime prezente în celulele dezintegrate (în fragmentele celulare), în celulele vii, dar neproliferante. Enzimele microorganismelor proliferante sunt enzime care se eliberează din celulele vii aflate în curs de multiplicare. Cantitatea enzimelor libere este mult mai mică în soluția turbei decât în stare adsorbită sau/și complexată. La rândul lor, enzimele libere sunt adsorbite pe particule organice și minerale sau/și complexate cu substanțe humice. Datorită acestei împrejurări enzimele rămân active și după moartea celulelor care le-au produs. [1, 2].

Intrucât există un număr relativ redus de studii enzimologice calitative referitoare la intensitatea activității unor oligaze și poliaze din diferite tipuri de turbe, am considerat utilă cercetarea acestora. Aceasta ne-a permis evidențierea unor corelații între activitatea enzimatică a diferitelor tipuri de turbă în funcție de sinuziile generatoare și intensitatea procesului de turbificare, contribuind la înțelegerea mai profundă a reacțiilor catalizate de enzime cu rol decisiv în mineralizarea substanțelor organice. Între poliazele studiate se includ și două enzime care n-au mai fost evidențiate în turbă, dextranaza și levanaza, implicate în hidroliza polizaharidelor, dextran și levan, de origine microbiană. Am inițiat studiul acestor enzime în zăcămintele native de turbă ca și în turbe deshidratate și inactivate termic.

**Materiale și metode.** Au fost analizate probe de turbă oligotrofă, mezotrofă și eutrofă. Zăcămintele din care s-au prelevat probele de turbă și adâncimile acestora sunt trecute în tabelele 1-3. Pentru evidențierea enzimelor s-au utilizat probe de turbă cu umiditate naturală, probe uscate la un curent de aer rece și probe inactivate termic.

Am studiat calitativ: zaharaza, celobiaza, lactaza, amilaza, carboximetilcelulaza (CMC-aza), dextranaza, inulaza, levanaza și maltaza. Inactivarea (distrugerea enzimelor) s-a realizat prin autoclavare la 120°C timp de 30 minute în 3 zile consecutive.

Amestecurile de reacție au avut următoarea compoziție: 3 g turbă + 5 ml toluen + 20 ml soluție de substrat (zaharoză 10%; maltoză.H<sub>2</sub>O și lactoză.H<sub>2</sub>O 10,5%; celobioză, amidon solubil, carboximetilceluloză (CMC), inulină și dextran 2%, levan 0,25%). În continuare, acestea au fost incubate la 37°C. După 10 zile de incubare, lichidele supernatante ale amestecurilor de reacție au fost analizate prin

metoda cromatografiei pe hârtie (tehnica circulară și descendentă). S-a folosit hârtie Whatman 1. Din fiecare amestec de reacție s-a analizat o cantitate de 7  $\mu$ l lichid supernatant. Sistemul de dizolvanți utilizat a fost alcătuit din n-propanol, acetat de etil și apă în proporție de 6: 1:3 vol./vol./vol. Durata dezvoltării a fost de 2-21/2 ore (tehnica circulară) sau 24 ore (tehnica descendentă), la temperatura camerei. Identificarea zaharurilor reducătoare s-a efectuat cu AgNO<sub>3</sub>, [7] iar cetozele libere și combinate au fost detectate cu reactivul pe bază de uree și acid o-fosforic [6].

**Rezultate și discuții.** *Compararea intensității activităților enzimatiche și catalitice neenzimatiche ale celor trei tipuri de turbe (oligotrofe, mezotrofe și eutrofe).*

Datele analitice sunt prezentate sintetic, în tabelele 1-3. Intensitatea activităților enzimatiche se notează prin semne de "+", iar absența activității prin "-".

În **tabelul 1** sunt trecute rezultatele obținute la analizele calitative ale probelor de turbă oligotrofă. În toate probele de turbă (10), au fost detectate următoarele activități enzimatiche comune: zaharaza, lactaza, CMC-aza, inulaza; în nouă probe de turbă au fost prezentate celobiaza, amilaza, levanaza și maltaza, iar dextranaza a fost singura enzimă a cărei activitate nu a fost semnată decât în patru probe de turbă (activități enzimatiche deferențiale). În profilul (I) extras din mlaștina de la Luci au excelat în intensitate următoarele activități enzimatiche: zaharaza, celobiaza, amilaza, CMC-aza, inulaza și maltaza. În turba de la Poiana Stampei-Căsoi s-au înregistrat activitățile cele mai mari la zaharază, celobiază, lactază, amilază, CMC-ază și maltază. În turba de la Poiana Stampei-Pilugani semnalăm că exceptând dextranaza, celelalte 8 activități enzimatiche au fost bine reprezentate.

În cadrul aceluiași profil, la toate trei mlaștinile de turbă, activitățile zaharazică, CMC-azică, maltazică și amilazică se pot grupa în categoria enzimelor cu intensitatea maximă, activitățile celobiazică, lactazică și inulazică se pot grupa în categoria enzimelor cu intensități medii, iar activitățile deztranazică și levanazică se încadrează în ultima categorie, prezentând intensitățile cele mai scăzute. O caracteristică a tuturor activităților enzimatiche studiate este diminuarea acestora în raport cu creșterea profunzimii, atât la Luci (profilul I) cât și la Poiana Stampei-Căsoi și Pilugani. Menționăm că prin deshidratarea probelor de turbă, în general, nu s-au produs modificări esențiale ale activităților enzimatiche, relevăm doar o inactivare parțială a amilazei la ultima probă de la Poiana Stampei-Căsoi și a levanazei în prima probă de la Luci (profilul I). Prin autoclavarea turbei, catalizatorii termostabili determină hidroliza neenzimatică a substraturilor. În cele trei mlaștini de turbă, la toate nivelele cercetate, catalizatorii neenzimatici au acționat drastic asupra substraturilor. Astfel zaharoza, inulina și levanul au fost cel mai puternic hidrolizate pe cale neenzimatică, la CMC și maltoză intensitatea scindării a fost intermediară, iar asupra celobiozei, lactozei, amidonului și dextranului catalizatorii neenzimatici au acționat cu intensitate minimă.

În **tabelul 2** sunt prezentate rezultatele obținute la analizele calitative ale probelor de turbă mezotrofă. La toate probele de turbă (5) au fost detectate următoarele șase activități enzimatiche comune: zaharaza, celobiaza, lactaza,

amilaza, CMC-aza și maltaza, iar în categoria activităților enzimatiche diferențiale se include: activitatea dextranazică care a fost evidențiată numai în patru probe de turbă, activitatea inulazică care a fost semnalată în trei probe de turbă și activitatea levanazică care a fost prezentă numai în două probe de turbă.

În funcție de intensitatea diferitelor activități enzimatiche, între cele două profile de turbă mezotrofă, se conturează unele deosebiri. Astfel în probele prevenite din Parcul Național Retezat activitățile: zaharazică, celobiazică, lactazică, amilazică, maltazică, inulazică și levanazică au atins intensitățile maxime, activitatea CMC-azică ocupă o poziție intermediară, iar activitatea dextranazică a fost cea mai slab reprezentată.

În probele de turbă mezotrofă, provenite din zona de lagg a mlaștinii Luci (profilul II), intensitățile maxime s-au obținut la activitățile: lactazică, amilazică, zaharazică și maltazică, poziția medie este ocupată de activitățile: celobiazică, CMC-azică și dextranazică, iar activitățile inulazică și levanazică nu au putut fi puse în evidență.

Remarcăm potențialul enzimatic mult mai ridicat al turbei din Parcul Național Retezat, în comparație cu turba de la Luci (profilul II), evidențiind totodată și un element de similaritate a acestora, prin detectarea în ambele cazuri a acelorași nivele de intensitate la activitățile: lactazică, amilazică și CMC-azică.

Intensitatea acestor activități enzimatiche nu se modifică în raport cu adâncimea, între 10-70 cm (Parcul Național Retezat) și 20-40 cm (Luci profilul II), semnalându-se o ușoară tendință de diminuare a lor la probele colectate de la adâncimile maxime.

În probele cu turbă autoclavată, catalizatorii neenzimatici, termostabili au acționat extrem de slab numai asupra a șapte substraturi (zaharoza, lactoza, amidonul, dextranul, maltoza, inulina, și levanul), menținându-se mult sub nivelul activităților enzimatiche.

În **tabelul 3** sunt prezentate rezultatele analizelor calitative ale probelor de turbă eutrofă. În toate probele au fost identificate șapte activități enzimatiche comune. Aceste activități enzimatiche sunt următoarele: zaharaza, celobiaza, lactaza, amilaza, CMC-aza, inulaza și maltaza. Activitatea levanazică a fost detectată în patru probe, iar activitatea dextranazică numai în trei probe.

Activitățile enzimatiche maxime s-au înregistrat la: zaharază, celobiază, lactază, amilază și maltază, poziții intermediare dețin activitățile CMC-azică și inulazică, iar activitățile dextranazică și levanazică se situează în categoria intensităților minime.

Evoluția pe verticală a acestor activități enzimatiche arată o tendință de uniformizare între 30-150 cm adâncime, după care are loc o diminuare a acestora până la 250 cm.

În probele cu turbă autoclavată, hidroliza neenzimatică a substraturilor a fost practic inexistentă.

#### *Sinteza rezultatelor obținute la analizele enzimatice calitative*

Turba conține substanțe organice abundente care provin în special din resturile vegetale. Dintre substanțele organice existente în resturile vegetale hidrații de carbon se află în cantitatea cea mai mare deținând mai mult de 50% din greutatea acestora. Printre hidrații de carbon predomină celuloza și hemicelulozele. Cantitatea

celorlalte polizaharide (amidon, inulină etc.) este mai mică. Pe acest temei am considerat util să abordăm studii legate de enzimele (hidrolaze, oligaze, poliaze) care catalizează depolimerizarea hidrolitică a unor oligo- și polizaharide având în vedere faptul că această depolimerizare constituie o etapă cheie în procesul de mineralizare a celor mai abundente substanțe organice din turbă. Reamintim că am efectuat și cercetări privind hidroliza a două polizaharide de origine microbiană - dextranul și levanul.

Cunoscut fiind faptul că prin determinarea conținutului de polizaharide existente în turbă se pot obține informații asupra gradului de descompunere a materialului vegetal și al vârstei sedimentelor de turbă, am considerat că și studierea calitativă a activității unor oligaze și poliaze poate servi pe de o parte la diferențierea tipurilor fundamentale de turbă, iar pe de altă parte pe baza rezultatelor obținute se pot obține informații asupra gradului de descompunere a materialului vegetal generator și al vârstei acestor sedimente. Astfel, activitatea intensă a carbohidrazelor presupune un grad mai mic de descompunere a materialului vegetal corespunzătoare unui proces incipient de turbificare caracteristic turbei subrecente, iar activitatea apreciabil mai redusă a acestora arată un grad de descompunere accentuat, dovedind evoluția stadiului de turbificare și vechimea mai mare a zăcămintelor de turbă.

Intensitatea activității enzimelor studiate este dependentă de următorii factori: natura enzimei, tipul genetic de turbă, adâncimea de colectare a probelor (stadiul de descompunere a materialului vegetal generator și vârsta), precum și de felul probei analizate (turbă umedă, uscată, inactivată termic).

În general, la cele trei tipuri de turbă activitățile zaharazică, amilazică, lactazică, maltazică și inulazică s-au dovedit a fi mai intense decât activitățile celobiazică, CMC-azică, dextranazică și levanazică.

Rezultatele obținute au indicat că tipul turbei influențează într-o măsură mare activitatea oligazelor și poliazelor. Activitățile enzimactice cele mai ridicate s-au evidențiat la turba mezotrofă, poziția interemediară este ocupată de turba oligotrofă, iar la turba eutrofă, deși s-au obținut activități mari ale acestor enzime, aceasta se situează pe poziția ultimă.

Un factor de care depinde activitatea enzimatică este adâncimea de colectare a probelor de turbă. Pe baza analizelor calitative s-a constatat că activitatea tuturor enzimelor cercetate atinge nivelul maxim în probele din zona superioară a profilelor, relevându-se strânsa interdependență între adâncimea mică a probelor de turbă, stadiul incipient al procesului de turbificare, vârsta subrecentă a acestora și intensitatea extrem de ridicată a activității oligazelor și poliazelor cercetate. În probele bazale ale profilelor de turbă analizate s-au semnalat în toate cazurile activitățile cele mai scăzute.

Se știe că există o dependență directă între umiditatea turbei și activitatea enzimatică a acesteia. Pe baza rezultatelor obținute la analizele enzimologice calitative, în general nu se remarcă diminuarea activității enzimactice în probele de turbă deshidratate față de probele la care nu s-a modificat umiditatea nativă a turbei. Prin autoclavarea turbei s-a produs accentuarea acidității ei numai în cazul probelor oligotrofe.

Tabel 1

### Analize enzimologice calitative ale probelor de turbă oligotrofă

Denumirea enzimei	Felul probei	Locul de colectare al probelor									
		Luci (profilul I)			Poiana Stampei-Căsoi			Poiana Stampei-Pilugani			
		25-40	60-80	100-120	15-30	47-65	80-96	60-80	100-120	150-170	230-250
Zaharaza	Turbă neautoclavată umedă uscată	++++ ++++	+++ ++++	++ +++	+++ ++++	++ +++	± ±	+++ ++++	++ +++	++ +++	+ ++
Hidroliza neenzimatică a zaharozei	Turbă autoclavată umedă uscată	++++	++++	++++	++	+++	+	++	+	++	++
Celobiaza	Turbă neautoclavată umedă uscată	++ +++	+ +	± ±	+++ +++	++ ++	± -	+++ ++	++ +	+ +	- -
Hidroliza neenzimatică a celobiozei	Turbă autoclavată umedă uscată	± ±	± ±	± ±	- +	+ ±	- ±	± ++	+ ++	± +	- +
Lactaza	Turbă neautoclavată umedă uscată	± ±	± ±	± ±	++++ +++	++ +	± ±	+++ ++	++ +	+ +	± +
Hidroliza neenzimatică a lactozei	Turbă autoclavată umedă uscată	± ±	± ±	± ±	+ +	± ±	- ±	± ±	± ±	± ±	± ±
Amilaza	Turbă neautoclavată umedă uscată	++ +	± +	- -	+ ++	+++ +++	± -	+++ ++	+ ±	± ±	- ±
Hidroliza neenzimatică a amidonului	Turbă autoclavată umedă uscată	- ++	± ±	- -	- +	± +	- ±	± ++	- +	± ±	- ±
CMC-aza	Turbă neautoclavată umedă uscată	+++	+	±	±	++	±	++	+	±	±
Hidroliza neenzimatică a CMC-ului	Turbă autoclavată umedă uscată	± ±	++ -	± -	- -	± ±	± -	± -	± -	± -	± -
Dextranaza	Turbă neautoclavată umedă uscată	- ±	- ±	± -	- -	± ±	- -	± ±	- -	- -	- -
Hidroliza neenzimatică a dextranului	Turbă autoclavată umedă uscată	- +	- ±	± ±	- +	± ±	- ±	± +	- +	± +	- +
Inulaza	Turbă neautoclavată umedă uscată	++	+	±	+	+	±	++	++	++	+
Hidroliza neenzimatică a inulinei	Turbă autoclavată umedă uscată	+++	++	+	+++	++	±	++++	++++	++++	+++
Levanaza	Turbă neautoclavată umedă uscată	± -	± ±	± ±	± ±	± ±	- ±	++ +	+ +	++ ++	± ±
Hidroliza neenzimatică a levanului	Turbă autoclavată umedă uscată	+ ++++	± +	± -	++ +++	+	± +	+++ ++	++ +	+++ ++	++ -
Maltaza	Turbă neautoclavată umedă uscată	++++	++	±	++++	++++	+	+++	±	-	-
Hidroliza neenzimatică a maltozei	Turbă autoclavată umedă uscată	+	+	+	-	±	±	±	±	±	-



Tabel 2

### Analize enzimologice calitative ale probelor de turbă mezotrofă

Denumirea enzimei	Felul probei	Locul de colectare al probelor				
		Judele din Parcul Național Retezat			Luci (profilul II)	
		Adâncimea (cm)				
		10-30	50-70	90-115	20-40	50-70
Zaharaza	Turbă neautoclavată umedă uscată	++++	++++	++++	++	++
		++++	++++	++++	+++	+++
Hidroliza neenzimatică a zaharozei	Turbă autoclavată umedă uscată	++	+	±	++	++
Celobiaza	Turbă neautoclavată umedă uscată	++++	+++	++	+	+
		++++	+++	++	++	+
Hidroliza neenzimatică a celobiozei	Turbă autoclavată umedă uscată	-	-	-	-	-
Lactaza	Turbă neautoclavată umedă uscată	+++	+++	++	+++	+
		+++	+++	++	+++	++
Hidroliza neenzimatică a lactozei	Turbă autoclavată umedă uscată	-	-	-	±	-
Amilaza	Turbă neautoclavată umedă uscată	+++	+++	+	+++	+
		+++	+++	+	+++	+
Hidroliza neenzimatică a amidonului	Turbă autoclavată umedă uscată	-	-	-	±	±
CMC-aza	Turbă neautoclavată umedă uscată	++	+	+	++	+
		++	+	+	++	+
Hidroliza neenzimatică a CMC-ului	Turbă autoclavată umedă uscată	-	-	-	±	-
Dextranaza	Turbă neautoclavată umedă uscată	+	±	-	±	±
		±	-	-	±	±
Hidroliza neenzimatică a dextranului	Turbă autoclavată umedă uscată	±	-	-	±	±
Inulaza	Turbă neautoclavată umedă uscată	+++	+	+	-	-
		+++	++	+	-	-
Hidroliza neenzimatică a inulinei	Turbă autoclavată umedă uscată	+	+	±	-	-
Levanaza	Turbă neautoclavată umedă uscată	+++	±	-	-	-
		+++	±	-	-	-
Hidroliza neenzimatică a levanului	Turbă autoclavată umedă uscată	+	-	-	-	-
Maltaza	Turbă neautoclavată umedă uscată	++++	+++	+	+	+
		++++	+++	++	+++	++
Hidroliza neenzimatică a maltozei	Turbă autoclavată umedă uscată	±	±	±	-	-

Tabel 3

**Analize enzimologice calitative ale probelor de turbă eutrofă**

Denumirea enzimei	Felul probei	Locul de colectare al probelor					
		Lozna					
		Adâncimea (cm)					
		30-50	80-100	130-150	180-200	230-250	
Zaharaza	Turbă neautoclavată	umedă	++++	++++	+++	++	+
	uscată	++++	++++	+++	++	+	
Hidroliza neenzimatică a zaharozei	Turbă autoclavată	uscată	-	-	-	-	-
Celobiaza	Turbă neautoclavată	umedă	++++	++++	+++	+++	++
	uscată	++++	++++	++	++	++	
Hidroliza neenzimatică a celobiozei	Turbă autoclavată	uscată	-	-	-	-	-
Lactaza	Turbă neautoclavată	umedă	+++	+++	++	++	+
	uscată	+++	+++	++	+	+	
Hidroliza neenzimatică a lactozei	Turbă autoclavată	uscată	±	-	-	-	-
Amilaza	Turbă neautoclavată	umedă	++++	+++	+++	++	+
	uscată	+++	+++	+++	++	+	
Hidroliza neenzimatică a amidonului	Turbă autoclavată	uscată	-	-	-	-	-
CMC-aza	Turbă neautoclavată	umedă	++	++	+	±	±
	uscată	++	+	±	±	±	
Hidroliza neenzimatică a CMC-ului	Turbă autoclavată	uscată	-	-	-	-	-
Dextranaza	Turbă neautoclavată	umedă	±	±	-	-	-
	uscată	±	±	±	-	-	
Hidroliza neenzimatică a dextranului	Turbă autoclavată	uscată	-	-	-	-	-
Înulaza	Turbă neautoclavată	umedă	+	+	++	+	+
	uscată	++	++	++	+	+	
Hidroliza neenzimatică a inulinei	Turbă autoclavată	uscată	±	±	-	-	-
Levanaza	Turbă neautoclavată	umedă	-	±	±	±	±
	uscată	-	±	±	±	±	
Hidroliza neenzimatică a levanului	Turbă autoclavată	uscată	-	-	-	-	-
Maltaza	Turbă neautoclavată	umedă	++	++	+	++	+
	uscată	+++	+++	++	+	+	
Hidroliza neenzimatică a maltozei	Turbă autoclavată	uscată	-	-	-	-	-

**Concluzii.** Din cele arătate mai sus rezultă că analizele enzimologice calitative ale oligazelor și poliazelor sunt utile atât pentru caracterizarea tipurilor fundamentale de turbă cât și pentru obținerea unor informații asupra proceselor biochimice care au loc în diferite sedimente în vederea utilizării turbei în balneoterapie, agricultură sau în industrie.

## BIBLIOGRAFIE

1. K i s s, S., D r ă g a n – B u l a r d a, M., R ă d u l e s c u, D., *Biological significance of enzymes accumulated in soil*, "Advances Agron.", **27**, 1975, 25-87.
2. K i s s, S., P a ș c a, D., D r ă g a n – B u l a r d a, M., *Enzymology of Disturbed Soils*, Elsevier Sci., Amsterdam, XIV +336p, 1998.
3. P a ș c a, D., K i s s, S., *Enzymatic potential of some highmoor peats from Romania*, "Proc. 10<sup>th</sup> Int. Peat Congr. (Bremen, 1996)", Bremen, 1996, 263-272.
4. P a ș c a, D., K i s s, S., *Physico-chemical and enzymological properties of a Romanian eutrophic peatland under agricultural use*, "Écologie", **30** (1), 1999, 33-38.
5. P a ș c a, D., K i s s, S., *Enzymatic potential in some interstadial peats utilisable in balneotherapy*, In: B e e r, A-M., L ü t t i g, G., L u k a n o v, J., (Hrsg-Eds), "Moortherapie 2000. Peat Therapy on its Way into next Millennium" Balneol. Inst., Bad Kissingen, Germany: 245-252, 2000.
6. W i s e, C. S., D i m l e r, R. J., D a v i s, H. A., R i s t, C. E., *Determination of easily hydrolysable fructose units in dextran preparation*, "Anal. Chem.", **27**, 1955, 33-36.
7. W r i g h t, S. W., U l s t r o m, R. A., S z e w c z a k, J. T., *Studies on carbohydrates in body fluids. I. Identification by means of paper chromatography*, "Amer. Med. Assoc. J. Dis. Children", **93**, 1957, 173-181.

## CAPACITĂȚI MALTAZICE ȘI DE MULTIPLICARE ALE UNOR TULPINI DE DROJDII PANIFICAȚIE

LETIȚIA OPREAN\* și ENIKO GASPAR\*

### **SUMMARY. - Maltasic and Multiplication Capacity of Some Baker's Yeasts Strains.**

The comparative researches concerning the adaptability to the maltose of enzyme complex fermentation and multiplication capacities of some *Saccharomyces cerevisiae* bakers' yeasts strains are presented in this paper. In the Lucian Blaga University, Food Biotechnology Department, Microbiological laboratory were isolated the bakers' yeasts strains as pure culture. At the room temperature (20°C) during 3 days (72 hours) the fermentation liquid medium with maltose dynamics fermentation by the bakers' yeasts strains and the cells' multiplication speed of the same yeasts. The gravimetric determination, with usually analyses methods was made for the first followed aspect. Also, was determinate the CO<sub>2</sub> mass, emitted in 6 hours and calculated in mass % (CO<sub>2</sub> g/100 g medium). For the second followed aspect was counted the total and alive yeast cells, using the Thoma chamber. At the end of medium fermentation with maltose, the *Saccharomyces cerevisiae* DP-2 bakers' yeast has the most adaptability to the maltose of enzyme complex fermentation capacity and the best values of multiplication speed, in decreasing order, are for: *Saccharomyces cerevisiae* DP-5 bakers' yeast, DP-3, DP-6 and DP-1.

La fermentarea aluaturilor se utilizează drojdii alcooligene ce aparțin genului *Saccharomyces* (*Meyen*) *Rees* și anume speciei *Saccharomyces cerevisiae*. Tulpinile de drojdie de panificație *Saccharomyces cerevisiae* pot prezenta capacități diferite de adaptare în condițiile de mediu oferite de tehnologia de panificație [1-8].

Obținută prin înmulțire pe un mediu de melasă, în panificație, drojdia trebuie să-și adapteze complexul enzimatic de la fermentarea glucozei la cel al maltozei, diglucid format prin activitatea enzimelor amilolitice din făină asupra amidonului.

Maltoza are un rol de inductor al enzimelor maltozo-permeaza și maltaza ( $\alpha$ -glucozidaza), numai după ce din mediu sunt fermentate în succesiune: glucoza, fructoza și zaharoza. Maltoza și maltotrioza pătrund în celula de drojdie sub influența unor permeaze specifice induse în prezența lor, enzime care se comportă ca sisteme active de transport. După pătrunderea în interiorul celulei maltoza sub acțiunea  $\alpha$ -glucozidazei induse este hidrolizată în 2 moli de glucoză și are loc fermentarea rapidă.

Adaptarea drojdiilor de panificație la fermentarea maltozei ce se formează în aluat, este o caracteristică comandată genetic. În genomul nuclear al celulei drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* există 5 gene distincte responsabile pentru formarea  $\alpha$ -glucozidazei și fermentarea maltozei de către această drojdie. Controlul fermentării

---

\* Universitatea Lucian Blaga, Catedra de Biotehnologii Alimentare, Sibiu  
E-mail: oprean\_letitia@yahoo.com

maltozei este realizat prin două mecanisme diferite și anume prin transcripție, când are loc transmiterea informației genetice de către gena structurală prin intermediul acidului ribonucleic mesager care efectuează translația. Ca rezultat se produce reglarea genetică a biosintezei enzimelor adaptative, respectiv a maltozo-permeazei și a maltazei ( $\alpha$ -glucozidazei).

După introducerea inoculului de drojdie, când în mediu există o cantitate suficientă de oxigen, tulpinile de drojdii de panificație pot produce oxidarea maltozei până la produșii finali ai respirației și are loc înmulțirea celulelor. Acest proces de respirație se reduce și se intensifică procesul fermentativ, iar celulele de drojdie existente cresc în dimensiuni și în celule se acumulează glicogen.

Capacitatea de adaptare cât mai rapidă la fermentarea glucidelor din mediile cu făină și inducerea rapidă a activității maltazice care să accelereze procesele fermentative din aluaturi, precum și creșterea vitezei de multiplicare sunt cele mai importante proprietăți biotehnologice ale drojdiei de panificație.

În lucrarea de față descriem cercetări comparative privind studierea capacității maltazice și de multiplicare a șase tulpini de drojdii de panificație selecționate *Saccharomyces cerevisiae* cu activitate maltazică superioară (DP-1 ("Ruf"), DP-2 ("Banat"), DP-3 ("Dr. Oetker"), DP-4 (Turcia), DP-5 ("Aromax") și Dp-6 ("Pain l'ancienne") izolate sub formă de culturi pure în cadrul Laboratorului de Microbiologie al Catedrei de Biotehnologii alimentare, Universitatea "Lucian Blaga" din Sibiu.

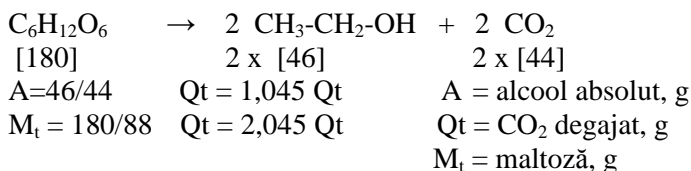
**Materiale și metode.** Pentru cultivarea tulpinilor de drojdii de panificație a servit, drept mediu nutritiv, mediul Sabouraud lichid pentru fermentarea maltozei sterilizat în prealabil. Mediul a fost distribuit în cantități de 200 ml în baloane cu fund plat de 250 ml, sterilizate și închise cu ventile de fermentație cu acid sulfuric concentrat.

Pentru inocularea mediului lichid cu maltoză, din cele 6 tulpini de drojdie de panificație *Saccharomyces cerevisiae* selecționate s-au preparat culturi pure pe must de malț sterilizat. Cantitatea de inocul de drojdie folosită la însămânțarea mediului lichid cu maltoză reprezintă 2 % suspensie de celule ( $2 \times 10^6$  celule/ ml mediu).

Fermentația mediului cu maltoză a fost condusă la temperatura camerei (20°C) timp de 3 zile (72 ore). Determinările s-a efectuat în serii paralele de probe.

În cursul fermentației s-a urmărit dinamica (viteza) fermentării mediului cu maltoză de către tulpinile de drojdii de panificație studiate și dinamica multiplicării celulelor de drojdie în acest mediu. În acest scop, s-a determinat gravimetric, cu metodele de analiză curente, în conformitate cu STAS-ul în vigoare, masa de CO<sub>2</sub> degajată în 6 ore și exprimată în % masice (g CO<sub>2</sub>/100 g mediu) prin cântărirea probelor, cât timp s-au înregistrat pierderi în greutate și numărul de celule totale și celule vii de drojdie, prin numărarea cu camera Thomna, după colorare cu soluție de albastru de metilen și prin metoda culturală Koch [4, 7, 8].

Conform ecuației globale a fermentației alcoolice, se poate calcula cu aproximație cantitatea de alcool etilic, cantitatea de maltoză fermentată și intensitatea fermentației prin conversia cantității de CO<sub>2</sub> rezultat în prima perioadă de studiu a fermentației, cu următoarele relații:



**Rezultate.** Rezultatele obținute în studierea dinamicii fermentării mediului lichid cu maltoză de către cele 6 tulpini de drojdii de panificație *Saccharomyces cerevisiae* selecționate (dinamica degajării CO<sub>2</sub>), ca mod de caracterizare a vitezei lor de fermentare a maltozei, sunt trecute în Tabelul 1.

Tabel 1

**Dinamica fermentației mediului cu maltoză de către cele 6 tulpini de drojdii de panificație *Saccharomyces cerevisiae* (dinamica CO<sub>2</sub> degajat)**

Tulpini de <i>Sacch.</i> <i>cerevisiae</i>	Masa CO <sub>2</sub> degajata (% masice)											
	Durata de fermentatie (ore)											
	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72
DP-1	0,31	0,73	1,23	1,78	2,02	2,22	2,37	2,47	2,52	2,57	2,57	
DP-2	0,73	1,58	2,48	3,53	3,83	4,03	4,13	4,18	4,18			
DP-3	0,50	1,05	1,65	2,30	2,66	2,91	3,11	3,26	3,36	3,41	3,41	
DP-4	0,42	0,93	1,53	2,18	2,52	2,72	2,87	2,97	3,02	3,07	3,07	
DP-5	0,65	1,41	2,23	3,19	3,54	3,79	3,89	3,94	3,94			
DP-6	0,36	0,78	1,28	1,84	2,08	2,30	2,45	2,57	2,67	2,72	2,72	

Se poate vedea din acest tabel că, deja după 6 ore de fermentație se evidențiază o amorsare rapidă a fermentației la toate tulpinile de drojdii de panificație studiate, ceea ce demonstrează că aceste drojdii se adaptează rapid la mediul cu maltoză, prezentând un maxim de fermentație după 12-24 ore.

Cantitatea maximă de CO<sub>2</sub> degajată în 24 ore s-a evidențiat la drojdia de panificație *S.cerevisiae* DP-2, care este cu 49,58 % mai mare decât a drojdiei de panificație *S.cerevisiae* DP-1, drojdia cu cea mai mică valoare a masei de CO<sub>2</sub> degajată în 24 ore. S-au remarcat și drojdiile de panificație *S. cerevisiae* DP-5, *S. cerevisiae* DP-3, *S. cerevisiae* DP-4 și *S. cerevisiae* DP-6, a căror cantitate de CO<sub>2</sub> degajată în 24 ore a fost cu 44,21, 22,61, 18,35 și respectiv 3,27 % mai mare decât a drojdiei de panificație *S. cerevisiae* DP-1.

Cantitatea de CO<sub>2</sub> degajată în 6 ore a crescut treptat între 24 și 48 ore de fermentație a mediului lichid cu maltoză, după care rămâne aproximativ constantă.

La sfârșitul fermentației, tulpinile de drojdii de panificație studiate se pot diferenția în funcție de viteza de fermentare a mediului cu maltoză. Cantitatea maximă de CO<sub>2</sub> degajată în 6 ore s-a evidențiat la drojdia de panificație *S. cerevisiae* DP-2 care este cu 38,52 % mai mare decât a drojdiei de panificație *S. cerevisiae* DP-1, drojdia cu cea mai mică valoare a masei de CO<sub>2</sub> degajată în 6 ore. S-au remarcat și drojdiile de panificație *S. cerevisiae* DP-5, *S. cerevisiae* DP-3, *S. cerevisiae* DP-4

și *S. cerevisiae* DP-6, a căror cantitate de CO<sub>2</sub> degajată în 6 ore a fost cu 34,77, 28,96, 27,57 și respectiv 4,74 % mai mare decât a drojdiei de panificație *S. cerevisiae* DP-1.

Din bilanțul cantitativ al ecuației globale a fermentației alcoolice a maltozei din mediu s-au constatat importante diferențieri între tulpinile de drojdii de panificație *Saccharomyces cerevisiae* selecționate. Valorile parametrilor de fermentare: alcool etilic format (g) și cantitatea de maltoză consumată (g) de către tulpinile de drojdii de panificație selecționate sunt redată în Tabelul 2.

Tabel 2

**Valorile parametrilor de fermentare (alcool etilic și maltoză) pentru tulpinile de drojdii de panificație *Saccharomyces cerevisiae* selecționate**

Tulpini de drojdii de panificație <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24 ore		24 ore		24 ore	
	Alcool etilic, g	Maltoza, g	Alcool etilic, g	Maltoza, g	Alcool etilic, g	Maltoza, g
DP-1	1,86	3,64	2,58	5,05	2,68	5,25
DP-2	3,68	7,21	4,36	8,54	4,37	8,55
DP-3	2,40	4,70	3,40	6,66	3,56	6,97
DP-4	2,26	4,45	3,10	6,07	3,20	6,28
DP-5	3,33	6,52	4,11	8,05	4,12	8,06
DP-6	1,92	3,76	2,68	5,27	2,84	5,56

Datele din Tabelul 2 exprimă corelația dintre timp (ore) și cei doi parametri studiați: alcool etilic format și cantitatea de maltoză consumată în 24 ore, ceea ce evidențiază puterea alcooligenă și activitatea maltazică a tulpinilor de drojdii de panificație *Saccharomyces cerevisiae* studiate.

Puterea alcooligenă – după cum se poate vedea din acest tabel – este ridicată la majoritatea tulpinilor de drojdii de panificație studiate. La tulpinile de drojdii, alcoolul etilic s-a putut evidenția după 12 ore de fermentație, cantitatea maximă de alcool etilic obținându-se după 24 ore, după care s-au obținut cantități mai mici de alcool etilic, apropiate ca valoare.

După 24 ore de fermentație, drojdia de panificație *S. cerevisiae* DP-2 s-a remarcat prin cea mai bună capacitate alcooligenă, valoarea concentrației alcoolice fiind cu 49,46 % mai mare decât la *S. cerevisiae* DP-1, drojdia cu cea mai redusă capacitate alcooligenă dintre tulpinile studiate. Această tulpină este urmată de drojdia de panificație *S. cerevisiae* DP-5, la care concentrația alcoolică a fost cu 44,15 % mai mare decât la drojdia de panificație *S. cerevisiae* DP-1. Se remarcă și drojdiile de panificație *S. cerevisiae* DP-3, *S. cerevisiae* DP-4 și *S. cerevisiae* DP-6, prezentând, în ordinea enumerată, o concentrație alcoolică cu 22,50, 17,70 și respectiv 3,13% mai mare decât cea obținută cu drojdia de panificație *S. cerevisiae* DP-1.

La sfârșitul fermentației, la majoritatea tulpinilor de drojdii de panificație, valorile concentrației alcoolice sunt ridicate, cu mici diferențe de la o tulpină la alta. Valoarea maximă a concentrației alcoolice este înregistrată la drojdia de panificație *Saccharomyces cerevisiae* DP-2, fiind mai mare cu 38,68 % decât la *S. cerevisiae* DP-1, drojdia cu cea mai mică valoare a concentrației alcoolice. Se remarcă și drojdiile de panificație *S. cerevisiae* DP-5, *S. cerevisiae* DP-3, *S. cerevisiae* DP-4 și *S. cerevisiae* DP-6, prezentând, în ordinea enumerată, o concentrație alcoolică cu 34,96, 24,72, 16,52 și respectiv 5,64 mai mare decât cea obținută cu drojdia de panificație *S. cerevisiae* DP-1.

Evaluarea capacității de fermentare a maltozei din mediu de către tulpinile de drojdii de panificație *Saccharomyces cerevisiae* selecționate este redată în Tabelul 2.

Se poate vedea din acest tabel că, drojdia de panificație *S. cerevisiae* DP-2 se remarcă prin valoarea maximă a cantității de maltoză consumată în 24 ore și deci prin cea mai ridicată viteză de fermentare a maltozei din mediu. Valoarea cantității de maltoză consumată în 24 ore de către drojdia de panificație *S. cerevisiae* DP-2 este cu 49,52 % mai mare decât a drojdiei de panificație *S. cerevisiae* DP-1, drojdia cu cea mai mică valoare a maltozei consumate. S-au remarcat și drojdiile de panificație *S. cerevisiae* DP-5, *S. cerevisiae* DP-3, *S. cerevisiae* DP-4 și *S. cerevisiae* DP-6, a căror cantitate de maltoză consumată în 24 ore a fost cu 44,18, 22,56, 18,21 și respectiv 3,20 %, mai mare decât a drojdiei de panificație *S. cerevisiae* DP-1.

La sfârșitul fermentației, drojdia de panificație *S. cerevisiae* DP-2 se evidențiază prin valoarea maximă a cantității de maltoză consumată în 24 ore și deci prin cea mai ridicată viteză de fermentare a maltozei din mediu. Valoarea cantității de maltoză consumată în 24 ore de către drojdia de panificație *S. cerevisiae* DP-2 este cu 38,60 % mai mare decât a drojdiei de panificație *S. cerevisiae* DP-1, care se diferențiază de celelalte tulpini prin valoarea cea mai mică a cantității de maltoză consumată în 24 ore. S-au remarcat și drojdiile de panificație *S. cerevisiae* DP-5, *S. cerevisiae* DP-5, *S. cerevisiae* DP-3, *S. cerevisiae* DP-4 și *S. cerevisiae* DP-6, a căror cantitate de maltoză consumată în 24 ore a fost cu 34,87, 24,68, 24,68, 16,41 și respectiv 5,58 % mai mare decât a drojdiei de panificație *S. cerevisiae* DP-1.

Rezultatele obținute în studierea variației concentrației de celule totale și celule vii a tulpinilor de drojdii de panificație *Saccharomyces cerevisiae* studiate pe parcursul fermentației mediului lichid cu maltoză sunt redată în Tabelul 3. Concentrația inițială de celule de drojdie (inoculul folosit) este de  $2 \times 10^6$  celule / ml mediu lichid cu maltoză.

Se observă că în primele 24 ore de fermentație a mediului lichid cu maltoză are loc o creștere accentuată a majorității tulpinilor de drojdie de panificație studiate, ceea ce dovedește că în această etapă a avut loc o multiplicare foarte activă a drojdiilor. La aceste tulpini de drojdii se observă o creștere accentuată a numărului de celule totale, valorile obținute fiind mai mari decât valoarea inițială.



**Viteza de multiplicare a tulpinilor de drojdie de panificație în mediul lichid cu maltoză**

Tulpini de drojdie de panificație <i>Sacch. cerevisiae</i>	Durata cultivării, ore			
	24 ore	48 ore	72 ore	
	Nr. total de celule / ml Nr.x10 <sup>6</sup>	Nr. total de celule / ml Nr.x10 <sup>6</sup>	Nr. total de celule / ml Nr.x10 <sup>6</sup>	Celule vii /ml Nr.x10 <sup>6</sup>
DP-1	46	256	348	253
DP-2	298	588	640	598
DP-3	180	360	462	380
DP-4	142	412	540	465
DP-5	160	478	624	570
DP-6	112	340	498	390

În primele 24 ore de fermentație, valoarea maximă a numărului de celule totale a fost înregistrată la drojdia de panificație *S. cerevisiae* DP-2. Această valoare este cu 84,56 % mai mare decât cea obținută la drojdia de panificație *S. cerevisiae* DP-1, caracterizată prin cel mai mic număr de celule totale. Se remarcă și drojdiile de panificație *S. cerevisiae* DP-5, *S. cerevisiae* DP-3, *S. cerevisiae* DP-4 și *S. cerevisiae* DP-6 prezentând un număr total de celule cu 34,96, 24,72, 16,52 și respectiv 5,64 % mai mare decât cel obținut cu drojdia de panificație *S. cerevisiae* DP-1.

După 48 ore de fermentație, concentrația în celule totale a crescut la toate drojdiile, cu mici variații între ele. Valoarea cea mai ridicată a numărului de celule totale se remarcă la drojdia de panificație *S. cerevisiae* DP-2 cu activitate maltazică superioară. Această valoare este cu 56,46 % mai mare decât cea obținută la drojdia de panificație *S. cerevisiae* DP-1, caracterizată prin cel mai mic număr de celule totale. Se remarcă și drojdiile de panificație *S. cerevisiae* DP-5, *S. cerevisiae* DP-3, *S. cerevisiae* DP-4 și *S. cerevisiae* DP-6 prezentând, în ordinea enumerată, un număr total de celule cu 46,44, 28,88, 37,86 și respectiv 24,70 % mai mare decât cel obținut cu drojdia de panificație *S. cerevisiae* DP-1.

La sfârșitul fermentației, tulpinile de drojdie de panificație studiate se pot diferenția în funcție de capacitatea lor de multiplicare. Numărul maxim de celule totale s-a înregistrat la drojdia de panificație *S. cerevisiae* DP-2, fiind cu 57,69 % mai mare decât al drojdiei de panificație *S. cerevisiae* DP-1, care se diferențiază de celelalte tulpini prin valoarea cea mai mică a numărului de celule totale. Se remarcă și drojdiile de panificație *S. cerevisiae* DP-5, *S. cerevisiae* DP-3, *S. cerevisiae* DP-4 și *S. cerevisiae* DP-6 prezentând, în ordinea enumerată, un număr total de celule cu 46,44, 28,88, 37,86 și respectiv 24,70 % mai mare decât cel obținut cu drojdia de panificație *S. cerevisiae* DP-1.

**Concluzii.** 1. În cadrul Laboratorului de microbiologie al Catedrei de Biotehnologii alimentare, Universitatea "Lucian Blaga" din Sibiu, au fost izolate sub formă de culturi pure și selecționate 6 tulpini de drojdie de panificație *Saccharomyces cerevisiae* cu capacitate maltazică superioară care fac parte din colecția de drojdie industriale a laboratorului.

2. Tulpinile de drojdii de panificație *Saccharomyces cerevisiae* studiate se evidențiază prin o amorsare rapidă a fermentației, ceea ce demonstrează că aceste drojdii se adaptează rapid la mediul cu maltoză, prezentând un maxim de fermentare după 12-24 ore.

3. La sfârșitul fermentației, drojdia de panificație *S. cerevisiae* DP-2 se remarcă prin viteza maximă de fermentare a maltozei (cantitatea maximă de CO<sub>2</sub> degajată în 6 ore), fiind urmată, în ordine descrescătoare, de drojdiile de panificație *S. cerevisiae* DP-5, *S. cerevisiae* DP-3, *S. cerevisiae* DP-4, *S. cerevisiae* DP-6 și *S. cerevisiae* DP-1.

4. La sfârșitul fermentației, drojdia de panificație *S. cerevisiae* DP-2 se remarcă prin cea mai bună capacitate maltazică, putere alcooligenă și viteză de multiplicare, fiind urmată, în ordine descrescătoare, de drojdiile de panificație *S. cerevisiae* DP-5, *S. cerevisiae* DP-3, *S. cerevisiae* DP-4, *S. cerevisiae* DP-6 și *S. cerevisiae* DP-1.

## BIBLIOGRAFIE

1. Anghel, I., Herlea, V., Voica, C., Cojocaru, I., *Biologia și tehnologia drojdiilor*, Vol.II, p.123-126, Ed. Tehn., București, 1989.
2. Banu, C., Vasu, S., Stoicescu, A., Rotaru, G., Bordei, D., Enache, A., Mircea, C., *Biotehnologii în industria alimentară*, p.86-95, Ed. Tehn., București, 1981.
3. Berzescu, P., Dumitrescu, M., Hopulele, T., Katherin, I., Stoicescu, A., *Tehnologia berii și a malțului*, p.145-158, Ed. Ceres, București, 1981.
4. Burgeois, C.M., Leveau, J.V., *Techniques d'analyse et de controle dans les industries agroalimentaires. Le controle microbiologique*, Biofutur, 1993.
5. Hough, J.S., Briggs, D.E., Stevens, R., Yong, T.W., *Brewery Fermentation, Malting and Brewing Science*, p.164-179, Chapman and Hall, London, 1990.
6. Guiraud, J.P., *Microbiologie alimentaire*, p. 57-72, Dunod, Paris, 1999.
7. Drăgan – Bularda, M., *Microbiologie generală. Lucrări practice*, p.276-279, Univ. "Babeș-Bolyai", Cluj-Napoca, 2000.
8. Oprean, L., *Procese microbiologice în industria de morărit-panificație*, p.132-151, Ed. Univ. "Lucian Blaga", 2003.

## CERCETĂRI MICROBIOLOGICE ÎN TURBE OLIGOTROFE DIN BAZINELE HIDROGRAFICE ALE SOMEȘULUI CALD ȘI SOMEȘULUI RECE ȘI A TURBEI TERAPEUTICE DE LA BĂILE SOMEȘENI

RADU CRIȘAN\*

**SUMMARY.** – **Microbiological Researches on Oligotrophic Peats from the Hydrographic Basins of Someșul cold and Someșul Rece and Therapeutic Peat from Băile Someșeni – Cluj.** Microbiological analyses were carried out on oligotrophic peat profiles in the Molhașul Mare Izbuc and Căpățâna, sampling depths were 0 –25, 75 – 100 and 150 – 175cm, and on therapeutic peat from Băile Someșeni sampling depths were 0 –25, 50 – 75 and 150 –175 cm. We determined the number of bacteria belonging to the following physiological groups: aerobic heterotrophs, ammonifiers, denitrifiers, desulfifiers, iron – reducers, as well as the number of actinomycetes and micromycetes. The highest number was registered in the therapeutic peat, the values of microbial indicator of peat quality varied between 5.15 and 4.48.

Turbăriile din bazinele hidrografice ale Someșului Cald și Someșului Rece depășesc cu mai mult de jumătate numărul total al tinoavelor din România, numite de localnici molhașuri. Acest fapt se explică prin condițiile orografice, prin substratul geologic, metamorfic, bogat în roci silicioase și prin precipitații abundente, care, toate favorizează dezvoltarea sfagnetelor. Suprafața lor, însă, nu este atât de mare ca în cazul celor întâlnite în Carpații Orientali. În Munții Apuseni sunt delimitate două mari regiuni de tinoave, fiecare cuprinzând mai multe grupe și serii. În grupa tinoavelor din regiunea de izvoare și cursul superior al Someșului Cald se încadrează și zăcămintul de turbă oligotrofă de la Molhașul Mare, de la Izbuc. Situat la o altitudine de aproximativ 1200 m acesta se întinde pe o suprafață de aproximativ 8 ha. Molhașul Mare de la Izbuc are un volum de aproximativ 320.000 m<sup>3</sup> de turbă, acest tinov fiind unul din zăcămintele cele mai voluminoase din Munții Apuseni, dar în același timp este cel mai nefalsificat tinov din regiune și printre cele mai autentice din țară [12].

Mlaștinile oligotrofe din bazinul superior al Someșului Rece sunt situate la altitudini mai mari (1350-1700 m) decât cele din bazinul Someșului Cald, aceasta fiind regiunea cea mai înaltă cu tinoave tipice din țară. Sub aspect floristic, cele mai reprezentative tinoave sunt cele două Molhașuri ale Căpățâanii. Ele se află la aproximativ 1600 m altitudine și sunt separate unul de altul printr-un mic pârâu străjuit de molizi.

Primul tinov, denumit și Căpățâna Est, cu o suprafață de aproximativ 5 ha, are spre extremitatea nord-estică o mică populație de *Pinus mugo*, ceea ce atestă continuitatea acestei specii în regiune pe tot parcursul pleistocenului.

---

\* Muzeul Național de Istorie a Transilvaniei, Colecția de Istorie a Farmaciei, Piața Unirii Nr. 28, RO-400113 Cluj-Napoca

Al doilea tinov, denumit Căpățâna Vest, are o suprafață de circa 8 ha, este alungit ca formă și este lipsit de cenoze de *Pinus mugo*. Forma celor două tinoave este vizibil bombată spre centru, grosimea stratului de turbă în aceste zone depășește pe alocuri 5 m, iar cantitatea totală de turbă este apreciată la peste 250.000 m<sup>3</sup>.

Zăcământul de turbă terapeutică de la Băile Someșeni, situat în partea de est a municipiului Cluj – Napoca, este estimat la un volum total de aproximativ 70.000 m<sup>3</sup>. Nămolul de turbă de aici a fost utilizat în balneoterapie din prima jumătate a secolului trecut, mai ales pentru tratarea unor afecțiuni reumatice. În această lucrare ne-am propus ca obiectiv evidențierea potențialului microbial într-un profil de turbă dintr-o zonă a turbăriei de la Someșeni din care în trecut se extrăgea turbă pentru baza de tratament existentă în incinta Băilor Someșeni. Menționăm că turba de la Băile Someșeni are pH – ul neutru datorat apelor minerale slab alcaline și neutre.

**Materiale și metode.** Pentru analizele microbiologice au fost prelevate probe de turbă din profilele practice în tinoavele Molhașul Mare de la Izbuț și Căpățâna (expoziție estică). Eșantioanele de turbă au fost prelevate în condiții aseptice, de la adâncimile de 0-25, 75-100 și 150-175 cm. Prelevarea probelor s-a efectuat la 30.07.1986 (Molhașul Mare de la Izbuț) și 12.08.1988 (Căpățâna). Pentru estimarea potențialului microbial al zăcământului de turbă de la Băile Someșeni, au fost prelevate probe dintr-un profil de turbă din zona în care aceasta este exploatată în balneoterapie, de la trei adâncimi diferite: 0-25 cm, 50-75 cm și 150-175 cm. Probele de turbă au fost prelevate la data de 14.06.2001. Prelevarea s-a făcut în condiții aseptice. Aduse în laborator, probele cu umiditate naturală au servit atât pentru determinarea conținutului în substanță uscată, prin deshidratarea acestora în etuvă, la 105°C, timp de 72 de ore, cât și pentru analizele microbiologice.

În probele cu umiditate naturală s-au efectuat analize bacteriologice cantitative, determinându-se numărul bacteriilor care aparțin următoarelor grupe fiziologice: heterotrofe aerobe, amonificatoare, denitrificatoare, desulfocitoare și fier-reducătoare. De asemenea, s-a determinat numărul de actinomicete și micromicete mezofile aerobe.

**Medii de cultură.** Numărul bacteriilor heterotrofe aerobe a fost determinat pe un mediu cu bulion de carne agarizat, având următoarea compoziție: NaCl 0,5 g, peptonă 1 g, agar-agar 2 g, zeamă de carne, ad. 100 ml; pH 7,5. Sterilizarea se face prin autoclavare 30 de minute la 120°C. Câte 25 ml mediu se repartizează în cutii Petri sterile.

Numărul bacteriilor amonificatoare a fost determinat folosind un mediu cu apă peptonată cu următoarea compoziție: NaCl 0,5 g, peptonă 2 g, apă distilată ad. 100 ml, pH 7,9. Câte 10 ml mediu se repartizează în eprubete și se sterilizează prin autoclavare la 120°C timp de o oră.

Numărul bacteriilor denitrificatoare a fost determinat folosindu-se mediul lui De Barjac [11], cu următoarea compoziție: KNO<sub>3</sub> 0,2 g, CaCO<sub>3</sub> 0,5 g, glucoză 1 g, soluție salină Vinogradski nediluată 5 ml, apă distilată ad. 100 ml, pH 7,2. Câte 20 ml

mediu se repartizează în eprubete și se sterilizează la 112°C timp de 20 de minute/zi, în trei zile consecutive.

Pentru determinarea numărului bacteriilor desulfocitoare s-a utilizat mediul Van Delden [2]. având următoarea compoziție: asparagină 0,2g,  $K_2HPO_4$  0,1g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,15g,  $CaSO_4$  0,5g, lactat de Na 0,5g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  urme (2-3cristale mici) și apă de robinet 100ml; pH 7,0. Mediul a fost repartizat în eprubete (15ml / eprubetă) și sterilizat în autoclav, la 105°C timp de 30 minute / zi, în trei zile consecutive.

Numărul bacteriilor fier-reducătoare s-a stabilit cu ajutorul mediului în care asparagina a fost înlocuită cu peptonă [10], în următoarea compoziție:  $K_2HPO_4$  0,1 g,  $KH_2PO_4$  0,08 g, KCl 0,02 g,  $Fe_2O_3 \cdot 3H_2O$  0,01 g, extract de drojdie 0,05 g, peptonă 0,5 g, glucoză 2 g, apă distilată ad. 100 ml pH 7. Câte 7 ml mediu se repartizează în eprubete și se sterilizează prin autoclavare la 105°C timp de o oră/zi, în trei zile consecutive [9].

Numărul actinomicetelor s-a determinat folosind mediul cu următoarea compoziție: glucoză 1 g, asparagină 0,05 g,  $K_2HPO_4$  0,05 g, agar-agar 1,5 g, apă distilată ad. 100 ml, pH 7,5. Câte 25 ml mediu se repartizează în eprubete și se sterilizează la 105°C timp de 20 minute/zi, în trei zile consecutive [11].

Numărul ciupercilor mezofile aerobe a fost stabilit utilizându-se mediul Martin [11]. Mediul are următoarea compoziție: glucoză 2 g, peptonă 1g  $K_2HPO_4$  0,1 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05 g, roz Bengal 0,003 g, agar-agar 2 g ,apă distilată ad. 100 ml. Câte 25 ml mediu se repartizează în eprubete și se sterilizează la 110°C timp de 20 minute. În momentul întrebuițării, la mediul lichefiat și răcit la 45-50°C, se adaugă 0,5 ml dintr-o soluție sterilă de sulfat de streptomicină 0,15%.

După inocularea diferitelor diluții de turbă în mediile de cultură, incubarea acestora s-a făcut la 28°C, timp de 7 – 10 zile. Numărul bacteriilor, actinomicetelor și micromicetelor a fost calculat după Alexander [1].

**Rezultate și discuții.** Datele analitice obținute la cele 6 probe de turbă de la Molhașul Mare de la Izbuc și Căpățâna sunt prezentate în *Tabelul 1* Cele mai bine reprezentate sunt bacteriile heterotrofe aerobe, care se găsesc în număr relativ ridicat, atât în turba de la Molhașul Mare de la Izbuc, cât și în cea de la Căpățâna, în eșantionul de la 0-25 cm. Constatăm că în profunzimea ambelor profile de turbă numărul bacteriilor heterotrofe aerobe înregistrează o descreștere cu creșterea adâncimii, fapt constatat de altfel și la celelalte grupe fiziologice de microorganisme. Aceasta s-ar datora condițiilor de mediu neprielnice pentru aceste grupe fiziologice: anaerobioză, temperatură scăzută, aciditate crescută.

Numărul bacteriilor amonificatoare este cuprins între 242.057 celule /g turbă uscată (0-25 cm) și 23.112 celule /g turbă uscată (150-175 cm), ambele la Molhașul Mare de la Izbuc. De remarcat este eșantionul de turbă de la 75-100 cm (Căpățâna), în care s-a înregistrat numărul cel mai mare de bacterii amonificatoare din acest zăcământ. Bacteriile denitrificatoare se situează pe locul 3 ca număr total de celule, după bacteriile heterotrofe aerobe și amonificatoare. La acest grup fiziologic, pe primul loc se află turba

de la Molhașul Mare de la Izbug (0-25 cm), urmată de cea de la Căpățâna (75-100 cm). De remarcat că eșantioanele de turbă de la adâncimile de 75-100 cm și 150-175 cm (Molhașul Mare – Izbug) au valori foarte apropiate ale numărului de bacterii denitrificatoare. Bacteriile desulfocitoare sunt cel mai slab reprezentate, doar în straturile superficiale, înregistrându-se valori de ordinul zecilor. În straturile profunde nu s-a consemnat prezența lor.

Bacteriile fier-reducătoare sunt puțin numeroase. Valorile lor sunt cuprinse între 11.951 (0-25 cm) și 1.201 (150-175 cm) celule /g turbă uscată, ambele înregistrate în turba de la Molhașul Mare de la Izbug. La Căpățâna, numărul bacteriilor fier-reducătoare are valori intermediare față de cele limită consemnate la Molhașul Mare de la Izbug.

Prezența actinomicetelor în turbele oligotrofe analizate se explică prin existența unor tulpini rezistente, mai tolerante la pH - ul acid, știut fiind faptul că actinomicetele preferă, în general, pH neutru sau alcalin. Numărul actinomicetelor este mai mare în eșantioanele de turbă de la suprafață, apoi scade odată cu creșterea adâncimii. De altfel, aceasta este și tendința descrescătoare a valorilor pH - ului. Față de cele 756.429 celule /g turbă uscată înregistrate la suprafața tinovului Molhașul Mare de la Izbug, la adâncimea de 150-175 cm, în tinovul Căpățâna este consemnată prezența a doar 7.704 celule /g turbă uscată.

Micromicetele mezofile aerobe sunt bine reprezentate, înregistrând valori de același ordin de mărime cu al actinomicetelor. De asemenea, este consemnată aceeași tendință de descreștere liniară a valorilor odată cu creșterea adâncimii de prelevare a turbei.

Comparând cele două zăcăminte de turbă oligotrofă pe baza numărului de microorganisme (bacterii, actinomicete și ciuperci), putem constata că, la 5 din cele 7 grupe fiziologice studiate, numărul maxim de microorganisme este consemnat în turba de la Molhașul Mare de la Izbug, iar în cea de la Căpățâna numărul maxim de microorganisme se înregistrează la două grupe fiziologice. Se poate afirma, deci, că turba de la Molhașul Mare de la Izbug are un potențial microbial superior celui din turba de la Căpățâna. Afirmația este confirmată de valorile indicatorului microbial al calității turbei (IMCT), calculat după formula propusă de Muntean [8], pe baza numărului de microorganisme care aparțin fiecărui grup fiziologic

Se constată că, la fiecare adâncime, valorile IMCT în turba de la Molhașul Mare de la Izbug sunt superioare celor înregistrate în turba de la Căpățâna: 4,872 față de 4,702 (0-25 cm), 4,179 față de 4,127 (75-100 cm), respectiv 3,783 față de 3,701 (150-175 cm). Diferențele dintre cele două tinoave nu sunt atât de mari cât sunt diferențele între adâncimi, la fiecare tinov.

Tot în *Tabelul 1* sunt redate rezultatele analizelor microbiologice efectuate asupra eșantioanelor din profilul de turbă de la Băile Someșeni. După cum se poate constata din datele acestui tabel, în toate eșantioanele analizate a fost detectată prezența tuturor grupelor ecofiziologice de microorganisme studiate. Cele mai bine reprezentate

sunt bacteriile heterotrofe aerobe, la fiecare adâncime a profilului, numărul acestora fiind de ordinul zecilor de milioane /g turbă substanță uscată. În stratul superficial (0-25 cm) numărul bacteriilor heterotrofe aerobe ajunge la aproape  $10^7$  (98.603.122) /g turbă substanță uscată. Numărul bacteriilor heterotrofe aerobe scade cu creșterea adâncimii de prelevare. Dacă, la 50-75 cm adâncime, numărul de bacterii heterotrofe aerobe este apropiat de cel înregistrat în stratul superficial, (75.074.074 bacterii / g substanță uscată), la 150-175 cm scade de 8,5 ori comparativ cu cel consemnat la suprafața zăcământului de turbă, înregistrându-se 11.627.907 bacterii heterotrofe aerobe / g substanța uscată a turbei.

Foarte bine reprezentate sunt și bacteriile amonificatoare. În profunzimea profilului de turbă numărul de amonificatoare este de 361.757 celule / g turbă substanță uscată. În stratul superficial bacteriile amonificatoare sunt prezente în număr de peste  $6,5 \cdot 10^6$  (6.573.541), iar în stratul de la 50-75 cm numărul lor depășește valoarea de  $10^7$  adică 11.851.852 bacterii /g, turbă substanță uscată.

Tabel 1

**Numărul microorganismelor (celule/g turbă uscată) din profilele de turbă de la Căpățâna, Molhașul Mare de la Izbuca și Băile Someșeni**

Turbăria	Adâncimea (cm)	Bacterii					Actino micete	Micro micete
		Heterotrofe aerobe	Amonificatoare	Denitrificatoare	Desulfificatoare	Fier-reducătoare		
Căpățâna	0-25	1.224.459	135.234	51.447	66	6.908	391.003	537.997
	75-100	210.043	175.673	103.112	0	9.356	57.284	38.189
	150-175	92.449	33.898	26.194	0	4.160	7.704	30.816
Mare de la Izbuca	0-25	3.177.004	242.057	139.183	30	11.951	756.429	435.857
	75-100	405.508	149.253	87.605	0	2.109	162.223	97.339
	150-175	123.266	23.112	83.204	0	1.201	46.224	23.112
Băile Someșeni	0-25	98.603.122	6.573.541	69.844	698	10.682	410.846	8.217
	50-75	74.074.074	11.851.852	35.556	50	8.889	103.703	7.407
	150-175	11.627.907	361.757	71.059	39	3.947	77.519	6.460

Tendința descrescătoare a numărului de microorganisme odată cu creșterea profunzimii este consemnată în 5 cazuri din cele 7 grupe ecofiziologice studiate. Excepție fac bacteriile amonificatoare, care sunt prezente în număr mai mare în stratul intermediar (50-75 cm) și bacteriile denitrificatoare, cel mai bine reprezentate în eșantionul prelevat de la adâncimea de 170-175 cm ( $6,9 \cdot 10^4 = 71.059$  /g turbă uscată), cu numărul cel mai mic ( $3,5 \cdot 10^4 = 35.556$  /g turbă uscată) în stratul intermediar (50-75 cm).

Bacteriile fier-reducătoare sunt prezente într-un număr cu aproximativ un ordin de mărime inferior celui al bacteriilor denitrificatoare, urmând cursul descrescător odată cu creșterea adâncimii de prelevare:  $10.682 > 8.889 > 3.947$  bacterii fier-reducătoare/g turbă uscată.

Cel mai slab reprezentate sunt bacteriile desulfocitoare, al căror număr nu ajunge la ordinul  $10^3$  nici în stratul superficial, unde sunt, totuși, mai numeroase decât în straturile profunde, numărul acestor bacterii au înregistrat următoarea ordine descrescătoare de la suprafața profilului până în profunzimea acestuia:  $698 > 50 > 39$  celule / g turbă uscată.

Actinomicetele sunt prezente, de asemenea, într-un număr apreciabil, de ordinul sutelor de mii (straturile superioare), respectiv al zecilor de mii /g turbă substanță uscată (în stratul de la 150-175 cm adâncime). De la suprafața profilului de turbă până la adâncimea maximă de prelevare a turbei s-au înregistrat următoarele valori a numărului de actinomicete:  $410.846 > 103.107 > 77.519$  /g substanța uscată a turbei.

Valori de ordinul  $10^3$ /g turbă substanță uscată înregistrează micromicetele mezofile aerobe, cu aceeași tendință descrescătoare în profunzimea profilului, dar cu diferențe mai mici între cele trei straturi analizate. Numărul micromicetelor au înregistrat următoarea ordine descrescătoare:  $8.217 > 7.407 > 6.460$  g /turbă uscată.

Pe baza numărului de microorganisme /g turbă substanță uscată, s-a calculat indicatorul microbial al calității turbei, care permite o apreciere globală a potențialului microbial al eșantioanelor analizate, acestea dispunând și de un potențial enzimatic crescut (3, 4, 5 și 6).

După cum se poate constata, tendința de descreștere a potențialului microbial cu creșterea adâncimii de prelevare a eșantioanelor de turbă, de la Băile Someșeni, este ilustrată sugestiv de valorile indicatorilor microbieni ai calității turbei (IMCT): 5,151 în stratul superficial, 5,004 la 50-75 cm și 4,481 la 150-175 cm.

**Concluzii.** 1. În probele de turbă din tinoavele Căpățâna și Molhașul Mare de la Izbuc, prelevate de la suprafață (0-25 cm) sunt prezente microorganisme care aparțin fiecăreia dintre cele 7 grupe ecofiziologice studiate – bacterii: heterotrofe aerobe, amonificatoare, denitrificatoare, desulfocitoare, fier-reducătoare, actinomicete și micromicete. Bacteriile desulfocitoare nu au putut fi evidențiate în probele de turbă de la adâncimile de 75-100 și 150-175 cm. Celelalte grupe ecofiziologice studiate au fost prezente și la aceste adâncimi.

2. În turba de la Molhașul Mare de la Izbuc, numărul microorganismelor studiate scade cu creșterea adâncimii de prelevare, această situație fiind valabilă și pentru turba de la Căpățâna pentru bacteriile heterotrofe aerobe, actinomicete și micromicete. În turba de la Căpățâna, numărul cel mai mare de bacterii amonificatoare, denitrificatoare și fier-reducătoare s-a obținut în stratul intermediar (75-100 cm). Tendința generală de descreștere a numărului de microorganisme cu adâncimea de prelevare este ilustrată de valorile indicatorilor microbieni ai calității turbei, care, în ambele profile studiate, înregistrează valoarea maximă în stratul superficial și valoarea minimă în stratul cel mai profund. Turbăriile de la Molhașul Mare – Izbuc și Căpățâna sunt declarate rezervații naturale, ocrotite de lege [7] și ca atare exploatarea lor este interzisă. Calitățile lor terapeutice, din punct de vedere microbiologic și enzimologic, corespund turbelor oligotrofe folosite în stațiunea Vatra Dornei pentru balneoterapie.



3. În zăcământul de turbă de la Băile Someșeni (Cluj - Napoca), la toate cele trei adâncimi de prelevare a eșantioanelor (0-25, 50-75, respectiv 150-175 cm), a fost detectată prezența tuturor grupelor ecofiziologice studiate: bacterii heterotrofe aerobe, bacterii amonificatoare, bacterii denitrificatoare, bacterii desulfocatoare, bacterii fier-reducătoare, actinomicete și micromicete mezofile aerobe.

4. Grupul cel mai numeros este acela al bacteriilor heterotrofe aerobe. Cel mai slab reprezentate sunt bacteriile desulfocatoare. Există o tendință evidentă de descreștere a numărului de microorganisme și, implicit, a potențialului microbial, așa cum este el definit de valorile indicatorilor enzimatici ai calității turbei, odată cu creșterea adâncimii de prelevare a eșantioanelor.

5. Se poate afirma că zăcământul de turbă de la Băile Someșeni are un potențial microbial remarcabil. Datele analizelor microbiologice le confirmă pe cele ale analizelor enzimologice efectuate, rezultatele acestora fiind publicate așa după cum reiese din bibliografia anexată la această lucrare. Aceste date atestă existența unui potențial biologic ridicat al zăcământului de turbă de la Băile Someșeni, care a fost exploatat mult timp în scopuri terapeutice. Această turbă p-Hul de la neutru la slab alcalin care favorizează activitatea microorganismelor implicate în circuitul biogeochimic al materiei în natură. Aceste microorganisme ca și enzimele produse de către ele sunt indicatori valoroși și stabilirea terapeuticității turbei, completând investigațiile sanitare de profil care avizează utilizarea turbei în terapeutică.

## BIBLIOGRAFIE

1. A l e x a n d e r, M., *Most probable-number method for microbial populations*, în Black, C.A., Evans, D.D., White, J.L., Ensminger, L.E., Clark, F.E. (Eds.), *Methods of Soil Analysis*, p.1467-1472, Am. Soc. Agron., Madison, 1965.
2. A l l e n, O.N., *Experiments in Soil Bacteriology*, Third Ed., p.31, Burgess, Minneapolis, 1957.
3. C r i ș a n, R., *Evaluarea potențialului biologic al turbelor din mlaștinile aferente bazinelor hidrografice Someșul Cald și Someșul Rece, în vederea utilizării lor în agricultură și medicină*. Teză dr., Univ. Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, 1998.
4. C r i ș a n, R., M u n t e a n, V., P a ș c a, D., C o l d e a, G., *Activitatea enzimatică a turbei de sub diferitele asociații vegetale ale tinovului Căpățâna*. Stud. Cercet. Biol. (Muzeul Bistrița - Năsăud) **5**, 25-33, 1999.
5. C r i ș a n, R., M u n t e a n, V., P a ș c a, D., *Activitatea enzimatică a turbei terapeutice de la Băile Someșeni – Cluj*, Studii și Cercetări, Biol. (Bistrița), **6**, 13-18, 2001.
6. C r i ș a n, R., M u n t e a n, V., P a ș c a, D., *Analize microbiologice în turbe oligotrofe*, Lucrările celei de a XVI-a Conferințe Naționale pentru Știința Solului, Publicațiile Societății Naționale Române pentru Știința Solului, 30B, 34-40, 2001.

7. Monitorul Oficial al României, nr. 152/12 aprilie 2000, Anexa 1, 2.0. Rezervații și monumente ale naturii.
8. Muntean, V., *Bacterial indicator of mud quality*, Contrib.Bot. (Cluj-Napoca), 73-76, 1995 - 1996.
9. Ottow, J. C. G., *Evolution of iron-reducing bacteria in soil and the physiological mechanism of iron reduction* in *Aerobacter aerogenes*, Z. Allg. Mikrobiol., 8, 441- 443, 1968.
10. Pârveu, R., Stanciu, E., Lörinczi, F., Kiss, S., Drăgan – Bularda, M., Rădulescu, D., *Iron – reducing capacity of soil micromycetes*, Fourth Symp. Soil. Biol. (Cluj – Napoca), pp. 149 – 154, Ed. Ceres, București, 1977.
11. Pochon, J., *Manuel technique d'analyse microbiologique du sol*, Masson, Paris, 1954.
12. Pop, E., *Mlaștinile de turbă din R.P. Română*, Ed. Acad. R.P.R., București, 1960.

## TAXONOMY AND PHYSIOLOGY OF THE OBLIGATELY CHEMOLITHOAUTOTROPHIC, ALKALIPHILIC SULFUR- OXIDIZING BACTERIA FROM SODA LAKES

HORIA BANCIU\*

**SUMMARY.** - Saline environments result from a complex interaction of the biogeochemical, geographical and climatic conditions. Based on these particularities acidic, neutral or alkaline saline lakes may occur and they are met on every continent on Earth. Natural element cycling in these environments is sustained by a broad variety of life forms among which the bacteria play a dominant role. One category of saline environment is represented by lakes with high alkalinity and salinity - the soda lakes. Surprisingly, the biomass production and the biodiversity in these (extreme) environments are very high. In the present review we are dealing with the taxonomy and physiology of microbiological groups involved in the oxidation of sulfur that take place in the soda lake habitats. Three taxonomical groups of sulfur-oxidizing bacteria have been described to date, all of them belonging to gamma-Proteobacteria. They differ significantly in their morphology, physiology and biochemical composition, occupying particular and important places in the biological sulfur cycling occurring in the saline-alkaline lakes.

Natural habitats are characterized by full and balanced recycling of chemical elements (C, O, H, N, S, P, metals etc.). Biological utilization of elements is performed by all living creatures under form of trophic chains in which every group of organisms have a specific place. Any external or internal perturbation of the number and diversity of trophic chain participants results in a break of full natural circles. All environments on Earth are populated in a way or another, even if many of their tiniest inhabitants were not yet identified and characterized. Considered as “unusual” habitats, the environments featuring extreme conditions are, in fact, largely distributed on our planet. The current biological research is strongly interested in studying these extreme environments not only for fundamental reasons but also for their potential applicative interest. One of the latest trends in the modern biology focused on life in the extreme conditions is the extrapolation of knowledge toward the extra-terrestrial sciences.

**Saline environments.** Extreme environments are widely distributed on Earth and they comprise the immense desert regions, the surface and deep-sea active volcanic areas, the thermal and often acidic springs and lakes, the Arctic and Antarctic ice shields, the permafrost and glaciers, the saline and/or alkaline soils and lakes etc. Despite the apparently adverse physico-chemical conditions, these

---

\*Babeș-Bolyai University, Department of Experimental Biology, 400006 Cluj-Napoca, Romania.

E-mail: hbanciu@biochem.ubbcluj.ro

extreme environments are densely populated by microorganisms. In the past decades a growing number of new genera and species of extremophilic microorganisms have been discovered and described. However, in spite of these recent advances, the cultivated bacteria only make up a small percentage of the microorganisms known to be present in these environments.

The present review concerns one particular segment of these extreme milieus, namely saline and alkaline environments. Most saline and/or alkaline lakes are located in the arid areas in Middle East and Central Asia, Eastern Africa, the western and northern part of the U.S.A and Central Australia. Remote saline lakes have been also found in other part of the world, such as the hypersaline Antarctic lakes [18]. The saline lakes may have originated from a complex interaction of biogeochemical, geographical and climatic conditions. Based on these particularities acidic, neutral or alkaline saline lakes can occur. Saline lakes may contain water permanently, intermittently or transiently. They range from deep to shallow, from small to extremely large (Great Salt Lake, Dead Sea).

Based on their marine or continental origin, the saline lakes are divided into thalassohaline (with the same salt composition as seawater) and athalassohaline lakes (with a salt composition different from that of the seawater) (Table 1) [20]. The neutral saline lakes (pH 6-8) contain NaCl as the major salt and their buffering capacity is low. On the other hand, the alkaline saline (soda) lakes (pH 9-11) are characterized by the presence of large amounts of sodium carbonates ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$ ) that confer the water a high buffering capacity (Fig. 1). Naturally occurring alkalinity is usually associated with salinity [9]. Other major ions found in salt lakes are  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^+$  as cations, and  $\text{SO}_4^{2-}$  and  $\text{Br}^-$  as anions. In the soda lakes, one of the major chemical characteristics is the lack of solubilized divalent cations ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) due to their strong tendency of precipitation as carbonates under alkaline conditions. The removal of divalent cation carbonates drives the solubilization of sodium or potassium carbonates, thus increasing the monovalent cation concentration. In this way brines are formed. In some parts of the world, the shallow lakes may end as a layer of solid rock (trona – crystalline sodium sesquihydrate,  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{NaHCO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) by evaporation during dry seasons. A broad range of intermediate saline and/or alkaline lakes occur by the mixing of the minerals in various ratios. Several examples of saline lakes and their chemical composition are presented in Table 1.

In general, at a salt concentration higher than that found in seawater (35 g/l, w/v), the lake is considered highly saline or hypersaline [7]. The saline lakes have attracted the attention of investigators due to their unique chemical and biological features. Soda lakes are considered as models of ancient Martian or Archaean terrestrial aquatic biotopes [14, 15]. The (hyper)saline lakes are populated mostly with halophilic neutrophilic organisms while the alkaline saline lakes are the habitats of haloalkaliphilic species. The organisms living in such environments possess special adaptation mechanisms that make them interesting for industrial application.

Table 1

**Concentration of ions in thalassohaline and athalassohaline brines, modified after  
G r a n t *et al.*, [7], I m h o f f *et al.*, [12] and Z a v a r z i n *et al.*, [32]**

Ions	Concentration (g/l)						
	Seawater	Great Salt Lake, U.S.A.	Dead Sea	Big Soda Lake, U.S.A.	Lake Hadyn, Siberia	Lake Magadi, Kenya	Lake Zugm- Wadi Natrun, Egypt
Na <sup>+</sup>	10.8	105.0	39.7	8.1	3.9	161.0	142.0
Mg <sup>2+</sup>	1.3	11.1	42.4	0.32	0.28	0	0
Ca <sup>2+</sup>	0.4	0.3	17.2	0.15	0	0	0
K <sup>+</sup>	0.4	6.7	7.6	0.005	0	2.3	2.3
Cl <sup>-</sup>	19.4	181.0	219.0	7.1	2.6	111.8	154.6
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2.7	27.0	0.4	5.8	3.8	16.8	22.6
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> / HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.34	0.72	0.2	4.1	2.4	23.4	67.2
pH	8.2	7.7	6.3	9.7	8.4	11.0	11.0

**Diversity of salt-loving microorganisms.** In the past decades the studies revealed a large diversity of organisms that thrive in highly saline and alkaline lakes [6, 19, 20]. Based on their salt tolerance and optimal salt concentration, the halophilic organisms can be grouped into several categories: halotolerants, low-salt halophiles, moderate halophiles, borderline extreme halophiles, extreme halophiles and haloversatiles (Table 2) [7, 31]. The halophiles that have their pH optimum at alkaline values are called haloalkaliphiles. On the reverse, many alkaliphiles are low salt or nonhalophilic alkaliphiles [10]. The term “natronophilic” (or “trona-loving“ organisms) has been suggested for the organisms living at high soda (carbonate/bicarbonate) concentrations rather than at high NaCl concentrations. This quality may apply to those haloalkaliphilic organisms isolated from soda lakes and growing optimally at high pH and high soda concentrations. In the following text we will use the terms “halophilic” or “halophiles” for those organisms that are at least low-salt halophiles (require a minimum of 0.2 M or 15 g/l salts).

Halophilic organisms are found in all three domains of life: *Archaea*, *Bacteria* and *Eucarya*. A large nutritional and ecological spectrum of halophiles assures the natural cycling of the elements in the saline environments. The taxonomy, physiology and molecular aspects of halophiles and halophilic adaptations have been extensively reviewed in the past [7, 17, 19–21, 30, 31].

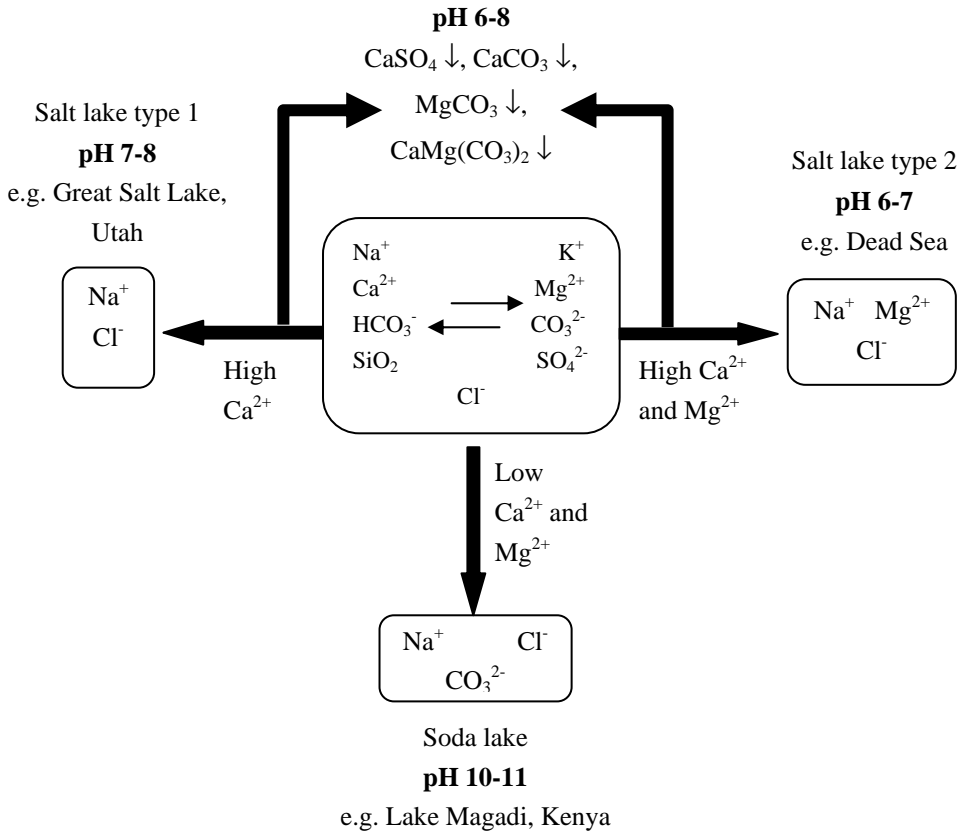


Fig. 1. Schematic representation of the genesis of acidic, neutral and alkaline saline lakes, modified after Grant et al., [7]

Most of the halophilic organisms are prokaryotes and only a few are eukaryotes. The unicellular eukaryotes, such as green algae of genus *Dunaliella* can live up to saturation values of NaCl. The green algae are the trophic base for higher eukaryotes in the (hyper)saline lakes like the brine shrimps (*Artemia franciscana*, *A. monica*) and the brine flies (*Ephydra gracilis*, *E. hians*). Species of protozoa, fungi, invertebrates and plants tolerating high concentrations of NaCl have also been described [5].

The primary biomass producers in the soda lakes are mostly the haloalkaliphilic cyanobacteria that can produce up to 10 g C/ m<sup>2</sup> day [8]. The low saline soda lakes turn often into a red color because of seasonal blooming of halophilic cyanobacteria while the primary biomass producers in hypersaline soda lakes are both haloalkaliphilic cyanobacteria and anoxygenic phototrophic bacteria [32]. Cyanobacteria are essential both for N<sub>2</sub> fixation and for O<sub>2</sub> production in the saline lakes.

Haloalkaliphilic phototrophic anoxygenic bacteria are represented mainly by purple sulfur bacteria of the genera *Ectothiorhodospira* and *Halorhodospira*. They use inorganic sulfur compounds like sulfide and elemental sulfur as electron donor for C fixation and for growth. The organic compounds are further mineralized through biological processes catalyzed aerobically by halophilic heterotrophic bacteria of the genus *Halomonas* [6]. The final step in the organic matter degradation occurs primarily under anaerobic conditions. In principle all major metabolic group are represented among the halophiles. At extreme salt concentrations (>150 g/l) several physiological groups of organisms could not be found: autotrophic methanogens, acetoclastic methanogens, dissimilatory sulfate-reducers that perform the complete oxidation of their substrate and autotrophic ammonia and nitrite oxidizers. According to Oren [19] the reason for the absence of these nutritional groups at hypersaline conditions might be the bioenergetic constraints. It is speculated that since these organisms perform a less energetically efficient metabolism, they could not sustain an energetically expensive osmoregulation.

Table 2

**Categories of halophilic microorganisms, modified after G r a n t *et al.*, [7] and V e n t o s a, [31]**

Category	Salt concentration (M)		
	Range	Optimum	Example
Nonhalophiles	0-1.0	<0.2	<i>Escherichia coli</i>
Low-salt halophiles	0.2-2.0	0.2-0.5	<i>Thioalkalimicrobium aerophilum</i>
Moderate halophiles	0.4-3.5	0.5-2.0	<i>Desulfovibrio halophilus</i>
Borderline extreme halophiles	1.4-4.0	2.0-3.0	<i>Halorhodospira abdelmalekii</i>
Extreme halophiles	2.0-5.2	>3.0	halophilic <i>Archaea</i> (e.g. <i>Halococcus</i> sp.)
(Extreme) Halotolerants	0->1.0 (5.0)	<0.2	<i>Dunaliella</i>
Haloversatiles	0->3.0	0.2-0.5	<i>Halothiobacillus kellyi</i>

**Sulfur-oxidizing bacteria (SOB) from soda lakes.** The biology of inorganic sulfur oxidation was well documented in neutral and acidic conditions [16]. In the neutral hypersaline environments purple sulfur bacteria use light as energy source and inorganic sulfur compounds ( $H_2S$ ,  $S^0$ ,  $S_2O_3^{2-}$ ) as electron donors. The inorganic sulfur oxidation by obligate haloalkaliphilic chemolithoautotrophs was only recently discovered and investigated. The autotrophic SOB bacteria capable of oxidation of inorganic sulfur compounds at moderate to high salt concentration and at high pH can be divided into three genera: *Thioalkalimicrobium* (low-salt tolerant alkaliphiles), *Thioalkalivibrio* (extremely salt tolerant and extremely halophilic

alkaliphiles) and *Thioalkalispira* [22-28]. These genera belong to the  $\gamma$  subdivision of the Proteobacteria (Fig. 2). The haloalkaliphilic SOB play a crucial role in the natural sulfur-cycle in the saline, alkaline environments.

**Genus *Thioalkalimicrobium*.** The genus *Thioalkalimicrobium* comprises species with a low DNA G-C content (48-51 mol%) isolated from the low saline Siberian soda lakes, from Kenyan soda lakes and from the saline and alkaline Mono Lake in U.S.A. The cells are rod-shaped, vibroid, spirilloid and coccoid. Some strains include motile cells with one to three polar flagella while other strains are non-motile. The cells of *Thioalkalimicrobium* sp. survive 4-12 months at 4°C. They can be cultivated on alkaline thiosulfate agar medium and the colonies are reddish, without sulfur deposition. The ultrastructural study of *Thioalkalimicrobium* cells showed a similar organization in all strains, with an undulating cell wall of the Gram-negative type and multiple carboxysome-like structures localized in the central region of the cell. The cell wall in these bacteria was very unstable under low-osmotic conditions and during storage.

The 16S rRNA gene sequence analysis of the type strains revealed that the *Thioalkalimicrobium* group has a relatively close affiliation to the neutrophilic sulfur-oxidizing bacteria of the genus *Thiomicrospira* (4 and 10% total sequence difference with *Thiomicrospira pelophila* and *Thiomicrospira crunogena* type strains, respectively).

Based on phylogenetic analysis including 16S rDNA sequence analysis and DNA-DNA hybridization supplemented by phenotypic characterization, in the *Thioalkalimicrobium* group three species have been described to date: *Thioalkalimicrobium aerophilum*, *Thioalkalimicrobium sibiricum* and *Thioalkalimicrobium cyclicum*.

The strains of *Thioalkalimicrobium aerophilum* were isolated from the water and surface sediments of Siberian soda lakes (e.g. the type strain AL 3<sup>T</sup>, DSM 13739<sup>T</sup>) and from Kenyan soda lake sediments [24].

*Thioalkalimicrobium sibiricum* type strain, AL 7<sup>T</sup> (DSM 13740<sup>T</sup>) was isolated from the sediments of Siberian soda lake in Buriatia (Russia) [24].

*Thioalkalimicrobium cyclicum* (type strain ALM 1<sup>T</sup>, DSM 14477<sup>T</sup>) was isolated on solid agar medium from the oxygen-sulfide interface water layer of Mono Lake (California, U.S.A) [22]. Unlike strains of *Thioalkalimicrobium sibiricum* that are rather microaerophilic, the strains of *Thioalkalimicrobium aerophilum* grow faster under fully aerobic conditions. Another phenotypic difference is the tetrathionate-oxidizing capacity, which is present in *Thioalkalimicrobium aerophilum* and *Thioalkalimicrobium cyclicum* and very low or absent in *Thioalkalimicrobium sibiricum*. Moreover, *Thioalkalimicrobium aerophilum* strains demand a higher sodium ion concentration for optimal growth than *Thioalkalimicrobium sibiricum* strains [23].

**Genus *Thioalkalivibrio*.** The genus *Thioalkalivibrio* includes obligately autotrophic sulfur-oxidizing species with a high DNA G-C content (61.0-65.6 mol%). The *Thioalkalivibrio* group belongs to the  $\gamma$ -Proteobacteria and has no immediate relatives among the other chemolithotrophic members of the  $\gamma$ -Proteobacteria. The



group bears a distant relationship to the anaerobic purple sulfur bacteria of the genus *Ectothiorhodospira* [24].

The strains were isolated mostly from the Kenyan soda lakes, which are, in general, more alkaline and saline than the Siberian steppe lakes. To date, one species of *Thioalkalivibrio* was isolated from Mono Lake (U.S.A.) [22]. The group is represented mainly by vibrio-shaped bacteria with one polar flagellum. Some strains show spirilla-, rod-, filamentous rod-shaped cells or curved barrel-like-cells with thick capsules. It also may include strains with non-motile cells. The Gram-negative cell wall of *Thioalkalivibrio* cells is undulating and the multiple carboxysome-like structures are present in the center of the cells with the exception of the denitrifying species. In contrast to the *Thioalkalimicrobium* strains, cells of the *Thioalkalivibrio* strains were more resistant to osmotic shock and survived much longer during storage in liquid cultures at 4°C. A substantial difference in cell fine structure was observed only in the haloalkaliphilic strains. Strain ALJ 15 presents a cell wall with multiple tubular extensions filled with electron-dense material. The cells of another haloalkaliphilic strain, ALJ 22, are surrounded by a large capsule, sometimes shared by several cells that tend to aggregate.

Genetically, as well as phenotypically, the *Thioalkalivibrio* group is more heterogenous than the *Thioalkalimicrobium* group. DNA-DNA hybridization demonstrated that it includes both highly related strains with more than 90% DNA homology and only weakly related representatives with a DNA similarity of about 30% with the other strains. The group includes strains that possessed important phenotypic differences and could not be separated from the others based on its 16S RNA or DNA-DNA homology. There are moderate halotolerant and extremely halophilic and halotolerant strains. The latter are able to produce membrane-bound yellow carotenoids but genetically they could not be separated from the colorless strains. This is a first known example of pigment formation among the aerobic 'colorless' sulfur bacteria. In the haloalkaliphilic strains, the amount of carotenoid produced positively correlated with the salt concentration in the growth medium. The colored strains do not contain bacteriochlorophylls.

Several strains of *Thioalkalivibrio* are able to grow with thiocyanate (SCN<sup>-</sup>) as the sole energy and nitrogen source. They were isolated from soda lakes in South-East Siberia, Kenya and Egypt and classified into two separate species.

***Thioalkalivibrio versutus*** (type strain AL 2<sup>T</sup>, DSM 13738<sup>T</sup>) includes strains of vibrio- to spirilla-shaped bacteria isolated from Kenyan and Siberian soda lakes. Two strains (ALJ 15 and ALJ 22) are halophilic, thermotolerant and produce a membrane-bound yellow pigment. The type strain was isolated from the surface sediments of a Siberian soda lake (Tuva Republic) [24].

***Thioalkalivibrio halophilus*** (type strain HL 17<sup>T</sup>, DSM 15791<sup>T</sup>) is an obligately chemolithoautotrophic, halophilic and facultatively alkaliphilic bacterium. Cells are 0.3-0.4 x 1-2 µm, motile by a single polar flagellum. At low salinity often produces extracellular sulfur from thiosulfate. Produces yellow, membrane-associated pigment during growth at high salinity, with a main absorption maximum at 426 and a minor one at 457 nm in the methanol extract. The G+C content in DNA is

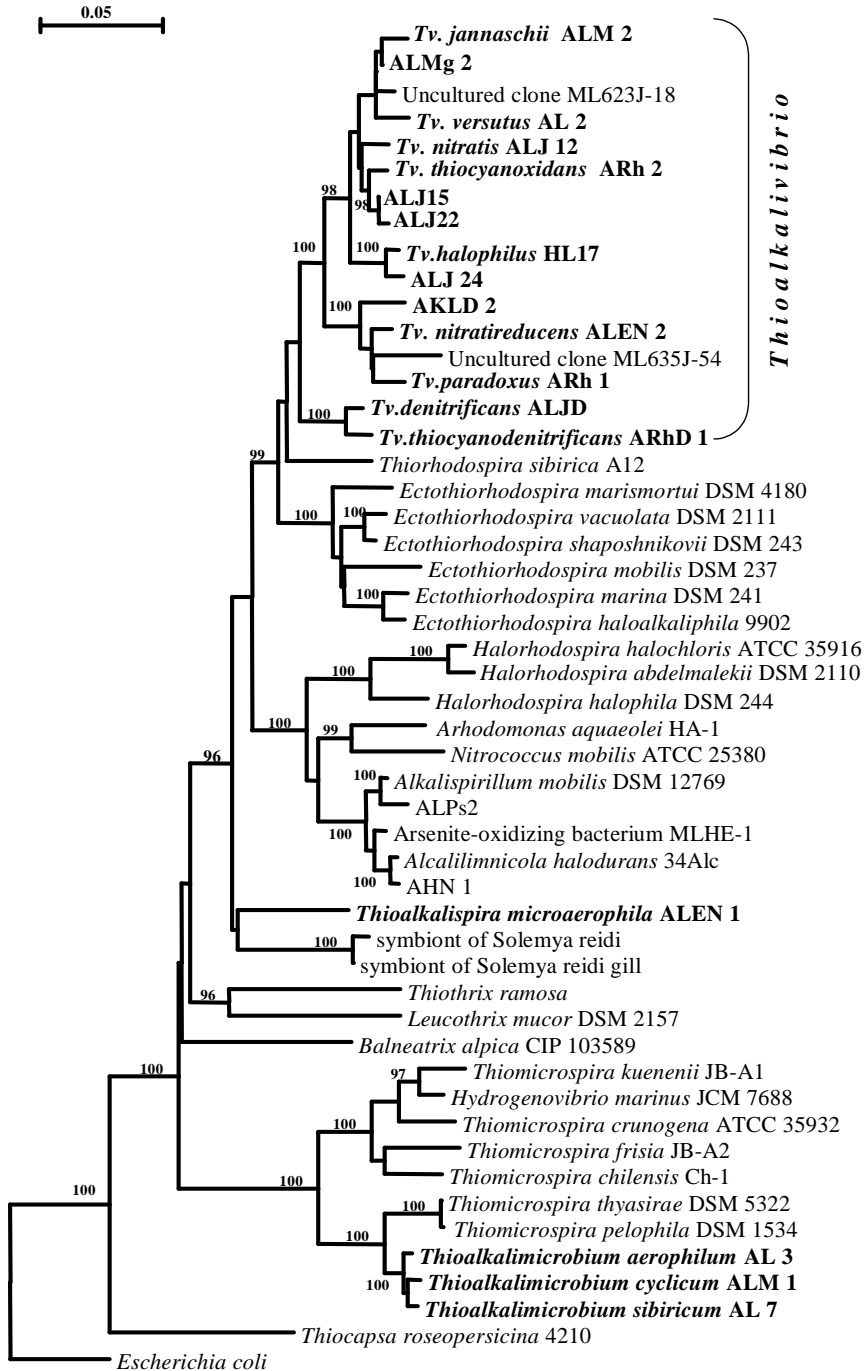


Fig. 2 Phylogenetic tree demonstrating position of the three new genera of haloalkaliphilic SOB isolated from the soda lakes. Numbers on the branches indicates bootstrap values (only the highest values are included). Unaffiliated strains among the genus *Thioalkalivibrio*: extremely salt tolerant strains from Mongolia (AL Mg 2) and Kenya (ALJ 15, ALJ 22, ALJ 24); AKLD 2 – facultatively anaerobic nitrate-reducing strain from Kulunda. Bar, 5% sequence divergence.

65.1 ± 0.5 mol% (*T<sub>m</sub>*). It is an extremely salt-tolerant bacterium growing at sodium concentrations between 0.2 and 5 M with an optimum at 2 M Na<sup>+</sup>. It grows at high concentrations of NaCl and of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> (soda). Strain HL 17<sup>T</sup> is a facultative alkaliphile growing at pH range 7.5-9.8, with a broad optimum between pH 8.0 and 9.0. It used reduced inorganic sulfur compounds (thiosulfate, sulfide, polysulfide, elemental sulfur and tetrathionate) as energy source and electron donor. In continuous culture, under energy limitation, thiosulfate was stoichiometrically oxidized to sulfate. In sodium carbonate medium under alkaline conditions the maximum growth rate was similar while the biomass yield was lower as compared with the NaCl-grown culture. The maximum sulfur-oxidizing capacity measured in washed cells was higher in the soda buffer independent of the growth conditions. The compatible solute content of the biomass was higher in the sodium chloride-grown culture than in the sodium carbonate/bicarbonate-grown culture. The data suggest that the osmotic pressure differences between soda and NaCl solutions might be responsible for the difference observed in compatible solutes production. This may have important implications in overall energetic metabolism of high salt adaptation [2].

*Thioalkalivibrio denitrificans* (type strain ALJD<sup>T</sup>, DSM 13742<sup>T</sup>) includes a non-denitrifying strain from the Kenyan soda lakes, phenotypically similar to *Thioalkalivibrio versutus*. The type strain ALJD<sup>T</sup>, isolated from sediments of soda lake Bogoria (Kenya), is a facultatively anaerobic and microaerobic denitrifier. The strain ALJD<sup>T</sup> had a relatively low DNA similarity with the non-denitrifying *Thioalkalivibrio* strains except strain ALJ 10 (55-58% similarity). ALJD<sup>T</sup> also had a protein profile very similar to that of the non-denitrifying strain ALJ 10. Strain ALJ 10 does not grow anaerobically with different nitrogen oxides as electron acceptors. The reason for such an obvious discrepancy between the genetic similarity and physiological difference is not clear. It might be speculated that this could be the result of the complete deletion of the DNA region responsible for denitrification in strain ALJ 10 [24].

*Thioalkalivibrio nitratiss* (type strain ALJ 12<sup>T</sup>, DSM 13741<sup>T</sup>) includes strains from Kenyan and Siberian soda lakes with a high DNA homology (80%). Unlike other species of the genus, they reduce nitrate to nitrite during growth with thiosulfate under oxygen-limiting conditions. Strain ALJ 21 produces membrane-bound yellow pigment and contains high level of cytochromes. The type strain, ALJ 12<sup>T</sup> was isolated from sediments of soda lake Nakuru (Kenya). They store sulfur intracellularly [24].

*Thioalkalivibrio nitratireducens* (type strain ALEN 2<sup>T</sup>, DSM 14787<sup>T</sup>) was isolated from the hypersaline Lake Fazda (Wadi Natrun, Egypt) and presented barrel-shaped, coccoid, non-motile cells. Strain ALEN 2<sup>T</sup> is facultatively anaerobic, obligately alkaliphilic and moderately halophilic. The strain oxidizes thiosulfate, sulfide, polysulfide and, much less actively, elemental sulfur and tetrathionate to sulfate. They grow anaerobically in the presence of nitrate as electron acceptor and thiosulfate, sulfide or polysulfide as electron donor. The sole product of nitrate reduction is nitrite. *Thioalkalivibrio nitratireducens* is genetically most closely related to the thiocyanate-oxidizing species, *Thioalkalivibrio paradoxus*. Its DNA G+C content is 64.8±0.5 mol% (*T<sub>m</sub>* method) [28].

*Thioalkalivibrio jannaschii* (type strain ALM 2<sup>T</sup>, DSM 14478<sup>T</sup>) was isolated from the O<sub>2</sub>-HS<sup>-</sup> interface layer of Mono Lake (California, USA), tolerates up to 4 M Na<sup>+</sup> and produces a membrane-bound yellow pigment [22]

*Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* (type strain ARh 2<sup>T</sup>, DSM 13532<sup>T</sup>) differs from the other *Thioalkalivibrio* species by the ability to grow with thiocyanate as the sole energy, nitrogen and sulfur source, producing cyanate as an intermediate. Cells are short vibrios and each has a single polar flagellum. The extremely salt-tolerant strains produce a membrane-bound yellow pigment. The species is obligately chemolithoautotrophic. The type strain ARh 2<sup>T</sup>, isolated from a Kenyan soda lake, is a yellow-colored, extremely natronotolerant bacterium able to grow in soda brines (up to 4.3 M Na<sup>+</sup>) [27].

*Thioalkalivibrio paradoxus* (type strain ARh 1<sup>T</sup>, DSM 13531<sup>T</sup>) cells are large, non-motile, barrel-like rods with capsules. It was isolated from the sediments of Kenyan (e.g. the type strain) and Egyptian soda lakes. The strains are obligately alkaliphilic and moderately halophilic [27].

**Genus *Thioalkalispira*.** To date the genus *Thioalkalispira* is represented by a single obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing species *Thioalkalispira microaerophila* (type strain ALEN 1<sup>T</sup>, DSM 14786<sup>T</sup>). Isolated from a soda lake in Wadi Natrun, Egypt, the *Thioalkalispira* spirillum-like bacterial cells are motile and with a single polar flagellum. They contain a membrane-associated yellow pigment. The DNA G-C content of *Thioalkalispira microaerophila* is 58.9±0.5 mol% (T<sub>m</sub>), which is lower than the values observed for all of the known haloalkaliphilic SOB of the genera *Thioalkalimicrobium* and *Thioalkalivibrio* isolated so far. Phylogenetic analyses of the 16S rDNA sequences of strain ALEN 1<sup>T</sup> and its closest relatives demonstrated that this strain formed a deep branch within the  $\gamma$ -*Proteobacteria*, with no obvious association to any described cluster of species/genera [26].

**Growth characteristics and sulfur-oxidizing potential of alkaliphilic SOB from soda lakes.** The growth physiology of the representatives of the genera *Thioalkalimicrobium* and *Thioalkalivibrio* genera have been studied under substrate excess in batch culture or substrate limitation in continuous culture, at alkaline pH and at low salt concentration (0.2-1.5 M Na<sup>+</sup>) [1, 2, 22-25, 27, 28].

#### **Growth characteristics of *Thioalkalimicrobium* sp.**

##### ***Optimal growth conditions***

Species of *Thioalkalimicrobium* are obligate chemolithoautotrophic bacteria. In batch cultures, *Thioalkalimicrobium* strains grow optimally at pH values higher than 9. In pH-controlled thiosulfate-limited continuous culture, growth occurred within a pH range of 7.5-10.6, with an optimum around 10. At pH values lower than 8, most of the cells lysed. All strains are sodium-dependent, with a minimal sodium ion requirement of about 0.2-0.3 M. The upper limit of sodium ion concentration was 1.2-1.5 M.

**Growth kinetics**

As a general property for *Thioalkalimicrobium* species a maximum specific growth rate in chemostat culture of  $0.33 \text{ h}^{-1}$  was established, while in batch culture it varied from 0.08 to  $0.22 \text{ h}^{-1}$ . The molar growth yield on thiosulfate in batch culture varied from 1.8 to  $2.7 \text{ g protein (mol thiosulfate)}^{-1}$  while in chemostat culture this value did not exceed  $3.5 \text{ g protein (mol thiosulfate)}^{-1}$  [24].

**Sulfur oxidation potential and cytochrome composition**

The obligately chemolithoautotrophic *Thioalkalimicrobium* strains were able to grow only in the presence of thiosulfate or sulfide. Organic compounds (e.g. acetate, yeast extract) are assimilated without growth. Intermediate elemental sulfur formation could not be detected during batch cultivation. Under unfavorable pH conditions small amounts of sulfite were detected in some strains. During polysulfide oxidation in cell suspension or under severe oxygen limitation in thiosulfate- or sulfide-growing culture, production of elemental sulfur was observed. On the basis of their oxygen requirement, *Thioalkalimicrobium* strains have been divided into two categories: preferentially aerobic and preferentially microaerobic. Aerobic strains grew better under conditions of non-limiting oxygen supply. This category included mostly rod-shaped bacteria isolated from the water or surface sediments of the Siberian soda lakes. The microaerobic strains mostly originated from the anaerobic sediments. They grew faster under conditions of limited oxygen supply. Some of them, however, were only slightly inhibited by forced aeration. The latter strains were represented by vibroid cells and formed compact colonies.

The *Thioalkalimicrobium* cells have, in general, high sulfide and thiosulfate-dependent respiration activity, and low cytochrome *c* oxidase activity [ $0.2\text{-}0.3 \text{ mmol tetramethyl-ethyl-phenylene-diamine (TMPD) (mg protein)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ]. They contain high concentrations of cytochromes *c* and lower concentration of cytochromes *b*. In membranes of *Thioalkalimicrobium aerophilum* and *Thioalkalimicrobium sibiricum* the cytochrome *c* oxidase is of the *cbb3* type - a cytochrome *c* oxidase with high affinity to oxygen [24]. All members of this group oxidized thiosulfate, sulfide and polysulfide with maximum rates at pH 9-10 and up to pH 11. The specific rates are comparable with the highest values observed in neutrophilic sulfur bacteria. On the other hand, only a few of the *Thioalkalimicrobium* strains were able to oxidize tetrathionate and most could not oxidize elemental sulfur or did it with a very low specific activity. As the affinity constant for tetrathionate was at least one order of magnitude higher than that for thiosulfate and sulfide (about 80-100 mM) and because of the instability of tetrathionate under alkaline conditions at high concentrations, it is very unlikely that tetrathionate can serve as a natural substrate for the *Thioalkalimicrobium* group. In contrast, polysulfides can be regarded as specific substrates for alkaliphilic sulfur bacteria because they become chemically stable at alkaline pH. The stoichiometry of oxygen consumption and accumulation of colloidal sulfur during polysulfide oxidation indicated that only the terminal sulfur atoms of  $\text{S}_6^{2-}$  were oxidized completely to sulfate by the *Thioalkalimicrobium* strains. These results demonstrated that inorganic polysulfur compounds like polysulfide are unlikely to be involved as intermediates of sulfide oxidation in

these bacteria. Together with the complete inability to oxidize sulfite, the absence of sulfite dehydrogenase activity and the very low tetrathionate synthase activity in cell-free extracts, the results suggested that the *Thioalkalimicrobium* representatives oxidize sulfur compounds directly to sulfate by a mechanism similar to that found in several neutrophilic sulfur bacteria like *Paracoccus versutus*.

### **Growth characteristics of *Thioalkalivibrio* species**

#### ***Optimal growth conditions***

Strains of *Thioalkalivibrio* are obligately chemolithoautotrophs growing optimally at pH 10.0-10.2. Some strains are capable of growing down to 9-9.5 while others fail to grow below pH 10. Many strains of *Thioalkalivibrio* are halotolerant or extremely halotolerant, being able to grow between 0.6 and 4 M Na<sup>+</sup>. Some strains of *Thioalkalivibrio versutus* are obligate halophilic and thermotolerant, growing only above 1 M Na<sup>+</sup> (optimum at 1-2 M) and up to 45-47°C (optimum at 40°C).

#### ***Growth kinetics***

In general, the batch and continuous cultivation have shown that the maximum specific growth rate with thiosulfate is less than 0.2 h<sup>-1</sup>. Unlike *Thioalkalimicrobium* species, the maximum molar yield on thiosulfate in *Thioalkalivibrio* strains is higher (up to 8 g protein mol<sup>-1</sup>) [1, 24].

#### ***Sulfur oxidation potential and cytochrome composition***

*Thioalkalivibrio* strains oxidize sulfide, thiosulfate, elemental sulfur, sulfite and polythionates with relatively low activities within the pH range 7.0 to 11.0-11.5 (optimum pH 9-10). The rates of oxygen consumption with various inorganic sulfur substrates are ranging between 0.2 to 0.8 μmol O<sub>2</sub> (mg protein)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. Sulfide and polysulfide oxidation by washed cells display a biphasic kinetics, a first phase attributed to fast oxidation to intermediate sulfur, and a second phase attributed to a slower oxidation of elemental sulfur to sulfate. Elemental sulfur is transiently produced at the beginning of the exponential phase in batch cultivation on thiosulfate at alkaline pH. Elemental sulfur when produced is stored in the periplasm. No sulfur formation was observed upon polysulfide oxidation in cell suspension. The end product of inorganic sulfur oxidation is sulfate. Tetrathionate is hydrolysed first to thiosulfate, elemental sulfur and sulfate in *Thioalkalivibrio versutus* strains.

*Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* and *Thioalkalivibrio paradoxus*, isolated from sediments of Kenyan or Egyptian lakes, are capable of utilizing thiosulfate as energy source and thiocyanate (SCN<sup>-</sup>) as sole source of energy, nitrogen and sulfur. Washed cells of *Thioalkalivibrio paradoxus* were able to oxidize carbon disulfide, a unique property among *Thioalkalivibrio* species. Thiocyanate-oxidizing capacity is inducible in these strains. As a result of thiocyanate degradation, cyanate (OCN<sup>-</sup>) is produced as intermediate compound. Cyanase activity, which liberates NH<sub>3</sub>, is absent in *Thioalkalivibrio paradoxus* and present in few strains of *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans*. Cyanate is stable under alkaline conditions and it is used as nitrogen source by haloalkaliphilic strains. Interestingly, *Thioalkalivibrio paradoxus* has an extremely low elemental sulfur oxidation activity and therefore, the oxidation of thiosulfate, sulfide, polysulfide and thiocyanate results in the accumulation of

elemental sulfur [27]. Sulfite dehydrogenase activity in *Thioalkalivibrio* is AMP-independent, unlike sulfite dehydrogenase activity in *Thioalkalimicrobium* implying that the organisms may have substrate level ATP production. The cytochromes spectra showed that *c*- and *b*- types cytochromes are dominating in the membranes. The cytochrome *c* oxidase activity is relatively high, with moderate sensitivity to cyanide and with spectroscopic properties of cytochrome *o*. *Thioalkalivibrio denitrificans* is the only *Thioalkalivibrio* species that contains cytochrome oxidase type *aa*<sub>3</sub> [24]. The major ubiquinone in this genus is Q-8 [24].

*Thioalkalivibrio denitrificans* grows best anaerobically in the presence of thiosulfate as electron donor and nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) as electron acceptor. Nitrite in small concentrations can also be used as electron acceptor but growth is slower than with N<sub>2</sub>O. *Thioalkalivibrio nitratis* and *Thioalkalivibrio nitratreducens* are capable of reducing nitrate to nitrite under microaerobic conditions. The cytochrome oxidase activity of nitrate-reducing strains was much lower than in other species. The activity of the cytochrome *c* oxidase in cell-free extracts of *Thioalkalivibrio* species other than *Thioalkalivibrio nitratis* is 5-50 times higher than in the members of *Thioalkalimicrobium*. This activity is also at least five times less sensitive to CN<sup>-</sup>. The latter confirmed the spectroscopic evidence on the different nature of cytochrome *c* oxidases in the two groups of these sulfur-oxidizing alkaliphiles. The high activity of cytochrome oxidases in *Thioalkalivibrio* is however in contrast with their low maximum respiratory activity as compared with *Thioalkalimicrobium*. It is possible that the high oxidase activity may be an adaptation to low oxygen concentration in order to lower the overall apparent affinity constant ( $K_s$ ) for oxygen rather than increasing the overall (apparent) maximum respiratory capacity ( $V_{max}$ ).

**Growth characteristics of *Thioalkalispira* species.** *Thioalkalispira* strains use thiosulfate or sulfide as electron donors. Washed cells oxidize thiosulfate, sulfide, polysulfide and elemental sulfur to sulfate. It grows optimally under micro-oxic conditions (1–2% O<sub>2</sub> in the gas phase), whereas growth is inhibited under fully oxic conditions. Among nitrous oxides only nitrate is used as electron acceptor but without growth. The representatives of the species are alkaliphilic and moderately halophilic bacteria growing between pH 8 and 10.4 (optimum around pH 10) and at a salt concentration between 0.3 and 1.5 M Na<sup>+</sup> (optimum 0.5 M). The maximum growth rate (0.08 h<sup>-1</sup>) of the organism was achieved in a thiosulfate-limited micro-oxic continuous culture at pH 10 [26].

**Discussion and conclusions.** Of high interest for the research of sulfur-oxidizing bacteria thriving in the soda lakes has been to answer the question “how do the alkaliphilic SOB work?”. In the last years a multiple approach was used to clarify the physiology of sulfur oxidation and the aspects of competitive interactions between the two groups of alkaliphilic SOB. Morphological and physiological features of alkaliphilic SOB have been presented above. Biochemical data concerning the salt and pH adaptation showed that the composition of the cell membranes in

alkaliphilic SOB from soda lakes is dominated by the unsaturated fatty acids. It is expected that the content of anionic lipids is very high, especially in the extremely salt-tolerant strains [3, 4]. This assumption was confirmed by the highly negative values found in the membrane surface potential of *Thioalkalimicrobium* and *Thioalkalivibrio* (Banciu, unpublished results). The presence of significant amounts of squalene, an apolar lipids acting like a barrier or as modulator of membrane fluidity, may also explain the extremely salt-tolerance of some alkaliphilic SOB belonging to *Thioalkalivibrio* group. The squalene may also play a role in the alkaliphilicity.

Many extremely salt-tolerant, extremely natronophilic and halophilic strains of *Thioalkalivibrio* group synthesized a membrane-bound yellow pigment not found in the low-salt tolerant *Thioalkalivibrio* strains. This pigment is a 23 C-polyene compound with a structure unknown for any bacterial pigments [29]. Although its complete formula and function is not yet completely understood, it is clearly essential for the functioning of these bacteria at extremely high salt/pH conditions.

The high osmotic pressure is counterbalanced in the salt-loving alkaliphiles by the production of compatible solutes, ectoine (*Thioalkalimicrobium*) or glycine-betaine (*Thioalkalivibrio*).

The updated information on the alkaliphilic SOB from soda lakes is summarized in Table 3.

Table 3

### Summary of main properties of the two groups of alkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes.

The author's contribution to the knowledge of alkaliphilic SOB is marked with (\*)

Parameter or property	<i>Thioalkalimicrobium</i> sp.	<i>Thioalkalivibrio</i> sp.
Isolation*	Alkaline and low to moderate saline soda lakes	Alkaline and hypersaline soda lakes with high variations of [Na <sup>+</sup> ]
Genotypic and metabolic diversity*	Homogenous (3 species, 43 strains)	Heterogenous (7 species, 74 strains)
G+C mol% in DNA	47.3-51.2	61-66
Cell morphology*	Rods to spirilla with 1-3 polar flagella	Mostly vibrios or short spirilla with a single polar flagellum
pH limits (optimum)*	7.5-10.6 (10.0)	7.5-10.65 (10.10.2)
Upper temperature limit, °C	39	50
Salt tolerance*	0.2-1.5 M Na <sup>+</sup> (low salt tolerants)	0.6-4.3 M Na <sup>+</sup> (moderate and extremely salt tolerants)
Grow rate*	High	Low
Biomass yield*	Low	High
Thiosulfate and sulfide oxidation rates*	High	Moderate
Elemental sulfur oxidation rate*	Very low	Moderate
Sulfur intermediates*	Sulfite	Polysulfide, sulfur
Intracellular sulfur*	Not present	Present in some strains
Sulfur production (at O <sub>2</sub> excess)*	Zero to low	Low to moderate
Apparent affinity constant for substrate*	Micromolar concentration	Micromolar concentration
Viability and resistance to starvation*	Low (weeks-months)	High (months-years)
Survival strategy*	R-strategists	K-strategists
Dominant cytochromes	c	c and b
Cytochrome oxidases	cbb <sub>3</sub>	o, cbb <sub>3</sub> , aa <sub>3</sub>
Membrane lipids (Dominant fatty acids and apolar lipids)*	C16:1, C18:1, C16:0	Cyc-C19, C18:1, squalene
Compatible solutes*	Ectoine	Glycine betaine
Yellow pigments*	Not present	Present in some strains



**Acknowledgements.** The author is grateful to his colleagues at Delft University of Technology, The Netherlands, where most of the experimental facts mentioned in the present review was performed.

## REFERENCES

1. Banciu, H., Sorokin, D. Y., Kleerebezem, R., Muyzer, G., Galinski, E. A., Kuenen, J. G., *Growth kinetics of haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacterium Thioalkalivibrio versutus strain ALJ 15 in continuous culture*, "Extremophiles", **8**, 2004, 185-192.
2. Banciu, H., Sorokin, D. Y., Muyzer, G., Kleerebezem, R., Galinski, E. A., Kuenen, J. G., *Thioalkalivibrio halophilus sp. nov, a novel obligately chemolithoautotrophic facultatively alkaliphilic and extremely salt-tolerant sulfur-oxidizing bacterium from a hypersaline alkaline lake*, "Extremophiles", **8**, 2004, 325-334.
3. Banciu, H., Sorokin, D. Y., Rijpstra, W. I., Sinnighe Damste, J. S., Galinski, E. A., Takaichi, S., Muyzer, G., Kuenen, J. G., *Fatty acid, compatible solute and pigment composition of obligately chemolithoautotrophic alkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes*, "FEMS Microbiol. Lett.", **243**, 2005, 181-187.
4. Banciu, H., Tarba, C., *Adaptări biochimice la bacterii dublu extremofilă*, "Analele Soc. Nat. Biol. Cel.", **IX** (2), 2005, 325-332.
5. DasSarma, S., Arora, P., *Halophiles*, In: "Encyclopedia of Life Sciences", vol. **8**, pp 458-466, Nature Publishing Group, 2002.
6. Duckworth, A. W., Grant, W. D., Jones, B. E., van Steenberg, R., *Phylogenetic diversity of soda lakes alkaliphiles*, "FEMS Microbiol. Ecol.", **19**, 1996, 181-191.
7. Grant, W. D., Gemmell, R. T., McGinity, T. J., *Halophiles*, In: Horikoshi, K., Grant, W. D. (eds) "Extremophiles—Microbial Life in Extreme Environments", pp 93-132, Wiley & Sons Inc., New York, 1998.
8. Grant, W. D., Mutha, W. E., Jones, B. E., *Alkaliphiles: ecology, diversity and applications*, "FEMS Microbiol. Rev.", **75**, 1990, 255-270.
9. Grant, W. D., Tindall, B. J., *The alkaline saline environment*, In: Herbert, R. A., Codd, G. A. (eds) "Microbes in Extreme Environments", pp 25-54, Academic Press, London, 1986.
10. Hamamoto, T., Horikoshi, K., *Alkaliphiles*, In: Lederberg, J., (ed), "Encyclopedia of Microbiology", pp 81-87, Academic Press Inc., San Diego, 1992.
11. Hollibaugh, J. T., Wong, P. S., Bano, N., Pak, S. K., Prager, E. M., Orrego, C., *Stratification of microbial assemblages in Mono Lake, California, and response to a mixing event*, "Hydrobiologia", **466**, 2001, 45-60.
12. Imhoff, J. F., Sahl, H. G., Soliman, G. S. H., Trüper, H. G., *The Wadi Natrun: chemical composition and microbial mass developments in alkaline brines of eutrophic desert lakes*, "Geomicrobiol. J.", **1**, 1979, 219-234.
13. Imhoff, J. F., Sülting, J., *The phylogenetic relationship among Ectothiorhodospiraceae: a reevaluation of their taxonomy on the basis of 16S rDNA analyses*, "Arch. Microbiol.", **165**, 1996, 106-113.
14. Kempe, S., Degens, E. T., *An early soda ocean?*, "Chem. Geol.", **53**, 1985, 95-108.
15. Kempe, S., Kazmierczak, J., *A terrestrial model for an alkaline martian hydrosphere*, "Planet Space Sci.", **45**, 1997, 1493-1499.
16. Kuenen, J. G., Beudeker, R. F., *Microbiology of thiobacilli and other sulphur-oxidizing autotrophs, mixotrophs and heterotrophs*, "Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.", **298**, 1982, 473-497.

17. Kushner, D. J., *Halophilic bacteria: their life in and out of salt*, In: D a C o s t a, M. S., D u a r t e, J. C., W i l l i a m s, R. A. D., (eds) "Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology", pp280-288, 1989, Elsevier, London.
18. Lawson, P. A., Collins, M. D., Schumann, P., Tindall, B. J., Hirsch, P., Labrenz, M., *New ll-diaminopimelic acid-containing actinomycetes from hypersaline, heliothermal and meromictic antarctic Ekho Lake: Nocardioides aquaticus sp. nov. and Friedmanniella lacustris sp. nov.*, "Syst. Appl. Microbiol.", **23**, 2000, 219-229.
19. O r e n, A., *The ecology and taxonomy of anaerobic halophilic eubacteria*, "FEMS Microbiol. Rev." **39**, 1986, 23-29.
20. O r e n, A., *Halophilic microorganisms and their environments*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2002.
21. R e e d, R. H., *The alkaline saline environment*. In: H e r b e r t, R. A., C o d d, G. A. (eds) „Microbes in Extreme Environments“, pp 55-81, Academic Press, London, 1986.
22. S o r o k i n, D. Y., G o r l e n k o, V. M., T o u r o v a, T. P., T s a p i n, A. I., N e a l s o n, K. H., K u e n e n, G. J., *Thioalkalimicrobium cyclicum sp. nov. and Thioalkalivibrio jannaschii sp. nov., novel species of haloalkaliphilic, obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from hypersaline alkaline Mono Lake (California)*, "Int. J. Syst. Evol. Microbiol." **52**, 2002, 913-920.
23. S o r o k i n, D. Y., L y s e n k o, A. M., M i t y u s h i n a, L. L., *Isolation and characterization of alkaliphilic heterotrophic bacteria capable of oxidation of inorganic sulfur compounds to tetrathionate*, "Microbiology (Moscow)", 1996, **65**, 370-383.
24. S o r o k i n, D. Y., L y s e n k o, A. M., M i t y u s h i n a, L. L., T o u r o v a, T. P., J o n e s, B. E., R a i n e y, F. A., R o b e r t s o n, L. A., K u e n e n, J. G., *Thioalkalimicrobium aerophilum gen. nov., sp. nov. and Thioalkalimicrobium sibericum sp. nov., and Thioalkalivibrio versutus gen. nov., sp. nov., Thioalkalivibrio nitratis sp. nov., and Thioalkalivibrio denitrificans sp. nov., novel obligately alkaliphilic and obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes*, "Int. J. Syst. Evol. Microbiol.", 2001, **51**, 565-580.
25. S o r o k i n, D. Y., R o b e r t s o n, L. A., K u e n e n, J. G., *Isolation and characterization of alkaliphilic, chemolithoautotrophic, sulphur-oxidizing bacteria*, "Ant. van Leeuwenhoek", 2000, **77**, 251-262.
26. S o r o k i n, D. Y., T o u r o v a, T. P., K o l g a n o v a, T. V., S j o l l e m a, K. A., K u e n e n, J. G., *Thioalkalispira microaerophila gen. nov., sp. nov., a novel lithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from a soda lake*. "Int. J. Syst. Evol. Microbiol.", 2002 a, **52**, 2175-2182.
27. S o r o k i n, D. Y., T o u r o v a, T. P., L y s e n k o, A. M., M i t y u s h i n a, L. L., K u e n e n, J. G., *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans sp. nov. and Thioalkalivibrio paradoxus sp. nov., novel alkaliphilic, obligately autotrophic, sulfur-oxidizing bacteria capable of growth on thiocyanate, from soda lakes*, "Int. J. Syst. Evol. Microbiol.", 2002 b, **52**, 657-664.
28. S o r o k i n, D. Y., T o u r o v a, T. P., S j o l l e m a, K. A., K u e n e n, J. G., *Thialkalivibrio nitrareducens sp. nov., a nitrate-reducing member of an autotrophic denitrifying consortium from soda lake*, "Int. J. Syst. Evol. Microbiol.", 2003, **53**, 1779-1783.
29. T a k a i c h i, S., M a o k a, T., A k i m o t o, N., S o r o k i n, D. Y., B a n c i u, H., K u e n e n, J. G., *Two novel yellow pigments natronochrome and chloronatronochrome from the natrono(alkali)philic sulfur-oxidizing bacterium Thioalkalivibrio versutus ALJ 15*, „Tetrahedron Lett.", 2004, **45**, 8303-8305.
30. V e n t o s a, A., *Taxonomy of halophilic bacteria*. In: D a C o s t a, M. S., D u a r t e, J. C., W i l l i a m s, R. A. D. (eds) "Microbiology of Extreme Environments and Its Potential for Biotechnology", pp 262-279, Elsevier, London, 1989.
31. V e n t o s a, A., N i e t o, J. J., O r e n, A., *Biology of moderately halophilic aerobic bacteria*, "Microbiol. Mol. Biol. Rev.", 1998, **62**, 504-544.
32. Z a v a r z i n, G. A., Z h i l i n a, T. N., K e v b r i n, V. V., *The alkaliphilic microbial community and its functional diversity*, "Microbiology (Moscow)", 1999, **68**, 579-599.