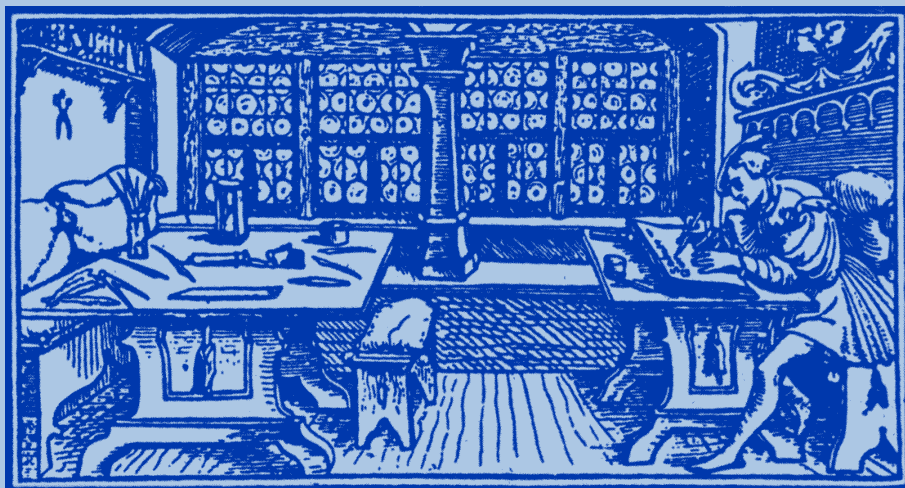


STUDIA

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

1

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

SUMAR - CONTENTS - SOMMAIRE - INHALT

P.-V. BELDEAN, Ecological Studies on the <i>Coreoidea</i> (<i>Heteroptera</i> , <i>Insecta</i>) in the Nature Reserve Cheile Turzii (Cluj County).....	3
V. DINCĂ, New Data Regarding Several <i>Lepidoptera Species</i> Little Known in Romania.....	11
L. FODORPATAKI, I.-Z. VASS, Changes in Chlorophyll Fluorescence during the Greening of Etiolated Leaves	17
V. BERCEA, E. MUNTEAN, A. NICOARĂ, N. DRAGOȘ, Evaluarea creșterii și caracterizarea aparatului fotosintetic la alga verde <i>Mougeotia sp. (Chlorophyta)</i> * Growth Assessment and Characterization of the Photosynthetic Apparatus of the Green Alga <i>Mougeotia sp. (Chlorophyta)</i>	25
V. BERCEA, A. NICOARĂ, N. DRAGOȘ, Sensibilitatea fotosistemului PS II la presiunea de excitare corelată cu disiparea neradiativă a energiei excitației la alga verde <i>Chlorella fusca</i> * PS II Photosystem Sensibility to Excitation Pressure, Correlated with Nonphotochemical Dissipation of Excitation Energy at the Green Alga <i>Chlorella fusca</i>	35
V. BERCEA, A. NICOARĂ, N. DRAGOȘ, Activitatea fotochimică a fotosistemului PS II în prezența luminii în exces și refacerea acesteia la întuneric, la alga verde <i>Chlorella fusca</i> * The PS II Photosystem's Photochemical Activity in the Presence of Exces Light and its Recovery in Dark at the Green Alga <i>Chlorella fusca</i>	47
L. GROZA, C. DOBROTĂ, Influența microelementelor cupru și zinc asupra dinamicii fosforului în frunzele de căpșun (<i>Fragaria ananassa D.</i>) * The Influence of Copper and Zinc on the Dynamic of Phosphorus in Strawberry (<i>Fragaria ananassa D.</i>) Leaves.....	59

M. STEJAR, C. TARBA, Comparison of the Effect of Succused and Unsuccused Dilutions of Some Stimulating Agents in the Release of Reactive Oxygen Species by the Human Polymorphonuclear Leukocytes.....	65
C. PAȘCA, D.-V. SANDU, M. GORDAN, Studiul histologic și electronomicroscopic al timusului șobolanilor tratați cu doze terapeutice de nurofen * Histological and Electronomicroscopical Studies of the Thymus of the Rats Treated with Therapeutical Doses of Nurofen.....	77
E. KIS, C. CRĂCIUN, Modificări ultrastructurale și biochimice induse de tratamentul cu dermovate la șobolani prepuberi * Ultrastructural and Biochemical Alterations Induced by Dermovate Treatment in Prepubertal Rats.....	89
H. BANCIU, Sulfur Cycle and Trophic Relationships among Haloalkaliphilic Sulfur Bacteria.....	99
M.-C. CURTICĂPEAN, M. DRĂGAN-BULARDA, Distribuția cantitativă a grupelor ecofiziologice de bacterii implicate în circuitul azotului în lacul de acumulare Gilău * The Quantitatively Distribution of the Bacteria Ecophysiological Groups from the Nitrogen Cycle in the Gilău Dam Reservoir	109
A.-D. SAMUEL, M. DRĂGAN-BULARDA, C. DOMUȚA, Enzymatic Activities in a Brown Luvic Soil	119

ECOLOGICAL STUDIES ON THE *COREOIDEA*
(*HETEROPTERA*, *INSECTA*) IN THE NATURE RESERVE
CHEILE TURZII (CLUJ COUNTY)

PAUL-VASILE BELDEAN*

SUMMARY. - *Ecological Studies on the Coreoidea (Heteroptera, Insecta) in the Nature Reserve Cheile Turzii (Cluj county).* The biological material was collected in the course of 2004. Monthly collections were made during the period May-September. 15 samples were collected from each researched station: oak grove, dry meadow, abrupt meadow, meadow with bushes, riverside coppice. 20 species of *Coreoidea* were identified, belonging to 12 genera and 4 families. The best represented is the *Rhopalidae* family, both from the point of view of number of species and from the point of view of number of individuals. The greatest number of species was collected from the meadow with bushes. A result of the calculation of the numerical and relative abundance, the best represented species are: *Stictopleurus crassicornis*, *S. abutilon*, *Coreus marginatus*, *Rhopalus parumpunctatus* and *R. subrufus*. Out of the 20 reported species, seven are eurybiontic, three are xerophilous, three are xero-thermophilous, two are thermophilous, two prefer sandy regions, one species is mesophilous, one is hygrophilous and one prefers forestry ecosystems. A rare species in the Romanian fauna was also reported (*Rhopalus distinctus*). The greatest diversity was noted in the meadow with bushes, and the equitability had the highest value in the oak grove. The maximum number of species was recorded in August and the minimum number in June. The majority of species (18) are polyphagous. Among the 20 species, 40% have a Palearctic spreading.

The Nature Reserve Cheile Turzii was founded in 1938 as a botanical and geological reserve. In 1950 it was declared Monument of Nature, at present having a surface of 104 ha [4].

The region Cheile Turzii (Gorges-of-Turda) is situated at the South-East extremity of Gilău Mountains, at about 7 km from Turda city. These gorges were formed by the gradual deepening of the Hășdate river, digging up to a depth of 250 m and a length of 1270 m. They were formed in Jurassic limestone, limited towards the East by porphyric tuff and towards West by marl schists, limestone marl and conglomerate grit stone. The rocks are covered by wood soils, weak podzol soils and rendzina. The flow direction of the Hășdate river is NW-SE, and this river is situated at an altitude of 445 m at the entrance and 420 m at the exit of Cheile Turzii. The climate is continental moderate, with average annual temperatures of about +8°C and annual rain average of about 600 mm [3].

The flora is very diverse, due both to the borderline position between plain and mountains, and to the various nature of the rocks, the microclimate and the anthropogenic influences. The flora of this region is made up of 982 species of plants, including relict (*Ephedra distachya*), rare and endemic plants (*Onosoma heterophylla*, *Centaurea reichenbachoides*, *Sorbus dacica*, *Allium obliquum*, *Ferula sadleriana*, *Dianthus kitaibelii* ssp. *spiculifolius* etc.) [4].

* *Universitatea „Babeș-Bolyai”, Catedra de Taxonomie și Ecologie, Cluj-Napoca, 400006, România. E-mail: beldeanp@yahoo.com*

In the fauna of Cheile Turzii, the rare species of gastropods (*Dauderbardia jeckelii*, *Cochlodina transsylvanica*), butterflies (*Dysauxes punctata*, *Heterogynnis pinnela*, *Eublemma suavis* etc.) and birds (*Aquila chrysaetos*, *Bubo bubo*, *Monticola saxatilis*, *Trichodroma muraria* etc.) stand out [4].

No other papers precede our research on the suprafamily *Coreoidea* of the Gorges-of-Turda. The only existing information comes from the book „Fauna României”, which only mentions 8 species residing in this area.

Material and methods. The biological material was collected in the course of 2004. Monthly sampling was carried out within the period May-September. 15 samples were taken (3 per month) from each sampling spot, by means of specific methods for each existent vegetation type: with the sweeping net made of herbaceous vegetation (50 mows/sample) and by shaking of the trees and bushes in the umbrella net. For each sample, the date and the sampling spot were recorded. The collected material was killed in alcohol 70% and kept in alcohol with the same concentration in plastic tubes.

In the area Cheile Turzii, samples were collected from the following ecosystems:

1. Oak grove (*Quercus petraea*) on the side with southern exposure from the left of the Hășdate river, between 440-500 m altitude. Together with the oak, the hornbeam (*Carpinus betulus*), the beech (*Fagus sylvatica*) and the common maple (*Acer campestre*) can also be found very often. The clearings are frequent and the grass layer is well developed.

2. Dry meadow on a slope with southern exposure, beginning from the half of the slope “Emil Pop” (550 m), up to the altitude of 580 m. The predominant herbaceous plants are xerophytic, specific to the steppe such as: *Festuca sulcata*, *F. valesiaca*, *Jurinea transilvanica*, *Carex humilis* etc [3].

3. Abrupt meadow situated on the left side, with southern exposure and the vegetation generally represented by *Sesleria rigida* and species of *Dianthus*, *Saxifraga*, *Viola*, *Centaurea*, *Carex* and *Festuca*.

4. Meadow with bushes situated on the plateau above the “Emil Pop” slope, in open space, at 740 m altitude. The meadow gathers species of herbaceous chalcophile plants: *Thymus comosus*, *Galium erectum*, *Centaurea atropurpurea* [3]. Sporadically, there are bushes of *Rosa canina*, *Crataegus monogyna*, *Prunus spinosa* etc.

5. Riverside coppice represented by small groups alongside the Hășdate river. Together with *Salix* species, one can also find here species of the genus *Populus*. The herbaceous layer is made up mostly of *Chaerophyllum aromaticum*, *Anthriscus silvestris*, *Rubus caesius* etc [3].

The identification was carried out in the laboratory, by means of the stereomicroscope and various bibliographical sources [1, 5, 6]. The biological material was classified in families, subfamilies and species, according to the present taxonomic system [1, 5]. The number of individuals, the numerical abundance and the relative abundance were indicated for each species. In order to establish the trophic and zoogeographic spectrum of each species, various bibliographical sources were consulted [1, 2, 5].

Results and discussions. Faunistic and ecological analysis. Prior to our researches, eight species of *Coreoidea* were recorded in the Gorges-of-Turda Nature Reserve [1]. Out of these, after the sampling, we rediscovered five species (*Gonocerus acuteangulatus*,

Bathysolen nubilus, *Ceraleptus gracilicornis*, *Rhopalus distinctus*, *Dicranocephalus agilis*), while there were three species formerly recorded that were no longer present (*Enoplops scapha*, *Dicranocephalus medius*, *Arenocoris falleni*).

From the Gorges-of-Turda Reserve we collected 314 individuals of *Coreoidea*, belonging to 20 species, 12 genera and four families. The 20 species represent 36.37% of the total number of species (55) recorded in the Romanian fauna. The presence of the 20 species on such a restricted area related to the Romania's surface, makes us to consider that the Gorges-of-Turda Reserve have a very rich fauna of *Coreoidea*.

Out of the 314 individuals collected from *Coreoidea*, 226 belong to the *Rhopalidae* family and 80 to the *Coreidae* family. The *Alydidae* family is represented by six individuals and the *Stenocephalidae* family is represented by just two individuals. As far as the number of species is concerned, the best represented is still the *Rhopalidae* family with nine species, being followed by the *Coreidae* family with seven species and *Alydidae* and *Stenocephalidae* families, each represented by two species (Table 1).

In what the numerical and relative abundance is concerned, the best represented species in the studied area are: *Stictopleurus crassicornis* in the oak grove ($A=0.67$, $Ar=34.48$) and in the meadow with bushes ($A=1.93$, $Ar=29$), *Stictopleurus abutilon* in the abrupt meadow ($A=1.6$, $Ar=32$) and in the riverside coppice ($A=0.73$, $Ar=47.82$) and *Coreus marginatus* in the dry meadow ($A=1.73$, $Ar=29.87$). Besides these species, high values of the two indices were recorded by *Rhopalus parumpunctatus* in the meadow with bushes and *Rhopalus subrufus* in the dry meadow (Table 1).

The greatest number of species was collected from the meadow with bushes (14 species), followed by the dry meadow (13 species) and abrupt meadow (11 species). From the oak grove there were collected five species and from the riverside coppice six species (Fig. 1).

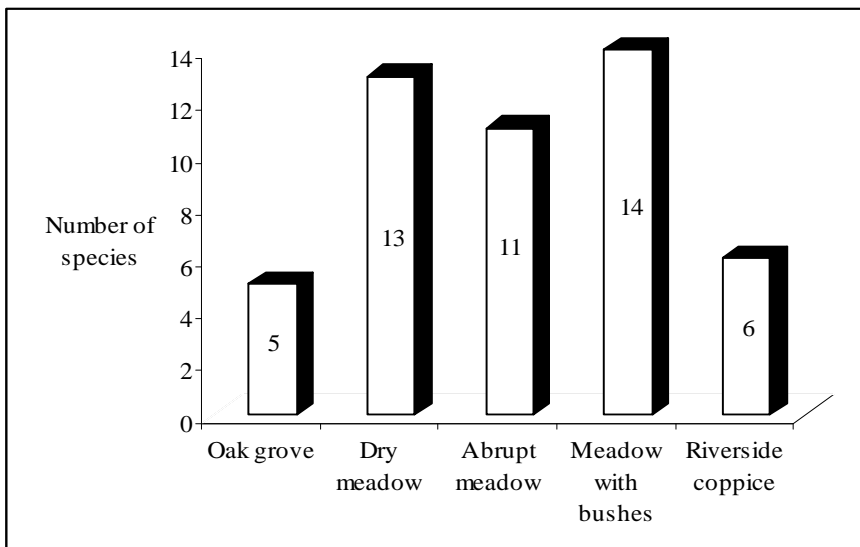


Fig. 1. The distribution of the *Coreoidea* species in the study area.

Table 1

The number of individuals, the numerical abundance and the relative abundance of *Coreoidea* species collected from the Gorges-of-Turda Nature Reserve.

Suprafamily, family, subfamily, species	Oak grove			Dry meadow			Abrupt meadow			Meadow with bushes			Riverside coppice			
	N	A	Ar%	N	A	Ar%	N	A	Ar%	N	A	Ar%	N	A	Ar%	
Suprafamily Coreoidea Reuter, 1910	314	29		87			75			100			23			
Family Coreidae Leach, 1815	80	8		33			19			19			1			
Subfamily Coreinae Stål, 1867	72	8		29			17			18						
<i>Gonocerus acuteangulatus</i> (Goeze, 1778)	2									2	0.13	2				
<i>Syromastes rhombeus</i> (Linné, 1767)	3			3	0.2	3.45										
<i>Coreus marginatus</i> (Linné, 1758)	67	8	0.53	27.59	26	1.73	29.87	17	1.13	22.67	16	1.06	16			
Subfamily Arenocorinae Bergroth, 1913	8			4			2			1			1			
<i>Bathysolen nubilus</i> (Fallen, 1807)	2			1	0.06	1.15				1	0.06	1				
<i>Ceraleptus lividus</i> Stein, 1858	2						2	0.13	2.67							
<i>Ceraleptus gracilicornis</i> (Herrich-Schäffer, 1835)	3			2	0.13	2.3							1	0.06	4.34	
<i>Coriomeris denticulatus</i> (Scopoli, 1763)	1			1	0.06	1.15										
Family Alydidae Stål, 1872	6			3			1			2						
<i>Alydus calcaratus</i> (Linné, 1758)	4			1	0.06	1.15	1	0.06	1.33	2	0.13	2				
<i>Camptopus lateralis</i> (Germar, 1817)	2			2	0.13	2.3										
Family Rhopalidae Amyot et Serville, 1843	226	21		51			55			77			22			
<i>Rhopalus parumpunctatus</i> Schilling, 1829	32	2	0.13	6.9	10	0.67	11.5	4	0.26	5.33	12	0.8	12	4	0.26	17.4
<i>Rhopalus distinctus</i> (Signoret, 1859)	1									1	0.06	1				
<i>Rhopalus conspersus</i> (Fieber, 1837)	11			3	0.2	3.45	1	0.06	1.33	7	0.46	7				
<i>Rhopalus subrufus</i> (Gmelin, 1790)	27	4	0.26	13.79	10	0.67	11.5	5	0.33	6.67	6	0.4	6	2	0.13	8.7
<i>Rhopalus maculatus</i> (Fieber, 1837)	10							3	0.2	4	7	0.46	7			
<i>Brachycarenum tigrinus</i> (Schilling, 1829)	2							2	0.13	2.67						
<i>Stictopleurus punctato- nervosus</i> (Goeze, 1778)	13			8	0.53	9.18	1	0.06	1.33	3	0.2	3	1	0.06	4.34	
<i>Stictopleurus crassicornis</i> (Linné, 1758)	68	10	0.67	34.48	10	0.67	11.5	15	1	20	29	1.93	29	4	0.26	17.4
<i>Stictopleurus abutilon</i> (Rossi, 1790)	62	5	0.33	17.24	10	0.67	11.5	24	1.6	32	12	0.8	12	11	0.73	47.82
Family Stenocephalidae Dallas, 1852	2									2						
<i>Dicranocephalus agilis</i> (Scopoli, 1763)	1									1	0.06	1				
<i>Dicranocephalus albipes</i> (Fabricius, 1781)	1									1	0.06	1				
Total number of species		5		13			11			14			6			

Abbreviations: A – Numerical abundance. Ar – Relative abundance. N – Number of individuals.

Out of the 20 recorded species, according to the specialist literature [1, 2, 5], seven species do not show significant ecological preference and can be considered eurybiontic (*Coreus marginatus*, *Alydus calcaratus*, *Rhopalus subrufus*, *R. parumpunctatus*, *Stictopleurus crassicornis*, *Dicranocephalus agilis*, *D. albipes*). Out of the 13 stenobiont species, three of them are xerophilous (*Syromastes rhombeus*, *Bathysolen nubilis*, *Ceraleptus lividus*), three are xero-thermophilous (*Ceraleptus gracilicornis*, *Camptopus lateralis*, *Stictopleurus abutilon*), two are thermophilous (*Rhopalus distinctus*, *Stictopleurus punctatonevrosus*), two prefer sandy regions (*Rhopalus conspersus*, *Brachycarenum tigrinus*), one species is mesophilous (*Coriomeris denticulatus*), one is hygrophilous (*Rhopalus maculatus*) and one prefers forestry ecosystems (*Gonocerus acuteangulatus*). The presence of the hygrophilous species is very interesting, especially because it was recorded in the “abrupt meadow” and the “meadow with bushes” ecosystems, these having a xero-mesophyll aspect. After the analysis of the ecological nature of the species, the preference for open and sunny ecosystems of the majority of the species is noticeable. Out of the 13 stenobiont species only *Gonocerus acuteangulatus* prefers forestry ecosystems.

In accordance with the ecological preferences of the species, only four of the 20 species were recorded in all the five studied ecosystems, and two of them were recorded in four of the studied ecosystems. Two species were present in three of the ecosystems, three species were collected from two of the ecosystems and nine species were collected from only one of the ecosystems.

Rhopalus distinctus (Signoret, 1859) is a thermophilous species, usually found on sandy biotope, on *Trifolium*, *Calluna* etc. It is spread in the South-Paleartic area and it is thought to be rare in the Romanian fauna [1].

Diversity and equitability. The highest diversity was recorded in the meadow with bushes, followed by the dry meadow and the abrupt meadow. The lowest value of the diversity was recorded in the oak grove and in the riverside coppice. The values of the Shanon-Wiener diversity index shows once again the fact that the *Coreoidea* species prefer herbaceous and open ecosystems (Table 2).

As for the equitability, the highest value was recorded in the oak grove. Here, the difference between the numbers of individuals of each reported species is relatively reduced. The lowest equitability was recorded in the abrupt meadow, where the majority of the species are present in reduced number of individuals, but three species (*Coreus marginatus*, *Stictopleurus crassicornis*, *S. abutilon*) are present in a larger number of individuals.

Table 2

The diversity and the equitability of the studied ecosystems according to the *Coreoidea* populations.

	Oak grove	Dry meadow	Abrupt meadow	Meadow with bushes	Riverside coppice
H'	0,644	0,921	0,805	0,933	0,628
E	0,921	0,826	0,773	0,814	0,807

Abbreviations: E = Equitability index. H' = Shanon-Wiener diversity index.

The dynamics of the populations. In order to perform the studies of dynamics on *Coreoidea* populations in the Gorges-of-Turda Nature Reserve, monthly sampling was carried out in the period May-September (Table 3). Both the number of adult individuals and the number of species vary throughout the year (Fig. 2). All of the *Coreoidea* species recorded by us in the Gorges-of-Turda spend the winter in adult stage. Therefore, in May, when the populations come out of diapause and are in the pairing period, a large number of species and individuals are registered. In June, when the majority of the species are in the stage of the egg or larva, the number of individuals and species is reduced. In the herbaceous ecosystems researched, in July, when the individuals from the new generation of some species reach the maturity, the number of individuals and species begin to increase. Both the maximum number of individuals and the maximum number of species was recorded in August, when the adult individuals from the new generation appear at the majority of the species.

In September, the number of individuals and species from the herbaceous ecosystems reduces because of the migration of some species from these open ecosystems to the forestry ecosystems, where wintering takes place. This also explains the maximum number recorded in September in the studied forest.

Table 3

The dynamics of the *Coreoidea* populations in the studied ecosystems in the Gorges-of-Turda Nature Reserve.

The collecting period	Oak grove		Dry meadow		Abrupt meadow		Meadow with bushes		Riverside coppice		Total	
	nr. ind.	nr. sp.	nr. ind.	nr. sp.	nr. ind.	nr. sp.	nr. ind.	nr. sp.	nr. ind.	nr. sp.	nr. ind.	nr. sp.
May	5	3	29	5	11	5	14	6	4	4	63	12
June	4	2	14	7	13	4	13	4	7	2	51	7
July	6	4	16	7	16	5	22	7	4	2	64	11
August	6	4	21	9	20	7	35	10	5	4	87	14
September	8	4	7	5	15	4	16	6	3	2	49	8

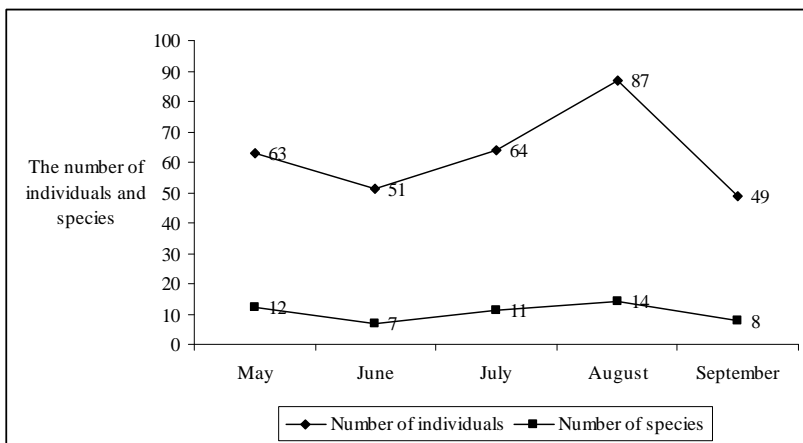


Fig. 2. The dynamics of the *Coreoidea* suprafamily in the Gorges-of-Turda Nature Reserve.

Trophic spectrum. The majority of the collected species are polyphagous. Only one species is monophagous (*Dicranocephalus albipes*, feeding on *Euphorbia*) and one species is oligophagous (*Ceraleptus gracilicornis*, feeding on the family *Fabaceae*) [1]. Some of the polyphagous species have preferences for certain genus or families of plants: *Coreus marginatus* prefer *Rumex* and *Polygonum* genus, *Dicranocephalus agilis* prefer *Euphorbia* genus, *Camptopus lateralis* prefer *Medicago* genus, *Rhopalus distinctus* prefer *Thymus* genus, *Ceraleptus lividus* and *Coriomeris denticulatus* prefers *Fabaceae* family [2, 5]. The adults of *Alydus calcaratus* are polyphagous and live on different herbaceous plants while the larvae are similar to the ants (*Formica rufa*, *Lasius niger*, *Myrmica rubra* etc) and live in their nests. The reason for this collaboration is not known yet but it is supposed that the *Alydus calcaratus* larvae feed with ants larvae [6].

Zoogeographic analysis. From the 20 collected species, eight have Palearctic spreading (*Syromastes rhombeus*, *Bathysolen nubilus*, *Rhopalus conspersus*, *Brachycarenum tigrinus*, *Stictopleurus punctatonervosus*, *S. crassicornis*, *S. abutilon*, *Dicranocephalus agilis*), three have South-Palearctic spreading, (*Ceraleptus gracilicornis*, *Camptopus lateralis*, *Rhopalus distinctus*), three have Holarctic spreading (*Coriomeris denticulatus*, *Alydus calcaratus*, *Rhopalus parumpunctatus*) and two have Eurosiberian spreading (*Coreus marginatus*, *Rhopalus maculatus*). Each of the other zoogeographic units present is represented by one species: *Gonocerus acuteangulatus* is spread in Europe, Minor Asia and Central Asia, *Ceraleptus lividus* in Central and South Europe, *Rhopalus subrufus* in Holarctic, Etiopian, Oriental and Neotropical regions and *Dicranocephalus agilis* in Central and Southern Europe and in the South-West of Asia [1, 2, 5, 6]

Conclusions. 1. In the Gorges-of-Turda Nature Reserve, 20 species of *Coreoidea* were recorded, belonging to 12 genera and four families. The 20 species represent 36.37% of the Romanian fauna of *Coreoidea*.

2. Both as number of species and as number of individuals, the best represented is *Rhopalidae* family, followed by *Coreidae* family and *Alydidae* and *Stenocephalidae* families.

3. The greatest number of species was collected from the meadow with bushes, followed by the dry meadow, the abrupt meadow, the oak grove and the riverside coppice.

4. The values of the numerical and relative abundance, point the fact that the best represented species are: *Stictopleurus crassicornis*, *S. abutilon*, *Coreus marginatus*, *Rhopalus parumpunctatus* and *R. subrufus*.

5. From the 20 recorded species, seven species are eurybiontic, three are xerophilous, three are xero-thermophilous, two are thermophilous, two prefer sandy regions, one species is mesophilous, one is hygrophilous and one prefers forestry ecosystems. The preference for open and sunny ecosystems is obvious for the majority of the species.

6. A rare species in the Romanian fauna was found (*Rhopalus distinctus*).

7. The highest diversity was recorded in the meadow with bushes, and the highest equitability was recorded in the oak grove.

8. The maximum number of species was recorded in August and the minimum number in June.

9. The majority of the collected species are polyphagous. A monophagous species (*Dicranocephalus albipes*) and an oligophagous species (*Ceraleptus gracilicornis*) was recorded.

10. From the 20 collected species, 40% have Palearctic spreading.

REFERENCES

1. K i s, B., Insecta, Heteroptera: *Suprafamiliiile Coreoidea și Pyrrhocorioidea*, Fauna României, **VIII**(9), București, 2001.
2. L e h r, P., A., *Keys to the insects of the Far East of the USSR*, English translation, U. S. Department of Agriculture, 2001.
3. P o p, I., *Caracterele generale ale florei și vegetației Cheii Turzii*, Buletin Științific, Inst. Ped. Baia-Mare, **1**(1), 1969, 43-51.
4. P o p, I., C r i s t e a, V., H o d i ș a n I., *Vegetația județului Cluj (Studiu fitocenologic, ecologic, bioeconomic și ecoprotectiv)*, Contribuții Botanice, **XXXV**(2), 2002, 5-254.
5. S c h u h, R. T., S l a t e r J. A., *True Bugs of the World (Hemiptera: Heteroptera). Classification and Natural History*, Cornell Univ. Press, New York, London, 1995.
6. S o u t h w o o d, T. R. E., L e s t o n, D., *Land and water bugs of the British Isles*, Frederick Warne, London, 1959.

NEW DATA REGARDING SEVERAL LEPIDOPTERA SPECIES LITTLE KNOWN IN ROMANIA

VLAD DINCĂ*

ABSTRACT. – During the last years (2003-2004) we collected a rich lepidopterological material from various regions of Romania. Our attention was driven by several rare species which are poorly known from our country, such as: *Kentrochrysalis elegans steffensi* Popescu-Gorj, 1971, *Kirinia roxelana* (Cramer, 1777), *Nychiodes waltheri* Wagner, 1919, *Scotopteryx ignorata* Huemer & Hausmann, 1998, *Cucullia fraterna*, Butler, 1878, *Pyrocleptria cora* (Eversmann, 1837), *Plusidia cheiranthi* (Tauscher, 1809), *Chrysodeixis chalcites* (Esper, 1789), *Euxoa hastifera pomazensis* Kovács, 1952, *Euxoa vitta* (Esper, 1789), *Grammia quenseli* (Paykull, 1793), etc.

Although certain regions of Romania are quite well studied from a lepidopterological point of view, there are still many large areas that have been poorly sampled (especially the southern regions Oltenia and Muntenia) [10]. This fact is reflected in the insufficient data concerning a considerable number of Lepidoptera species whose actual distribution in the country is more than unsatisfactorily known. This state of fact is also obvious in the Catalogue of the Romanian Lepidoptera published in 2003 [10]. Therefore, we hope that the data provided in this paper will aid to a better knowledge of the distribution of several rare Lepidoptera species in Romania.

Materials and methods. The lepidopterological material was collected using classical methods such as the insect net and the light trap; we used mercury vapor lamps of 160-250 W powered by a portable electricity generator. To precisely determine several specimens, we studied the morphology of the genital apparatus.

Results and discussions. Further on, we present the occurrence sites accompanied by comments upon the actual distribution for the species that we considered to be little known from Romania.

Pyralidae

Uresiphita gilvata (Fabricius, 1794) – 1 spec., Breaza (Istrița Hill, Buzău County), 13. VII. 2004.

This is a southern migrating species that occasionally reaches northern Europe (e.g. southern Great Britain, Denmark) [4]. In Romania, it hasn't been recorded during the last 25 years [10]. The present observation represents the first record of this species from Muntenia.

* *Gheorghe Doja street, no. 5, bl. 36 C2, ap. 44, Ploiești (Prahova) 100400, Romania.*
E-mail: sudistu@yahoo.com

Lasiocampidae

Malacosoma castrensis shardaghi Daniel, Forster & Osthelder, 1951– 20 ♂♂, 2 ♀♀, Esechioi Forest (south-western Dobrogea), 8-9. VI. 2001. Surprisingly, this taxon was extremely abundant, and we observed more than 300 specimens coming at our light traps!

The subspecies *shardaghi* is known in Romania only from Dobrogea [9, 10, 11].

Sphingidae

Kentrochrysalis elegans steffensi Popescu-Gorj, 1971 – 4 spec., 6 km West of Lunca (Olt County), 10-11. V. 2002.

K. elegans is distributed across SE Europe, Asia Minor, Syria and Iran. It is considered one of the rarest sphingid species in Romania, being poorly known only from the southern parts of Romania (plains of Oltenia and Muntenia), where the subspecies *K. e. steffensi* occur. Nevertheless, observations made during the last years, including the present data, suggest that *K. elegans* is not such a rare species in our country, but rather a very local one, occurring only in the southern plains of Romania [12, 13].

Nymphalidae

Kirinia roxelana (Cramer, 1777) – 2 ♂♂, 7 ♀♀: Esechioi Forest (south-western Dobrogea), 8-9. VI. 2001 (2 ♂♂ & 1 ♀); 30. VII.-1. VIII. 2001 (6 ♀♀).

During both collecting periods we noticed the presence of several other specimens flying inside the forest; the butterflies seemed to be particularly active in the afternoon, when we could see them on the tree (*Quercus*) branches and trunks.

According to the data present in literature, this is the first record of this species from southern Dobrogea. Outside Romania, *K. roxelana* is spread across South-Eastern Europe, Turkey, Cyprus, Israel, Lebanon, Syria, Northern Iraq and Western Iran [14].

Geometridae

Nychiodes waltheri Wagner, 1919 – 2 spec., Esechioi Forest (south-western Dobrogea), 30. VII.-1. VIII. 2001.

The species was quite recently recorded for the first time in Romania [8], being known only from southern Dobrogea [8, 9].

Scotopteryx ignorata Huemer & Hausmann, 1998 – 1 ♂, Istrița Hill (Buzău County), 27. V. 2000, genit. prep. no. 32/Dincă.

S. ignorata was recently described as a new species to science: the holotype was collected from Fischauerbge (Austria) [2]. The present data show that this species is distributed across eastern Austria, Slovenia, Romania, Bulgaria and northern Greece [2]. Some of the studied material included in the original description (paratypes) of the species originates from Romania, or more precisely from “Fânațele Clujului” (botanical reserve near Cluj-Napoca, Transylvania).

In Romania, *S. ignorata* was only recorded from three locations in Cluj County (Transylvania): “Fânațele Clujului”, Suatu [10] and Vișoara [3]. Recent data also certify the presence of the species in Cozia Mountains (Stânișoara Monastery) where 15 specimens have been identified [10].

The colour of the wings as well as their pattern present a certain degree of variability which may often cause confusion with similar species of the group such as *S. mucronata* and *S. luridata* unless the genitalia is examined. We studied the male genitalia (Fig. 1) of the collected specimen and compared it to that illustrated in the original description of the species [2].

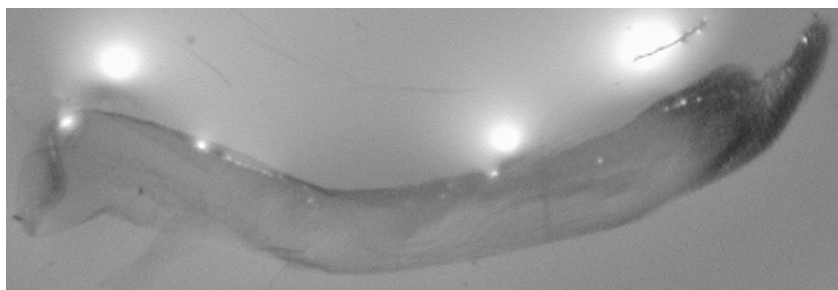


Fig. 1. Aedeagus of *Scotopteryx ignorata* (genit. prep. no. 32/Dincă)

The male specimen of *S. ignorata* collected from Istrița Hill represents the first record in Romania outside the Carpathian mountain chain. We believe that the species is more widely distributed in the country than it is known at the present moment and we consider that the lack of data is mainly due to the novelty of the species. In order to obtain more complete data about the real distribution of *S. ignorata* in Romania, a reexamination of all the specimens present in museum and private collections belonging to the *Scotopteryx mucronata-luridata* complex would be very interesting.

Noctuidae

Cucullia fraterna Butler, 1878 – 7 ♂♂: Breaza (Istrița Hill, Buzău County), 1-4. VII. 1998 (1♂); 12-16. VII. 1998 (3 ♂♂); 4-5. VI. 1999 (3 ♂♂); genit. prep. no. 8, 9, 10, 21, 75, 112/Dincă.

In Romania, the record of *C. fraterna* is based on a single male specimen collected from Popina Island (Razelm Lake, Tulcea County) on the 8-th of May 1992 [5]; the species has not been recorded again from Romania since then.

Many specimens of *C. fraterna* are quite similar to other species of the genus *Cucullia* (*C. lactucae* D. & S., *C. chamomillae* D. & S., *C. lucifuga* D. & S.). Therefore, we studied the male genitalia of six of the seven captured specimens (Fig. 2, 3) and compared them to the illustration from “Die Noctuiden Rumäniens” [5].

The seven male specimens identified by us from Breaza village (Istrița Hill, Buzău County), represent the second record of this species from Romania and therefore contribute to a better knowledge about the distribution of this rare species in our country. We believe that the presence of *C. fraterna* in Moldova (the region of Moldova that is presently within the territory of Romania) is very probable as this would fill a gap in the species’ distribution, linking the populations from Bulgaria to those from Ukraine and Finland [5].

Pyrocleptria cora (Eversmann, 1837) – 1 ♂, “Fănațele Clujului” (Cluj-Napoca), 28. V. 2004. Another specimen was observed during the same day.

The species is known in Europe only from Romania, Ukraine and Hungary, being extremely local and preferring steppe habitats.

In Romania, the species is known as very local from the steppe area “Valea lui David” (Iași County) as well as from Turda Gorges (Cluj County). In the collection of the Natural History Museum in Budapest there is a specimen labeled “Cluj, VI. 1941, coll.Bartha” [5]. The early stages haven’t been described yet.

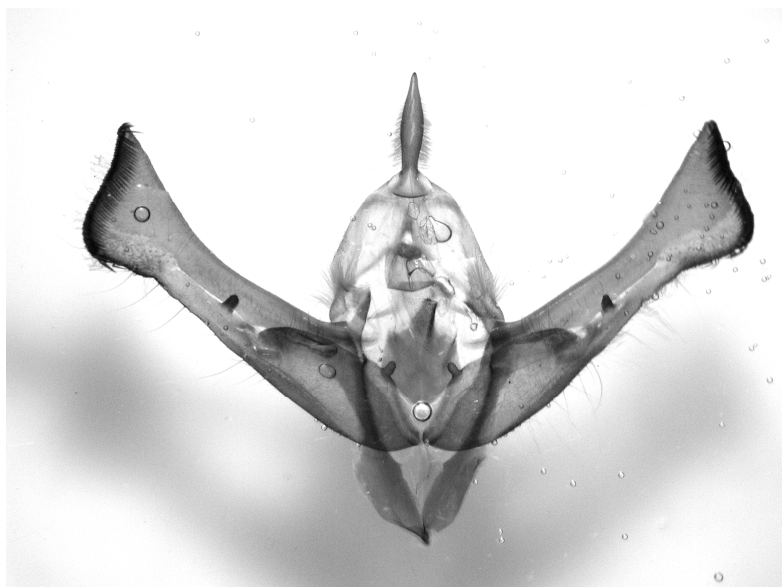


Fig. 2. Male genitalia of *Cucullia fraterna* (genit. prep. no. 112/Dincă)

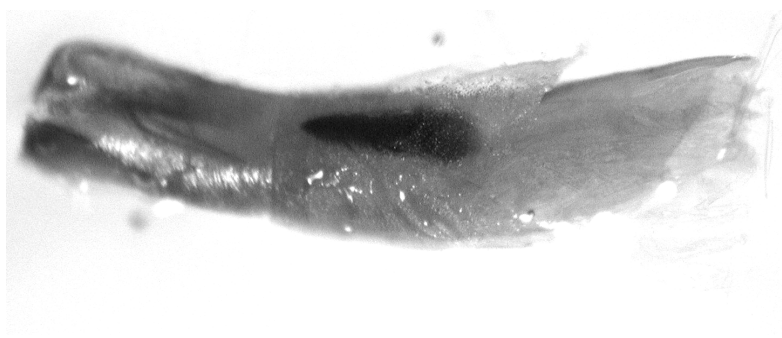


Fig. 3. Aedeagus of *Cucullia fraterna* (genit. prep. no. 75/Dincă)

Although the Lepidoptera fauna from “Fânațele Clujului” area was quite intensively studied for more than 80 years, this diurnal heliophilous species (which is easy to recognize in the field) had not been previously observed in the region.

The population discovered by us in the “Fânațele Clujului” perimeter bears, as well as the one in Turda Gorges, are of special biogeographical significance because they attest the presence in the plain of Transylvania of “islands” probably originating from the Pannonic steppe.

Plusidia cheiranthi (Tauscher, 1809) – 3 spec., Păstăraia Valley (Cluj County), 1-5. VII. 2002.

This is a very scarce species in Romania, only recorded from Bucharest, Timișoara (year 1910) [5] and Călimănești (jud. Vâlcea) [1] And, more recently (2002), collected from Buzău County (SZÉKELY pers. com.).

The present data represent the first record of the species from Transylvania, filling a gap in the species' distribution, which reaches Hungary, western Poland and the Baltic countries [5].

Chrysodeixis chalcites (Esper, 1789) – 4 spec.: Breaza (Istrița Hill, Buzău County), 22-23. VIII. 2001 (1 spec.); 20. IX. 2004 (1 spec.); Istrița Hill-740 m (Buzău County), 21. IX. 2004 (1 spec.). Another specimen was observed in Breaza village on 20. IX. 2004.

This is a migrating species recorded in Romania based on only three specimens collected from Hagieni, Vama Veche and the surroundings of Bucharest [7, 12].

The four specimens identified by us in the perimeter of Istrița Hill represent the northernmost distribution point in our country.

Euxoa cos (Hübner, 1824) – 5 spec.: Istrița Hill-740 m (Buzău County), 21. IX. 2003 (3 spec.); 21. IX. 2004 (2 spec.).

It is a rare xerothermophilous species, only found occasionally in southern Dobrogea (eg. Hagieni) [9].

The present data represent the first record of this species from Muntenia.

Euxoa hastifera pomazensis Kovács, 1952 – 6 spec.: Istrița Hill-740 m (Buzău County), 21. IX. 2003 (3 spec.); Istrița Hill-740 m (Buzău County), 21. IX. 2004 (3 spec.).

A very rare species, recorded occasionally from Moldova (Galați County) and Transylvania (Sălaj and Cluj Counties) [10]. Several specimens were captured in the surroundings of Cluj-Napoca using pheromone traps [6].

The present data represent the first record of this species from Muntenia.

Euxoa vitta (Esper, 1789) – 1 ♂, Istrița Hill-740 m (Buzău County), 21. IX. 2004.

E. vitta is one of the rarest noctuid species from Romania; it's more than 150 years since it has been recorded from Săcărâmb (Hunedoara County) and Crasna [6]. There is only one more recent record from Ocna Sibiului [5].

The present data represent the first record in Romania from outside the Carpathian chain. It is a xerothermophilous species, ranging from North-Eastern Spain across Central Europe reaching the Baltic Countries to the North and Bulgaria in South-Eastern Europe [5].

Arctiidae

Grammia quenseli (Paykull, 1793) – 1 ♀, Bucegi Mountains ("Cota 2000"), 10. VII. 2004.

A very scarce species, typical of alpine regions, known in Romania only from Bucegi Mountains, from where it hasn't been recorded for more than 25 years [10].

Conclusions. In the present paper we provided new data concerning 14 Lepidoptera species which are poorly known from Romania.

One species is recorded for the second time from Romania, and two species are recorded for the first time outside the Romanian Carpathian mountain chain. Six species are recorded for the first time from Muntenia (being also very rare and local anywhere else in Romania), while others haven't been recorded for at least 25 years from our country.

These new data fill some distributional gaps for most of the presented species, contributing to a better knowledge of their ranges and habitat preferences at Romanian and European level.

Acknowledgements. We thank Roger Vila PhD and László Rákósy PhD for comments on the manuscript and also Sergiu Mihuş PhD for his support in collecting a part of the material presented in this paper.

REFERENCES

1. Bobârnac, B., Matei, I., Costescu, C., Stănoiu, I., *Contribuții la studiul entomofaunei zonei subcarpatice a Olteniei*, „Stud. și Cerc.” Vâlcea, 1973, 211-217.
2. Huemer, P., Hausmann, A., *Scotopteryx ignorata sp. n., ein bisher übersehene europäische Art des Scotopteryx mucronata-luridata-Komplexes (Geometridae)*, “Nota lepid.”, **21** (4), 1998, 240-263.
3. Kovács, S., Rákósy, L., Kovács, Z., Cremene, C., Goia, M., *Lepidoptera (Fluturi)*. – In: Rákósy, L., Kovács, S. (ed.): *Rezervația Naturală „Dealul cu Fluturi” de la Vișoara*, Soc. lepid. rom., Cluj-Napoca, 2001, 81-113.
4. Palm, E., *Nordeuropas Pyralider*. – In: *Danmarks Dyreliv 3*, Fauna Bøger, Copenhagen, 1986, 224-225.
5. Rákósy, L., *Die Noctuiden Rumäniens*, Staphia, Linz, 1996.
6. Rákósy, L., Coroiu, I., *Euxoa hastifera Donzel and Euxoa vitta Esper, in the Romanian Fauna (Lepidoptera, Noctuidae). A critical analysis of diagnosis characters*, „Studia Univ. Babeş-Bolyai, Biol.”, **34** (2), 1989, 56-63.
7. Rákósy, L., Neuman, H., *Cosmia confinis (Herrich-Schäffer, 1849) și Chrysodeixis chalcites (Esper, 1789) în fauna României (Lepidoptera, Noctuidae)*, „Stud. cerc. biol. Biol. anim.”, **42** (2), 1990, 75-78.
8. Rákósy, L., Székely, L., *Nychiodes waltheri F. Wagner, 1909 (Lepidoptera, Geometridae) în fauna României*, „Bul. inf. Soc. lepid. rom.”, **4** (1), 1993, 13-16.
9. Rákósy, L., Székely, L., *Macrolepidopterele din sudul Dobrogei*, „Entomol. rom.”, **1**, 1996, 17-62.
10. Rákósy, L., Goia, M., Kovács, Z., *Catalogul Lepidopterelor României / Verzeichnis der Schmetterlinge Rumäniens*, Soc. lepid. rom., Cluj-Napoca, 2003.
11. Székely, L., *Des nouveautés concernant la faune de lépidoptères de sud-ouest de la Doubroudja*, “Sargetia, Series Sc. Nat. Deva”, **14**, 1994, 139-144.
12. Székely, L., Stanciu, S.-M., *Contribuții la studiul faunei de lepidoptere din Câmpia Munteniei II*, „Bul. inf. Soc. lepid. rom.”, **12** (1-4), 2002, 259-268.
13. Székely, L., Haneschläger, P., Görbe, R., *Contribuții la studiul faunei de lepidoptere din Câmpia Munteniei I*, „Bul. inf. Soc. lepid. rom.”, **9** (3-4), 1998, 177-186.
14. Tolman, T., Lewington, R., *Butterflies of Britain and Europe*, HarperCollins Publishers, London, 1997.

CHANGES IN CHLOROPHYLL FLUORESCENCE DURING THE GREENING OF ETIOLATED LEAVES

LASZLO FODORPATAKI* and ISTVAN-ZOLTAN VASS*

SUMMARY. – Etiolated leaves of barley and maize plantlets were exposed to two different photon flux densities (150 and 600 $\mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$) and the parameters of the induced chlorophyll fluorescence were registered every 24 hours during the greening of leaves. Variations in the ground fluorescence, the maximal fluorescence, the variable fluorescence, the variable/maximal fluorescence ratio, as well as in the time needed to reach the maximal fluorescence were determined in order to get a better insight in the processes related to the gradual transformation of etioplasts into functional chloroplasts during the greening of dark-grown leaves. Deductions were made regarding the development of the light-harvesting pigment-protein complexes and their capacity to absorb light. Variations of the potential quantum yield efficiency of photosystem II were monitored during the greening process, and the electron transport capacity of the acceptor side of PS II was evaluated on the base of the reduction state of the primary quinone acceptor pool of the thylakoid membranes developed in the young chloroplasts. The results demonstrate the usefulness of chlorophyll fluorescence parameters in getting new insights into the development of the primary photosynthetic processes during the greening of etiolated leaves. The significance of the results was evaluated with the one-way ANOVA and with the Tukey test. The first day of exposure to light (disregarding the photon flux density) is crucial in the onset of processes involved in the light reactions of photosynthesis and in the increment of the potential quantum yield efficiency of photosystem II.

When light shines on a plant, the energy content of the blue and red components of the light is absorbed by the chlorophyll molecules. This energy is then used in a variety of processes. Some is used to drive the chemical reactions of photosynthesis, while the remainder is lost in a number of ways including heat dissipation, radiationless de-excitation and re-emission as light known as fluorescence [2, 7, 20]. In other terms, photons absorbed by chlorophyll give rise to photochemical charge separation, dissipation of energy as heat and fluorescent emission. These three processes are competitive for the same incident light energy. In intact leaves the wavelength of maximum fluorescence is around 685 nm and is mainly contributed by the light-harvesting complexes of photosystem II (PS II).

The chlorophyll fluorescence measurement is both non-destructive and non-invasive and is therefore well suited to procedures requiring periodic repetitive sampling or screening. The measurement is also rapidly performed, being an ideal basis for gathering large quantities of data in field conditions [9, 11, 15, 21]. *In vivo* and *in situ* chlorophyll fluorescence measurements are appropriate for: a) evaluation of environmental factors influencing the efficiency of primary production of plants; b) screening of plants for tolerance to specific environmental conditions; c) monitoring the effects of stress conditions

* Babeș-Bolyai University, Department of Experimental Biology, 400084 Cluj-Napoca, Romania. E-mail: lfodorp@bioge.ubbcluj.ro

on the photochemical efficiency of plants; d) studying the ability of plants to react to new demands placed upon them; e) evaluating the adaptive processes that may lead to normalization and improved future resistance to new habitat conditions [3, 4, 6, 13, 17].

Chlorophyll fluorescence measurements have emerged during the last years as the most frequently used tool for assessment of photosynthetic performance and the general physiological state of plants [1, 8, 14, 16].

The process of greening in the presence of light is an important step in the development of leaves, on which the photosynthetic events rely. Undeveloped leaves grown in darkness possess non-photosynthetic etioplasts instead of chloroplasts, and are called etiolated leaves. Upon illumination, the etioplasts are gradually transformed into chloroplasts, while the internal thylakoidal system is formed and chlorophyll-protein complexes are synthesized. During the greening of etiolated leaves, the primary processes of photosynthesis appear gradually and start to function with different intensities. The photosynthetically active photon flux density influences the dynamics of chlorophyll synthesis and of the photochemical processes during the development of young leaves. This is the reason why the aim of this study is the investigation of characteristic changes in the main parameters of the induced chlorophyll fluorescence during the greening of etiolated leaves, in order to get a better insight into the intimate processes that interact during the establishment of a high photosynthetic efficiency [5, 18, 22].

Material and methods. Barley (*Hordeum vulgare* L.) and maize (*Zea mays* L.) seeds were germinated at room temperature, in darkness, using Linhard germination dishes covered with aluminium foil. The germination lasted for nine days, until the leaflets of young plants reached a minimal diameter of 4 millimeters, enough to apply the leafclips used for dark preadaptation and chlorophyll fluorescence measurements. After reaching the desired leaf diameter in darkness, the etiolated plants were exposed to a continuous light. There were two series of experiments, each lasting for four days: in the first series the light intensity was equal to $150 \mu\text{mole photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, while in the second one $600 \mu\text{mole photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ were applied. Fluorescence measurements were carried out every 24 hours after the onset of the illumination, using a Plant Efficiency Analyser (Hansatech Instruments Ltd., England). Each measurement was preceded by dark adaptation of the leaf disks for 30 minutes, and the parameters of the induced chlorophyll fluorescence were determined on 5 randomly chosen leaves belonging to 5 different plantlets.

If a leaf is kept in darkness for several minutes and then is brightly illuminated, chlorophyll fluorescence rapidly rises from an initial low level (the ground fluorescence, F_0) via an intermediate level (I) to a peak level (maximal fluorescence, F_m if light is saturating), and then gradually decays through several intermediate maxima to a level close to the original F_0 . The difference between F_m and F_0 is the variable fluorescence (F_v). The kinetics of this response are termed the Kautsky effect. The ratio F_v/F_m has been shown to be proportional to the quantum yield of photochemical reactions and shows a high degree of correlation with the potential light use efficiency of net photosynthesis of intact leaves. Fluorescence yield is minimal (F_0) when all reaction centres are in an active, "open" state. When the Q_A primary quinone acceptor pool of the illuminated thylakoid membranes is fully reduced, excitation of the P680 reaction centre cannot result in stable charge separation (the reaction centres are inactive, "closed") and maximum fluorescence yield (F_m) is obtained [10,12, 19, 22]. In conventional chlorophyll fluorimetry, fluorescence is excited by continuous light which is strongly absorbed

by chlorophyll and fluorescence emission is detected at wavelengths beyond 660 nm. The obtained information is derived primarily from dark-light induction curves (in dark-adapted plant samples). While the plant sample is in a dark-adapted state, the minimal and maximal fluorescence yields (F_0 and F_m) are determined by application of a saturating pulse of light. The ratio F_v/F_m is a measure of the potential maximal PS II quantum yield (Fig. 1).

The experimental data were evaluated statistically, using ANOVA ($P < 0.05$) and the Tukey test ($P < 0.05$) [23].

Results and discussion. During the greening of etiolated leaves specific processes occur, which have a crucial role in the development of the photosynthetic function. Such events are: the biosynthesis of chlorophyll molecules and the assamblage of light-harvesting pigment-protein complexes in the presence of light, the development of the thylakoid membrane system of the chloroplasts emerging from preexisting etioplasts, the conversion of an increasing percentage of the absorbed light energy into chemical energy, as well as the initiation and optimization of carbon assimilation in the autotrophic cells of the mesophyll. Chlorophyll fluorescence competes with the photochemical reactions for the same source of light energy.

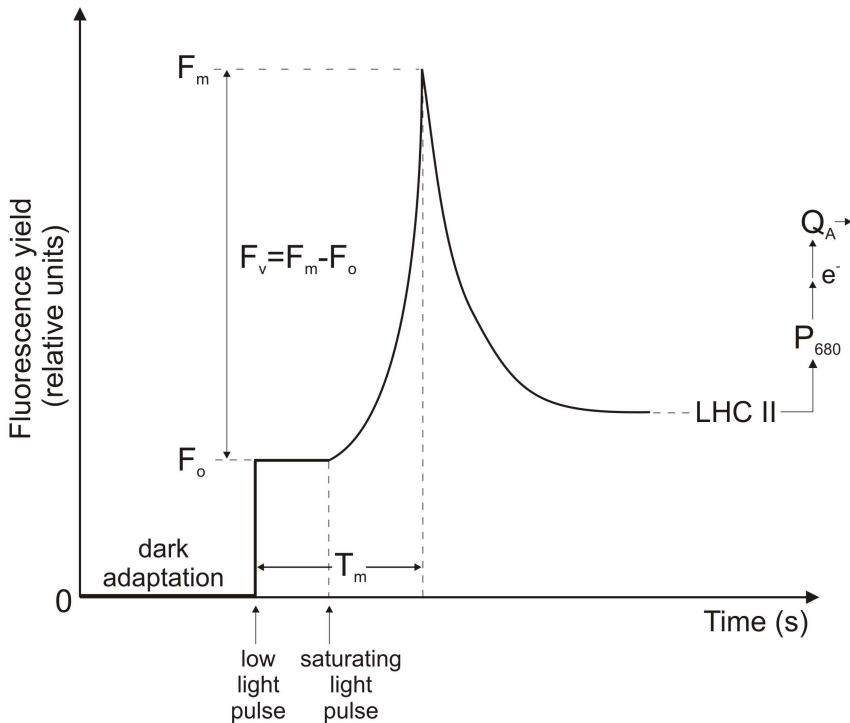


Fig. 1. Schematic representation of the kinetics of induced chlorophyll fluorescence in dark-adapted leaf samples, as well as of the main photosynthetic components strictly related to these parameters (original).

F_0 - ground fluorescence; F_m - maximal fluorescence; F_v - variable fluorescence; LHC II - light-harvesting complex of photosystem II; P_{680} - reaction centre of photosystem II; Q_A^- - primary quinone acceptor of photosystem II in the thylakoid membranes of chloroplasts.

The ground fluorescence (F_0), related to the level of organization of the light-harvesting pigment-protein complex associated to photosystem II, increases intensely during the first day of the greening process both in barley and in maize. In the presence of a lower photon flux density ($150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) this increment is more pronounced in the young leaves of barley than in maize, which develops a smaller antenna system. During the next few days the values of F_0 remain approximately constant in both species (Fig. 2). In the presence of a higher photon flux density ($600 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), F_0 drops in the second day to a value obviously below the one registered during the first day after the exposure of leaves to light, while during the third day it increases slowly. Fluctuations of F_0 are higher in both species under the conditions of a more intense illumination.

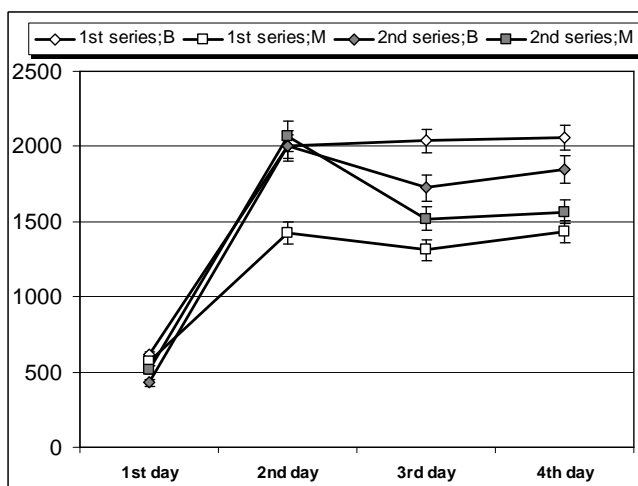


Fig. 2. Changes in the ground fluorescence (F_0 , expressed in relative units) during the greening of etiolated leaves of barley (B) and maize (M) in low light (1st series) and in high photon flux density (2nd series). The error bars indicate standard deviation ($n = 5$).

The transitory maximal fluorescence (F_m), which can be recorded when the dark-adapted leaves are exposed to a short pulse of saturating light, gives information about the ability of the PS II to perform light-driven electron transport through the quinone acceptors, as a result of the primary charge separation in the P_{680} reaction centre. F_m rises quickly during the first day of illumination and reaches a slightly higher value in the presence of a more intense illumination, in barley and maize as well. During the next two days it remains constant at $600 \mu\text{M photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and it continues to increase moderately at $150 \mu\text{M photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 3). The variable fluorescence (F_v), which represents the difference between the maximal and the ground fluorescence, reflects the combined modification in time of F_0 and F_m during de-etiolation. As it is expected from the previous data, it increases gradually over the days after exposure of leaves to light, and it has slightly elevated values in the leaves developing in higher light intensity, as compared to those grown in low photon flux densities (Fig. 4).

The time period needed to reach the maximal fluorescence (T_m), related to the intensity of photochemical processes on the acceptor side of photosystem II, decreases very obviously during the greening of etiolated leaves. This decrement is more continuous in the case of barley

CHANGES IN CHLOROPHYLL FLUORESCENCE DURING THE GREENING OF ETIOLATED LEAVES

leaves, especially if they are illuminated with low photon flux density. In leaves of maize T_m decreases more intensely during the first day, stays constant in the second day of illumination and continues to become slightly shorter during the next period. In both plant species T_m has lower values under high photon flux density than in the presence of low light (Fig. 5).

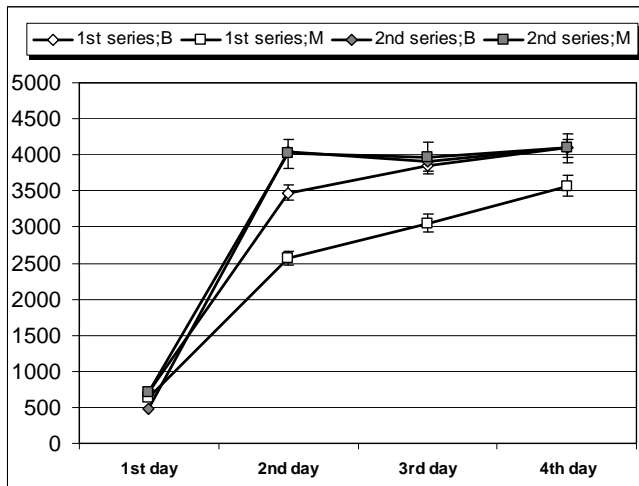


Fig. 3. Changes in the maximal fluorescence (F_m , expressed in relative units) during the greening of etiolated leaves of barley (B) and maize (M) in low light (1st series) and in high photon flux density (2nd series). The error bars indicate standard deviation (n = 5).

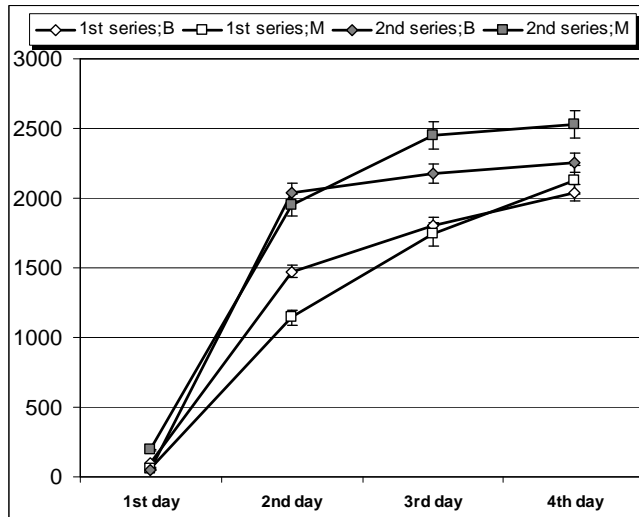


Fig. 4. Changes in the variable fluorescence (F_v , expressed in relative units) during the greening of etiolated leaves of barley (B) and maize (M) in low light (1st series) and in high photon flux density (2nd series). The error bars indicate standard deviation (n = 5).

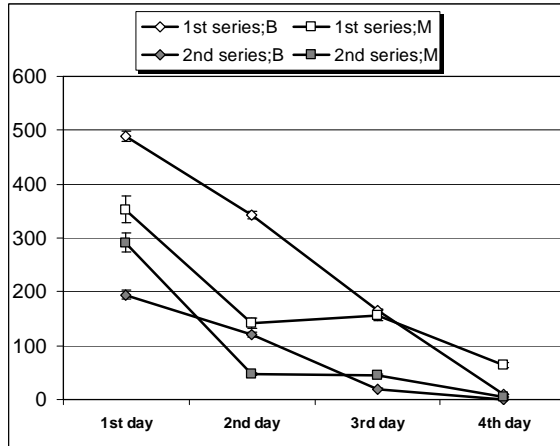


Fig. 5. Changes in the time period needed to reach the maximal fluorescence (T_m , expressed in ms) during the greening of etiolated leaves of barley (B) and maize (M) in low light (1st series) and in high photon flux density (2nd series). The error bars indicate standard deviation ($n = 5$). The mean values are significantly different according to the Tukey test ($P < 0.01$).

Considering the efficiency of photosynthetic light energy conversion, the most important parameter of the conventional chlorophyll fluorescence measurements in dark-preadapted plant materials is represented by the potential or maximal quantum yield efficiency, indicated by the value of the F_v/F_m ratio. During the greening of etiolated barley and maize leaves, this parameter increases in the first days of exposure to light from 0.1-0.25 to values around 0.5-0.7, reflecting that during the development of photosynthetic structures the efficiency of light reactions becomes progressively higher. The values also indicate that the regulation of the primary photosynthetic processes results in similar potential quantum yield efficiencies in the presence of different non-excessive photon flux densities (Fig. 6).

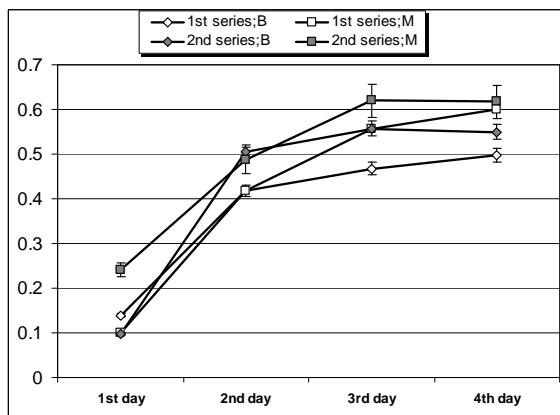


Fig. 6. Variations of the F_v/F_m ratio, reflecting the potential quantum yield efficiency of photosystem II, during the greening of etiolated leaves of barley (B) and maize (M) in low light (1st series) and in high photon flux density (2nd series). The error bars indicate standard deviation ($n = 5$).

Conclusions. 1. Parameters of the conventional chlorophyll fluorescence (F_0 , F_m , F_v , F_v/F_m , T_m), induced in dark-adapted leaf disks, represent a useful tool in characterizing the developmental stages of the photosynthetic structures and functions during the greening process of etiolated leaves of plantlets which result from the germination of seeds in the absence of light.

2. The absolute value of the incident photon flux density (if this is not extremely high) does not influence significantly the dynamics of the assemblage of light-harvesting pigment-protein complexes around the core complex of photosystem II, and it has no obvious impact on the increment of potential quantum yield efficiency of PS II during the first few days of greening of etiolated leaflets.

3. Variations in the different parameters of the induced chlorophyll fluorescence are very similar during the greening of young leaves of barley and maize grown under the same conditions.

4. The most drastical changes in the ground fluorescence (F_0) and in the temporary maximal fluorescence (F_m) occur between the first and the second day of exposure to light of the dark-grown leaves. During the next days of greening, the increment of these parameters is much more moderate, but obviously progressive until the fourth day of constant illumination.

5. The time needed to reach the F_m (T_m , expressed in milliseconds) after a short pulse of actinic excitation light applied on the dark-preadapted leaf disks, decreases much more abruptly in maize than in barley leaves during the first days of de-etiolation under moderate photon flux densities.

6. Under the conditions of a higher photon flux density, the potential photosynthetic quantum yield efficiency (indicated by the F_v/F_m ratio) is higher in the greening leaves of maize (a C_4 plant which needs high light to perform a very efficient photosynthetic biomass production) than in those of barley (a C_3 species which is less productive than maize but more tolerant to the conditions of lower photon flux densities).

REFERENCES

1. Caspi, V., Droppa, M., Horváth, G., Malkin, S., Marder, J., Raskin, V., *The effect of copper on chlorophyll organization during greening of barley leaves*, „Photosynth. Res.”, **62**, 1999, 165-174.
2. Demmig-Adams, B., Adams, W. W. III, *Harvesting sunlight safely*, „Nature”, **403**, 2000, 371-374.
3. Fitter, A.H., Hay, R.K.M., *Environmental physiology of plants*, Academic Press, London, 2002.
4. Fodorpataki, L., Papp, J, *Ecophysiological studies based on chlorophyll fluorescence in algal cell cultures*, „Contrib. Bot.”, **37**, 2002, 221-230.
5. Fodorpataki, L., Bartha, Cs., Demeter, Sz.J., Turóczy, Z., *Interactive effects of hypoxia, low light stress and different carbon sources on photosynthetic parameters of the green alga Scenedesmus intermedius Chod.*, „Contrib. Bot.”, **38**(1), 2003, 105-111.
6. Gemel, J., Waters-Earhart, B., Eilersieck, M.R., Asfaw, A., Krause, G.F., Puri, V., Lower, W.R., *Photosynthetic electron transport as a bioassay*, in Wang, W., Gorsuch, J.W., Hughes, J.S. (Eds.), *Plants for environmental studies*, CRC Press, New York, 1997, 209-224.
7. Genty, B., Briantais, J.-M., Baker, N.R., *The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence*, „Biochim. Biophys. Acta”, **990**, 1989, 87-92.
8. Guidi, L., Nali, C., Ciompi, S., Lorenzini, G., Soldatini, G.F., *The use of chlorophyll fluorescence and leaf gas exchange as methods for studying the different responses to ozone of two bean cultivars*, „J. Exp. Bot.”, **48**(306), 1997, 173-179.
9. Hall, D.O., Rao, K.K., *Photosynthesis*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2001, 174-178.

10. Heinze, I., Dau, H., Senger, H., *The relation between the photochemical yield and variable fluorescence of photosystem II in the green alga Scenedesmus obliquus*, "J. Photochem. Photobiol. B.", **32**, 1996, 89-95.
11. Koblížek, M., Kaftan, D., Nedbal, L., *On the relationship between the non-photochemical quenching of the chlorophyll fluorescence and the photosystem II light-harvesting efficiency: a repetitive flash fluorescence induction study*, "Photosynth. Res.", **68**, 2001, 141-152.
12. Krause, G.H., Weis, E., *Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics*, "Annu. Rev. Plant Physiol.", **42**, 1991, 313-349.
13. Lichtenthaler, H.K., *The Kautsky effect: 60 years of chlorophyll fluorescence induction kinetics*, "Photosynthetica", **27** (1-2), 1992, 45-55.
14. Papageorgiou, G.C., Govindjee, Govindgee, R., Mimuro, M., Stamatakis, K., Alygizaki Zorba, A., Marata, N., *Light-induced and osmotically induced changes in chlorophyll a fluorescence in two Synechocystis sp. PCC 6803 strains that differ in membrane lipid unsaturation*, "Photosynth. Res.", **59**, 1999, 125-136.
15. Schreiber, U., Bilger, W., *Progress in chlorophyll fluorescence: major developments during the last years in retrospect*, "Prog. Bot.", **54**, 1992, 151-173.
16. Schreiber, U., Bilger, W., Hormann, H., Neubauer, C., *Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance*, in: Raghavendra, A.S. (Ed.), *Photosynthesis: a comprehensive treatise*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2000, 320-338.
17. Schulze, E.-D., Caldwell, M.M., *Ecophysiology of photosynthesis*, Springer, Berlin, 1995, 49-70.
18. Strasser, B.J., Dau, H., Heinze, I., Senger, H., *Comparison of light-induced and cell cycle dependent changes in the photosynthetic apparatus: a fluorescence induction study on the green alga Scenedesmus obliquus*, "Photosynth. Res.", **60**, 1999, 217-227.
19. Strasser, R.J., Srivastava, A., Govindjee: *Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria*, "Photochem. Photobiol.", **61**(1), 1995, 32-42.
20. Thiele, A., Krause, G.H., *Xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in photosystem II: relationship between zeaxanthin formation, energy-dependent fluorescence quenching and photoinhibition*, "J. Plant Physiol.", **144**, 1994, 324-332.
21. van Kooten, O., Snel, J., *The use of fluorescence nomenclature in plant stress physiology*, "Photosynth. Res.", **25**, 1990, 147-150.
22. Yamane, Y., Shikanai, T., Kashino, Y., Koike, H., Satoh, K., *Reduction of Q_A in the dark: another cause of fluorescence F_0 increases by high temperatures in higher plants*, "Photosynth. Res.", **63**, 2000, 23-34.
23. Zar, J.H., *Biostatistical analysis*, Prentice-Hall, New Jersey, 2000, 178-214.

EVALUAREA CREȘTERII ȘI CARACTERIZAREA APARATULUI FOTOSINTETIC LA ALGA VERDE *MOUGEOTIA SP.* (CHLOROPHYTA).

VICTOR BERCEA*, EDWARD MUNTEAN**, ANA NICOARĂ*
NICOLAE DRAGOȘ***

SUMMARY. Growth Assessment and Characterization of the Photosynthetic Apparatus of the Green Alga *Mougeotia sp.* (Chlorophyta). Growth assessment of the green alga *Mougeotia sp.* by means of the $\Delta \log_2$ O.D., during 15 days, under lighting of $300 \text{ Mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, generated a growth curve with exponential growth rate $R = 0.309$, a mean growth rate $R_m = 0.193$ and a generation time $g = 3.24$. A dry weight of 114.66 mg.l^{-1} with a high protein content was obtained. Pigment analysis showed a normal content of *a* and *b* chlorophyll and of carotenoids. HPLC analysis revealed the presence of the following major carotenoids: β -carotene, α -cryptoxanthin, lutein, anteraxanthin, violaxanthin and neoxanthin.

În celulele fotosintetice, principalele procese bioenergetice: fotosinteza și respirația - implică reacții transportoare de electroni însoțite de sinteza de ATP. În timp ce fotosinteza convertește energia luminii (fotoni) în energie chimică (NADPH și ATP) permițând asimilarea carbonului (CO_2), procesul de respirație convertește puterea reducătoare deținută de hidrații de carbon într-o putere de fosforilare. La celulele de eucariote cele două procese se desfășoară în organele separate, independente: fotosinteza se produce în cloroplaste iar procesul de respirație are loc în mitocondrii. Cercetările efectuate cu algele verzi unicelulare au evidențiat existența în membranele tilacoidale a conexiunii dintre lanțul respirator și lanțul transportorilor de electroni fotosintetici [4, 9]. Plantele trebuie să mențină un echilibru între energia derivată din reacțiile la lumină în cloroplast și cantitatea de energie utilizată la fixarea carbonului și în alte procese metabolice.

Organismele percep și procesează informația venită atât de la mediul biotic cât și de la cel abiotic în scopul creșterii și dezvoltării optime, respectiv, pentru adaptarea la mediu [20]. Dintre factorii de mediu, lumina și stimulii mecanici sunt cei mai semnificativi pentru plante. Se cunoaște mișcarea de fotorealocare la plante prin care cloroplastele își modifică poziția în așa fel încât să poată absorbi efectiv lumina pentru eficientizarea fotosintezei [21]. Lungimea de undă mai efectivă este cea din regiunea albastră unde fitocromul este receptorul care mediază motilitatea cloroplastelor [12, 16].

Lucrarea prezintă se referă la analiza creșterii și caracterizarea aparatului fotosintetic la alga verde *Mougeotia* în scopul efectuării de experimentări viitoare privind manifestarea și implicarea celulară a cloro-respirației.

* Institutul de Cercetări Biologice 400015/Cluj-Napoca. E-mail: icb@mail.dntcj.ro

** Univ. Științe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj-Napoca. E-mail: edimuntean@yahoo.com

*** Univ. „Babeș-Bolyai”, Fac. de Biologie și Geologie, Cluj-Napoca. E-mail: ndragos@biolog.ubbcluj.ro
Cercetare finanțată în Programul Național CERES nr. 4-10/2004

Material și metode. Alga verde *Mougeotia sp.* Agardh (AICB 560), (Fig. 1) provine din Colecția de culturi de alge a I.C.B. Cluj-Napoca (AICB) [8]. Tulpina AICB 560 a fost crescută în soluția nutritivă Bold (BBM), în condiții de agitare continuă cu aer, iluminare continuă ($300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) și la temperatura de $19\text{-}20^{\circ}\text{C}$. Durata de cultivare a fost de 15 zile. Creșterea suspensiei algale s-a estimat prin trasarea curbei de creștere pe baza **Alog₂** a densității optice [24]. La finele perioadei de creștere s-a determinat acumularea de biomasă precum și conținutul acesteia în pigmenți asimilatori și în proteine celulare.

Pentru analiza componentelor pigmentari, suspensia de algă s-a mojarat și extras cu acetona în prezență de CaCO_3 . Conținutul în clorofile (clorofila **a** și **b**) și carotenoide s-a estimat spectrofotometric pe baza coeficienților specifici de absorbție [1, 17]. Pentru evidențierea formelor de clorofilă **a** dominante s-au trasat spectrele de absorbție *in vivo* la spectrofotometrul Unicam SP 1800 aplicându-se principiul transmisiei prin sticla opacă [23]. Rezultatele sunt exprimate în $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ substanță uscată sau în mmol / mol clorofila **a**.

Proteinele s-au determinat după metoda Lowry și colab.[19].

Pentru analiza carotenoidelor majore s-a recurs la cromatografia în strat subțire și la cromatografia de lichide de înaltă performanță. În vederea separării și identificării prin cromatografie în strat subțire, extractul de pigmenți s-a saponificat în soluție etanolică de 1, 7% KOH [10].

Pentru analiza carotenoidelor prin HPLC, suspensia de algă s-a centrifugat la 10.000g, iar sedimentul a fost saponificat cu o soluție de 30% KOH în etanol în raport volumetric de 1:1 cu suspensia algală, la temperatura camerei, timp de 10 ore. Carotenoidele au fost extrase din masa de reacție cu dietileter, urmând spălări repetate cu apă distilată până la atingerea unui pH neutru; carotenoidele din apele de spălare au fost recuperate utilizând volume mici de dietileter. Epifazele eterice au fost combinate, spălate cu apă distilată și evaporate la sec sub vid; reziduu obținut a fost redizolvat în 5 ml acetat de etil, fiind apoi injectat în sistemul HPLC. Sistemul HPLC este constituit dintr-un sistem de pompe Kontron Instruments 322, un injector Rheodyne echipat cu buclă de 20 μl , o coloană Nucleosil 120-5 C18 (250 mm x 4.6 mm), un detector de matrice de fotodiode Waters 990 și un calculator pe care rulează software-ul Waters 990 pentru prelucrarea datelor. Gradientul utilizat: 0 min: 10% B / 90% A; 20 min: 70% B / 30% A (A fiind amestecul acetonitril:apă = 9:1; B fiind acetat de etil) [18]. Identificarea compușilor izolați a fost realizată pe baza spectrelor de absorbție și prin cromatografie HPLC cu standardele disponibile [5].

Rezultate și discuții. Speciile de *Mougeotia* sunt alge verzi filamentoase neramificate. Marginile drepte și paralele ale peretelui celular sunt caracteristice acestei specii. Celulele au un singur cloroplast sub forma unei plăci axiale sau panglică care, de regulă, se întinde pe întreaga lungime a celulei, înconjurat de un strat subțire de citoplasmă (Fig. 1).

Cloroplastul poate fi văzut turtit, întins orizontal, ori el poate fi răsucit, strâmt și jupuit la mijlocul celulei. Cloroplastul conține numeroși pirenoidi și granule de amidon (Fig. 1, P).

În condiții de lumină redusă, cloroplastul își schimbă orientarea de la poziția marginală la poziția plană. În lumină puternică cloroplastul își schimbă orientarea de la poziția plană axială la poziția marginală îngustă. Mișcarea cloroplastului ca răspuns la lumină este rezultatul gradientului formelor active de fitocrom care formează un sistem de pigment alternativ în jurul periferiei cilindrului celular. Gradienții de fitocrom sunt rapid transformați în gradienți ai interacțiunilor microfilamentelor de actină-miozină care generează forțele motrice de rotație a cloroplastului [11, 25].

CREȘTEREA ȘI PIGMENȚII ASIMILATORI LA MOUGEOTIA SP.

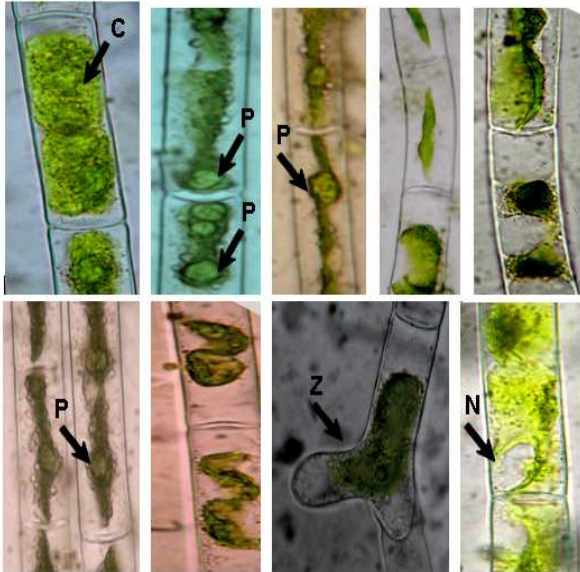


Fig. 1. Aspectul morfologic al filamentului și cloroplastului de *Mougeotia* sp. : C = cloroplast; N= nucleu; P= pirenoid; Z =formarea unui zigospore

Procesul de creștere. Curba de creștere la alga *Mougeotia* la lumina moderată de $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, este redată în Fig. 2. Culturile au prezentat în prima zi o fază latentă, apoi au intrat în faza exponențială de creștere. Parametrii de creștere exprimați prin rata de creștere exponențială $R=0,309$; rata medie de creștere $R_m=0,193$ și printr-un timp de generație $g = 3,24$, atestă o creștere relativ rapidă în primele 4 zile de creștere. Începând cu ziua 8, diferențele de creștere a tulpinilor determină mărirea abaterii de la medie a parametrilor de creștere.

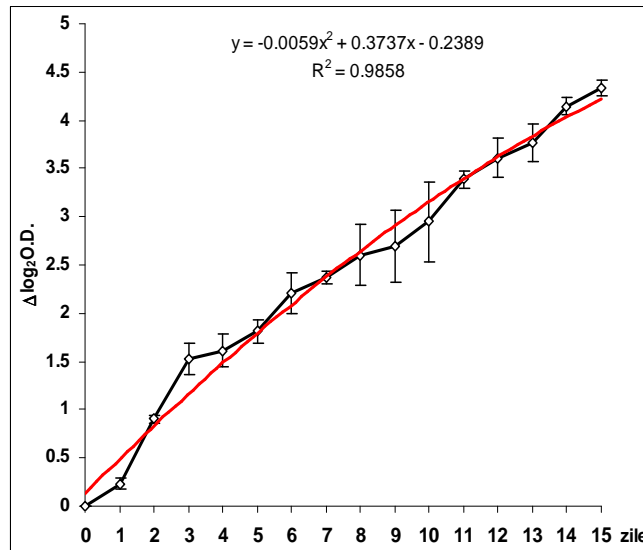


Fig. 2. Curba de creștere la alga *Mougeotia* sp. în condițiile luminii moderate de $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

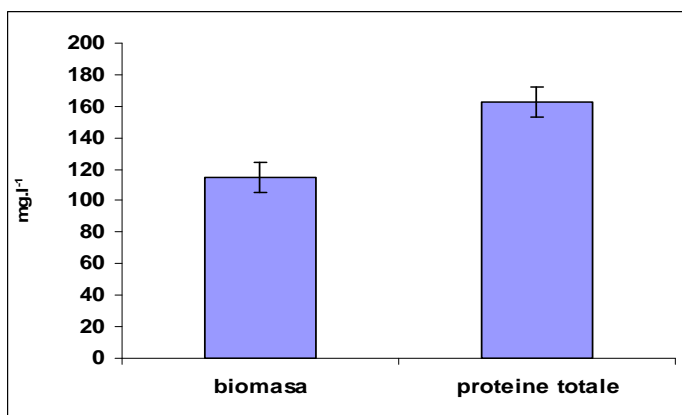


Fig. 3. Conținutul în substanță uscată și proteine totale la suspensiile de *Mougeotia*

Analiza pigmentilor asimilatori. Compoziția în pigmenti asimilatori a suspensiei algale de *Mougeotia* este sumarizată în tabelul 1. Lumina moderată de creștere a determinat acumularea unei cantități normale de clorofilă și carotenoide. Aceste cantități s-au menținut într-o proporție normală și constantă pe durata creșterii celulare așa cum reiese din valorile raportului dintre componenții pigmentari și valoarea abaterii standard (Fig. 4). Aparatul fotosintetic reacționează la intensitățile și calitatea luminii în scopul optimizării eficienței fotosintetice. La lumina moderată, capacitatea fotosintetică a celulelor este diminuată cu toate că concentrația clorofilei este mărită [22]. Dintre xantofilele ciclului xantofilic implicate în fotoprotecție, s-a remarcat prezența violaxantinei și a anteraxantinei în cantități apreciable. Lipsește zeaxantina, alt component al ciclului xantofilic, tocmai din cauza luminii moderate de creștere care nu a stresat fotosinteza, deci nu a determinat interconvertibilitatea dintre violaxantină și zeaxantină prin intermediul anteraxantinei.

Tabel 1

Conținutul în componenți asimilatori ai suspensiei de *Mougeotia*

Componenți	Valori cantitative
clorofila <i>a</i> (mol)	$4,527 \times 10^{-5}$
clorofila <i>b</i> (mol)	$1,53 \times 10^{-5}$
caroteni (mmol/mol cl. a)	213, 64
luteina (mmol/mol cl.a)	340, 30
neoxantina (mmol/mol cl.a)	157, 33
violaxantina (mmol/mol cl.a)	193, 35
anteraxantina (mmol/mol cl.a)	157, 33
Total carotenoide (mmol/mol cl. a)	1061, 95
Total pigmenti (mol)	7, 119
a/b	2, 96
a+b/carotenoide	5, 70
substanța uscată (mg.l ⁻¹)	115
proteine totale (mg.l ⁻¹)	162, 71

Conținutul ridicat în pigmenți fotosintetici în raport cu substanța uscată, în special în clorofile, cu raporturi normale între componente, confirmă că lumina de creștere a fost saturabilă fotosintetic (Fig. 4). Reglarea dezvoltării organismului fotoautotrof este facilitată datorită prezenței pigmenților asimilatori care îndeplinesc recepția specifică și traducerea corectă a fotosemnalului, [7].

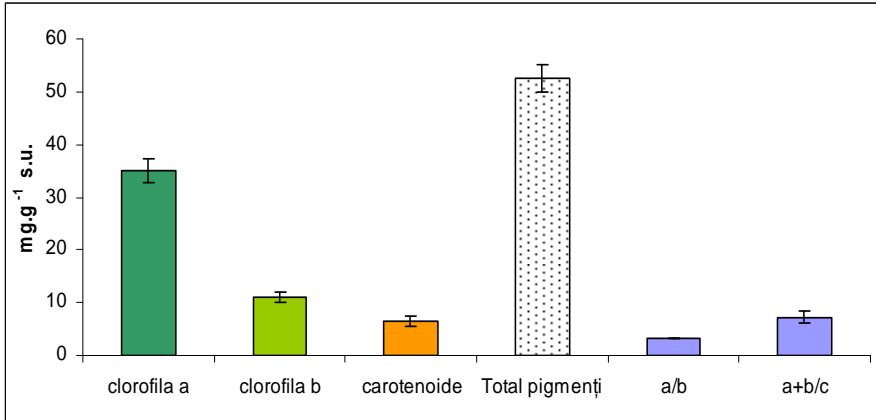


Fig. 4. Conținutul în pigmenți asimilatori raportat la substanța uscată.
a/b = raportul dintre clorofile; a+b/c = raportul dintre clorofile și carotenoide

Fără îndoială, spectrul de absorbție contribuie în mare parte la deducerea stării în care se află pigmentul asimilator în organismul viu. Pentru determinarea spectrului de absorbție a componentelor pigmentari *in vivo*, în general, se preferă a se reprezenta absorbția în funcție de lungimea de undă, dar se ridică problema omogenității materialului celular viu [23].

Fig. 5 redă spectrul de absorbție *in vivo* a suspensiilor algale precum și spectrul de absorbție *in vitro* al clorofilelor *a* și *b*, izolate prin cromatografie TLC.

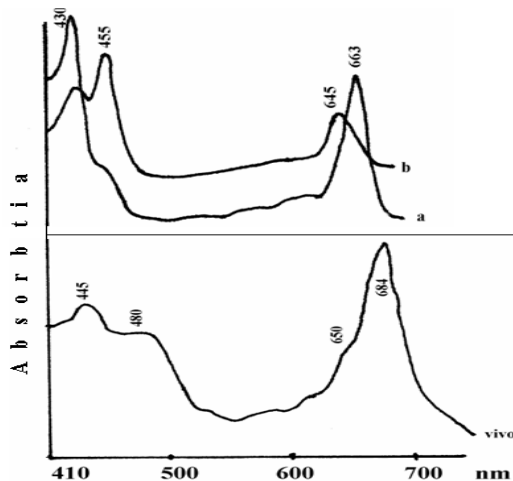


Fig. 5. Spectrul de absorbție a suspensiei de Mougeotia *in vivo* și spectrul de absorbție *in vitro* a clorofilei *a* și *b* separate cromatografic.

La lumina moderată de creștere a filamentelor de *Mougeotia* spectrul de absorbție *in vivo* a fost bine delimitat cu benzi de absorbție în zonele albastră și roșie. Astfel, în zona albastră s-a evidențiat aria spectrală de amplitudine redusă compusă din benzile de absorbție cu maximele între 430-445 nm pentru clorofile și 480 nm aparținând carotenoidelor a căror contribuție la spectru este însemnată.

Urmează aria spectrală compusă din benzile de absorbție cu maximele la 650 nm și 684 nm. La intensitatea moderată de lumină de 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lumina de creștere a suspensiei algale), spectrul de absorbție și-a redus amplitudinea, aria spectrală și, în mod semnificativ, diversitatea componentelor de clorofile care intră în structura fotosistemelor.

Caracteristicile spectrale *in vitro* ale clorofilelor sunt prezentate în Fig. 5. Pentru clorofila a s-au evidențiat maximele de absorbție la 430 nm în zona spectrală albastră și la 663 nm în zona spectrală roșie. Pentru clorofila b s-au înregistrat maximele de absorbție la 445 nm și 645 nm, cu o amplitudine spectrală mai diminuată.

Măsurătorile *in vivo* privind dominanța diferitelor forme de clorofilă a aflate în componența fotosistemelor PS I și PS II, a evidențiat componența relativ redusă a celor două fotosisteme (Fig. 6). S-a remarcat cantitatea mai diminuată a formelor de clorofila a, respectiv, cu absorbția *in vivo* la 670 nm și 684 nm, și dominanța clorofilei b cu absorbția *in vivo* la 650 nm. Scăderea diversității formelor de clorofila a atestă o activitate redox relativ redusă la nivelul celor două fotosisteme.

Această adaptare este benefică pentru experimentele cu utilizarea luminii de intensitate ridicată deoarece realizarea fotoinhibiției este întârziată.

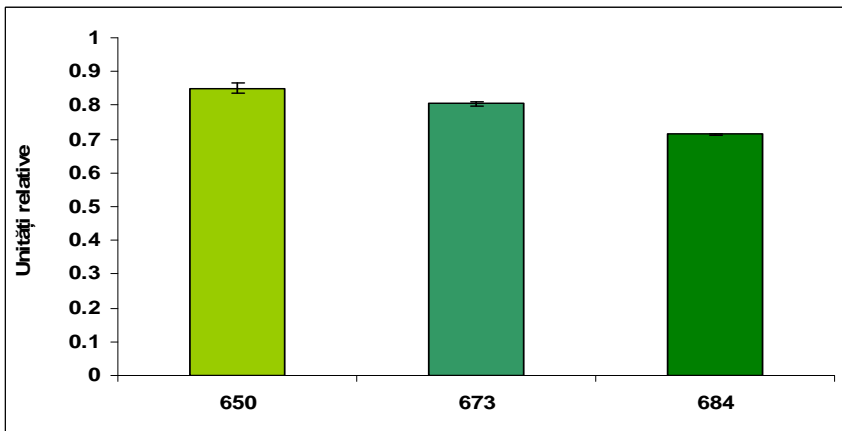


Fig. 6. Conținutul *in vivo* al diferitelor forme de clorofila la *Mougeotia*.

Analiza carotenoidelor și xantofilelor prin cromatografie HPLC. Carotenoidele sunt tetraterpene cu C_{40} atomi, fiind larg distribuite la organismele vii. Lanțul polienic al carotenoidelor constând din legături duble conjugate este responsabil de pigmentarea carotenoidelor și de abilitatea lor de-a absorbi fotonii în domeniul spectral vizibil. Există două principale clase de carotenoide produse natural: hidrocarburi carotenoidice sau caroteni (cum este β -carotenul și α -carotenul) și xantofilele care sunt derivați oxigenați ai carotenilor (violaxantina, anteraxantina, zeaxantina, neoxantina, luteina, etc.). În general, o distincție se poate face între carotenoidele primare și secundare. Xantofilele primare sunt

definite ca și xantofilele ce sunt componenți structurali și funcționali ai aparatului fotosintetic și deci esențiale pentru supraviețuirea celulei. Xantofile secundare sunt acele xantofile pe care le produc microalgele în cantități mari numai după ce au fost expuse la un stimul de mediu specific (carotenogeneză) [14]. Plantele verzi au o compoziție în carotenoide remarcabil de similară. Principalele carotenoide din țesutul fotosintetic al plantelor sunt: luteina (45% din total), β -carotenul (25-30%), violaxantina (10-15%) și neoxantina (10-15%) [5]. În condiții de iluminare intensă se acumulează zeaxantina și anteraxantina. În comparație cu plantele, algele prezintă o diversitate mult mai mare în compoziția lor pigmentară. Carotenoidele acționează ca și pigmenți secundari de captare a luminii datorită absorbției în intervalul 450-570 nm, unde clorofilele nu absorb eficient [3].

Principalele carotenoide majore identificate prin cromatografie HPLC, la suspensia de *Mougeotia*, sunt prezentate în Fig. 7. S-au identificat în principal șase carotenoide majore, iar pentru vârfurile din cromatogramă sunt prezentate spectrele de absorbție ale acestor carotenoide.

Carotenoidele identificate sunt cele existente normal la celulele fotosintetizatoare, și anume: β -caroten, α -criptoxantină, luteină, anteraxantină, violaxantină și neoxantină. Carotenoidele sunt eluate în ordinea descrescătoare a polarității moleculare: cele mai polare au cei mai reduși timpi de retenție, în timp ce carotenoidele cu molecule nepolare au timpi de retenție maximi. Caracteristicile spectrale ale carotenoidelor identificate sunt specificate în tabelul 2. Pe lângă aceste carotenoide au fost identificate și unii izomeri ai acestora, dar lipsește zeaxantina, xantofilă implicată în ciclul xantofilic.

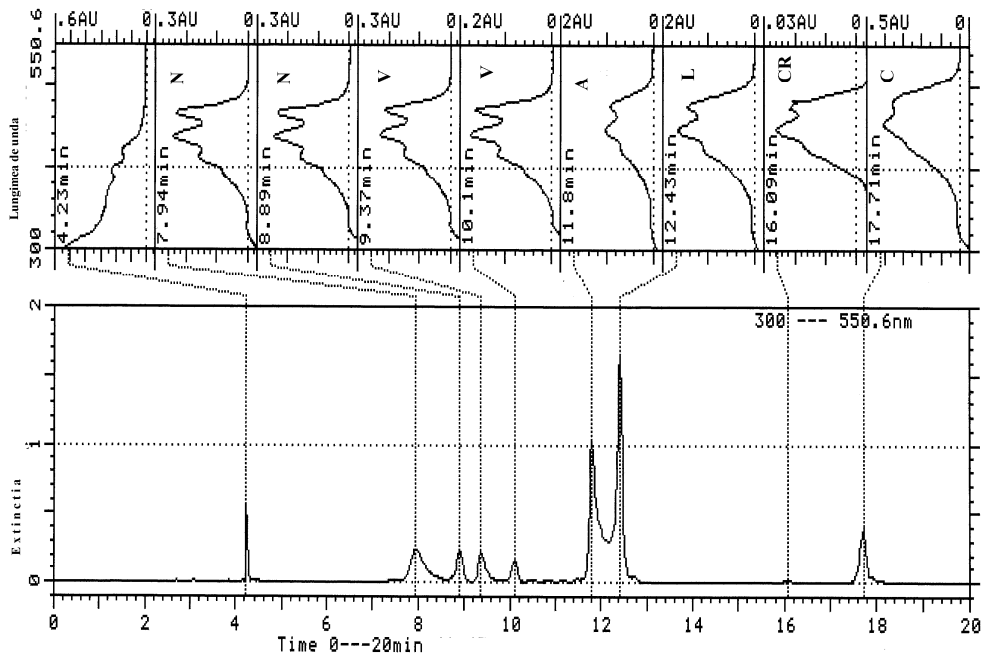


Fig. 7. Cromatograma carotenoidelor majore prezente la *Mougeotia*. N=neoxantina; V=violaxantina; A=anteraxantina; L=luteina; CR= α -criptoxantina; C= β -caroten.

Menținerea echilibrului între captarea și utilizarea energiei luminii este esențială pentru supraviețuirea organismelor fotosintetice oxigenice. Xantofilele participă la captarea luminii și sunt esențiale în protejarea cloroplastelor de distrugerile fotooxidative. În lupta cu dezechilibrul dintre absorbția energiei de excitație și utilizarea sa, algele și plantele își reglează captarea luminii fotosintetice și produc o serie de molecule antioxidante – enzime, pentru a detoxifica speciile reactive de oxigen care se formează. Xantofilele prezente în membranele tilacoidelor participă la aceste funcții protective fiind adevărați antioxidanți [2, 15].

Mecanismul biochimic molecular de bază al fotosintezei apare riguros de conservat în evoluția plantelor și odată cu acesta și xantofilele [6]. Schimbările în condițiile de mediu cum ar fi intensitatea luminii ori temperatura duc la un dezechilibru între energia luminii absorbite prin fotochimie vizavi de energia utilizată prin metabolism. Un astfel de dezechilibru energetic este simțit prin alterarea presiunii de excitație a fotosistemului PS II, ceea ce reflectă starea reductivă relativă a fotosistemului [13].

Tabel 2

Caracteristicile spectrale ale carotenoidelor majore din suspensiile de *Mougeotia* identificate prin cromatografie HPLC.

Carotenoide	λ_{\max} (nm)			Timp de retenție [min.]	% arie
Neoxantina	413	437	467	7, 94	8, 52
Neoxantina (izomer)	413	438	467	8, 89	3, 69
Violaxantina	417, 6	440	471	9, 37	4, 78
Violaxantina (izomer)	417, 6	440	471	10, 1	2, 80
Anteraxantina	420	441	472	11, 8	32, 56
Luteina	425	447	475	12, 43	37, 09
α -criptoxantina		448, 4	473, 6	16, 09	-
β -caroten		454	482	17, 71	10, 53

Concluzii. 1. Procesul de creștere al suspensiilor de *Mougeotia* s-a analizat prin trasarea curbei de creștere pe baza densității optice în perioada de creștere exponențială. Parametrii de creștere exprimați prin rata de creștere exponențială $R=0,309$, rata medie de creștere $R_m=0,193$ și printr-un timp de generație $g = 3,24$, atestă o creștere relativ rapidă în primele 4 zile, cu unele diferențe de creștere pe parcursul întregii perioade exponențiale. Acumularea substanței uscate într-o cantitate apreciabilă la lumina moderată, cantitate de 114.66 mg.l^{-1} , reprezintă un alt parametru de estimare a procesului de creștere.

2. Lumina moderată de creștere a determinat acumularea unei cantități normale de clorofilă și carotenoide. Aceste cantități s-au menținut într-o proporție normală și constantă pe durata creșterii celulare așa cum reiese din valorile raportului dintre componenții pigmentari și valoarea abaterii standard. Dintre xantofilele ciclului xantofilic implicate în fotoprotecție, sa remarcat prezența violaxantinei și a anteraxantinei în cantități apreciable. Spectrul de absorbție *in vivo* este bine delimitat cu benzi de absorbție în zonele albastră și roșie. Măsurătorile *in vivo* privind dominanța diferitelor forme de clorofilă a, a evidențiat componența relativ redusă a celor două fotosisteme. S-a remarcat cantitatea mai diminuată a formelor de clorofila a, cu absorbția *in vivo* la 670 nm și 684 nm, și dominanța clorofilei b cu absorbția *in vivo* la 650 nm. Scăderea diversității formelor de clorofila a atestă o activitate redox relativ redusă la nivelul celor două fotosisteme.

3. Carotenoidele majore identificate prin cromatografie HPLC sunt cele existente normal la celulele fotosintetizatoare: β -carotenul, α -criptoxantina, luteina, anteraxantina, violaxantina și neoxantina. Dintre xantofilele ciclului xantofilic implicate în fotoprotecție s-a remarcat prezența violaxantinei și a anteraxantinei în cantități apreciabile. A lipsit zeaxantina, alt component al ciclului xantofilic, tocmai din cauza luminii moderate de creștere care nu a stresat fotosinteza, deci nu a determinat interconvertibilitatea dintre violaxantină și zeaxantină prin intermediul anteraxantinei. Mecanismul biochimic molecular de bază al fotosintezei apare conservat riguros în evoluția plantelor și odată cu acesta și tipurile principale de xantofile.

BIBLIOGRAFIE

1. Arnon, D. I., *Copper enzymes in chloroplasts. Polyphenyloxidase in Beta vulgaris*, „Plant Physiol.”, **24**, 1949, 1-15.
2. Baroli, I., Do, A. N. D., Yamane, T., Niyogi, K. K., *Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects Chlamydomonas reinhardtii from photooxidative stress*, „Plant Cell”, **15**, 2003, 992-1008.
3. Baroli, I., Niyogi, K. K., *Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants*, „Phil.Trans.R.Soc.Lond.B”, **355**, 2000, 1385-1394.
4. Bennoun, P., *Evidence for a respiratory chain in the chloroplast*, „Proc.Natl.Acad.Sci.USA”, **79**, 1982, 4352-4356.
5. Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., *Carotenoids*. Volume 1A: *Isolation and analysis*. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin. 1995.
6. Bungard, R. A., Ruban, A. V., Hibberd, J. M., Press, M. C., Horton, P., Scholles, J. D., *Unusual carotenoid composition and a new type of xanthophyll cycle in plants*, „Proc.Natl.Acad.Sci.USA”, **96**, 1999, 1135-1139.
7. Czjganc, C. F., *Pigments in Plants*, Akademik-Verlag, Berlin. 1981.
8. Dragoș, N., Péterfi, L. Șt., Momeu, L., Popescu, C. *An introduction to the algae and the culture collection of algae at the Institute of the Biological Research Cluj-Napoca*. Cluj Univ.Press. 1997.
9. Goedheer, J. C., *Acooperation of two pigment systems and respiration in photosynthetic luminescence*, „Biochim.Biophys.Acta”, **66**, 1963, 61-71.
10. Hager, A., Bertenrath, T. M., *Die isolierung und quantitative bestimmung der carotenoide und chlorophylle von blättern, algen und isolierten chloroplasten mit hilfe dünnschichtchromatographischer methoden*, „Planta”, **69**, 1966, 198-216.
11. Haupt, W., *Light-mediated movement of chloroplasts*, „Annu. Rev. Plant Physiol.”, **33**, 1982, 205-233.
12. Haupt, W., Scheuerlein, R., *Chloroplast movement*, „Plant Cell Environ.”, **13**, 1990, 595-614.
13. Huner, N. P. A., Öquist, G., Sarhan, F., *Energy balance and acclimation to light and cold*, „Trends Plant Sci.”, **3**, 6, 1998, 224-230.
14. Jin, E., Polle, J. E. W., Lee, H. K., Hyun, S. M., Chang, M., *Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application*, „J.Microbiol. Biotechnol.”, **13**, 2, 2003, 165-174.
15. Jin, E., Yokthongwattana, K., Polle, J. E. W., Melis, A., *Role of the reversible xanthophyll cycle in the photosystem II damage and repair cycle in Dunaliella salina*, „Plant Physiol.”, **132**, 2003, 352-364.

16. K a d o t a, A., S a t o, Y., W a d a, M., *Intracellular chloroplast photorelocation in the moss Physcomitrella patens is mediated by phytochrome as well as by a blue-light receptor* „, *Planta*”, **210**, 2000, 932-937.
17. L i c h t e n t h a l e r, H. K., W e l l b u r n, A. R., *Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents*, „*Biochem.Soc.Trans.*”, **603**, 1983, 591-592.
18. M u n t e a n, E., B e r c e a, V., D r a g o s, N., N i c o a r ă, A., *High performance liquid chromatography analysis of carotenoids involved in violaxanthin cycle in Scenedesmus opoliensis P.Richter algae.*, „*Buletinul USAMV-CN*”, A-H, 2000, 54.
19. 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.
20. N e f f, M. M., F a n k h a u s e r, C., C h o r y, J., *Light: an indicator of time and place*, „*Genes Develop.*”, **14**, 2000, 257-271.
21. S a t o, Y., W a d a, M., K a d o t a, A., *External Ca²⁺ is essential for chloroplast movement induced by mechanical stimulation but not by light stimulation*, „*Plant Physiol.*”, **127**, 2001, 497-504.
22. S e n g e r, H., S c h r a d e r, E., B i s h o p, N. I., *Changes in the carotenoid pattern during the synchronous life cycle of Scenedesmus*, „*Bot.Acta*”, **106**, 1993, 72-77.
23. S h i b a t a, K., *Spectrophotometry of intact biological materials. Absolute and relative measurements of their transmission, reflection and absorption spectra*, „*J.Biochem.*”, **45**, 8, 1958, 599-623.
24. S t e i n, J. R., *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*, Cambridge Univ.Press, Cambridge. 1973.
25. W a g n e r, G., *Intracellular movement*, „ *Prog. Bot.*”, **57**, 1996, 68–80.

**SENSIBILITATEA FOTOSISTEMULUI PS II LA PRESIUNEA DE
EXCITARE CORELATĂ CU DISIPAREA NERADIATIVĂ
A ENERGIEI EXCITAȚIEI LA ALGA VERDE
*CHLORELLA FUSCA***

VICTOR BERCEA* , ANA NICOARĂ* și NICOLAE DRAGOȘ**

SUMMARY. – **PS II Photosystem Sensibility to Excitation Pressure, Correlated with Nonphotochemical Dissipation of Excitation Energy at the Green Alga *Chlorella fusca*.** Excitation pressure effects on PS II, correlated with the nonphotochemical dissipation of excitation energy and the violaxanthin de-epoxidation, after different exposure times and light intensities is presented. Light intensities have increased the proportion of open reaction centers. 2000 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ and 3000 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ light has determined to the increasing of Q_A in reduced state, while 2500 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ light has significantly reduced their quantity. The excitation pressure increased with the light exposure time. The nonphotochemical dissipation of excitation energy has been intensified in relation with light intensity and with the increasing of light exposure times. A linear positive correlation between violaxanthin de-epoxidation activity and the nonphotochemical dissipation of excitation energy (NPQ) was observed. The xanthophyll cycle pigments had a particular response with respect to light intensities.

Analiza fluorescenței clorofilei furnizează însemnate date privind procesul de disipare a energiei excitației. Inducerea disipării energiei se poate aprecia prin stingerea nefotochimică a fluorescenței clorofilei (NPQ)[4]. S-a propus că baza moleculară a disipării neradiative în siguranță implică în parte carotenoidul zeaxantina, ipotetic acționând ca un atenuator al stării de excitație a clorofilei din antena fotosintetică [3].

Un important aspect al manifestării NPQ este procesul de activare prin lumina intensă a fotosintezei cloroplastelor adaptate la lumină redusă. Dacă cloroplastele sunt pre-iluminate cu lumină intensă, crește sensibilitatea lui NPQ ceea ce se corelează cu formarea zeaxantinei prin de-epoxidarea violaxantinei [21]. Explicarea biochimică rezidă în faptul că formarea zeaxantinei este strâns legată de schimbările structurale în complexul pigment-proteină LHC II [12].

Mecanismul NPQ cuprinde trei componente corespunzător cineticilor de relaxare la întineric urmând perioadei de iluminare: q_E este componenta dependentă de energie care produce disiparea energiei sub formă de căldură neradiativă. Necesită formarea gradientului de electroni transtilacoidal (ΔpH), fiind indus rapid și reversibil prin pH-ul lumenului provocat de lumină. Are drept rezultat protonația proteinelor cheie: violaxantin de-epoxidaza și *PsbS* care este componenta asociată complexului polipeptidic captator de lumină a PS II determinând activarea ciclului xantofilic care produce zeaxantina, pigment xantofilic legat de proteinele antenei PS II [2, 7, 8, 19]. q_T este componenta dependentă de starea de tranziție, fiind legată de fosforilarea polipeptidelor LHC II [20]. q_I este componenta indusă de

* Institutul de Cercetări biologice 400015/Cluj-Napoca. E-mail: icb@mail.dntcj.ro

** Univ. „Babeș-Bolyai”, Fac. de Biologie și Geologie Cluj-Napoca. E-mail: ndragos@biolog.ubbcluj.ro.
Cercetare finanțată în Programul Național CERES nr. 3-121/2003

transformarea centrului de reacție PS II în urma fotoinhibiției care afectează mecanismul de fotoliza apei s-au afectează acceptorul marginal producându-se dubla reducere a Q_A [14]. În absența modulării q_L , transportorii de electroni reduși energetic vor bloca curgerea electronilor înainte ca lumenul tilacoidal să devină acid. Se produce o supraducere prin care rezultă Q_A dublu reduși și stabili energetic, permițând formarea speciilor de clorofilă triplet care pot reacționa cu O_2 formând oxigenul singlet (1O_2) care este foarte toxic.

În această lucrare prezentăm rezultatele referitoare la acțiunea presiunii de excitație asupra fotochimiei fotosistemului PS II în corelație cu disiparea neradiativă a energiei excitației și cu activitatea de-epoxidării violaxantinei în urma efectelor intensităților diferite de lumină pe durată lungă de timp.

Material și metode. Alga verde *Chlorella fusca* Shihira et Krauss (AICB 25) provine din Colecția de culturi de alge a I. C. B. Cluj-Napoca (AICB)[6]. Alga a fost crescută în soluția nutritivă Bold (BBM), în condiții de agitare continuă cu aer și iluminare continuă ($450 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), la temperatura de 22°C . După 16 zile, creșterea culturilor s-a apreciat prin trasarea curbelor de creștere pe baza A_{log_2} a densității optice [29]. La finele perioadei de creștere s-a determinat biomasa (substanța uscată), concentrația pigmentilor asimilatori și a proteinelor celulare.

Expunerea la lumina de diferite intensități PAR (radiația activă fotosintetic) a suspensiei de alge s-a efectuat la 1500, 2000, 2500 și 3000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, timp de 120 minute, la temperatura camerei (perioada de iluminare). Ca sursă de lumină s-au folosit becuri halogen reglabile de 500W. Suspensia a fost agitată magnetic pe întreaga durată a expunerii la lumină pentru omogenizarea umbririi celulare, iar între suspensie și sursa de lumină s-a interpus un filtru cu apă pentru evitarea încălzirii. Probele analitice au fost prelevate la intervale de 15 și 30 minute, prin filtrare.

Pigmenții (clorofila a și b , carotenoide), extrași cu acetonă, s-au estimat spectrofotometric pe baza coeficienților specifici de absorbție [1, 15], rezultatele fiind exprimate în $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ suspensie algală. Proteinele s-au determinat după metoda Lowry și colab. [16].

De-epoxidarea violaxantinei, respectiv formarea zeaxantinei dependent de lumină s-a analizat *in vivo* prin măsurarea schimbărilor în absorbție între 505 - 535 nm (ΔA_{505})[3, 32].

Fluorescența clorofilei s-a măsurat cu fluorometrul PAM-200 corespunzător lui Schreiber și colab. [28]. Parametrii fluorescenței și analiza stingerii fluorescenței s-au efectuat prin aplicarea metodei pulsului de saturație. F'_0 s-a determinat folosindu-se lumina de excitație roșie. NPQ s-a calculat corespunzător ecuației $\text{NPQ} = (F_m - F'_m)/F'_m$, iar presiunea de excitație după formula $1 - q_p$.

Rezultate și discuții. Reacțiile la lumină convertesc energia fotonilor într-o stare electronică de excitație a moleculei pigmentului din sistemul antenă reprezentat prin clorofile și carotenoide ancorate la proteinele interne ale membranelor tilacoid funcționând ca și complexe proteice specializate denumite centrul de reacție. Starea excitată electronic este transferată tuturor moleculelor din antenă ca și exciton. Unii excitoni sunt convertiți înapoi la fotoni și emit fluorescență, alții sunt convertiți la căldură, iar alții sunt capturați prin proteina centrului de reacție. Excitonii capturați prin centrul de reacție furnizează energia pentru reacțiile fotochimice primare ale fotosintezei – transferă electronii de la molecula donor la molecula acceptor. Ambele molecule donor și acceptor sunt atașate la complexul proteic al centrului de reacție. Astfel se produce prima separare a sarcinilor, iar ulterior transferului electronilor, reacțiile sunt sărace energetic [31].

Proporția luminii PAR absorbită prin centrul de reacție PS II deschis și modul de utilizare în fotochimie, pe baza stării redox a acceptorului primar Q_A , sunt redată în Fig. 1. Pigmenții antenei fotosistemului PS II absorb lumina și o transferă la centrul de reacție care, aflați în stare deschisă (oxidată), capturează lumina și încep să se închidă ducând la creșterea fluorescenței variabile. Intensitățile de lumină experimentate au menținut crescut numărul centrilor de reacție deschisă, comparativ cu valorile martorului, asta însemnând că cea mai mare parte din energia de excitare s-a utilizat în fotochimia centrilor de reacție, ducând la scăderea fluorescenței. S-a înregistrat o proporție ridicată de centrul deschis la intensitățile de $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ și $2500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Intensitatea de $2000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a redus semnificativ cantitatea centrilor de reacție capabili de captarea excitației. Lumina de $3000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, în general, a redus proporția centrilor de reacție deschisă.

În primele 30 minute de expunere la diferitele intensități de lumină, proporția centrilor deschisă a fost ridicată, iar la expunerea îndelungată la lumină, a scăzut această proporție.

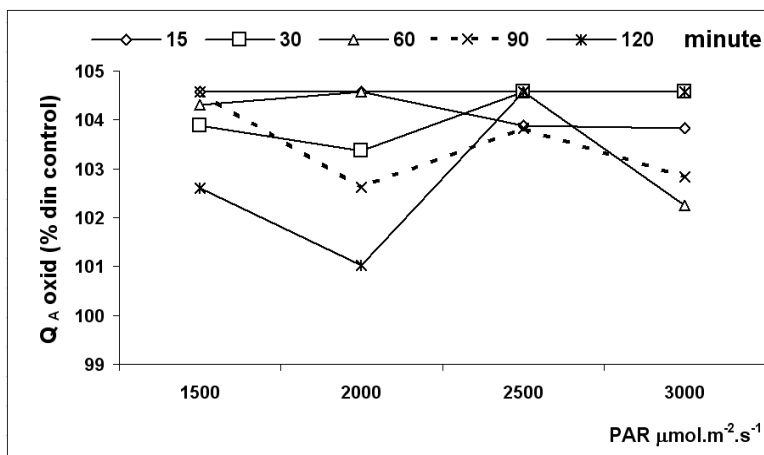


Fig. 1. Proporția centrilor de reacție deschisă la nivelul PS II sub acțiunea diferitelor intensități de lumină.

Rata relativă de excitare a centrilor de reacție depinde de stoichiometria acestora și de mărimea efectivă a antenei [10]. Fotosistemul PS II cuprinde antena cu rol de absorbția fotonilor și centrul de reacție având sarcina captării excitației și conversia acesteia în energie chimică. Pigmenții din antenă absorb fotonii și sunt inactivi fotosintetic, pe când cei din centrul de reacție sunt activi fotosintetic. Centrul de reacție absoarbe la lungimi de undă mari constituind o capcană pentru energia de excitare. Conversia fotonilor la potențialul chimic implică fotoexcitarea și separarea sarcinilor pentru a produce o clorofilă oxidată și reducerea unei alte clorine din centrul de reacție care transferă electronul la acceptorul primar Q_A [11].

Când Q_A sunt oxidați, viața excitației este scurtă fiind dependentă de constanța ratei de stabilizare a sarcinilor. Când Q_A este redus, PS II este incapabil de-a stabili separarea sarcinilor și astfel centrul devin închisă producându-se un dezechilibru între rata de sosire a energiei de excitare în centrul de reacție și rata de utilizare a electronilor pentru asimilarea CO_2 . Stabilizarea sarcinilor se produce numai când electronii sunt transferați la acceptorul primar Q_A [14].

Durata de viață a excitației crește când Q_A ajunge în starea redusă. O stare lungă de energie ridicată poate fi dăunătoare pentru structurile fotosintetice. Proporția de Q_A în stare redusă este redată de presiunea de excitație în Fig. 2. Lumina de $2000 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ și $3000 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a contribuit la creșterea proporției de Q_A în stare redusă, pe când intensitatea de $2500 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a redus substanțial cantitatea acestora, comparativ cu valorile martorului. Presiunea de excitație s-a mărit cu durata de expunere la lumină, respectiv după 30 minute. Această creștere evidențiază capacitatea scăzută a proceselor fotochimice de-a reoxida Q_A ceea ce duce la scăderea disipării energiei de excitație sub forma transferului fotosintetic al electronilor [22]. După *Maxwell* și colab. [17] creșterea presiunii de excitație determină scăderea fluorescenței variabile și a eficienței fotochimice, lipsa centrilor PS II_a precum și scăderea proporției LHC II asociată cu dublarea raportului proteină:clorofilă din cauza scăderii clorofilei per celulă.

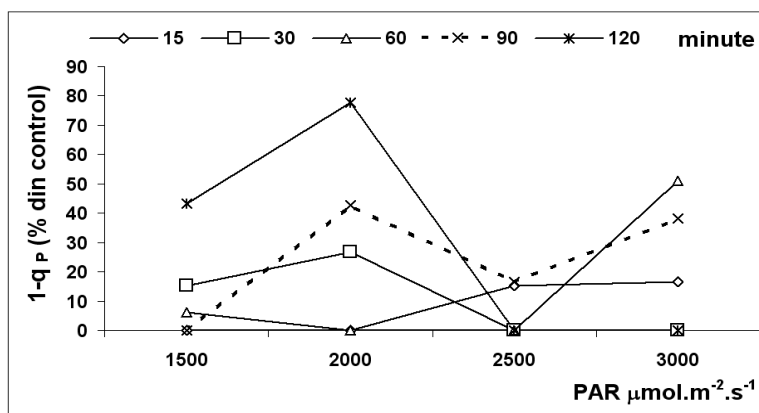


Fig. 2. Presiunea de excitație indusă de diferite intensități de lumină asupra fotochimiei PS II.

Intensificarea activității de disipare nefotochimică a energiei excitației se datorează reducerii reversibile a eficienței fotosintezei [25]. Capacitatea de disipare nefotochimică a energiei excitației s-a intensificat cu mărirea intensității luminii (Fig. 3). Intensitățile de $2500 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ și $3000 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ au determinat mărirea valorilor lui NPQ comparativ cu martorul. Disiparea neradiativă a energiei s-a intensificat, de asemenea, cu prelungirea duratei de expunere la lumină. Protecția împotriva fotoinhibării s-a redus după 60 minute de expunere, iar la lumina de $3000 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, din cauza instalării fotoinhibiției, s-au produs fotodistrugerii în antena fotosistemului PS II. NPQ indică importante ajustări regulatorii în membranele fotosintetice ca răspuns la factorii interni și externi [13]. Rezistența la fotoinhibare la alga *Chlorella* reflectă ajustarea fotosintetică la presiunea de excitație ridicată ducând la sporirea capacității de disipare neradiativă a excesului de energie prin producerea zeaxantinei [17].

Disiparea nefotochimică a energiei excitației asociată cu translocarea protonilor prin membrana tilacoidală este considerată un mecanism fotoprotectiv care ajută plantele în lupta cu lumina în exces [18, 26]. Acidifierea lumenului poate contribui la disiparea în antenă a energiei excitației prin coordonarea ciclului xantofilic [5] s-au prin agregarea antenei captatoare de lumină [27].

FOTOSISTEMUL PS II ȘI PRESIUNEA DE EXCITARE

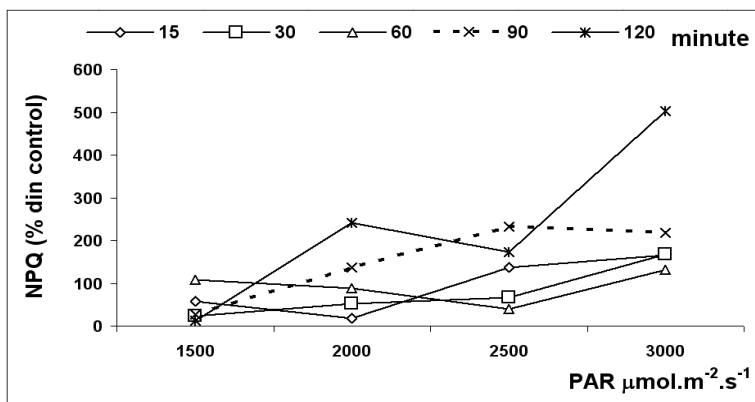


Fig. 3. Relația dintre dispariția neradiativă a energiei excitației și intensitatea luminii

Parametrul fluorescenței $1/F_m$ este un index de aproximare a pierderilor nefotochimice a energiei excitației din antena captatoare de lumină a fotosistemului PS II [9, 23]. În Fig. 4 se arată relația între indexul $1/F_m$ și intensitățile diferite de lumină. Valorile acestui index s-au mărit în dependență cu intensitatea luminii și cu prelungirea duratei de expunere la lumină.

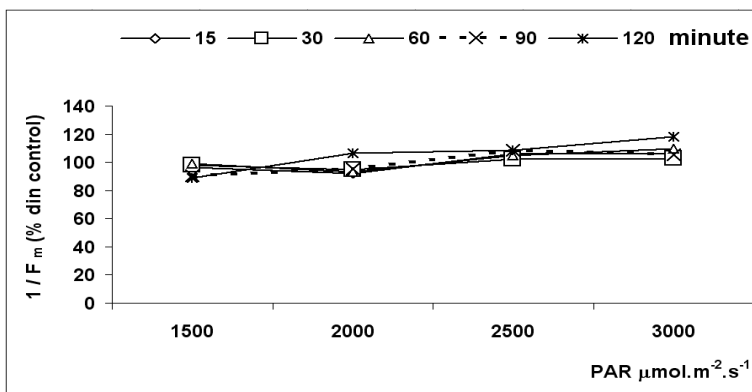


Fig. 4. Relația dintre indexul $1/F_m$ și diferitele intensități de lumină

De-epoxidarea violaxantinei, respectiv acumularea de zeaxantină, a fost un proces care a început lent, iar după 15 minute de expunere la diferite intensități ale luminii, activitatea de-epoxidării s-a intensificat în relație directă cu durata expunerii (Fig. 5). Lumina de $1500 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a indus treptat de-epoxidarea violaxantinei cu un vârf la 60 minute de expunere, situație înregistrată și la lumina de $2000 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Lumina de $2500 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ și $3000 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a stimulat activitatea de-epoxidării violaxantinei înregistrându-se două vârfuri la 30 și 90 minute de expunere. Expunerea îndelungată la $3000 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a indus inhibarea de-epoxidării violaxantinei. Schimbările în absorbție la 505 nm și obținerea de valori negative se corelează direct cu de-epoxidarea violaxantinei [32].

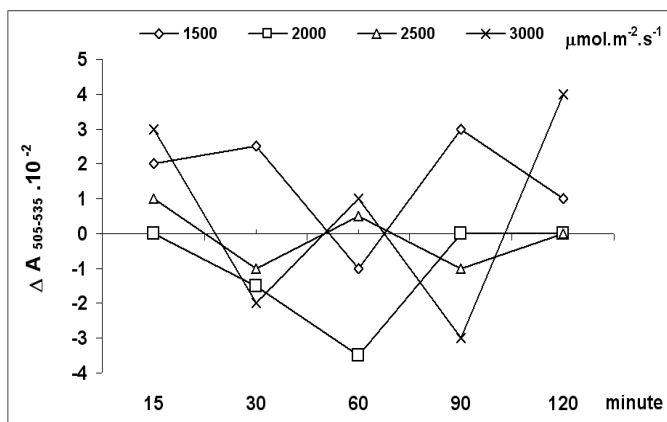


Fig. 5. Schimbările în absorbție ΔA_{505} produse de intensitățile de lumină la suspensiile de Chlorella.

A existat o corelație liniară pozitivă la majoritatea variantelor experimentale între activitatea de-epoxidării violaxantinei, măsurată prin schimbările în absorbție la 505 nm și procesul de disipare nefotochimică a energiei excitației reprezentat de NPQ (Fig. 6). pH-ul acid al lumenului tilacoidal precum și formarea zeaxantinei în prezența luminii induc intensificarea NPQ. La intensitatea luminii de 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ s-a înregistrat o corelație pozitivă între producerea de zeaxantină și intensificarea disipării neradiative a energiei excitației. Această corelație s-a redus la intensitățile de 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ și 2500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La lumina de 3000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ s-a înregistrat o corelație negativă.

Ciclul xantofilic considerat mecanism de fotoprotecție, este implicat în disiparea energiei excitației, fiind responsabil pentru scăderea eficienței fotochimice a PS II determinând reglarea în jos a activității PS II [30]. Zeaxantina facilitează disiparea energiei din centrul de reacție prin formarea sa când absorbția luminii excede capacitatea de conservare a energiei prin transportul fotosintetic al electronilor [24].

Acumularea pigmentilor asimilatori (clorofile, carotenoide) precum și raportul dintre aceștia este prezentată în Fig. 7. Fiecare fracțiune de pigment a avut o evoluție specifică în raport cu intensitatea luminii. În general, concentrația clorofilelor a crescut la lumina de 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, iar cantitatea carotenoidelor s-a menținut sub valorile matorului. Lumina de 2500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a determinat obținerea unor valori apropiate celor de la mator pentru clorofile și creșterea cantităților de carotenoide. În schimb, intensitatea de 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a produs scăderea clorofilelor și creșterea carotenoidelor, cu modificarea raporturilor dintre pigmenți. Expunerea la 3000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a determinat inhibarea acumulării clorofilelor și a carotenoidelor. Expunerea de durată a produs diminuarea cantității pigmentilor asimilatori, cu modificarea raporturilor dintre aceștia.

În paralel a crescut și cantitatea de proteine care se leagă cu pigmenții fotosintetici formând complexe structurale LHC (Fig. 8). Complexul LHC II_s este asociat cu carotenoidele hidroxi aparținând ciclului xantofilic [13]. Acumularea proteinelor celulare a fost direct dependentă de intensitatea luminii atingându-se valori mai ridicate la 2500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ și 3000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, comparativ cu matorul. Epoxidarea zeaxantinei și scăderea coeficientului NPQ pot fi posibil dependente de sinteza proteinelor. Sinteza de noi proteine poate fi necesară pentru reîntoarcerea la gradele scăzute de de-epoxidare a ciclului xantofilic [30].

FOTOSISTEMUL PS II ȘI PRESIUNEA DE EXCITARE

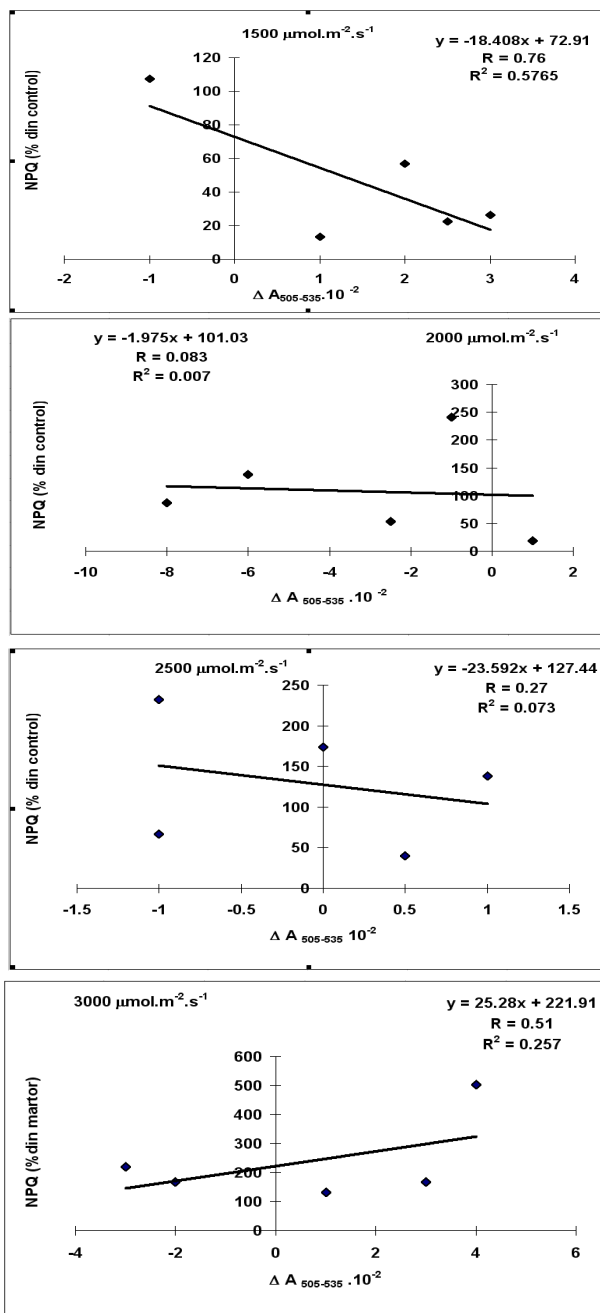


Fig. 6. Corelația între NPQ și schimbările în absorbție la 505 nm sub acțiunea luminii

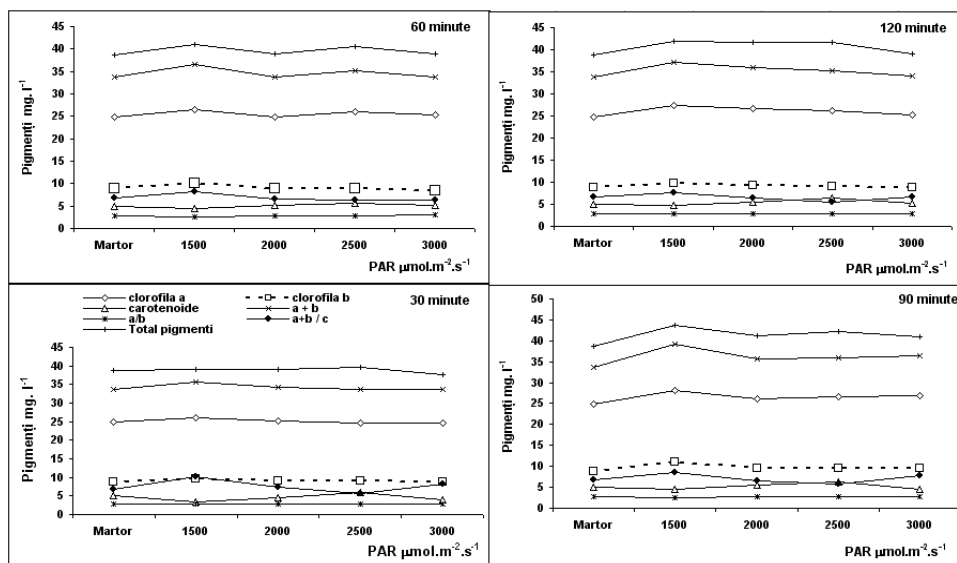


Fig. 7. Conținutul în pigmenți asimilatori (clorofile, carotenoide) la suspensiile de Chlorella în timpul preiluminării cu diferite intensități de lumină pe durata a 120 minute.

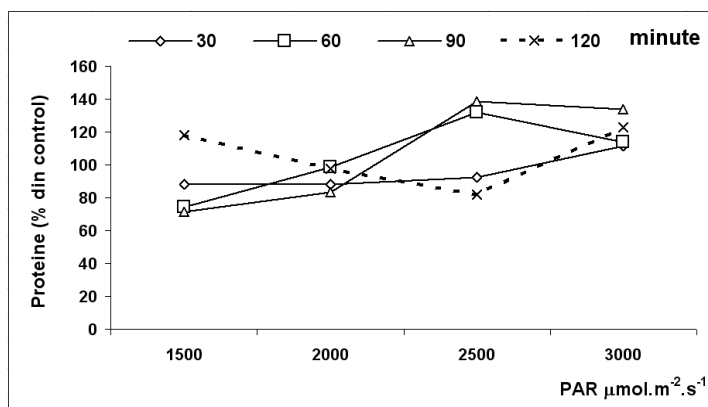


Fig. 8. Conținutul în proteine la suspensiile de Chlorella în timpul preiluminării cu diferite intensități de lumină pe durata a 120 minute.

Contribuția coeficienților fotochimici și nefotochimici în raport cu fotoinhibarea fotosistemului PS II se poate aprecia convențional prin raportul $(1-q_p)/NPQ$, care a fost definit ca un index al sensibilității fotosistemului PS II la lumina în exces deoarece este măsura fotonilor în exces s-au a stresului luminos [22, 23]. Însușiri semnificative se obțin când indexul de sensibilaste este comparat grafic cu intensitatea luminii (Fig. 9). Valori ridicate s-au obținut pentru expunerea la lumina de 1500 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, în special pentru durata expunerii de 120 minute. Valori ridicate s-au înregistrat la intensitatea de 2000 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Cele mai scăzute

valori s-au obținut la lumina de $2500 \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$. Valorile ridicate la respectivele intensități de lumină se datorează ratelor scăzute ale transportului electronilor (valori ridicate ale $1-q_p$), cât și capacității scăzute pentru translocarea protonilor (valori scăzute ale NPQ). La lumina de $2500 \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ ratele fotosintetice ale celulelor de alge au fost, în mod comparabil asemănătoare, indiferent de durata de expunere la lumină. De asemenea, la lumina respectivă, fotosistemul PS II *in vivo* a demonstrat capacitatea de-a echilibra consumul de lumină prin menținerea unui raport constant între procesele fotochimice și nefotochimice.

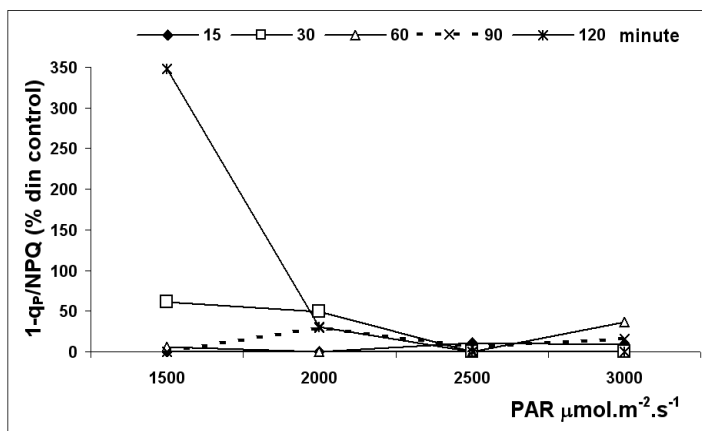


Fig. 9. Evoluția indexului de sensibilitate la stresul produs de lumina în exces

Concluzii. Rezultatele referitoare la acțiunea presiunii de excitare asupra fotochimiei fotosistemului PS II în corelație cu dispariția neradiativă a energiei excitației și cu activitatea de epoxidării violaxantinei în urma efectelor intensităților diferite de lumină pe durată lungă de timp au evidențiat următoarele:

1. Intensitățile de lumină experimentate au menținut crescut numărul centrilor de reacție deschiși, comparativ cu valorile martorului, asta însemnând că cea mai mare parte din energia excitației s-a utilizat în fotochimia centrilor de reacție, ducând la scăderea fluorescenței. În primele 30 minute de expunere la diferitele intensități de lumină, proporția centrilor deschiși a fost ridicată, iar la expunerea îndelungată la lumină, a scăzut această proporție.

2. Când acceptorul primar Q_A este oxidat, viața excitației este scurtă fiind dependentă de constanța ratei de stabilizare a sarcinilor. Durata de viață a excitației crește când Q_A ajunge în starea redusă. O stare lungă de energie ridicată poate fi dăunătoare pentru structurile fotosintetice. Lumina de $2000 \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ și $3000 \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ a contribuit la creșterea proporției de Q_A în stare redusă, pe când intensitatea de $2500 \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ a redus substanțial cantitatea acestora. Presiunea de excitare s-a mărit cu durata de expunere la lumină. Această creștere evidențiază capacitatea scăzută a proceselor fotochimice de-a reoxida Q_A ceea ce duce la scăderea disipării energiei excitației sub forma transferului fotosintetic al electronilor.

3. Capacitatea de disipare nefotochimică a energiei excitației s-a intensificat cu mărirea intensității luminii și cu prelungirea duratei de expunere la lumină. Disiparea nefotochimică a energiei excitației asociată cu translocarea protonilor prin membrana tilacoidală sunt considerate un mecanism fotoprotectiv care ajută plantele în lupta cu lumina în exces. Parametrul fluorescenței

$1 / F_m$ este un index de aproximare a pierderilor nefotochimice a energiei excitației din antena captatoare de lumină a fotosistemului PS II. Valorile acestui index s-au mărit în dependență cu intensitatea luminii și cu prelungirea duratei de expunere la lumină.

4. De-epoxidarea violaxantinei, respectiv acumularea de zeaxantină, a fost un proces care a început lent, apoi s-a intensificat în relație directă cu intensitatea luminii și durata expunerii. Expunerea îndelungată la 3000 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a indus inhibarea de-epoxidării violaxantinei. A existat o corelație liniară pozitivă la majoritatea variantelor experimentale între activitatea de-epoxidării violaxantinei, măsurată prin schimbările în absorbție la 505 nm și procesul de disipare nefotochimică a energiei excitației reprezentat de NPQ.

5. Ciclul xantofilic considerat mecanism de fotoprotecție, este implicat în disiparea energiei excitației, fiind responsabil pentru scăderea eficienței fotochimice a PS II determinând reglarea în jos a activității PS II. Fiecare fracțiune de pigment a avut o evoluție specifică în raport cu intensitatea luminii. Expunerea la 3000 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a determinat inhibarea acumulării clorofilelor și a carotenoidelor. Expunerea de durată a produs diminuarea cantității pigmentilor asimilatori, cu modificarea raporturilor dintre aceștia. În paralel a crescut și cantitatea de proteine care se leagă cu pigmenții fotosintetici formând complexe structurale LHC.

6. Contribuția coeficienților fotochimici și nefotochimici în raport cu fotoinhibarea fotosistemului PS II s-a apreciat convențional prin raportul $(1-q_p)/\text{NPQ}$, care a fost definit ca un index al sensibilității la lumina în exces.

BIBLIOGRAFIE

1. A r n o n, D. I., *Copper enzymes in chloroplasts. Polyphenyloxidase in Beta vulgaris*, "Plant Physiol.", **24**, 1949, 1-15.
2. A v e n s o n, T. J., C r u z, J. A., K r a m e r, D. M., *Modulation of energy-dependent quenching of excitons in antennae of higher plants*, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", **101**, 15, 2004, 5530-5535.
3. B i l g e r, W., B j ö r k m a n, O., T h a y e r, S. S., *Light-induced spectral absorbance changes in relation to photosynthesis and the epoxidation state of xanthophyll cycle components in cotton leaves*, "Plant Physiol.", **91**, 1989, 542-551.
4. B r i a n t a i s, J. M., V e r n o t t e, C., P i c a u d, M., K r a u s e, G. H., *A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts*, "Biochim. Biophys. Acta", **548**, 1979, 128-138.
5. D e m m i g-A d a m s, B., A d a m s, W. W., *Photoprotection and other responses of plants to high light stress*, "Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.", **43**, 1992, 599-626.
6. D r a g o ș, N., P é t e r f i, L. Șt., M o m e u, L., P o p e s c u, C., *An introduction to the algae and the culture collection of algae at the Institute of the Biological Research Cluj-Napoca*, Cluj Univ. Press, 1997.
7. F ä r b e r, A., Y o u n g, A. J., R u b a n, A. V., H o r t o n, P., J a h n s, P., *Dynamics of xanthophyll-cycle activity in different antenna subcomplexes in the photosynthetic membranes of higher plants. The relationship between zeaxanthin conversion and nonphotochemical fluorescence quenching*, "Plant Physiol.", **115**, 1997, 1669-1618.
8. G i l m o r e, A. M., H a z l e t t, T. L., G o v i n d j e e, *Xanthophyll cycle-dependent quenching of photosystem II chlorophyll a fluorescence: formation of a quenching complex with a short fluorescence lifetime*, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", **92**, 1995, 2273-2277.
9. H a v a u x, M., S t r a s s e r, R. J., G r e p p i n, H., *A theoretical and experimental analysis of the q_p and q_N coefficients of chlorophyll fluorescence quenching and their relation to photochemical and nonphotochemical events*, "Photosynth. Res", **27**, 1991, 41-55.

10. Habash, D. Z., Genty, B., Baker, N. R., *The consequences of chlorophyll deficiency for photosynthetic light use efficiency in a single nuclear gene mutation of cowpea*, "Photosynth. Res.", **42**, 1994, 17-25.
11. Hillier, W., Babcock, G. T., *Photosynthetic reaction centers*, "Plant Physiol.", **125**, 2001, 33-37.
12. Horton, P., Ruban, A. V., Rees, D., Pascal, A. A., Noctor, G., Young, A. J., *Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHC II chlorophyll-protein complex*, "FEBS Letters", **292**, 1991, 1-4.
13. Horton, P., Ruban, A. V., Walters, R. G., *Regulation of light harvesting in green plants. Indication by nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence*, "Plant Physiol.", **106**, 2, 1994, 415-420.
14. Laisk, A., Oja, V., *Alteration of photosystem II properties with non-photochemical excitation quenching*, "Phil. Trans. R. Soc. London. B", **355**, 2000, 1405-1418.
15. Lichtenthaler, H. K., Wellburn, A. R., *Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents*, "Biochem. Soc. Trans.", **603**, 1983, 591-592.
16. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, "J. Biol. Chem.", **193**, 1951, 265-275.
17. Maxwell, D. P., Falk, S., Huner, N. P. A., *Photosystem II excitation pressure and development of resistance to photoinhibition. I. Light-harvesting complex II abundance and zeaxanthin content in Chlorella vulgaris*, "Plant Physiol.", **107**, 1995, 687-694.
18. Mohanty, N., Gilmore, A. M., Yamamoto, H. Y., *Mechanism of non-photochemical quenching, II: resolution of rapidly reversible absorbance changes at 530 nm and fluorescence quenching by the effects of antimycin, dibucaine and cation exchanger*, A 23187., "Aust. J. Plant Physiol.", **22**1995, 239-247.
19. Müller-Moulé, P., Conklin, P. L., Niyogi, K. K., *Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity in vivo*, "Plant Physiol.", **128**, 2002, 970-977.
20. Netto, A. T., Campostrini, E., Oliveira, G. J., Yamaniishi, O. K., *Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in Carica papaya L.*, "Braz. J. Plant Physiol.", **14**, 2002, 203-210.
21. Noctor, G., Rees, D., Young, A., Horton, P., *The relationship between zeaxanthin, energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence and the transthylakoid pH-gradient in isolated chloroplasts*, "Biochim. Biophys. Acta", **1057**, 1991, 320-330.
22. Park, Y. I., Chow, W. S., Anderson, J. M., *The quantum yield of photoinactivation of photosystem II in pea leaves is greater at low than high photon exposure*, "Plant Cell Physiol.", **36**, 6, 1995, 1163-1167.
23. Park, Y. I., Chow, W. S., Anderson, J. M., Hurry, V. M., *Differential susceptibility of photosystem II to light stress in light-acclimated pea leaves depends on the capacity for photochemical and non-radiative dissipation of light*, "Plant Sci.", **115**, 1996, 137-149.
24. Pfundel, E. E., Dille, R. A., *The pH dependence of violaxanthin deepoxidation in isolated pea chloroplasts*, "Plant Physiol.", **101**, 1993, 65-71.
25. Ruban, A. V., Young, A. J., Horton, P., *Induction of nonphotochemical energy dissipation and absorbance changes in leaves. Evidence for changes in the state of the light-harvesting system of photosystem II in vivo*, "Plant Physiol.", **102**, 1993, 741-750.
26. Ruban, A., Horton, P., *An investigation of the sustained component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in isolated chloroplasts and leaves of spinach*, "Plant Physiol.", **108**, 1995, 721-726.
27. Ruban, A., Horton, P., *Regulation of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in plants*, "Aust. J. Plant Physiol.", **22**, 1995, 221-230.
28. Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W., *Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer*, "Photosynth. Res.", **10**, 1986, 51-62.

29. Stein, J. R., *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1973.
30. Verhoeven, A. S., Adams, W. W., Demmig-Adams, B., *Close relationship between the state of the xanthophyll cycle pigments and photosystem II efficiency during recovery from winter stress*, "Physiol. Plant.", **96**, 1996, 567-576.
31. Whitmarsh, J., Govindjee, *The photosynthetic process*, in Singhal, G. S., Renger, G., Sopory, S. K., Irrgang, K. D., Govindjee (Eds.): *Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis*, pp. 11-51, Narosa Publishers and Kluwer Academic, 1999.
32. Yamamoto, H. Y., Kamite, L., Wang, Y. Y., *An ascorbate-induced absorbance change in chloroplasts from violaxanthin de-epoxidation*, "Plant Physiol. ", **49**, 1972, 224-228.

ACTIVITATEA FOTOCHIMICĂ A FOTOSISTEMULUI PSII ÎN PREZENȚA LUMINII ÎN EXCES ȘI REFACEREA ACESTEIA LA ÎNTUNERIC, LA ALGA VERDE *CHLORELLA FUSCA*

VICTOR BERCEA*, ANA NICOARĂ* și NICOLAE DRAGOȘ**

SUMMARY. –The PS II Photosystem’s Photochemical Activity in the Presence of Exces Light and its Recovery in Dark at the Green Alga *Chlorella fusca*. *In vivo* activity of PS II under different light intensities and exposure times are described. The recovery period results are also presented. The increase of F_0 value, respective the decrease of F_m lead to a drop in the F_v value. Due to F_v diminishing values the nonphotochemical dissipation of excitation energy (q_N) increased. At high light intensities the excitation light captured by PS II reaction centers was altered because the number of open centers decreased. Varying with light intensity and exposure time, the quantum yield decreased. The non-cyclic electron transport rate increased with light intensity. Photochemical quenching (q_p) and nonphotochemical fluorescence quenching (q_N) seems to be correlated with light intensity. During the recovery period the PS II activity was characterized by F_v reaching control values, altered photochemical efficiency and quantum yield with non-cyclic electron transport.

În condiții naturale organismele fotosintetice sunt expuse normal la nivele de iluminare pe durata unei zile care exced capacitatea prin care energia de excitare rezultată se poate utiliza în fotosinteză. Această energie excesivă trebuie să fie ușor disipată altfel sistemul fotosintetic va suferi fotodistrugerii [18]. Analiza fluorescenței clorofilei furnizează însemnate date privind procesul de disipare a energiei (Fig. 1).

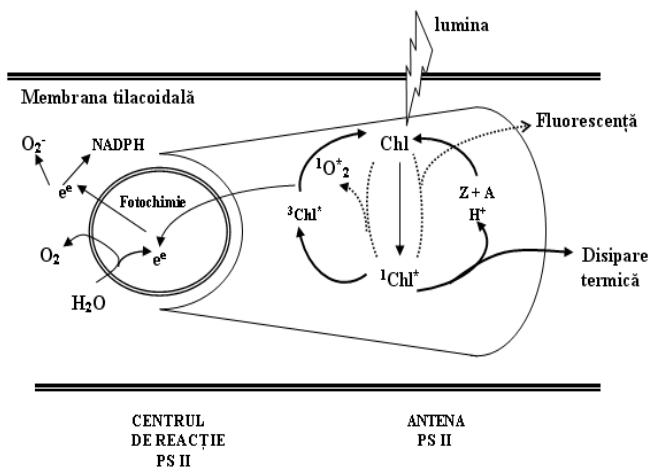


Fig. 1. Căile posibile ale energiei excitației din antena PS II.

* Institutul de Cercetări biologice 400015/Cluj-Napoca. E-mail: icb@mail.dntcj.ro

** Univ. „Babeș-Bolyai”, Fac. de Biologie și Geologie Cluj-Napoca. Cercetare finanțată în Programul Național CERES nr. 3-121/2003

Când clorofila absoarbe lumina, ea este excitată prin energia purtată de fotoni și trece din starea de bază în starea singlet $^1\text{Chl}^*$. Din această stare se reîntoarce la starea de bază prin relaxare pierzând electroni (e^-) a căror energie se poate utiliza în fotochimia centrului de reacție PSII s-au emițând lumină sub formă de fluorescență. Altă parte din excitație se pierde prin disiparea termică facilitată de zeaxantină și anteraxantină (Z+A) și pH-ul lumenului (H^+) (mecanismul de reglare în jos). Clorofila singlet $^1\text{Chl}^*$ poate trece în starea triplet $^3\text{Chl}^*$ care cedează energia de excitare oxigenului ducând la formarea speciilor reactive de oxigen (O_2) (ciclul apă-apă). Inducerea disipării energiei excitației se poate aprecia prin atenuarea nefotochimică a fluorescenței clorofilei (qN)[3].

S-a propus că baza moleculară a disipării neradiative în siguranță implică în parte carotenoidul zeaxantina, ipotetic acționând ca un stingător al stării de excitare a clorofilei din antena fotosintetică [2].

Lumina este în exces când următorul foton sosește înainte ca electronul (e^-) produs prin fotonul anterior să fie preluat prin acceptorul primar Q_A a fotosistemului PS II blocând calea pentru următorul electron. Astfel, lumina în exces este rezultatul dezechilibrului dintre rata sosirii excitației în centrul de reacție și rata de utilizare a electronilor pentru asimilarea CO_2 și eliberarea O_2 . Când acceptorul Q_A este redus, PS II este incapabil de-a stabili separarea sarcinilor astfel că centrul de reacție devin închiși. Ca rezultat, durata de viață a excitației se mărește când Q_A se află în stare redusă. Astfel, starea de energie ridicată precum și presiunea de excitare ridicată pot fi dăunătoare pentru structurile fotosintetice.

În fotosinteză fotonii excită clorofila ce formează sistemul antenar din jurul PS II, iar excitația este rapid transferată la o pereche specială de clorofile P_{680} din nucleul complex al PS II formându-se perechea de radicali $\text{P}_{680}^+\text{Pheo}^-$, starea aceasta este reversibilă și astfel excitația este transferată rapid la clorofila centrului P_{680} , iar de aici la antenă. Când se produce stabilizarea sarcinilor, electronii trec la acceptorul chinonic Q_A care devine redus. În prezența Q_A redus durata excitației este determinată de două procese competitive pentru diminuarea excitației: conversia disipativă (termică) și emisia de fluorescență.

Emisia excitației sub formă de fluorescență se produce cu o probabilitate constantă. Creșterea duratei excitației duce la creșterea probabilității emisie de fluorescență. Durata excitației este mare când Q_A sunt reduși și corespunzător, fluorescența este maximă (F_m) fiind suprasată de rata constantă competitivă a conversiei termice. Când Q_A este oxidat, durata excitației este scurtă, fiind determinată în principal de rata constantă a stabilizării sarcinilor de la $\text{P}_{680}^+\text{Pheo}^-/\text{Q}_A$ la $\text{P}_{680}^+\text{Pheo}/\text{Q}_A$, iar emisia de fluorescență este scăzută (F_0) [11].

În lucrarea actuală prezentăm rezultatele referitoare la activitatea fotochimică *in vivo* a fotosistemului PS II sub acțiunea diferitelor intensități de lumină pe durate diferite de expunere precum și în perioada de refacere după terminarea iluminării.

Material și metode. Alga verde *Chlorella fusca* Shihira et Krauss (AICB 25) provine din Colecția de culturi de alge a I. C. B. Cluj-Napoca (AICB)[5]. Alga a fost crescută în soluția nutritivă Bold (BBM), în condiții de agitare continuă cu aer, iluminare continuă ($450 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), la temperatura de 22°C .

După 16 zile, creșterea culturilor s-a apreciat prin trasarea curbilor de creștere pe baza **Alog₂** a densității optice [20]. La finele perioadei de creștere s-a determinat biomasa (substanța uscată), concentrația pigmentilor asimilatori și a proteinelor celulare.

Expunerea la lumina de diferite intensități PAR (radiația activă fotosintetic) a suspensiei de alge s-a efectuat la 1500, 2000, 2500 și 3000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, timp de 120 minute, la temperatura camerei (perioada de iluminare). Ca sursă de lumină s-au folosit becuri halogen

reglabile de 500W. Suspensia a fost agitată magnetic pe întreaga durată a expunerii la lumină pentru omogenizarea umbririi celulare, iar între suspensie și sursa de lumină s-a interpus un filtru cu apă pentru evitarea încălzirii. Probele analitice au fost prelevate la intervale de 15 și 30 minute, prin filtrare.

După expunerea la lumină, suspensia algală s-a menținut la semiîntuneric timp de 120 minute pentru epoxidarea zeaxantinei (perioada de refacere, reconversie) și la finele perioadei s-a determinat conținutul în pigmenți asimilatori și în proteine celulare.

Pigmenții (clorofila a și b, carotenoide), extrași cu acetonă, s-au estimat spectrofotometric pe baza coeficienților specifici de absorbție [1, 12], rezultatele fiind exprimate în mg. l^{-1} suspensie algală. Proteinele s-au determinat după metoda Lowry și colab. [13].

Fluorescența clorofilei s-a măsurat cu fluorometrul PAM-200 corespunzător lui Schreiber și colab. [19]. Parametrii fluorescenței și analiza stingerii s-a efectuat prin aplicarea metodei pulsului de saturație. F'_0 s-a determinat folosindu-se lumina de excitare roșie. Coeficientul q_N s-a calculat corespunzător definiției Stern-Volmer pentru F_m . Eficiența actuală a PS II s-a calculat după Demmig-Adams și Adams [4].

Rezultate și discuții. *Procesul de creștere.* Curba de creștere a culturilor de *Chlorella* la lumina moderată de $450 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, este redată în Fig. 2. Culturile au prezentat o creștere rapidă, fără fază latentă, atingându-se o rată de creștere exponențială $R = 0,373$; o rată medie de creștere $R_m = 0,13$ și un timp de generație $g = 2,68$. S-a acumulat o cantitate de biomasă de $0,495 \text{ g. l}^{-1}$, bogată în proteine și pigmenți asimilatori (Fig. 3).

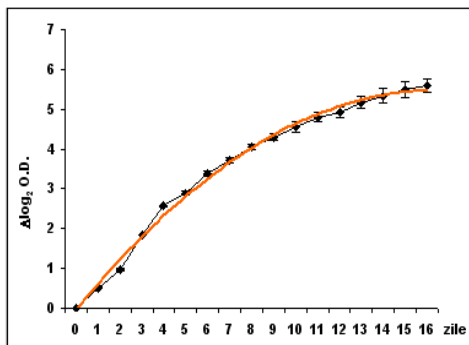


Fig. 2. Curba de creștere exponențială a culturii de *Chlorella* fusca

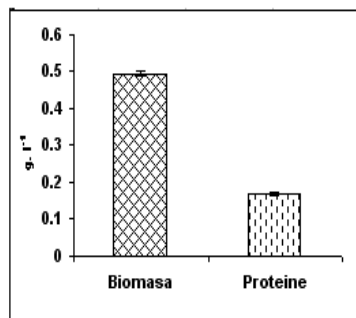


Fig. 3. Acumularea de biomasă și proteine la cultura de *Chlorella* fusca.

Activitatea fotochimică a PS II în timpul perioadei de iluminare. Preiluminarea cu diferite intensități de lumină a determinat scăderea fluorescenței F_0 în primele 30 minute apoi creșterea acesteia în raport direct cu durata de expunere, exceptând lumina de intensitatea $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Fig. 4). În general, valorile lui F_0 au depășit valorile martorului. F_0 a crescut datorită instalării fotoinhibiției [21]. Fluorescența maximă F_m a scăzut în raport cu durata de expunere, exceptând lumina de $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ la care în primele 60 minute F_m a scăzut, apoi a crescut spre finalul expunerii (Fig. 4). Fotoinhibiția în mod normal mărește nivelul F_0 în timp ce F_m scade [15]. Scăderea fluorescenței variabile atestă scăderea numărului de Q_A oxidați și reduși (scade volumul de plastochinonă), contribuind la scăderea ratei de captare a energiei excitației a PS II. Scade fluorescența variabilă și crește activitatea de disipare neradiativă a energiei excitației (q_N). În aceste condiții starea de energizare a membranelor tilacoidale precum și rata închiderii centrilor de reacție PS II la lumină este ridicată [10].

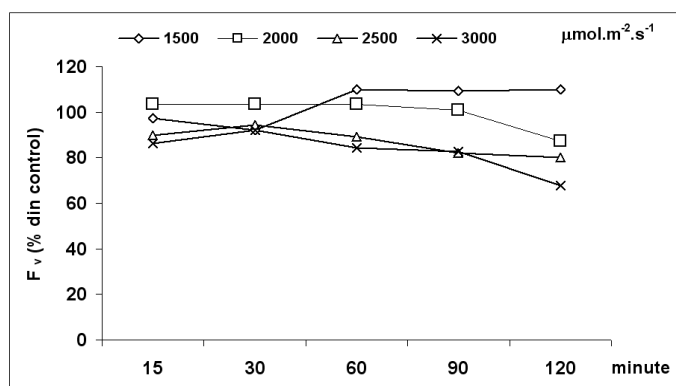


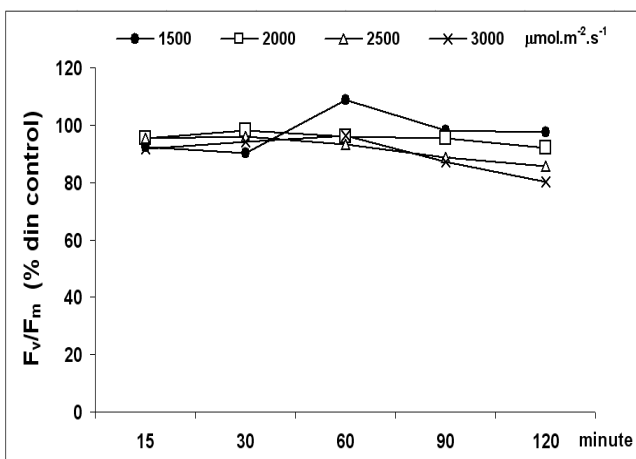
Fig. 4. Evoluția fluorescenței variabile în timpul preiluminării timp de 120 minute.

Eficiența activității fotochimice a fotosistemului PS II (F_v / F_m), în general, a scăzut în raport cu intensitatea luminii și cu durata de expunere la lumină. Eficiența captării excitației de către centrii de reacție PS II a fost afectată la intensitățile ridicate de lumină deoarece a scăzut numărul centrilor deschiși. Excepție au făcut intensitățile de 1500 și $2000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ la care în primele 30 minute de expunere, eficiența fotochimică a fost ușor stimulată (Fig. 5). Eficiența intrinsecă a centrilor de reacție deschiși ai PS II s-a redus la variantele preiluminate datorită fotoinhibiției. Eficiența actuală exprimă procentul de lumină absorbită ce este utilizată în fotochimia fotosistemului PS II. S-a înregistrat o scădere a eficienței actuale a PS II în dependență de intensitatea luminii și durata de expunere la lumină comparativ cu valorile martorului (Fig. 6). Această scădere se datorează reducerii eficienței intrinseci a PS II precum și intensificării disipării termice a energiei.

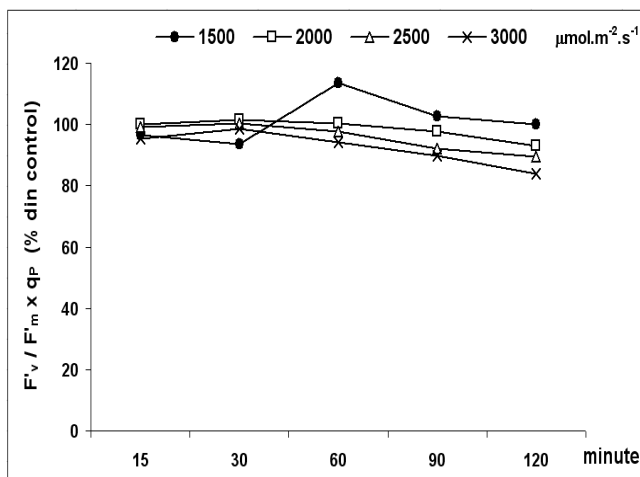
Producția cuantică a fotosistemului PS II, care exprimă eficiența transportului de electroni per cuantă absorbită, a scăzut în dependență cu intensitatea luminii și durata de expunere (Fig. 7). Astfel, lumina de $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a dezvoltat o producție cuantică apropiată valorilor martorului. Celelalte intensități de lumină au dezvoltat o producție cuantică apropiată martorului în primele 30 minute, apoi au devenit inhibitoare. Aceasta înseamnă că centrii de reacție ai PS II se închid treptat cu durata expunerii ducând la scăderea performanțelor fotosintezei prin scăderea transportului neciclic de electroni. Se

ACTIVITATEA FOTOCHIMICĂ A PS II

reduce fracția de lumină absorbită și utilizată în transportul electronilor, mecanism de reglare în jos a fotochimiei PS II, având rol de protecție la supraexcitare în condițiile luminii în exces. Prin reglarea în jos scade eficiența fotochimică a PS II și se intensifică disiparea nefotochimică a energiei excitației [16].

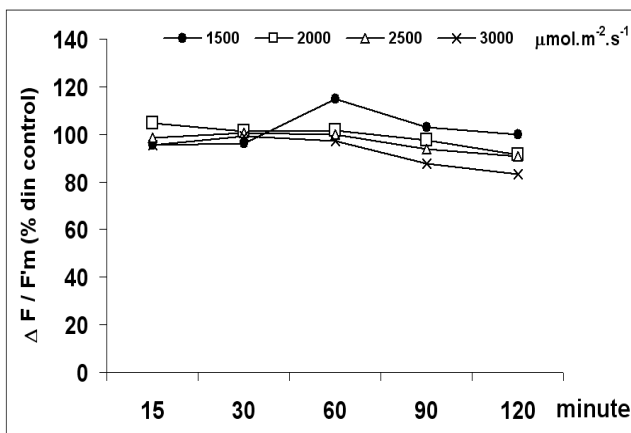


Fi g. 5. Eficiența fotochimică a PS II în timpul preiluminării.

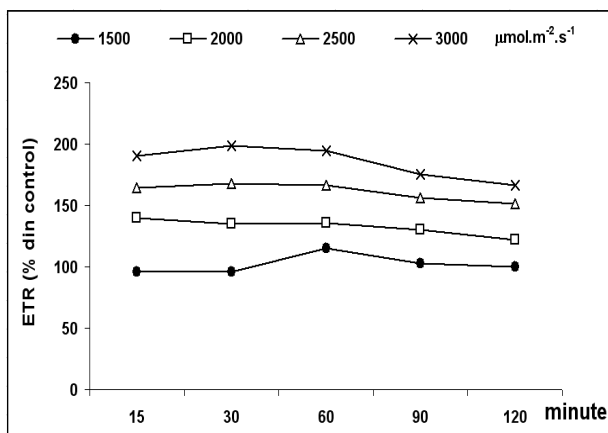


Fi g. 6. Eficiența actuală a PS II.

Rata transportului fotosintetic de electroni este prezentată în Fig. 8. S-au înregistrat rate diferite ca mărime în funcție de intensitatea luminii: de la 432 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ la lumina de 1500 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ până la 863 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ la 3000 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Rata transportului neciclic de electroni crește cu intensitatea luminii datorită creșterii energizării membranelor tilacoidale ceea ce duce la reducerea producției cuantice a centrilor de reacție PS II deschiși [8].



F i g. 7. Producția cuantică a PS II în timpul preiluminării.



F i g. 8. Rata transportului fotosintetic de electroni

În raport cu durata de expunere, în primele 60 minute s-a intensificat rata transportului de electroni în lanțul neciclic, după care valorile sau redus la toate intensitățile de lumină. Excepție a făcut lumina de 2000 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ care s-a dovedit inhibitoare și cea de 1500 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a cărei efecte au fost similare valorilor martorului.

Atenuarea activității fotochimice (q_p) a fotosistemului PS II a fost foarte intensă la variantele tratate cu lumină în raport cu martorul și s-a dovedit dependentă de intensitatea luminii. Astfel, la intensitățile de 1500 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ și 2000 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, în primele 30 minute a scăzut q_p , urmând o perioadă de relaxare între 30-60 minute, ca apoi să scadă puternic spre finalul expunerii la lumină. La intensitățile de 2500 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ și 3000 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ diminuarea lui q_p a fost foarte intensă, exceptând perioada de relaxare (Fig. 9). Valorile reale ridicate ale lui q_p evidențiază convertirea efectivă a energiei excitației în fotochimie producându-se o cantitate redusă de fluorescență.

ACTIVITATEA FOTOCHIMICĂ A PS II

Procesul de disipare neradiativă a energiei excitației exprimat prin q_N s-a dovedit dependent de intensitatea luminii și de durata de expunere (Fig. 10). La intensitatea de $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ disiparea nefotochimică a energiei a scăzut în primele 30 minute de expunere la lumină, urmând o perioadă de relaxare la 60 minute, ca apoi să scadă din nou. La intensitățile de $2000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ și $3000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, activitatea de disipare nefotochimică a energiei excitației a crescut în raport cu durata expunerii. La lumina de $2500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ valorile lui q_N s-au redus intens în primele 60 minute, apoi s-au mărit spre finalul expunerii. Valorile măsurate ale lui q_N situate sub 0, 5 vorbesc de un intens mecanism de energizare a membranelor tilacoidale la intensitățile de lumină experimentate. Mecanismul de reglare în jos a activității PS II este dominat de coeficientul Stern-Volmer. În absența reglării în jos, proporția centrilor de reacție deschiși va scădea cu mărirea intensității luminii [16]. Când q_N atinge valori ridicate datorită componentei sale dependente de energie indică faptul că fotoinhibiția a fost precedată de reglarea în jos [21]. Din punct de vedere fiziologic, q_N reprezintă un mecanism protectiv care ține constantă durata de viață a excitației la nivelul nucleului PS II [11].

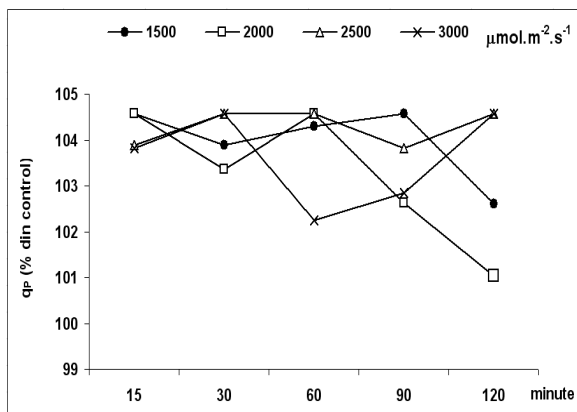


Fig. 9. Stingerea fotochimică a fluorescenței clorofilei în timpul preiluminării timp de 120 minute.

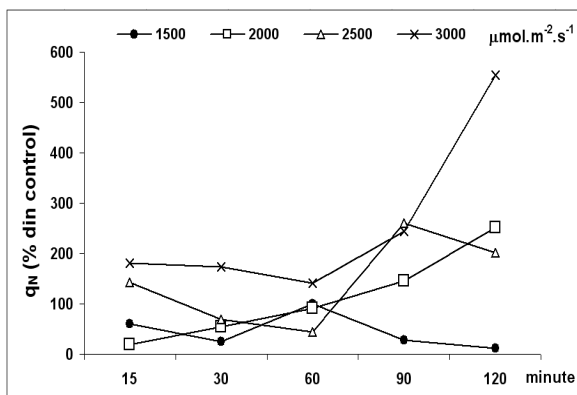


Fig. 10. Disiparea nefotochimică a energiei excitației la nivelul PS II.

Activitatea fotochimică a PS II în timpul perioadei de refacere. În perioada refacerii, variantele preiluminate cu intensități diferite de lumină s-au păstrat la întuneric pentru monitorizarea evoluției parametrilor fotosintetici. Astfel, fluorescența variabilă F_v a atins valorile matorului în primele 15 minute de refacere, totul depinzând de fotodistrugerile provocate de intensitățile luminii. Lumina de $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ s-a dovedit ușor suportată de celula algală, astfel că refacerea a fost foarte semnificativă, obținându-se valori mai mici pentru F_0 și mai mari pentru F_m comparativ cu matorul. Refacerea lui PS II depinde de starea de inactivare produsă de lumină [21]. Relaxarea rapidă a F_m la întuneric atestă implicarea în stingerea fluorescenței a complexelor LHC II [6]. Toate aceste schimbări în antenna PS II au determinat ajustarea fluorescenței variabile F_v care a atins valorile matorului, exceptând lumina de $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Fig. 11).

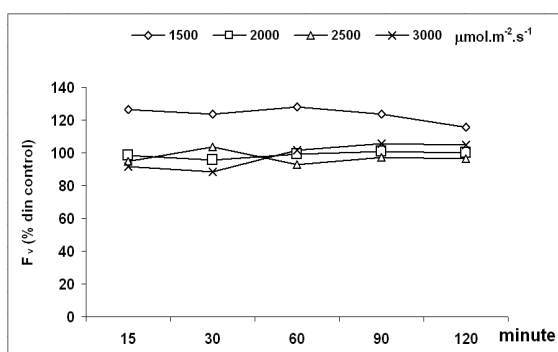


Fig. 11. *Evoluția fluorescenței F_v în timpul perioadei de refacere timp de 120 minute la variantele preiluminate.*

Eficiența fotochimică a fotosistemului PS II a rămas afectată în perioada refacerii. Intensitățile ridicate de lumină produc fotodistrugerii la nivelul centrilor de reacție PS II încât activitatea fotochimică rămâne tributară timpului și condițiilor de refacere impuse (Fig. 12). Expunerea îndelungată la lumină puternică duce la crearea situației stabile la nivelul PS II denumită fotoinhibiție s-au fotoinactivare [9] și necesită timp pentru relaxare ori îndepărtare în dependență cu distrugerile în centrul de reacție PS II [11].

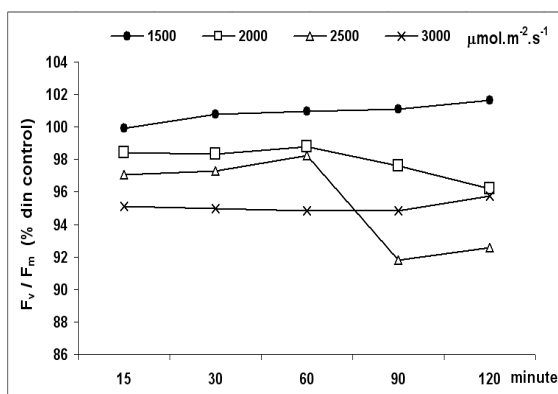


Fig. 12. *Eficiența fotochimică (F_v/F_m) a PS II în timpul perioadei de refacere*

Producția cuantică $\Delta F/F'_m$ a tins să se refacă substanțial în primele 30 minute de păstrare la întuneric, dar transportul neciclic al electronilor a rămas evident afectat. Rămân dominanți centrul de reacție reduși ai fotosistemului PS II. Varianta tratată cu lumină de $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, și-a refăcut eficiența fotochimică și producția cuantică, comparativ valorilor matorului (Fig. 13).

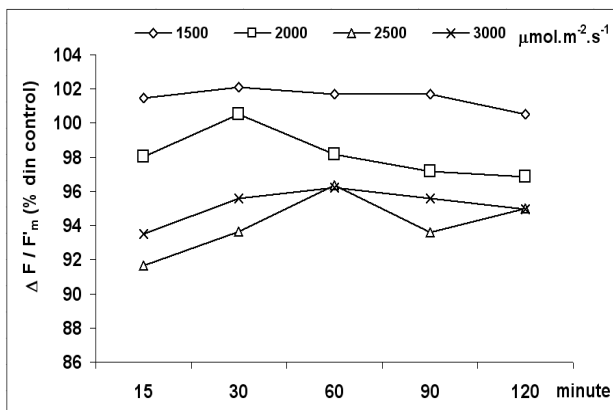


Fig. 13. Producția cuantică a PS II în timpul perioadei de refacere.

Stingerea fotochimică s-a intensificat depășind valorilor matorului, având un răspuns bifazic cu două maxime la 30, respectiv 90 minute de refacere (Fig. 14).

Acest răspuns bifazic evidențiază heterogenitatea mărimii antenei PS II [17].

Starea de reducere a PS II s-a menținut ridicată. Activitatea de disipare nefotochimică a energiei excitației s-a redus semnificativ după 15 minute de refacere la variantele supuse anterior iluminării (Fig. 15). S-a ajuns la valori de circa 40 %, comparativ cu matorul. Relaxarea lui q_N la întuneric arată o decădere inițială care se raportează componentei acestuia (q_E) dependente de energie [7].

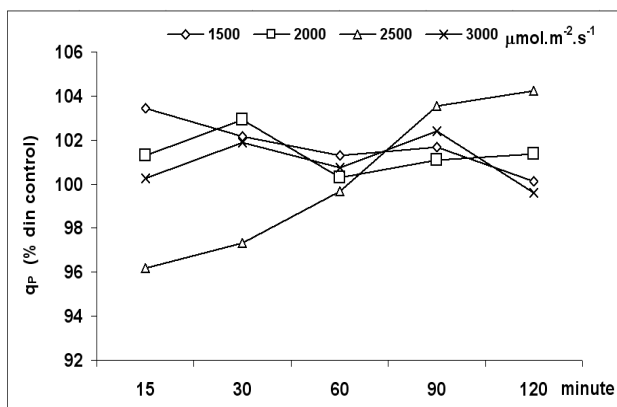


Fig. 14. Evoluția parametrului q_P în timpul perioadei de refacere la variantele preiluminate.

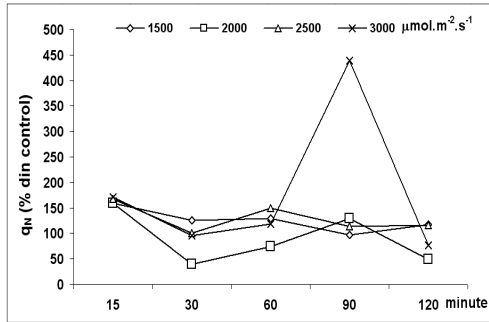


Fig. 15. Evoluția parametrilor q_N în timpul perioadei de refacere

Acumularea pigmentilor asimilatori s-a intensificat la sfârșitul perioadei de refacere (Fig. 16). Cantitatea de clorofile a depășit valorile matorului. Aceste organisme oxigenice au capacitatea de ași ajusta mărimea și compoziția complexelor captatoare de lumină (LHC) din jurul centrilor de reacție prin schimbările în cantitatea de lamele granale și stromatice [7]. Conținutul în carotenoide a scăzut simțitor. În paralel, a scăzut și cantitatea proteinelor celulare, exceptând varianta energizată cu lumina de $2500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Fig. 17). Crește conținutul celular în clorofile și totodată polipeptidele captatoare de lumină [14].

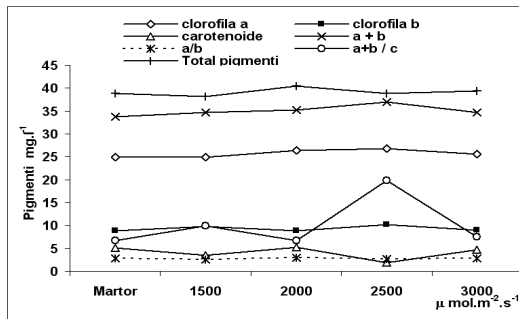


Fig. 16. Conținutul în pigmenți asimilatori la finele perioadei de refacere a variantelor de *Chlorella* anterior preiluminate

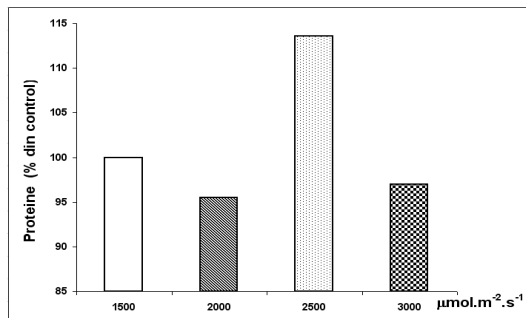


Fig. 17. Conținutul în proteine la finele perioadei de refacere la variantele de *Chlorella* anterior preiluminate.

Concluzii. Rezultatele referitoare la activitatea fotochimică *in vivo* a fotosistemului PS II sub acțiunea diferitelor intensități de lumină pe durate diferite de expunere precum și în perioada de refacere după înlăturarea energiei luminoase au evidențiat următoarele:

1. Fluorescența minimă F_0 a crescut, fluorescența maximă F_m a scăzut, ceea ce a determinat scăderea fluorescenței variabile contribuind la scăderea ratei de captare a energiei de excitare a PS II. Scade fluorescența variabilă și crește activitatea de disipare neradiativă a energiei excitației (q_N). În aceste condiții starea de energizare a membranelor tilacoidale precum și rata închiderii centrilor de reacție PS II la lumină este ridicată.

2. Eficiența captării excitației de către centrii de reacție PS II a fost afectată la intensitățile ridicate de lumină deoarece a scăzut numărul centrilor deschiși. Eficiența intrinsecă a centrilor de reacție deschiși ai PS II s-a redus la variantele preilluminate datorită fotoinhibiției. Eficiența actuală a scăzut în dependență de intensitatea luminii și durata de expunere.

3. Producția cuantică, care exprimă eficiența transportului de electroni per cuantă absorbită, a scăzut în dependență cu intensitatea luminii și durata de expunere. Se reduce fracția de lumină absorbită și utilizată în transportul electronilor, mecanism de reglare în jos a fotochimiei lui PS II, având rol de protecție la supraexcitare în condițiile luminii în exces. Rata transportului neciclic de electroni crește cu intensitatea luminii datorită creșterii energizării membranelor tilacoidale ceea ce duce la reducerea producției cuantice a centrilor de reacție PS II deschiși.

4. Stingerea activității fotochimice (q_p) s-a dovedit dependentă de intensitatea luminii. Valorile reale ridicate ale lui q_p evidențiază convertirea efectivă a energiei de excitare în fotochimie producându-se o cantitate redusă de fluorescență. Procesul de disipare neradiativă a energiei excitației exprimat prin q_N s-a dovedit dependent de intensitatea luminii și de durata de expunere. Valorile măsurate ale lui q_N situate sub 0,5 vorbesc de un intens mecanism de energizare a membranelor tilacoidale la intensitățile de lumină experimentate. Mecanismul de reglare în jos a activității PS II este dominat de coeficientul Stern-Volmer.

5. Activitatea fotochimică a PS II în timpul perioadei de refacere s-a caracterizat printr-o fluorescență variabilă care a atins valorile martorului, o eficiență fotochimică și o producție cuantică cu transportul neciclic al electronilor afectate. Stingerea fotochimică a prezentat un răspuns bifazic cu două maxime ceea ce evidențiază heterogenitatea mărimii antenei PS II. Starea de reducere a PS II s-a menținut ridicată, iar activitatea de disipare nefotochimică a energiei excitației s-a redus semnificativ datorită componentei acestuia (q_E) dependente de energie. Cantitatea de clorofile a depășit valorile martorului, iar conținutul în carotenoide a scăzut simțitor. În paralel, a scăzut și cantitatea proteinelor celulare.

BIBLIOGRAFIE

1. Arnon, D. I., *Copper enzymes in chloroplasts. Polyphenyloxidase in Beta vulgaris*, "Plant Physiol.", **24**, 1949, 1-15.
2. Bilger, W., Björkman, O., Thayer, S. S., *Light-induced spectral absorbance changes in relation to photosynthesis and the epoxidation state of xanthophyll cycle components in cotton leaves*, "Plant Physiol.", **91**, 1989, 542-551.
3. Briantais, J. M., Verrotte, C., Picaut, M., Krause, G. H., *A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts*, „Biochim. Biophys. Acta”, **548**, 1979, 128-138.

4. Demmig-Adams, B., Adams, W. W., *Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species*, "Planta", **198**, 1996, 460-470.
5. Dragoș, N., Péterfi, L. Șt., Momeu, L., Popescu, C., *An introduction to the algae and the culture collection of algae at the Institute of the Biological Research Cluj-Napoca*, Cluj Univ. Press, 1997.
6. Falk, S., Krol, M., Maxwell, D. P., Rezausoff, D. A., Gray, G. R., Huner, N. P. A., *Changes in in vivo fluorescence quenching in rye and barley as a function of reduced PS II light harvesting antenna size*, "Physiol. Plant.", **91**, 1994, 551-558.
7. Falk, S., Bruce, D., Huner, N. P. A., *Photosynthetic performance and fluorescence in relation to antenna size and absorption cross-sections in rye and barley grown under normal and intermittent light condition*, "Photosynth. Res.", **42**, 1994, 145-155.
8. Genty, B., Briantais, J. M., Baker, N. R., *The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence*, "Biochim. Biophys. Acta", **990**, 1989, 87-92.
9. Horton, P., Ruban, A. V., Walters, R. G., *Regulation of light harvesting in green plants. Indication by nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence*, "Plant Physiol.", **106**, 2, 1994, 415-420.
10. Koblížek, M., Kafařan, D., Nedbal, L., *On the relationship between the non-photochemical quenching of the chlorophyll fluorescence and the photosystem II light harvesting efficiency. A repetitive flash fluorescence induction study*, "Photosynth. Res.", **68**, 2001, 141-152.
11. Laisk, A., Oja, V., *Alteration of photosystem II properties with non-photochemical excitation quenching*, "Phil. Trans. R. Soc. London. B", **355**, 2000, 1405-1418.
12. Lichtenthaler, H. K., Wellburn, A. R., *Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents*, "Biochem. Soc. Trans.", **603**, 1983, 591-592.
13. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, "J. Biol. Chem.", **193**, 1951, 265-275.
14. Maxwell, D. P., Falk, S., Huner, N. P. A., *Photosystem II excitation pressure and development of resistance to photoinhibition. I. Light-harvesting complex II abundance and zeaxanthin content in Chlorella vulgaris*, "Plant Physiol.", **107**, 1995, 687-694.
15. Müller, P., Li, X. P., Niyogi, K. K., *Non-photochemical quenching. A response to excess light energy*, "Plant Physiol.", **125**, 2001, 1558-1566.
16. Oxenburgh, K., Baker, N. R., *An evaluation of the potential triggers of photoinactivation of photosystem II in the context of a Stern-Volmer model for downregulation and the reversible radical pair equilibrium model*, "Phil. Trans. R. Soc. London B", **355**, 2000, 1489-1498.
17. Park, Y. I., Chow, W. S., Anderson, J. M., *The quantum yield of photoinactivation of photosystem II in pea leaves is greater at low than high photon exposure*, "Plant Cell Physiol.", **36**, 6, 1995, 1163-1167.
18. Powles, W., *Photoinhibition of photosynthesis by visible light*, "Annu. Rev. Plant Physiol", **35**, 1984, 15-44.
19. Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W., *Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer*, "Photosynth. Res.", **10**, 1986, 51-62.
20. Stein, J. R., *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1973.
21. van Wijk, K. J., van Hasselt, P. R., *Kinetic resolution of different recovery phases of photoinhibited photosystem II in cold-acclimated and non-acclimated spinach leaves*, "Physiol. Plant.", **87**, 1993, 187-198.

INFLUENȚA MICROELEMENTELOR CUPRU ȘI ZINC ASUPRA DINAMICII FOSFORULUI ÎN FRUNZELE DE CĂPȘUN (*FRAGARIA ANANASSA* D.)

LAURA GROZA* și CRISTINA DOBROTĂ**

SUMMARY. – **The Influence of Copper and Zinc on the Dynamic of Phosphorus in Strawberry (*Fragaria ananassa* D.) Leaves.** Despite the wide range of copper and zinc concentrations in agricultural soils, and the potentially-toxic effects on plants of high concentrations of these elements, relatively few studies have examined their impact on other mineral nutrients. In this study, we examined the effects of copper and zinc supply on the dynamic of phosphorus in plant leaves. Strawberry plants (Redgauntlet cultivar) were grown in a 1:1:1 (v/v/v) soil:sand:silt mixture watered to saturation every other day and fertilized with a mineral solution containing N 15%, P 15%, and K 15%. Foliar applications of copper and zinc concentrations ranging from no added to concentration $5 \cdot 10^{-2}\%$ (expected to be toxic) were tested. In all treatments, copper supply significantly enhance the phosphorus concentration in plant leaves, but not the zinc supply. However, phosphorus concentration progressively decreased over time in all Cu or Zn treatments, remaining anyway higher than the control. These results suggest a progressing phosphorus deficiency in plants that received little or no supplemental copper. These results are consistent with results from studies on a range of agricultural plants, which suggest that Cu is required in low concentrations by plants for normal functioning and becomes toxic at higher concentrations.

Dezvoltarea industrială are ca urmare o accentuare a poluării mediului înconjurător cu substanțe dintre cele mai diverse. În zonele poluate cu metale grele s-a observat diminuarea procesului de creștere a organelor vegetative și a producției de biomasă, fenomen explicat prin influența poluanților asupra unor procese fiziologice de bază cum sunt fotosinteza [1] sau respirația [10]. Metalele grele ușor solubile ajung rapid în plante pe cale foliară, dar sunt și mai ușor spălate decât cele absorbite pe cale radiculară [5]. Elemente cum sunt Cu, Cd și Zn aplicate extraradicular pentru controlul atacurilor patogene pătrund cu ușurință în plante la nivel foliar datorită permeabilității cuticulare crescute [3].

Cuprul este un element esențial pentru creșterea și dezvoltarea plantelor, deși în concentrații ridicate este potențial toxic. Participă la numeroase procese fiziologice și este un important cofactor al metalotioneinelor. Metalotioneinele reduc stresul oxidativ indus de metale și le leagă, eliberându-le treptat [9]. În exces, cuprul inhibă creșterea plantelor și dereglează numeroase procese celulare cum ar fi: transportul de electroni din fotosinteză, respirația mitocondrială și răspunsul plantelor la stresul oxidativ. Deoarece cuprul este în același timp un cofactor esențial și un element toxic, plantele au dezvoltat numeroase strategii pentru a-i regla homeostazia. Aceste strategii trebuie să prevină circulația formelor reactive libere și să asigure legarea acestora în structura metaloproteinelor [10].

* Colegiul Național Mihai Eminescu, Satu Mare

** Universitatea "Babeș-Bolyai", Facultatea de Biologie și Geologie, str. Kogălniceanu 1, 3400 Cluj-Napoca, România. E-mail: crisd@bioge.ubbcluj.ro

Concentrațiile ridicate de azot și fosfor în plantele de cultură determină o productivitate crescută a acestora dar măresc și incidența atacurilor patogene [2]. Ca atare este necesar un tratament adecvat cum ar fi aplicarea foliară de sulfat de cupru la plantele de căpșun care este o practică frecventă de limitare a atacurilor patogene [6]. Între diferitele elemente minerale există interacțiuni complexe ca de exemplu, suplimentarea cu zinc reduce acumularea Cd în țesuturi prin inhibarea absorbției radiculare a acestuia [4]. La concentrații ridicate de cupru are loc o scădere a ratei fotosintezei datorată unui deficit de magneziu, pentru că absorbția radiculară a cuprului intră în competiție cu absorbția magneziului care este un component central al moleculei de clorofilă.

Abilitatea de a dezvolta rezistența la metale grele este genetică, dar poate fi modificată prin adaptare. Chemo-ecotipurile dezvoltă modele caracteristice de izoenzime; apar proprietăți care măresc capacitatea protoplasmii de a rezista la concentrații ridicate de metale grele. Una dintre strategiile adoptate de către plante pentru reducerea toxicității metalelor este sinteza de metalotioneine.

Veriga de legătură între elementele metalice și conținutul în fosfor, respectiv modificările structurale care apar la nivelul plantelor este reprezentată de hormonii vegetali. Astfel, cercetări recente arată faptul că etilena reglează rata maximă de elongație a rădăcinilor în condiții de carență de fosfor [11] iar citochininele reglează genele implicate în sinteza metalotioneinelor în deficiența de cupru [9].

Studiul de față își propune stabilirea relației existente între aplicările de cupru și zinc și conținutul în fosfor al plantelor de căpșun.

Materiale și metode. Experimentele au fost realizate la Stațiunea de Cercetări Pomicole și Producție Viile Satu Mare – ferma Turulung, situată la o distanță de 12 km de localitatea Turț (exploatare minieră de metale neferoase: cupru, zinc, plumb, argint etc.). Plantația de căpșun a fost înființată în anul 2000, utilizându-se soiul Redgauntlet și sistemul de cultură în rânduri simple, la distanța de 80/20 cm.

Soiul de căpșun Redgauntlet este un soi de origine engleză, cu o vigoare mijlocie și portul mediu. Florile sunt parțial ascunse între frunze. Fructele sunt mari, conice, regulate, cu pulpa succulentă, gust puțin dulce, acidulat, aromat. Este un soi rezistent la transport, productiv, rezistent la ger, secetă și boli.

Solul utilizat prezintă următoarea compoziție chimică și granulometrică: nisip grosier (2 – 0, 2 mm) – 7, 6%, nisip fin (0, 2 – , 02 mm) – 48, 0%, praf < 0, 002 mm – 20, 7%, argilă < 0, 01 mm – 32, 3, pH 6, 3, humus 1, 37(%), P_{AL} 34, 5 ppm, K_{AL} 148, 0 ppm, Ca schimbabil 4, 79 (ml/100 g), Mg schimbabil 0, 69 (ml/100 g). S-a efectuat fertilizarea suplimentară a solului cu îngrășăminte complexe (300 kg/ha), cu următoarea compoziție: N 15%, P 15%, K 15%.

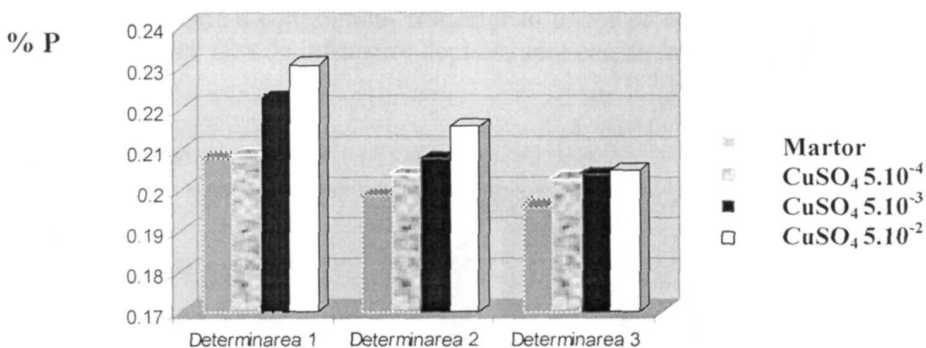
Cultura a fost irigată prin udări prin aspersiune în lunile mai (2) și iunie (3), erbicidată cu Elbatan și tratată fitosanitar cu $CuSO_4$ 1%, Topsin 0, 5-1% și Systhane 1% + Demitan 0, 05 – 0, 08%.

Au fost realizate următoarele variante, cărora li s-au administrat 2 stropiri foliare la un interval de o săptămână: V_1 – martor (H_2O), V_2 – $CuSO_4$ c = $5 \cdot 10^{-4}\%$, V_3 – $CuSO_4$ c = $5 \cdot 10^{-3}\%$, V_4 – $CuSO_4$ c = $5 \cdot 10^{-2}\%$, V_5 – $ZnSO_4$ c = $5 \cdot 10^{-4}\%$, V_6 – $ZnSO_4$ c = $5 \cdot 10^{-3}\%$, V_7 – $ZnSO_4$ c = $5 \cdot 10^{-2}\%$, V_8 – $CuSO_4$ + $ZnSO_4$ c = $5 \cdot 10^{-4}\%$, V_9 – $CuSO_4$ + $ZnSO_4$ c = $5 \cdot 10^{-3}\%$, V_{10} – $CuSO_4$ + $ZnSO_4$ c = $5 \cdot 10^{-2}\%$.

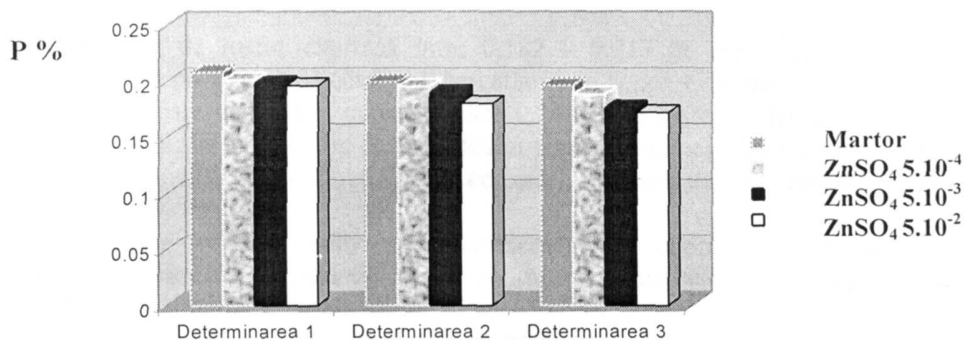
Probele au fost recoltate după prima stropire foliară în timpul înfrunzirii depline (determinarea 1), după a II-a stropire foliară în timpul înfloririi (determinarea 2) și în timpul coacerii depline a fructelor (determinarea 3).

Cantitatea de fosfor din frunze a fost determinată prin metoda spectrofotometrică, iar rezultatele au fost interpretate statistic prin testul *t*, corelație (coeficient de corelație *r*) și curba de răspuns (regresie).

Rezultate și discuții. Analizând dinamica fosforului din frunzele de căpșun sub influența microelementului cupru (figura 1) se constată că odată cu creșterea concentrației soluției de CuSO_4 aplicată are loc și creșterea cantității de fosfor, pentru fiecare variantă în parte. Pe măsură ce se parcurg diversele faze de creștere și dezvoltare ale plantei, de la înfrunzire (determinarea 1) spre înflorire (determinarea 2) și fructificare (determinarea 3) are loc o scădere a cantității macroelementului studiat dar în toate cazurile valorile sunt superioare matorului. Astfel, corelând aceste date cu cele existente în literatură se poate aprecia faptul că acest microelement pe de o parte este în măsură să limiteze atacurile patogene iar pe de altă parte poate stimula producția prin menținerea fosforului la concentrații ridicate.



Fi g. 1. Influența microelementului cupru (CuSO_4 -%) în diferite concentrații asupra conținutului în fosfor (%) în frunzele de căpșun



Fi g. 2. Influența microelementului zinc (ZnSO_4 -%) asupra conținutului în fosfor (%) în frunzele de căpșun

Zincul aplicat sub formă de soluție de ZnSO_4 în concentrații crescânde are ca efect scăderea cantității de fosfor din frunzele de căpșun, odată cu creșterea concentrației soluției de ZnSO_4 , și pe măsură ce sunt parcurse diversele faze de creștere și dezvoltare ale plantei (figura 2). Toate variantele tratate cu soluții de ZnSO_4 au valoarea medie anuală a cantității de fosfor din frunze inferioară matorului.

Figura 3 reprezintă dinamica fosforului în frunzele de căpșun sub influența microelementelor cupru și zinc administrate simultan. Se poate astfel observa faptul că are loc o creștere a cantității de fosfor în paralel cu creșterea concentrației soluției aplicate la valori superioare matorului, în toate variantele experimentale. În același timp are loc o scădere a conținutului frunzelor în fosfor pe măsura parcurgerii fazelor de vegetație dinspre faza de înfrunzire deplină, spre cea de înflorire și apoi de coacere a fructelor.

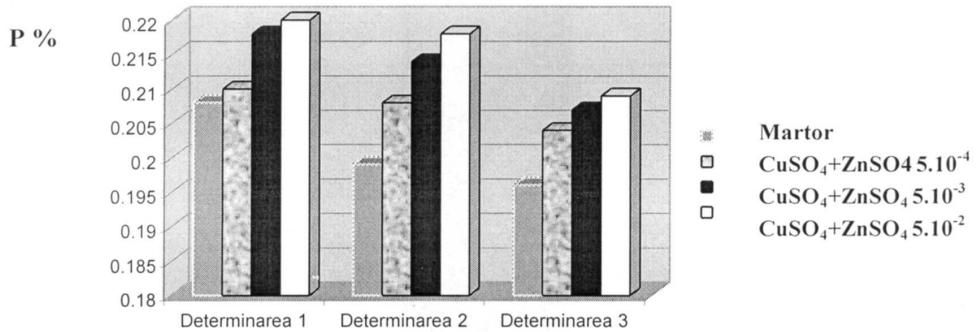


Fig. 3. Influența microelementelor cupru + zinc ($\text{CuSO}_4 + \text{ZnSO}_4$) asupra conținutului în fosfor (%) al frunzelor de căpșun

Cantitatea de fosfor cuprinsă între 0,182 – 0,217 % este mai mică, dar apropiată valorilor prezentate de către unii cercetători de la noi, cum sunt Pașca și Bologa [7], care dau valori cuprinse între 0,24-0,3 % fosfor în fructe în cazul variantelor nefertilizate și un optim de 0,3 % fosfor pentru variantele fertilizate cu N, P, K dar mult mai mici decât cele obținute în cercetări efectuate de alți cercetători din străinătate (0,67 % P) [8].

Rezultatele privind influența microelementelor cupru și zinc asupra conținutului în fosfor al frunzelor de căpșun obținute în urma celor trei ani de studiu (2001-2003), sunt sintetizate în tabelul 1.

Analizând tabelul 1 se observă că variantele tratate cu soluții în concentrații crescânde de CuSO_4 prezintă diferențe semnificative, respectiv distinct semnificative pozitiv față de martor în ceea ce privește conținutul de fosfor din frunze, în timp ce variantele tratate cu soluțiile de ZnSO_4 , deși determină scăderea treptată a valorii indicelui studiat, din punct de vedere statistic diferențele față de martor nu sunt considerate semnificative. Cu toate acestea, administrarea simultană a celor două microelemente produce odată cu creșterea concentrației amestecului o creștere a valorii conținutului de fosfor din frunze, producându-se diferențe pozitive foarte semnificative față de matorul netratat.

În ceea ce privește corelația dintre mator și variantele studiate se observă în toate cazurile o corelație pozitivă accentuată, între mator și varianta tratată cu soluția de $\text{CuSO}_4 + \text{ZnSO}_4 \cdot 5 \cdot 10^{-4}\%$ (V_8) existând o corelație pozitivă absolută.

Reprezentarea grafică a mediei multianuale a conținutului în fosfor al frunzelor de căpșun (figura 4) evidențiază faptul că cel mai ridicat conținut în fosfor îl prezintă varianta tratată cu soluția de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \cdot 10^{-2}$ (V_4), în timp ce varianta tratată cu soluția de $\text{ZnSO}_4 \cdot 5 \cdot 10^{-2}\%$ (V_7) prezintă cel mai scăzut conținut în fosfor, valori apropiate matorului prezentând varianta tratată cu soluția de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \cdot 10^{-4}\%$ (V_2), respectiv varianta tratată cu soluția de $\text{ZnSO}_4 \cdot 5 \cdot 10^{-3}\%$ (V_6).

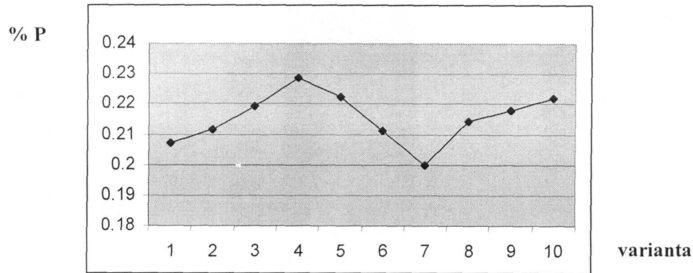


Fig. 4. Influența microelementelor cupru și zinc asupra conținutului frunzelor de căpșun în fosfor (media multianuală)

Tabel 1

Influența microelementelor cupru și zinc asupra conținutului frunzelor de căpșun în fosfor (%)

varianta	Cantitatea de fosfor (%) din frunzele de căpșun Medii anuale			Media generală	% față de martor	r față de martor	t față de martor	Semnificația t
	2001	2002	2003					
V ₁ martor	0, 207	0, 201	0, 2133	0, 2071	100	-	-	-
V ₂ CuSO ₄ c=5.10 ⁻⁴ %	0, 20903	0, 2053	0, 2207	0, 2118	102, 2694	0, 967	3, 145	*
V ₃ CuSO ₄ c=5.10 ⁻³ %	0, 2237	0, 2117	0, 2229	0, 2194	105, 9392	0, 827	5, 590	**
V ₄ CuSO ₄ c=5.10 ⁻³ %	0, 233	0, 2173	0, 236	0, 2288	110, 478	0, 926	7, 609	**
V ₅ ZnSO ₄ c=5.10 ⁻⁴ %	0, 227	0, 1947	0, 2453	0, 2223	107, 3394	0, 985	1, 347	0
V ₆ ZnSO ₄ c=5.10 ⁻³ %	0, 2137	0, 188	0, 232	0, 2112	101, 9797	0, 994	0, 447	0
V ₇ ZnSO ₄ c=5.10 ⁻² %	0, 1963	0, 1827	0, 22	0, 1997	96, 4268	0, 990	-1, 005	0
V ₈ CuSO ₄ +ZnSO ₄ c=5.10 ⁻⁴ %	0, 2143	0, 2073	0, 2213	0, 2143	103, 4766	1	14, 596	***
V ₉ CuSO ₄ +ZnSO ₄ c=5.10 ⁻³ %	0, 2163	0, 213	0, 2247	0, 218	105, 2632	0, 973	13, 316	***
V ₁₀ CuSO ₄ +ZnSO ₄ c=5.10 ⁻² %	0, 2197	0, 2157	0, 2307	0, 222	107, 1946	0, 969	10, 966	***

Semnificația lui t la GL_{eroare} = 4

O – diferențe nesemnificative

* – diferențe semnificative

** – diferențe distinct semnificative

*** – diferențe foarte semnificative,

Semnul “-” indică valori inferioare martorului,

r - coeficient de corelație

Curba de răspuns a conținutului de fosfor al frunzelor de căpșun în urma tratamentelor cu soluțiile de microelemente, față de varianta martor netratată poate fi estimată cel mai exact printr-o regresie pătratică, având ecuația matematică $y=b_0+b_1x+b_2x^2$, valorile coeficienților fiind prezentați în tabelul 2.

Tabel 2

Valorile coeficienților ecuației matematice pentru regresia pătratică în cazul influenței microelementelor cupru și zinc asupra conținutului frunzelor de căpșun în fosfor

Dependent	b0	b1	b2
V2	0.0813	0	3.0395
V3	0.0326	0.9019	0
V4	-0.0843	1.5116	0
V5	-0.6276	4.1038	0
V6	-0.5285	3.5716	0
V7	-0.1154	0	7.3418
V8	-0.0214	1.1380	0
V9	0.1190	0	2.3079
V10	0.0950	0	2.9600

Concluzii. Pe baza cercetărilor efectuate până în acest moment se pot trage următoarele concluzii:

1. Se poate afirma că zincul aplicat în concentrații crescânde sub formă de ZnSO₄ determină o scădere nesemnificativă a conținutului de fosfor din frunzele de căpșun.
2. Cuprul și amestecul cupru + zinc administrate în concentrații crescânde determină o creștere proporțională semnificativă a conținutului de fosfor în frunze.
3. De asemenea, între toate variantele tratate cu soluțiile de microelemente și martorul netratat există corelații pozitive strânse în ceea ce privește conținutul de fosfor al frunzelor.
4. Sub influența microelementelor cupru și zinc dinamica fosforului în frunzele de căpșun înregistrează o scădere treptată dinspre fenofaza de înfrunzire spre fenofaza de înflorire și fructificare, similar martorului, în acord cu necesitățile fiziologice ale plantei

BIBLIOGRAFIE

1. A d e o l a, O. F., *Toxic contamination, health and adaptive responses*, "Environ. Behav.", **32(2)**, 2000, 209-249.
2. A f i n i k i, Z., E m e c h e b e, A. M., A k p a, A. D., A l a b i, O. *Effect of fertilizer levels on grain yield, incidence and severity of downy mildew in pearl millet*, "Archives of Phytopathology and Plant Protection", **38**, 2005, 11-17.
3. G r e g e r, M., K a u t s k y, L., *Effect of Cu, Pb and Zn on two Potamogeton species grown under field conditions*, "Vegetatio", **97**, 1991, 173-184.
4. H a r t, J. J., W e l c h, R. M., W e n d e l l, A. N., C l a r c k, J. M., K o c h i a n, L.V., *Zinc effects on cadmium accumulation and partitioning in near-isogenic lines of durum wheat that differ in grain cadmium concentration*, „New Phytologist”, **166**, 2005, 1-12.
5. J o n e s, R.E., *Back concern for the environment: myths versus reality*, "Soc.Nat.Res.", **11**, 1998, 209-228.
6. L y n c h, M., T r e m b l a y, G., *Control of Angular Leaf Spot in Strawberry using Tribasic Copper Sulphate*, "Adv. in Strawberry Research", **15**, 1996, 29-38.
7. P a s c a, F., B o l o g a, C., *Eficiența îngrășămintelor chimice cu NPK în culturile de căpșun fertilizate la înființare cu îngrășămintă organice*, Ecotehnologii si Biotehnologii în cultura căpșunului, pp.37-45, EuroPrint, Satu Mare, 1995.
8. R o s o n, R. S. A., M a r t i n D e l M a l i n o, I. M., *The influence of nitrogen and potassium on strawberry plants cultivated on sandy soils.*, „Anales des edafologia y agrobiologia”, (**39**), 1980, 9-14.
9. T h o m a s, J. C., P e r r o n, M., L a R o s a, P. C., S n i g o c k i, A. *Cytokinin and the regulation of a tobacco metallothionein-like gene during copper stress*, „Physiol. Plantarum”, **123**, 2005, 262-271.
10. Y r u e l a, I. *Copper in plants*, "Braz. J. Plant Physiol.", **17(1)**, 2005, 145-156.
11. Z h o n g, M., B a s k i n, I., B r o w n, K. M., L y n c h, J. P., *Regulation of root elongation under phosphorus stress involves changes in ethylene responsiveness*, „Plant Physiol.", **131 (3)**, 2003, 1381-1390.

COMPARISON OF THE EFFECT OF SUCCESSED AND UNSUCCESSSED DILUTIONS OF SOME STIMULATING AGENTS IN THE RELEASE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES BY THE HUMAN POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES

MARIANA STEJAR^{1,2} and CORNELIU TARBA¹

SUMMARY. – Despite serious reservations that exist with regard to the efficacy of the homeopathic treatments, many clinical and laboratory physicians as well as biomedical investigators with a strong physico-chemical background continue to pay a special attention to this problem. Aware of the fact that the main obstacle in accepting the idea of homeopathic medicine resides in the difficulty of proposing a plausible explanation to the way in which a substance found in an infinitesimal concentration is capable of producing effects, extremely sophisticated hypotheses (from a physico-chemical point of view) have been lately elaborated, involving as a support for information storage and transmission the complex structure of water in conjunction with the specific methods (succussion/dynamization) by which homeopathic preparations are obtained. Since the essence of such hypotheses relies on the cooperative interactions existing among the water molecules, the homeopathic effects (so far documented mostly at the level of the human organism) should be present and measurable at different structural/functional levels by *in vitro* objective biophysical-biochemical assays, which exclude psychological effects. If the homeopathic phenomena can not be evidenced, *e. g.*, at the molecular/cellular level, the above-mentioned hypotheses are not tenable, regardless of how well articulated they may appear.

In order to test *in vitro* the homeopathic effect, we measured the concentration of the reactive oxygen species (ROS) liberated in the incubation medium during the confrontation of the polymorphonuclear (PMN) leukocytes with stimulating factors, such as concanavalin A (ConA) and phorbol myristate acetate (PMA). These stimulating agents were diluted either conventionally or using homeopathic procedures (succussion/dynamization) while the reduction of cytochrome c (cyt c), measured as the absorbance increase at 550 nm, was chosen as an assay for ROS presence. The incubation medium (1.5 ml), basically made of Hanks buffer, usually contained 10^6 cells/ml, 1 mg/ml cyt c and different conventional or homeopathic dilutions of ConA or PMA. By defining a *stimulation index* as $(A - A_0)/A_0$, where A is the absorbance at 550 nm in the stimulated sample and A_0 is the absorbance in the control sample, we obtained a very useful index for our quantitative evaluations. A similar approach was used in comparing directly the effects of the two types of dilutions (homeopathic and conventional) by calculating the percent differences between the response of paired samples, to which the paired *t* test was applied for establishing the statistical significance. Although we made a very large number of measurements, the number of pairs for each dilution varying between 3 and 13, there were no statistically significant differences in the case of the high and ultrahigh dilutions tested (10^{-4} – 10^{-30}).

¹ Babeș-Bolyai University, Department of Experimental Biology, 400006 Cluj-Napoca, Romania.
E-mail: cntarba@biochem.ubbcluj.ro

² Permanent address: "M. Eminescu" National College, 710155 Botoșani, Romania

Despite serious doubts raised by the scientific community regarding the efficacy of the homeopathic treatments, there are many physicians as well as biomedical investigators with a strong physical and/or chemical background which keep giving this issue a special attention. Hundreds of articles related to this problem, especially in the field of clinical medicine, but not exclusively, appear yearly, some of them published in reputed journals (for example [4, 6, 17-19, 29, 30]). In the USA, there are even patents recorded in this field (see [10]).

The basic tenets of the homeopathic medicine consist of two principles: the *principle of similarity* and the *principle of infinitesimals*. From a practical point of view, the two principles are in fact inseparable and can be summerized as follows: the medical treatment should use minute (infinitesimal) quantities of remedies that in larger doses produce effects similar to those of the disease. In fact, most of the remedies used by the homeopathic medicine are so diluted that they no longer contain any trace of active substance. In order to give a plausible explanation to the way in which a substance found in a state of ultrahigh dilution or ultralow concentration (10^{-30} M or even lower) may still be effective, the partisans of the homeopathic medicine have advanced very sophisticated hypotheses which involve as informational support certain peculiar (even quantic) aspects of water in conjunction with the typical way in which the homeopathic dilutions are obtained, i. e. by serial dilution accompanied by succussion. This procedure is said to dynamize or potentiate the dilution, i. e. to introduce energy and information, eventually enabling the dilution to exert its healing effects. The essence of most of these theories is based on the existence of intermolecular interactions among the water molecules, that lead to the formation of the so-called *water clusters*, the complexity of which could be modulated by the succussion process, thus the information about the original substance being preserved despite the very advanced dilution [1-3, 7, 8, 11, 12, 21, 26, 27, 31]

Since the essence of the explanatory hypotheses relies on the cooperative interactions of the water molecules (i. e., on a physico-chemical phenomenon), the homeopathic effects (so far documented mostly at the level of the human organism, as an entity) should be present and measurable at different structural/functional levels by *in vitro* objective biophysical-biochemical assays, which exclude psychological effects and subjectivity usually involved in clinical evaluations. If the homeopathic phenomena can not be evidenced, for example, at the molecular/cellular level, the above-mentioned hypotheses are not tenable, regardless of how well articulated they may appear. Becoming aware of this fact, a few investigators have tried to use such in vitro assays, most of them employing different types of cells. Some positive or, at least, controversial effects have been reported, especially with cells involved in the immune response of the organism [6, 9, 13, 19, 22, 23, 29, 30].

In an attempt to bring some clarification to this issue, we have decided to explore it by using both physical and (bio)chemical assays capable of testing the response of several types of cells to the presence of different active substances found in a state of variable dilutions, obtained by either homeopathic methods (succussion) or conventional means. Some preliminary results have been reported [25]. The present article is a more complete account of our work on the response of human polymorphonuclear (PMN) leukocytes to two stimulating (activating) agents: concanavalin A (ConA) and phorbol myristate acetate (PMA). It is known that one of the first defense reactions of the PMN cells to the presence of an antigen (pathogenic agent or its products, lectins etc., in general, a

so-called stimulating agent) is a massive production and release of reactive oxygen species (ROS) by a membrane bound NADPH-oxidase [4, 15, 28]. The release can be followed and exactly quantified by a spectrophotometric assay in which cytochrome c (cyt c) is reduced by the electrons donated by ROS [14, 20, 25, 28].

Material and methods. *Preparation of PMN leukocytes.* PMN cells were obtained from integral human blood under the conditions and by methods fully described previously [25]. Briefly, 10 ml of heparinized blood was divided into two equal parts and each carefully pipetted over 2.5 ml of a mixture of Ficoll-Odiston-Hanks (see below the composition of the media used). The two tubes were centrifuged for 20 min at 900 g in a swinging rotor of a thermostated centrifuge (4°C). After the removal of the supernatant by the use of the vacuum pump, 5 ml of a lysis solution was added in each tube, the mixture left in the cold (4°C) for 30 min and then centrifuged at room temperature, for 15 min, at 600 g. In some cases, a second treatment with the lysis solution was needed. This time, however, the cells were left in contact with the lysis solution for a very short period (1-2 min). Each PMN pellet obtained after the removal of the supernatant was suspended in 5 ml Hanks solution and recentrifuged at 350 g for 10 min, followed by a new wash with Hanks and a last centrifugation. Finally, each resulting button of PMN was suspended in 1 ml Hanks and the content of the two tubes pooled together. The concentration of the PMN cells was assessed using a Bürger-Türk hemocytometer. Cell viability verified by the Trypan-Blue exclusion test showed that our cells were alive in a proportion usually greater than 97%.

Preparation of the dilutions. The homeopathic dilutions were prepared according to a protocol that we described at length elsewhere [24]. The starting solution (made in Hanks) had a concentration tested as active from the allopathic (conventional) point of view. This starting dilution (0.33 mg ConA/ml or 33 ng PMA/ml) was dynamized for 2.5-3 min with the aid of an electromechanical device which generates strong, rhythmic shakings (succussions) with a frequency of about 100/min. From this original succussed dilution we made a 1/100 dilution (in Hanks) and, after applying the succussion, a new centesimal dilution was made etc. If the concentration of the original dilution is considered 1 (or 10^0), the next dilution is 10^{-2} and so on. By this procedure, centesimal dilutions up to 10^{-30} and occasionally 10^{-36} were prepared. The normal (conventional) dilutions were prepared by the same serial procedure, but a rather short and gentle stirring was used instead of succussion.

Cell incubation and ROS measurements. Series of test tubes were prepared, each tube containing a constant concentration of PMN cells (10^6 /ml) and cyt c (1 mg/ml) in either a succussed (S) or unsuccussed (N) dilution of ConA or PMA, prepared with Hanks as described above, the final volume being 1.5 ml in each tube. In this type of experiments, the cells were added last, while in preliminary tests, needed to establish the efficacy of the stimulating agents and, generally, the best working conditions, we used straight Hanks while different concentrations of stimulating agents (ConA or PMA) were added last. In each series of test tubes (usually 16), instead of the stimulating agents, in at least one tube we added distilled water or 0.9% NaCl, if ConA was tested, or ethanol, if PMA was tested, since ConA was a salty powder dissolved (or finely suspended) in distilled water and PMA was dissolved in ethanol. The tubes thus prepared were incubated in a gentle shaker, at 37°C, for 45 min. The reaction was then stopped by placing the tubes on ice for 5 min, after which they were centrifuged at 350 g for 10 min. From each tube, 1 ml of supernatant was

placed in a spectrophotometer cuvet and the spectrum recorded between 450 and 600 nm against Hanks solution as reference. Initially, for standardizing reasons, by the aid of the electronic cursor, we read the absorbance at several wavelengths, including 550 nm, 540 nm and the closest maximum and minimum to these wavelengths. Under the conditions of a strong reduction, the absorbance maximum of α band was situated between 549 and 550 nm, while the local minimum was between 534 and 535 nm. Later on, we usually read only the position of the maximum and minimum. Usually, in the literature, the difference of the absorbances recorded at 550 nm in the stimulated sample and the unstimulated one (the control sample, containing the vehicle instead of the stimulating agent) is taken as a *stimulation index*. In our endeavors to standardize the procedure, we observed that the method has two important drawbacks. First, concanavalin A (ConA), which was tested by us initially in concentrations varying between 0.066 and 0.33 mg/ml, is not sufficiently soluble in water (or other solvents) to obtain solutions of exact and sufficient concentration for reliable tests (even at the relatively modest concentration of 5-10 mg/ml, used for our stock solutions, ConA is practically a suspension and not a solution). The second drawback refers to the way in which the stimulating index is calculated, usually as a simple difference, which can vary greatly from one individual to another, from one preparation to another and even from one sample to another. There are also differences between different sources and sometimes even batches of cyt c. The first inconvenient was partly eliminated by using PMA, a much stronger stimulant, which is perfectly soluble in ethanol, at the concentrations employed, and precise aliquots of this drug can be injected with a Hamilton syringe. The concentrations used for standardization in this case varied between 3.3 ng/ml and 66 ng/ml. The second inconvenient was alleviated by redefining the stimulation index, which was computed as $\Delta A/A_0$, in which $\Delta A = A - A_0$, A being the absorbance in the stimulated sample and A_0 the absorbance in the unstimulated sample, both measured at 550 nm. By extension, when comparing the effects of the succussed (S) and unsuccussed or normal (N) dilutions, we could simplify the calculations by considering the unsuccussed (N) dilution as the reference for the corresponding succussed (S) dilution. Then we calculated the percent difference between the responses of the two solutions as $[(A_S - A_N)/A_N]100\%$, where A_S represents the absorbance in the succussed solution and A_N the absorbance in the paired unsuccussed solution, both measured at 550 nm, on the same cell preparation, during the same series of incubation, using the same batch and even preparation of cyt c etc. This procedure was especially helpful because it allowed us to treat together all the pairs obtained during many months of work, regardless of the blood or cyt c used, and establish whether there is a significant difference between the two types of dilutions by applying the paired *t* test.

Substances and solutions used. All the chemicals used were of analytical purity. ConA, PMA, cyt c and Trypan Blue were from Sigma (U. S. A.) and Ficoll from Pharmacia (Sweden). The Ficoll solution is prepared in double distilled water (0.9 g/10 ml) and filtered through filtering paper. Odiston is an aqueous solution of N,N'-diacetyl-3,5-diamino-2,4,5 trizoic acid with methylglucamin obtained from the Romanian pharmacies. Usually, 20 ml Odiston is mixed with 24 ml Hanks, from which 8.33 ml are taken and mixed with the 10 ml Ficoll mentioned above. To these, other 14.17 ml Hanks are added, finally resulting 32.5 ml of Ficoll-Odiston-Hanks with a density of 1.077 g/ml. The Hanks solution is usually prepared as a ten-fold concentrated stock (Hanks 10x). The

following quantities (in g) are dissolved in 800 ml double distilled water: NaCl (80), KCl (4), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2), KH_2PO_4 (0.6), Na_2HPO_4 (1.8), glucose (10). Separately, a solution of $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (1.84 g) in 200 ml is also prepared and, after the complete dissolution of calcium, the two solutions are mixed, with continuous stirring, filtered and stored at 4°C. This solution has a pH of about 6.6. Before using, it is diluted 10 times and pH adjusted to 7.35 with 1M NaOH. The lysis solution is a mixture of 8.29 g NH_4Cl , 1 g $KHCO_3$ and 0.37 mg NaEDTA in 1 liter of double distilled water.

Results and discussion. A few of the results obtained during the standardizing procedures are presented in Figs. 1-4. Fig. 1 and Fig. 2 show the spectrum of cyt c (between 450 and 600 nm) obtained after incubation in the presence of human PMN leukocytes, in the absence of a stimulating factor, i. e., in Hanks buffer only, with the addition of either 0.1 ml distilled H_2O (Fig. 1) or 10 μ l ethanol (Fig. 2). In both cases, the spectrum is characteristic to the oxidized state of the cyt c, with a very small peak close to 550 nm (the so-called α band), followed by a local minimum and a new peak at around 520 nm (the β band). These figures present characteristic control results obtained by us using the typical volumes of the two vehicles employed for the administration of the stimulating factors (water for conA and ethanol for PMA). Practically, the same results were obtained if 0.9% NaCl was used instead of distilled H_2O .

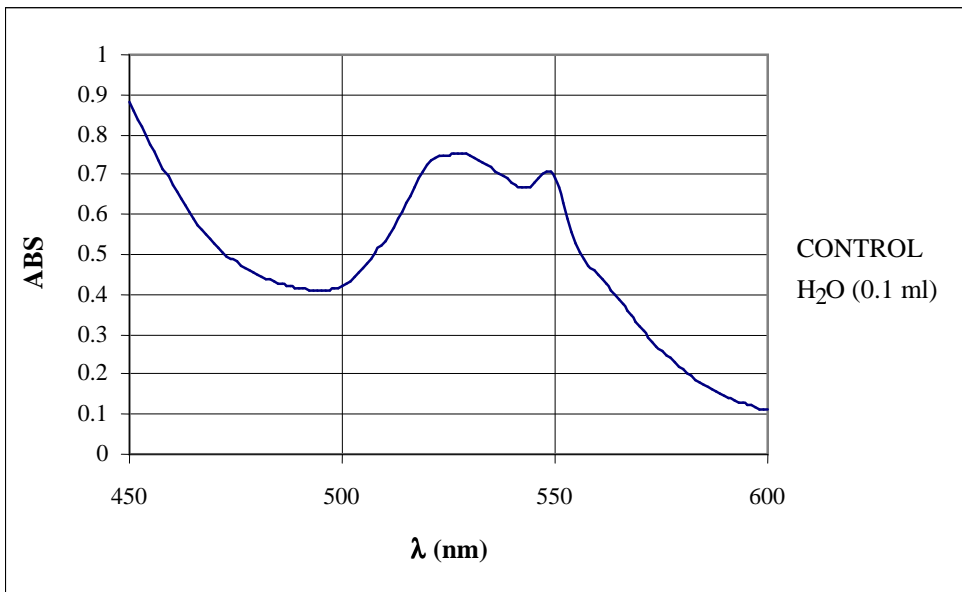


Fig. 1. Cytochrome c spectrum under nonstimulating conditions of the PMN cells (water control)

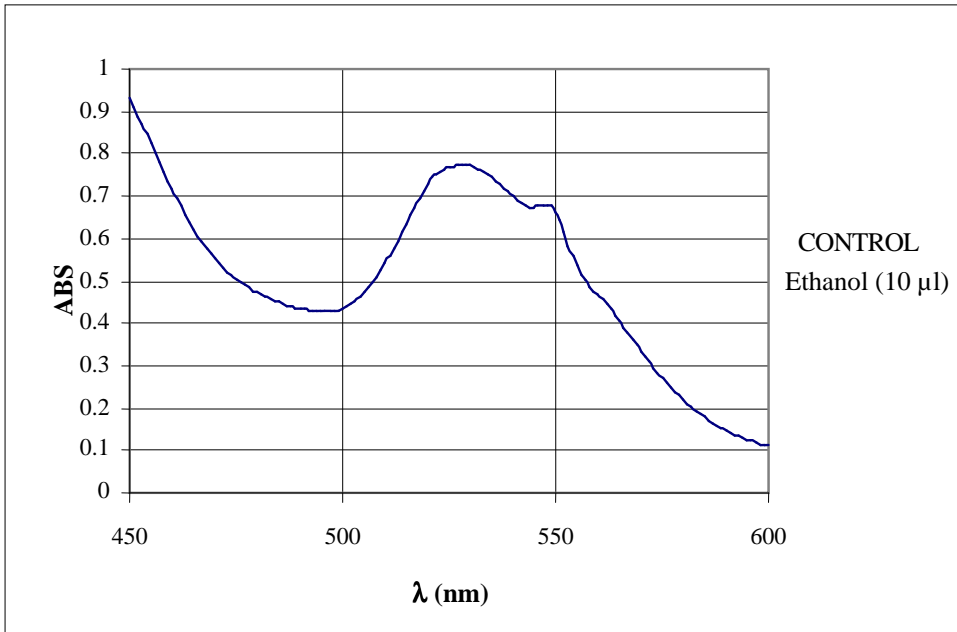


Fig. 2. *Cytochrome c* spectrum under nonstimulating conditions of the PMN cells (ethanol control)

Fig. 3 and Fig. 4 show the results obtained in the presence of the two stimulating agents: 0.33 mg ConA/ml (Fig. 3) or 66 ng PMA/ml (Fig. 4). One can observe a high increase of the absorption maximum around 550 nm (especially in the presence of PMA), characteristic for a strong reduction of cyt c. Although we have occasionally tried higher concentrations of PMA, further increase of the response is very small, suggesting that the cells are close to their maximum stimulation capacity. This is also demonstrated by the fact that, in most of the preparations, clearly lower responses can be observed only if PMA concentration is reduced at least 50 times (not presented here).

There are two ways in which one can check the homeopathic effect of a series of dilutions. According to the theory, one should expect a certain variation in the activity of different dilutions in the series, i. e., some succussed (S) dilutions will show higher activities and some will show lower activities than the corresponding conventional dilutions (N), which serve as control, while still others will have activities similar to their control. Indeed, there are certain reports in the homeopathic literature of sinusoidal (or pseudosinusoidal) variations in different activities tested (for example, [5, 16]). A synthesis of our results and the corresponding statistical calculations in comparing the stimulation of PMN leukocytes by the two complete series of ConA dilutions (S and N) is presented in Table 1, while the corresponding results obtained with PMA are shown in Table 2. As expected for any experimental results, in each case there are certain differences between the two series tested. However, none of these differences appear to be statistically significant, and this is true for both lower (10^{-2} – 10^{-8}) and higher (10^{-10} – 10^{-30}) dilutions, the

last being considered as having a homeopathic potential. There is only one dilution of this type in Table 1 (10^{-30}) in which the percent difference between the succussed and unsuccussed dilutions approaches the significance threshold and this is most certainly a chancy event, due to the small number of pairs measured (3). In none of the cases in which the number of pairs measured was 5 or higher have we observed such a situation.

Error!

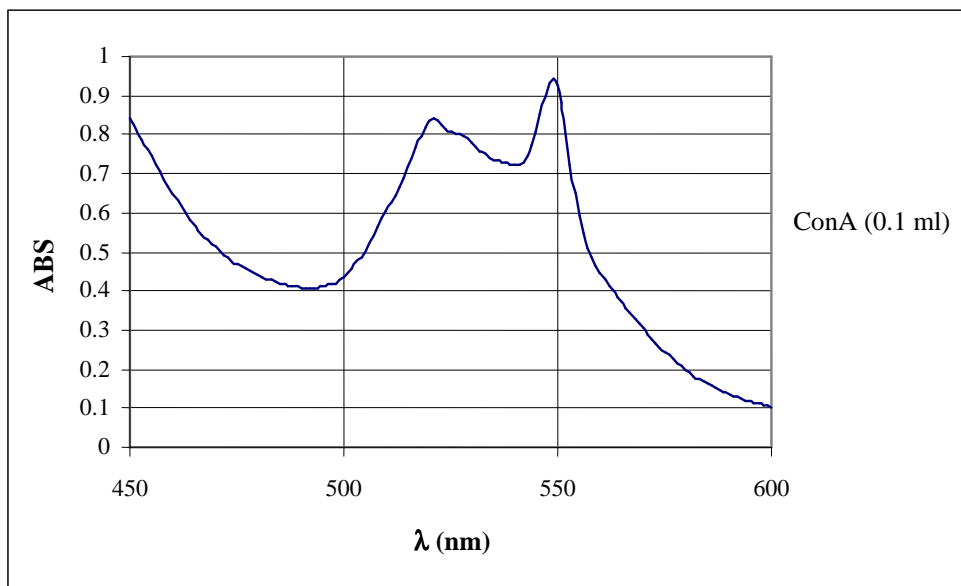


Fig. 3. Partial reduction of cyt c by ROS produced by PMN cells in the presence of ConA (0.33 mg/ml)

However, this type of experiment may not be the ideal one to test the homeopathic effect. From a conventional point of view, the responses in both series (S and N) of the high dilutions tested should be near each other and similar to the control, i. e. very close to zero. Due to the small absolute values that have to be compared, large relative differences may appear, and this lack of homogeneity has a negative impact on the significance coefficient (p). But there is another way to test the homeopathic effect. According to the homeopathic concepts, the dynamized dilutions of a certain factor (substance) should be able to modulate (inhibit/stimulate) the actions of the same or of another factor that acts in a similar way. At least certain dilutions in the dynamized (succussed) series should be able to inhibit (counteract) the action of the same or of a similar factor administered in allopathic doses (the principle of similarity). In this respect, we tested the effect of each homeopathic dilution against the same factor (a situation which we name homosimilarity), i. e., ConA vs. ConA dilution (Table 3) and PMA vs. PMA dilution (Table 4), or against the other similar factor (which we name heterosimilarity), i. e., PMA vs. ConA dilution (Table 5) and ConA vs. PMA dilution (Table 6).

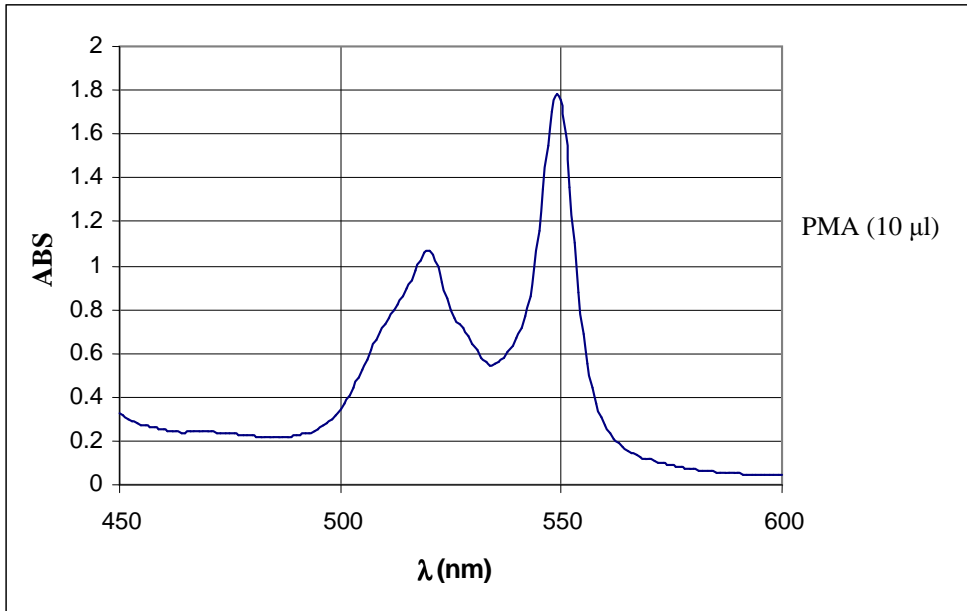


Fig. 4. Extensive reduction of cyt c by ROS produced by PMN cells in the presence of PMA (66 ng/ml)

Table 1

Synthesis of the results obtained in the comparison of PMN leukocyte stimulation by the two types of concanavalin A (ConA) dilutions (S and N) in Hanks buffer
 [The initial dilution (10^0) contains 0.33 mg ConA/ml]

DILUTION	Mean \pm SEM [($A_S - A_N$)/ A_N 100%]	Number of pairs (n)	t	p
10^0	2.13 \pm 9.15	11	0.7721	>> 0.1
10^{-2}	-0.22 \pm 7.40	3	0.0515	>>> 0.1
10^{-4}	1.59 \pm 3.11	3	0.8855	>> 0.1
10^{-6}	0.52 \pm 1.82	3	0.4949	>> 0.1
10^{-8}	1.11 \pm 5.71	3	0.3367	>> 0.1
10^{-10}	-0.51 \pm 2.08	8	0.6935	>> 0.1
10^{-12}	0.31 \pm 0.89	4	0.6966	>> 0.1
10^{-14}	-0.39 \pm 2.70	5	0.3230	>> 0.1
10^{-16}	-2.11 \pm 5.11	6	1.0114	> 0.1
10^{-18}	-0.96 \pm 5.52	5	0.3889	>> 0.1
10^{-20}	1.59 \pm 4.77	6	0.8165	>> 0.1
10^{-22}	1.94 \pm 2.75	3	1.2219	> 0.1
10^{-24}	2.73 \pm 4.39	5	1.3805	> 0.1
10^{-26}	-2.11 \pm 1.61	3	2.2699	> 0.1
10^{-28}	-1.59 \pm 2.94	7	1.4308	> 0.1
10^{-30}	2.52 \pm 1.23	3	3.5486	> 0.05

The advantage of the homo- and heterosimilarity experiments is the use of sizeable (allopathic) doses on (with) homeopathic dilutions, which give larger responses whose comparison is less risky and thus the significance of the differences can be more easily and

accurately established. Due to the large number of sample measurements involved in this type of work, we have tested only some of the homeopathic dilutions in the homosimilarity experiments (Tables 3 and 4). However, in the case of the heterosimilarity (Tables 5 and 6), we tested the whole homeopathic series (10^{-10} – 10^{-30}). Nevertheless, there were no significant differences recorded in all the comparisons performed by us.

Table 2

Synthesis of the results obtained in the comparison of PMN leukocyte stimulation by the two types of phorbol myristate acetate (PMA) dilutions (S and N) in Hanks buffer
 [The initial dilution (10^0) contains 66 ng PMA/ml]

DILUTION	Mean ± SEM [(A _S - A _N)/A _N]100%	Number of pairs (n)	t	p
10^0	0.21 ± 5.12	12	0.1421	>> 0.1
10^{-2}	1.28 ± 5.53	4	0.4629	>> 0.1
10^{-4}	0.20 ± 5.26	3	0.0658	>>> 0.1
10^{-6}	1.93 ± 3.33	3	1.0039	> 0.1
10^{-8}	-2.24 ± 6.75	3	0.5748	>> 0.1
10^{-10}	0.46 ± 4.48	13	0.3702	>> 0.1
10^{-12}	-0.83 ± 1.96	7	1.1204	> 0.1
10^{-14}	2.09 ± 6.55	7	0.8442	>> 0.1
10^{-16}	0.50 ± 4.41	4	0.2267	>> 0.1
10^{-18}	2.01 ± 5.32	11	1.2531	> 0.1
10^{-20}	-1.84 ± 3.48	5	1.1823	> 0.1
10^{-22}	2.14 ± 4.13	6	1.2692	> 0.1
10^{-24}	1.11 ± 6.29	3	0.3056	>> 0.1
10^{-26}	-0.52 ± 6.01	4	0.1730	>> 0.1
10^{-28}	0.85 ± 3.94	5	0.4824	>> 0.1
10^{-30}	-3.58 ± 9.89	4	0.7239	>> 0.1

Table 3

Synthesis of the results obtained in the comparison of the effects produced by the addition of ConA (0.066-0.33 mg/ml) to the two types of ConA dilutions (S and N)
 (See other details in Table 1)

DILUTION	Mean ± SEM [(A _S - A _N)/A _N]100%	Number of pairs (n)	t	p
10^{-12}	0.45 ± 3.61	4	0.2493	>> 0.1
10^{-16}	2.63 ± 4.82	3	0.9451	>> 0.1
10^{-20}	-0.91 ± 2.82	5	0.7216	>> 0.1
10^{-24}	-1.77 ± 3.63	4	0.9752	>> 0.1
10^{-28}	-0.32 ± 5.80	3	0.0956	>>> 0.1

The synthesis of our results seem to rule out any possible homeopathic effect, at least at the level of the *in vitro* testing. Of course, our experiments can be criticized both on allopathic and homeopathic grounds. From the point of view of the conventional science, we may be criticized because of the relatively low number of pairs (3-4) that we have measured in some of the dilutions tested. However, by looking at our tables, as expected from a random distribution, one can see that the higher is the number of measurements the more constant is the value of the significance coefficient of the differences (p) and this value is generally much smaller than 0.1., meaning that the differences are far from being significant.

Table 4

Synthesis of the results obtained in the comparison of the effects produced by the addition of PMA (0. 66-2 ng/ml) to the two types of PMA dilutions (S and N)
(See other details in Table 2)

DILUTION	Mean \pm SEM [(A _S -A _N)/A _N]100%	Number of pairs (n)	t	p
10 ⁻¹⁰	1. 19 \pm 16. 32	6	0. 1786	>> 0. 1
10 ⁻¹⁴	- 4. 41 \pm 14. 10	4	0. 6255	>> 0. 1
10 ⁻¹⁸	5. 94 \pm 6. 39	3	1. 6101	> 0. 1
10 ⁻²²	- 1. 81 \pm 14. 56	3	0. 2153	>> 0. 1
10 ⁻²⁶	- 0. 98 \pm 11. 93	4	0. 1643	>> 0. 1
10 ⁻³⁰	- 3. 43 \pm 25. 02	3	0. 2374	>> 0. 1

Table 5

Synthesis of the results obtained in the comparison of the effects produced by the addition of PMA (0. 66-2 ng/ml) to the two types of ConA dilutions (S and N)
(See other details in Table 1)

DILUTION	Mean \pm SEM [(A _S -A _N)/A _N]100%	Number of pairs (n)	t	p
10 ⁻¹⁰	2. 65 \pm 7. 41	4	0. 7152	>> 0. 1
10 ⁻¹²	0. 35 \pm 6. 19	4	0. 1131	>> 0. 1
10 ⁻¹⁴	3. 11 \pm 8. 86	4	0. 7020	>> 0. 1
10 ⁻¹⁶	- 0. 67 \pm 14. 19	3	0. 0818	>>> 0. 1
10 ⁻¹⁸	- 4. 05 \pm 7. 39	5	1. 2254	>> 0. 1
10 ⁻²⁰	0. 97 \pm 5. 38	4	0. 4032	>> 0. 1
10 ⁻²²	7. 94 \pm 12. 35	3	1. 1136	> 0. 1
10 ⁻²⁴	- 9. 61 \pm 12. 94	4	1. 4853	> 0. 1
10 ⁻²⁶	0. 39 \pm 5. 35	3	0. 1263	>> 0. 1
10 ⁻²⁸	- 5. 46 \pm 14. 29	5	0. 8543	>> 0. 1
10 ⁻³⁰	- 5. 45 \pm 8. 30	3	1. 1373	> 0. 1

Table 6

Synthesis of the results obtained in the comparison of the effects produced by the addition of ConA (0. 066-0. 33 mg/ml) to the two types of PMA dilutions (S and N)
(See other details in Table 2)

DILUTION	Mean \pm SEM [(A _S -A _N)/A _N]100%	Number of pairs (n)	t	p
10 ⁻¹⁰	1. 59 \pm 3. 05	5	1. 1657	> 0. 1
10 ⁻¹²	0. 50 \pm 2. 91	3	0. 2976	>> 0. 1
10 ⁻¹⁴	0. 78 \pm 6. 90	3	0. 1958	>> 0. 1
10 ⁻¹⁶	- 3. 32 \pm 4. 83	3	1. 1906	> 0. 1
10 ⁻¹⁸	1. 76 \pm 4. 57	6	0. 9433	>> 0. 1
10 ⁻²⁰	- 5. 52 \pm 8. 11	3	1. 1789	> 0. 1
10 ⁻²²	- 0. 05 \pm 3. 56	4	0. 0281	>>> 0. 1
10 ⁻²⁴	- 0. 09 \pm 4. 91	3	0. 0317	>>> 0. 1
10 ⁻²⁶	1. 49 \pm 1. 42	3	1. 8174	> 0. 1
10 ⁻²⁸	1. 66 \pm 1. 57	3	1. 8313	> 0. 1
10 ⁻³⁰	- 4. 30 \pm 9. 29	4	0. 9257	>> 0. 1

We may be criticized by the homeopathic supporters that we have not made all our measurements on the same blood sample, since, allegedly, the homeopathic effect is displayed at slightly different dilutions for different preparations. Given all the precautions that we have taken, by always using pair measurements and defining a reproducible coefficient of stimulation, we think that this is not a valid argument. However, from a homeopathic

point of view, it may seem perfectly legitimate, and the only answer we have to this is that it is practically impossible, under normal conditions, to take all the necessary measurements (to assure the proper statistics) on the same preparation. On the other hand, on occasion, we observed peculiar results, which can not be explained in the framework of the conventional science, but this does not give us the right to draw positive conclusions for the homeopathic effect, as long as such results are not reproducible.

Conclusions. From the results obtained in the present work, we can draw at least 3 important conclusions:

1. Phorbol myristate acetate (PMA) is a much stronger stimulant of the production of reactive oxygen species (ROS) by the polymorphonuclear (PMN) leukocytes than concanavalin A (ConA) and can be used in a more reliable way in obtaining and using homeopathic dilutions;

2. The use of a properly defined stimulation coefficient in conjunction with a paired *t* test allows a correct comparison of the stimulating capacity of succussed (S) and unsuccussed (N) dilutions of different stimulating factors or their combination, even though the results are obtained on several preparations;

3. None of our 6 experimental variants used in the present work was able to demonstrate the existence of statistically significant differences between the succussed and unsuccussed dilutions, which raises serious doubts about the reality of the homeopathic phenomenon.

R E F E R E N C E S

1. Anagnostatos, G. S., Endler, P. C., Schulte, J., *Small water clusters (clathrates) in the homeopathic preparation process*, in Endler, P. C., Schulte, J (Eds.), *Ultra High Dilution: Physiology and Physics*, pp. 121-128, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994
2. Antonchenko, V. Ya., Ilyn, V. V., *Points at issue in the physics of water and homoeopathy*, "Brit. Hom. J.", **81**, 1992, 91-93.
3. Bellavite, P., *Complexity science and homeopathy: a synthetic overview*, "Homeopathy", **92**, 2003, 203-212.
4. Bellavite, P., Chirumbolo, S., Gandini, G. Signorini, A., *Simultaneous assay for oxidative metabolism and adhesion of human neutrophils: evidence for correlation and dissociations of the two responses*, "J. Leukocyte Biol.", **51** (4), 2003, 329-335.
5. Bellavite, P., Lussignoli, S., Semizzi, M. L., Ortolani, R., Signorini, A., *The similia principle. From cellular models to regulation of homeostasis*, "Brit. Hom. J.", **86**, 1997, 73-85.
6. Benveniste, J., Davenas, E., Ducot, B., Spira, A., *Basophil achromasia by dilute ligand*, "FASEB J.", **5**, 1991, A-1008
7. Berezin, A. A., *Diversity of stable isotopes and physical foundations of homeopathic effect.*, "Berlin J. Res. Homoeopathy", **1** (2), 1991, 85-92
8. Bernal, G. G., *Homoeopathy and physics. A brief history*, "Brit. Hom. J.", **82**, 1993, 210-216.
9. Bonavida, B., Safrit, J., Tsuchitani, T., Zigelboim, J., *Overcoming tumor cell drug resistance by low doses of recombinant Tumor Necrosis Factor and drug*, in Doutremepuich, C. (Ed.), *Ultra Low Doses*, pp. 27-43, Taylor&Francis, Washington, D. C., 1991.

10. Brewit, B., *Methods for treating disorders by administering radio frequency signals corresponding to growth factors*, US Patent 5626617, 1997 (<http://www.emmesar.co...>).
11. Del Giudice, F., Preparata, E., *Coherent Electrodynamics in Water*, in Schulte, J., Endler, P. C. (Eds), *Fundamental Research in Ultra High Dilution and Homeopathy*, pp. 117-119, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1998
12. Del Giudice, F., Preparata, E., Vittelio, G., *Water as a free electric dipole laser*, *Physical Review Lett.*, **61**, 1988, 1085-1088.
13. Doutremepuich, C., De Sèze, O., Anne, M. C., Hariveau, E., Quillicini, R., *Platelet aggregation in whole blood after administration of ultra low dosage acethylsalicylic acid in healthy volunteers*, "*Thrombosis Research*", **20**, 1990, 99-105.
14. Johnston, R. B., Godzik, C. A., Cohn, Z. A., *Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages*, "*J. Exp. Med.*", **148**, 1978, 115-127.
15. Kobayashi, T., Robinson, J. M., Seguchi, H., *Identification of intracellular sites of superoxide production in stimulated neutrophils*, "*J. Cell Sci.*", **111**, 1998, 81-91.
16. Luu, D., Vinh, C., Boiron, J., *Etude de dilutions homéopathique par effet Raman-laser*, "*Ann. Hom. Fr.*", **4**, 1975, 433-434.
17. Maddox, J., *Waves caused by extreme dilution*, "*Nature*", **335**, 1988, 287-289.
18. Maddox, J., Randi, J., Steward, W., *High dilution experiments*, "*Nature*", **334**, 1988, 287-290.
19. Morimoto, H., Safritt, J. T., Bonavida, B., *Synergistic effect of tumor necrosis factor and diphtheria toxin-mediated cytotoxicity in sensitive and resistant human ovarian tumor cell lines*, "*J. Immunol.*", **147**, 1991, 2609-2616.
20. Olinescu, A., Dolganiuc, A., *Imunologie Practică în Clinică și Experiment*, Edit. Viața Medicală Românească, București, 2001.
21. Poitevin, B., *Mechanism of action of homoeopathic medicines*, "*Brit. Hom. J.*", **84**, 1995, 32-39.
22. Safritt, J. T., Belldegrun, A., Bonavida, B., *Sensitivity of human renal cell carcinoma lines to TNF, adriamycin and combination: role of TNF- α RNA induction in overcoming resistance*, "*J. Urology*", **149**, 1993, 1202-1208.
23. Sainte-Laudy, J., Belon, P., *Inhibition of human basophil activation by high dilutions of histamine*, "*Agents&Actions*", **38**, 1993, 254-257.
24. Tarba, C., Stejar, M., *Osmotic fragility of human erythrocytes suspended in succussed hypotonic solutions*, in Ardelean, A., Crăciun, C. (Eds.), *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, vol. 4, pp. 93-97, Edit. Risoprint, Cluj-Napoca, 1999.
25. Tarba, C., Stejar, M., *Considerații asupra unei metode spectrofotometrice de estimare a producției de specii reactive de oxigen (ROS) de către leucocitele polimorfonucleare (PMN)*, "*Analele SNBC*", **9** (2), 2004, 73-82
26. Torres, J. L., Guadalupe-Ruiz, M. A., *Stochastic resonance and the homeopathic effect*, "*Brit. Hom. J.*", **85**, 1996, 134-140.
27. Towsey, M. W., Hasan, M. Y., *Homeopathy - a biophysical point of view*, "*Brit. Hom. J.*", **84**, 1995, 218-228.
28. Vowels, S. J., Sekhsaria, S., Malech, H. L., Shalit, M., Fleischer, T. A., *Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes*, "*J. Immunol. Methods*", **178**, 1995, 89-96.
29. Wiegant, F. A. C., *Memory of water revisited*, "*Nature*", **370**, 1994, 322.
30. Woschnagg, C., Rak, S., Venge, P., *Oxygen radical production by blood eosinophils is reduced during birch pollen season in allergic patients*, "*Clin. Exp. Allergy*", **26**, 1996, 1064-1072.
31. Zacharias, C. R., Zacharias, A. C., *Physical modelling of dynamization*, "*Brit. Hom. J.*", **86**, 1997, 207-210.

STUDIUL HISTOLOGIC ȘI ELECTRONOMICROSCOPIC AL TIMUSULUI ȘOBOLANILOR TRATAȚI CU DOZE TERAPEUTICE DE NUROFEN

CRISTINA PAȘCA*, VICTORIA-DOINA SANDU* și MARIA GORDAN**

SUMMARY. – **Histological and Electronomicroscopical Studies of the Thymus of the Rats Treated with Therapeutical Doses of Nurofen.** Nowadays, the frequent use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) is often correlated with different side effects, which can seriously disturb the health of the treated organisms. The aim of the present study was to determine the features, dynamics and character (reversible or irreversible) of the alterations induced by a therapeutical dose of Nurofen at the level of the central lymphoid organ - thymus. Our results sustain and complete the previous investigations concerning the toxic effect of this drug upon the lymphoid structures, demonstrating that Nurofen has a moderate toxic action upon the thymus materialized in the perturbation of the vascular component, and especially of the cellular component (thymocytes and epithelio-reticular cells). The congestion, stasis, oedemas and diffuse intravascular coagulation phenomena seem to induce, maintain and aggravate the degenerative processes which affect the cellular component of the thymus. The alteration of the cellular component consists of a moderate cell (thymocyte) depletion, the sensitivity of which seems to depend on their age, the most affected being the lymphoblasts in the cortex of the lobules. By electron-microscopy, it could be observed that the thymocyte division in the cortex of the lobules was moderately decreased, while many thymocytes have pyknotic nuclei, and a peculiar shape as a consequence of the lysis process. At the level of the medulla, both the epithelio-reticular cells and especially thymocytes are affected by some degenerative processes (these cells having a vacuolised cytoplasm, pyknotic or altered nuclei, swollen and greatly modified mitochondria, and, zonally, presenting broken cell membranes which allow the cell constituents to spill out). In the spaces created by the lysis processes and in some perivascular areas, it could be noticed a moderate collagen proliferation correlated with a marked increase of the number of eosinophils, macrophages with an intense phagocytic activity, mastocytes and Hassall corpuscles. Generally, both the histopathological and ultrastructural modifications induced by Nurofen have a zonal, discrete, and temporary character, intense recovery processes being observed a short time after the administration of this drug has been stopped.

Între medicament și organism se stabilesc relații de reciprocitate, cunoscut fiind faptul că medicamentele influențează organismul până la nivelul ultrastructurilor celulare, dar și organismul, la rândul său, având capacitatea de a dirija “soarta” medicamentului asimilat.

Produsele medicamentoase antiinflamatoare nesteroidiene, din care face parte și Nurofenul, au în general un profil toxic substanțial, deloc neglijabil, concentrat în principal asupra tractului gastrointestinal, rinichilor, ficatului, măduvei hematogene și cordului [1, 3, 5, 7, 8, 9, 12, 17].

Referitor la hematotoxicitatea Nurofenului, cercetările întreprinse până în prezent au arătat că acest medicament, ca de altfel întreaga familie de produse farmaceutice căreia îi aparține, administrat în doze mari, induce leziuni structurale atât la nivelul măduvei

* *Universitatea “Babeș-Bolyai”, Facultatea de Biologie și Geologie, Catedra de Zoologie, 400006 Cluj-Napoca, România. E-mail: cpasca@biolog.ubbcluj.ro*

** *Liceul Pedagogic “Gheorghe Șincai”, 450051 Zalău, România*

hematopoitice, cât și la nivelul structurilor limfopoitice centrale și periferice, cărora le induce o semnificativă atrofie structurală corelată și cu o perturbarea semnificativă a funcțiilor lor. Leziunile determinate interesează cu precădere *celulele stem*, au un caracter ireversibil și prognoze nefavorabile și se materializează în principal prin: trombocitopenie asociată și cu anemia hemolitică sau anemia aplastică [4, 7, 14, 16]. Din păcate, datele cu privire la modificările histopatologice și ultrastructurale induse de Nurofen la nivelul structurilor limfoide sunt extrem de puține. Aceasta justifică pe deplin cercetările noastre care și-au propus să completeze informațiile cu privire la multiplele efecte secundare ale Nurofenului, prin evidențierea particularităților, dinamicii, reversibilității sau ireversibilității modificărilor structurale și ultrastructurale induse de acest antiinflamator nesteroidian (intens utilizat în prezent grație unui spectru terapeutic extrem de larg) la nivelul unui organ limfoid central al organismului – timusul.

Materiale și metode. Cercetările s-au efectuat pe șobolani albi Wistar, adulți, masculi, cu o greutate medie de 190 ± 10 grame. Animalele de experiență au fost întreținute în condiții optime de laborator, asigurându-li-se îngrijirea și hrana corespunzătoare și apă ad libitum. S-a lucrat pe 8 loturi constituite din câte 8 indivizi fiecare:

-loturile martor M_1 - M_4 – constituite din șobolani sănătoși, netratați cu medicament;

-loturile T_1 , T_2 și T_3 - constituite din șobolani sănătoși, tratați zilnic cu o doză terapeutică de 250 mg Nurofen/kg corp, administrată per os, prin gavaj, în trei prize (una înainte de masă și două după masă); șobolanii au fost sacrificați după 10, 20, respectiv, 35 de zile de tratament, pentru realizarea unor investigații structurale și ultrastructurale;

-lotul T_4 – constituit din șobolani tratați similar loturilor T_1 - T_3 , doar că după cele 35 de zile de tratament a urmat o perioadă de 10 zile în care nu li s-a mai administrat nici un medicament, asigurându-li-se doar o întreținere și o hrănire corespunzătoare, în scopul evidențierii capacității naturale de refacere a unor organe afectate de Nurofen.

Sacrificarea animalelor s-a făcut dimineața, la 16 ore de inaniție, după o anestezie profundă cu eter etilic, prin decapitare și exsanguinare. Imediat după sacrificare s-au recoltat fragmente de timus, care au fost imediat prelucrate conform tehnicilor uzuale, astfel încât să fie posibilă realizarea în condiții optime a investigațiilor de microscopie optică și electronică [2, 10, 13, 15].

Rezultate și discuții. Investigațiile structurale și ultrastructurale întreprinse în cadrul experimentului nostru demonstrează că Nurofenul administrat în doze terapeutice (250 mg/kg corp, timp de 35 de zile) exercită o acțiune toxică moderată asupra timusului șobolanilor albi Wistar adulți. Procesele alterative și degenerative induse de Nurofen devin decelabile microscopio-optic destul de târziu, mai exact după 20 de zile de tratament, când a fost observată o rărire a timocitelor din corticala lobulilor timici, corelată cu o tendință evidentă de omogenizare a structurii lobulare, cele două zone, corticala și medulara, distingându-se cu dificultate. Între limfocitele rămase la nivelul corticalei dar și medularei lobulilor timici, un mare număr sunt aglutinate, în timp ce altele se află în curs de lizare (Fig. 1). Modificările componente celulare timice sunt corelate cu alterări moderate ale componente vasculare concretizate într-o congestie vasculară și stază sanguină zonală, pe alocuri asociate cu un ușor edem perivascular.

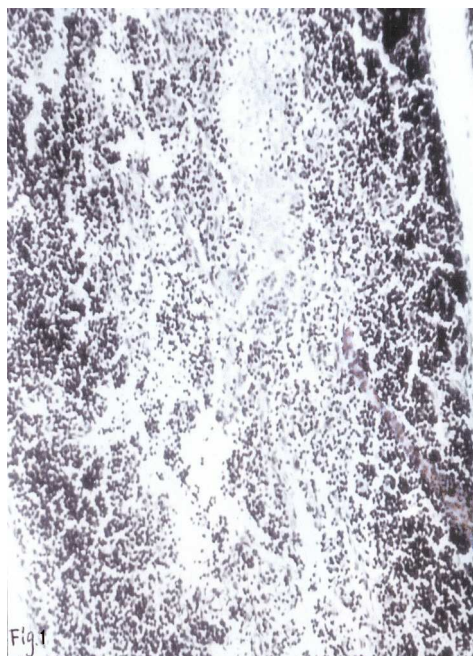


Fig. 1. Depleția și aglutinarea timocitelor din zona corticală a lobulilor timici și omogenizarea structurală a acestora (x 400).

După 30 de zile de administrare a acestui antiinflamator, fenomenele semnalate în timusul animalelor din lotul sacrificat anterior se amplifică, procesul de medularizare a lobulilor timici fiind mai clar evidențiat, lobulii dobândind o structură celulară aproape omogenă (Fig. 2). De asemenea, persistă fenomenele de aglutinare a limfocitelor și limfocitoliză, care concură la o vizualizare parțială a citoreticulului lobulilor timici. Tulburările de hemodinamică sanguină nu numai că persistă, dar se și accentuează și interesează bună parte din vasele capilare. Punctiform au fost semnalate chiar și unele microhemoragii, hematiile prezentând o afinitate tinctorială mare ceea ce denotă faptul că hemoragiile sunt destul de recente.

La 35 de zile de la începerea tratamentului, în timus se constată existența unor modificări histopatologice mai accentuate ca urmare a creșterii concentrației de Nurofen din organism. Astfel, pe fondul unei staze sanguine, congestii vasculare, a câtorva focare de microhemoragie precum și a unor fenomene de coagulare intravasculară diseminată, aspectul de omogenizare a lobulilor timici persistă (ca urmare a necrozei și necrobiozei timocitelor - în principal a limfoblastelor dar și a limfocitelor adulte) și caracterizează un mai mare număr de lobuli decât la lotul sacrificat anterior (Fig. 3 și 4). În plus, a fost semnalată și prezența câtorva lobuli atrofiați, ca urmare a unei proliferări zonale a colagenului (Fig. 5). La limita dintre corticala și medulara câtorva lobuli timici, apar conglomerate de timocite aglutinate precum și insule de hematii extravazate, dintre care unele sunt hemolizate. La nivelul țesutului conjunctiv perilobular, în numeroase zone au fost semnalate bogate infiltrate eozinofilice, precum și macrofage, ca o consecință a procesului inflamator local.

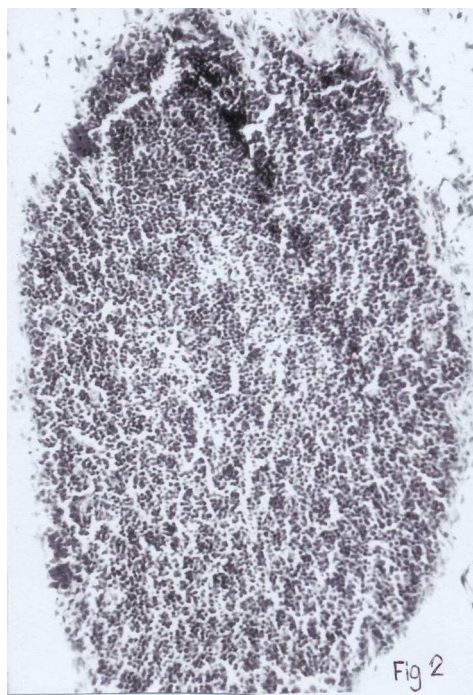


Fig. 2. Lobul timic cu structură celulară omogenă și rare focare de aglutinare a timocitelor (x 400).

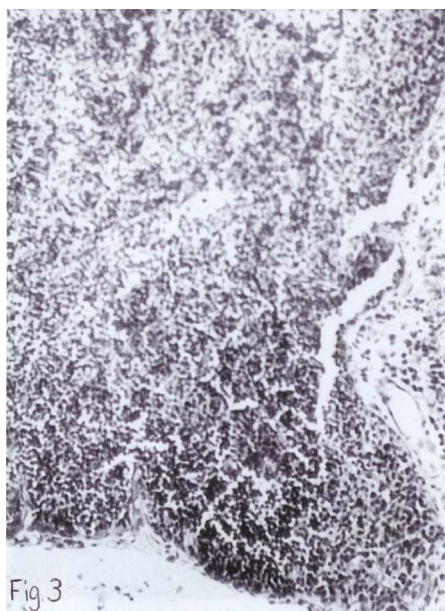


Fig. 3. Lobul timic cu microhemoragii difuze (x 400).

TOXICITATEA NUROFENULUI LA NIVELUL TIMUSULUI

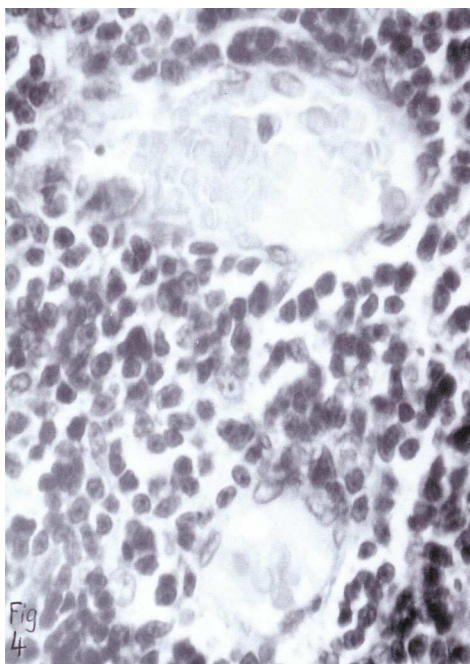


Fig. 4. Congestie vasculară, stază sanguină și coagulare intravasculară în capilare ale lobulului timic (x 1280).

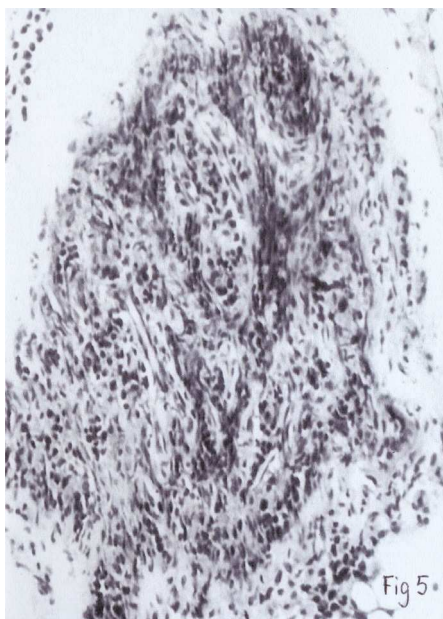


Fig. 5. Lobul timic atrofiat, cu sclerozarea evidentă atât a zonei corticale cât și medulare (x 512).

La 10 zile după încetarea administrării Nurofenului, procesul de refacere a citoarhitecturii lobulilor timici este clar exprimată, deși corticala lor este încă mai subțire decât la lotul martor, iar densitatea celulară este mai scăzută. Procesele de aglutinare și liză a timocitelor pot fi încă observate, dar au un caracter mult mai discret comparativ cu lotul sacrificat anterior (Fig. 6). Microhemoragiile intralobulare și coagularea intravasculară diseminată nu au mai fost semnalate, în timp ce congestia vasculară și staza sanguină persistă, însă sunt foarte discrete și au doar un caracter zonal.

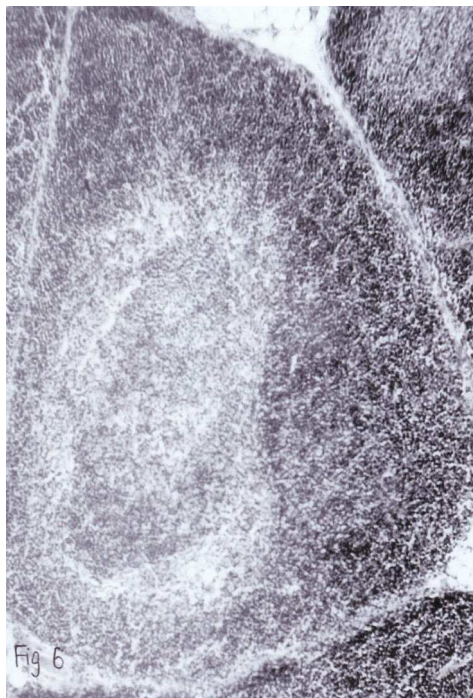


Fig. 6. Refacerea citoarhitecturii lobulilor timici ($\times 312$).

Procesele degenerative și alterative evidențiate la nivelul timusului prin studii de microscopie optică apar și mai evidente pe imaginile electronomicroscopice pe care se constată clar afectarea atât a componentei vasculare cât și a celei celulare timice, comparativ cu lotul de control. Gravitatea și extinderea leziunilor ultrastructurale înregistrează aceeași dinamică ca și modificările histopatologice mai sus prezentate.

Astfel, referitor la componenta vasculară timică, menționăm că electronomicroscopic se constată că Nurofenul determină o stază sanguină și o congestie vasculară semnificativă atât în corticala cât și în medulara lobulilor timici (Fig. 7). Aceasta este corelată cu modificarea permeabilității și integrității peretelui vascular, care justifică prezența hematiilor în unele zone în număr însemnat printre timocite, formând, în mod tranzitoriu, mici lacuri. Forma și aspectul hematiilor sugerează că ele se află în diferite stadii de degenerare. Aceste hematii apar mai puternic afectate de procesele degenerative în acele zone în care există o rărire mai pronunțată a timocitelor, consecință a timocitolizei.



Fig. 7. Congestie vasculară și stază sanguină la nivelul medulei lobulului timic (x 7600).

În ceea ce privește componenta celulară a timusului, menționăm că au fost observate modificări ultrastructurale în principal la nivelul timocitelor, dar și la celulele epitelio-reticulare.

Timocitele zonei corticale sunt mai puternic afectate decât cele din medulară, fiind surprinse în diferite stadii degenerative, prezentând nuclei surprinși atât în stadii incipiente de degenerare (contractarea nucleului, condensarea cromatinei, modificarea conturului nuclear, vacuolizarea nucleului), dar și în faze mai avansate de alterare, unii fiind picnotici, abia mai putând fi recunoscuți ca entități morfologice distincte (Fig. 8). În plus, s-a observat și rarefierea matricei citoplasmice a unor timocite, urmată de vacuolizarea acesteia, corelată cu alterarea structurii mitocondriale și cu ruperea membranei celulare urmată de împrăștierea constituenților celulari printre timocitele neafectate. În urma acestor fenomene, densitatea timocitelor din corticală scade foarte mult, iar în spațiile create în urma timocitolizei pot fi evidențiate cu ușurință celulele epitelio-reticulare.

Și în medulară se constată desfășurarea unor procese degenerative și alterative, materializate în prezența unor timocite surprinse în diferite stadii necrotice, cu citoplasma vacuolizată și nuclei cu formă și structură aberante, iar în spațiile rezultate în urma proceselor de timocitoliză se observă acumularea de detritusuri (Fig. 9). Distrugerile celulare masive, care concurează la apariția unui detritus abundent, justifică creșterea numărului de macrofage care desfășoară o activitate fagocitară extrem de intensă.

Liza unui număr însemnat de timocite din zona corticală face posibilă evidențierea cu ușurință a citoreticulului și a unor aspecte degenerative ale celulelor epitelio-reticulare, concretizate inițial prin apariția de vacuole polimorfe în citoplasma acestora, pentru ca ulterior să apară și modificări ale formei, dimensiunii și structurii nucleilor lor pe fondul vacuolizării citoplasmice (Fig. 10). În vecinătatea unor asemenea celule epitelio-reticulare

aflate în curs de degenerare se constată desfășurarea unor procese active de proliferare a colagenului, care după aspectul electrono-microscopic pare a fi tânăr. Fibrozarea însă este zonală și nu are un caracter invaziv (Fig. 11).

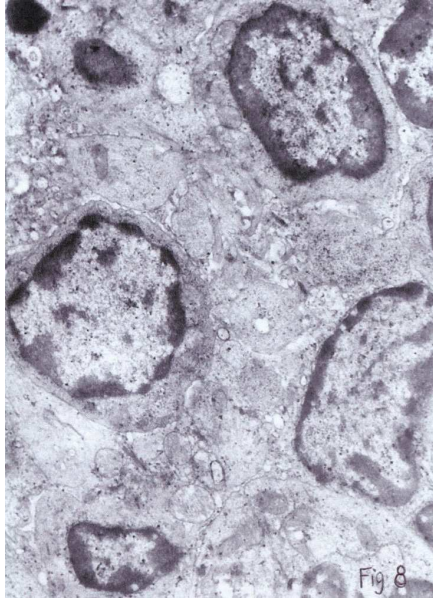


Fig. 8. Timocite din corticala lobulului timic aflate în diferite stadii degenerative și alterative (x 7600).

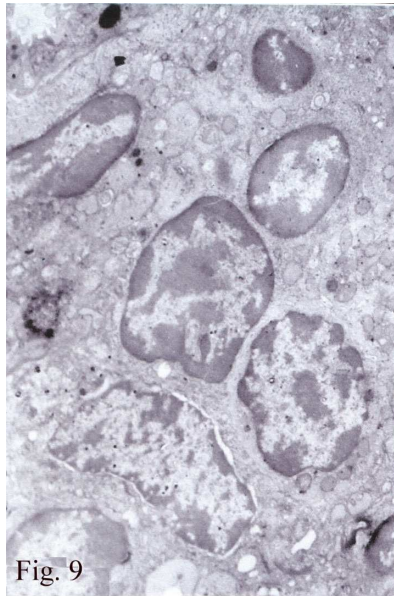


Fig. 9. Polimorfism nuclear în timocitele din medulara lobulului timic aflate în diferite stadii degenerative și alterative (x 4560).

TOXICITATEA NUROFENULUI LA NIVELUL TIMUSULUI

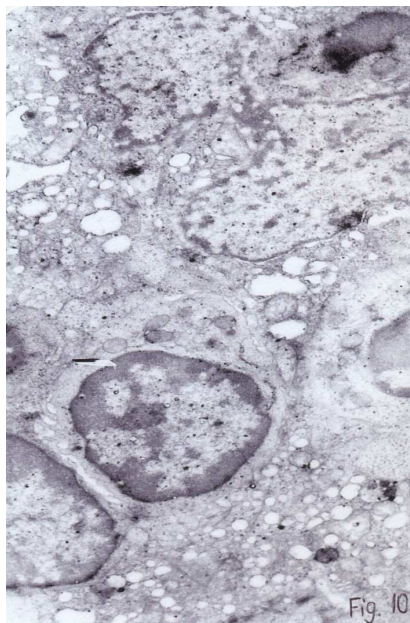


Fig. 10. Celule epitelioreticulare cu modificări nucleare și vacuolizarea citoplasmei (x 7600).

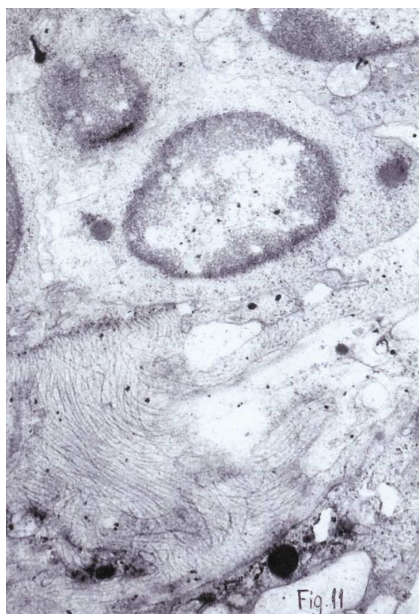


Fig. 11. Proces activ de proliferare a collagenului în zonele mai puternic afectate ale lobulilor timici (x 7600).

După cum este cunoscut, timusul este organul cu cea mai intensă activitate limfopoietică de la naștere și până la pubertate, asigurând aprovizionarea organismului cu limfocite T, funcția limfopoietică a timusului fiind corelată și cu capacitatea acestuia de a produce o serie de hormoni timici (timozina, timopietina, factorul timic umoral și factorul timic seric) cu roluri esențiale pentru organism, intervenind nu doar în formarea și controlul activității limfocitelor T care au părăsit timusul, ci și în eozinofiloipoieză și în formarea mastocitelor [11].

Rezultatele investigațiilor structurale și ultrastructurale realizate în cadrul experimentului nostru demonstrează că Nurofenul administrat în doze terapeutice o perioadă nu foarte îndelungată exercită o acțiune toxică moderată asupra timusului șobolanilor albi Wistar adulți, modificările induse de acest antiinflamator având o intensitate variabilă, fiind strâns corelate cu doza cumulativă de Nurofen și implicit cu durata tratamentului.

Legat de dinamica proceselor alterative și degenerative induse de Nurofen, am constatat că ele sunt semnificative tardiv, după 20 de zile de tratament, că ele se accentuează progresiv dar moderat pe parcursul următoarelor 15 zile de administrare a medicamentului, dar majoritatea modificărilor semnalate în timus nu ating nici o amploare și nici o extindere cu caracter ireversibil, permițând desfășurarea post-tratament a unor procese intense regenerative naturale, în absența vreunei medicații protectoare și/sau regeneratoare.

Acțiunea toxică la nivelul timusului s-a concretizat în inducerea unor perturbări semnificative atât la nivelul componentei vasculare, dar mai ales la nivelul componentei celulare timice. Tulburările de hemodinamică induse de Nurofen (congestie vasculară, stază sanguină, fenomene de coagulare intravasculară diseminată, microhemoragii) par a fi contribuit la declanșarea, menținerea și amplificarea modificărilor suferite de componenta celulară timică (alături de efectul toxic direct exercitat de medicament), pe de o parte perturbând aprovizionarea celulelor cu O₂ și substanțe nutritive și pe de altă parte favorizând acumularea locală de CO₂ și a diferiților alți produși de catabolism cu posibil potențial toxic. Fenomenele de coagulare intravasculară diseminată semnalate în cadrul cercetărilor noastre, prin constituirea unor rețele fine de fibrină în lumenul unor vase de calibru mic, pot explica inducerea anemiei hemolitice, care, potrivit datelor din literatură, reprezintă una dintre consecințele grave ale tratamentelor mai îndelungate cu Nurofen [4, 16].

Modificările degenerative și alterative ale componentei celulare par să intereseze în principal timocitele, dar și celulele epitelio-reticulare ce constituie citoreticulul parenchimului timic. Vârsta timocitelor pare să fie corelată cu sensibilitatea la Nurofen, cei mai afectați fiind limfoblaștii, în timp ce limfocitele T adulte se dovedesc a fi mai rezistente, ele înregistrând modificări ceva mai discrete și instalate mai târziu.

Efectul toxic direct al acestui antiinflamator nesteroidian corelat cu deficitul indus de O₂ și substanțe nutritive reduce temporar rata diviziunii timocitelor, ceea ce justifică rarefierea acestora (aspect vizibil în principal în corticala lobulilor) și omogenizarea structurii lobulare și vizualizarea celulelor epitelio-reticulare. Zonal, în unele spații rămase în urma distrugerii masive de timocite se observă o creștere a numărului de mastocite, eozinofile și macrofage a căror citoplasmă apare încărcată cu material fagocitat, precum și derularea unui proces activ, dar discret de fibrozare a câtorva lobuli timici ca urmare a proliferării collagenului.

Rezultatele noastre vin să confirme și totodată să completeze datele din literatura de specialitate potrivit căroră Nurofenul, ca de altfel întreaga familie de produse farmaceutice căreia îi aparține, administrat în doze mari, induce leziuni structurale, chiar și atrofii ale

structurilor hematopoietice (măduvă roșie, organe limfoide centrale și periferice), leziunile fiind concentrate în principal asupra celulelor stem și având un caracter ireversibil și prognoze nefavorabile [4, 6, 14, 16]. În sângele periferic, alterarea structurală și implicit funcțională a structurilor hematoformatoare de către Nurofen se manifestă, în principal, printr-o scădere a numărului de trombocite (scădere corelată cu o creștere a timpului de sângerare și coagulare și cu apariția destul de frecventă pe parcursul tratamentului cu acest antiinflamator a echimozelor tranzitorii și accidentelor hemoragipare), precum și prin apariția unei anemii aplastice sau a anemiei imunohemolitice asociate trombocitopeniei [4, 16].

Concluzii. 1. Rezultatele investigațiilor structurale și ultrastructurale realizate în cadrul experimentului nostru demonstrează că Nurofenul administrat în doze terapeutice (250 mg/kg corp timp de 35 de zile) exercită o acțiune toxică moderată asupra timusului sobolanilor albi Wistar.

2. Modificările histopatologice și ultrastructurale induse de acest antiinflamator la nivelul timusului au o intensitate variabilă, fiind strâns corelate cu doza cumulativă de Nurofen și implicit cu durata tratamentului.

3. Procesele alterative și degenerative induse de Nurofen devin clar decelabile târziu, după 20 de zile de tratament, se accentuează progresiv dar moderat pe parcursul următoarelor 15 zile, dar majoritatea modificărilor semnalate în timus nu ating nici o amploare și nici o extindere cu caracter ireversibil, permițând desfășurarea post-tratament a unor procese intense regenerative naturale în absența vreunei medicații protectoare și/sau regeneratoare.

4. Acțiunea toxică la nivelul timusului s-a concretizat în inducerea unor perturbări semnificative atât la nivelul componentei vasculare, dar mai ales la nivelul componentei celulare timice.

5. Tulburările de hemodinamică induse de Nurofen (congestie vasculară, stază sanguină, fenomene de coagulare intravasculară diseminată) par a fi contribuit la declanșarea, menținerea și amplificarea modificărilor suferite de componenta celulară timică.

6. Atât în corticala, cât și în medulara lobulilor timici au fost înregistrate modificări degenerative și alterative ale componentei celulare, care au interesat în principal timocitele, dar și celulele epitelio-reticulare.

7. Sensibilitatea timocitelor pare a fi invers proporțională cu vârsta acestora, cei mai afectați fiind limfoblaștii, în timp ce limfocitele T adulte se dovedesc a fi mai rezistente, ele înregistrând modificări mai discrete și instalate mai târziu.

8. Nurofenul, în condițiile experimentului nostru, reduce moderat și temporar rata diviziunii timocitelor, ceea ce justifică rarefierea acestora și vizualizarea rețelei celulelor epitelio-reticulare.

9. Electronomicroscopic, modificările ultrastructurale induse de Nurofen interesează în principal timocitele (rarefierea matricei citoplasmatică, urmată de vacuolizarea acesteia, alterarea structurii mitocondriale și uneori ruperea membranei plasmatică urmată de împrăștierea constituienților celulari printre timocitele neafectate) și într-o mai mică măsură celulele epitelio-reticulare (care prezentau o matrice citoplasmatică rarefiată și vacuolizată).

10. În unele spații rămase în urma distrugerii masive de timocite, se observă o creștere a numărului de mastocite, eozinofile și macrofage a căror citoplasmă este încărcată cu material fagocitat. Zonal, se constată derularea unui proces activ, dar discret de proliferare a collagenului și o tendință de fibrozare punctiformă a câtorva lobuli timici.

BIBLIOGRAFIE

1. Baumgartner, H., Schwartz, H. A., Blum, W., Bruhin, A., Gallachi, G., Goldinger, G., Saxer, M., Trost, H., *Ibuprofen and diclofenac sodium in the treatment of osteoarthritis: a comparative trial of two once-daily sustained-release NSAIDs formulations*, "Curr. Med. Res. Opin.", **13**, 1996, 435-444.
2. Brenda, S.W., *A Beginner's Handbook in Biological Transmission Electron Microscopy*, Butler & Tanner, London, 1981.
3. Cronin, R. E., Henrich, W. L., *Toxic nephropathy*, in: Brenner, B. M., (ed.), *The Kidney*, WB Saunders Company, Philadelphia, 2000.
4. Dobrescu, D., *Farmacoterapie practică*, vol. II, p. 133-145, Ed. Med., București, 1989.
5. Giovanni, G., Giovanni, P., *Do non-steroidal anti-inflammatory drugs and COX-2 selective inhibitors have different renal effects?* „J. Nephrol”, **15**, 2002, 480-489.
6. Głowiczki, P., Hollier, L. H., Trastek, V. F., Kopesky, K. R., Kaye, M. P., *Quantitative evaluation of ibuprofen treatment on thrombogenicity of expanded polytetra fluoroethylene vascular grafts*, "Surgery", **95**, 1984, 160-168.
7. Hawkey, C., Laine, L., Simon, T., Beaulieu, A., Maldonado-Cocco, J., Acevedo, E., Shahane, A., Quan, H., Bolognese, J., Mortensen, E., *Comparison of the effect of rofecoxib (a cyclooxygenase 2 inhibitor), ibuprofen, and placebo on the gastroduodenal mucosa of patients with osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*, "Arthritis Rheum.", **43**, 2000, 370-377.
8. Hosaka, E. M., Santos, O. F. P., Seguro, A. C. Vattimo, M. F. F., *Effect of cyclooxygenase inhibitors on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats*, „Braz. J. Med. Biol. Res.", **37**(7), 2004, 979-985.
9. Jones, R. H., Tait, C. L., *Side-effects of NSAIDs in the community*, "Brit. J. Clin. Pract.", **49**, 2001, 67-70.
10. Kay, D., *Techniques for Electron Microscopy*, Alden & Mowbray, Oxford, 1967.
11. Leeson, C. R., Leeson, T. S., Papparo, A. A., *Textbook of Histology*, W. B. Saunders, Philadelphia, 1985.
12. McGettigan, P., Henry, D., *Current problems with non-specific COX inhibitors*, "Curr. Pharm. Res.", **6**, 2000, 1693-1724.
13. Mureșan, E., Gaboreanu, M., Bogdan, A. T., Baba, A. I., *Tehnici de histologie normală și patologică*, Ed. Ceres, București, 1974.
14. Panchishina, M. V., Sogomonian, A. I., Radchenko, E. M., Zamulko, A. A., *Effect of pentoxyl, ibuprofen and acetylsalicylic acid on the thymus, spleen, and adrenals in an experiment*, "Rheum.", **36**, 1991, 27-30.
15. Ploaie, P. G., Petre, Z., *Introducere în microscopia electronică cu aplicații în biologia celulară și moleculară*, Ed. Acad. Rom., București, 1979.
16. Stobbe, H., Hugel, W., *Hematotoxic lesions caused by non-steroidal antirheumatic agents*, "Arch. Surg.", **35**, 1980, 165-169.
17. Zuin, M., Podda, M., Selmi, C., Giorgini, A., Zermiani, P., Mandelli, G., Sacchetta, A. C., Candiani, C., *Gastrointestinal tolerability of nurofen administered in two pharmaceutical formulations*, "Arzneimittelforschung", **50**, 2000, 837-842.

MODIFICĂRI ULTRASTRUCTURALE ȘI BIOCHIMICE INDUSE DE TRATAMENTUL CU DERMIVATE LA ȘOBOLANI PREPUBERI

ERIKA KIS* și CONSTANTIN CRĂCIUN**

Summary. — Ultrastructural and Biochemical Alterations Induced by Dermivate Treatment in Prepubertal Rats. It is well known that glucocorticoid therapy includes a variety of useful applications related to the multiple effects of this class of compounds. These include antiinflammatory, antiallergic, immunosuppressor or antitumor activities. Due to the ubiquitous nature of the glucocorticoid receptors and the intrinsic multiple activity of glucocorticoids there are a number of unwanted side effects. Most of these are receptor-mediated and are typical corticosteroid effects, such as suppression of pituitary-adrenal axis. Other side effects, including growth inhibition in children or skin thinning during topical application, in addition to systemic side effects, could present serious problems.

In recent studies elsewhere we have reported that the short-term epicutaneous application of some halogenated or unhalogenated topical glucocorticosteroids in young rats, exert steroid-diabetogen secondary side-effects, manifested through hyperglycemia, hepatic glucose overproduction, elevated serum lipids and muscular resistance to insulin. All these endocrine-metabolic disorders were accompanied by thymolysis, adrenal atrophy and several ultrastructural modifications in some pituitary and adrenal cells.

Starting from the above observations and from the important physiological roles of the pituitary-adrenal axis in young organisms, we investigated ultrastructural modifications and some metabolic reactions in prepubertal rats after a short-term epicutaneous treatment with Clobetasol-propionate containing cream.

Corticoizii topici de sinteză sunt utilizați pe scară largă în tratamente dermatologice datorită efectelor benefice la nivel cutanat. Cercetările efectuate în ultimii ani au semnalat o serie de efecte secundare sistemice ale acestor clase de steroizi, ceea ce limitează folosirea lor în special în cure de lungă durată [1-4, 6-14].

Cercetările noastre anterioare [1-4, 6-10] au demonstrat faptul că medicamentele pe bază de corticosteroizi sub formă de creme și unguente utilizate topic în afecțiunile dermatologice dovedesc o bună absorbție transcutană inducând acumularea unor supradoze de glucocorticoizi în organism, cu efecte negative la nivel sistemic. În acest sens, cercetările noastre anterioare privind efectul tratamentului topic cu Fluocinolon-acetonid N au indicat faptul că, în special la animalele tinere, timusul și suprarenalele, glande cu rol deosebit de important în dezvoltarea și creșterea organismului tânăr, sunt puternic afectate de excesul glucocorticoidic.

Dermocorticoidul Dermivate, medicament similar glucocorticoidului Fluocinolon-acetonid N, este recomandat și utilizat pentru afecțiuni dermatologice în special la copii. Ca urmare, în lucrarea de față ne-am propus urmărirea efectelor tratamentului cu Dermivate asupra ultrastructurii celulelor adenohipofizare și corticosuprarenaliene, precum și asupra unor parametri biochimici indicatori ai excesului glucocorticoidic.

* *Universitatea Babeș-Bolyai, Catedra de Biologie Experimentală, 3400 Cluj-Napoca, România.
E-mail: ekis@hasdeu.ubbcluj.ro*

** *Universitatea Babeș-Bolyai, Catedra de Biologie Experimentală, 3400 Cluj-Napoca, România.
E-mail: ccraciun@hasdeu.ubbcluj.ro*

Material și metode. Experiențele au fost efectuate pe șobolani Wistar prepuberi în vârstă de 30 de zile care au fost tratați timp de 3 zile consecutive cu dermocorticoidul Dermovate. Doza zilnică de 50 mg unguent/100 g g.c. a fost aplicată prin ungerea pielii în zona inguinală pe o suprafață de 1,5 cm².

Animalele de experiență au fost repartizate în următoarele loturi:

lotul M—animale prepubere netratate-martor;

lotul D—animale prepubere tratate cu Dermovate;

Animalele au fost sacrificate la 24 ore de la sistarea tratamentului, odată cu martorii corespunzători, după o inaniție de 16-18 ore. De la fiecare animal s-au prelevat următoarele organe: adenohipofiză, suprarenală și timus. Suprarenalele și timusul au fost cântărite cu o balanță de torsionare. S-a determinat apoi greutatea relativă a suprarenalei și timusului, care a fost exprimată în mg/100 g animal.

Fragmentele de adenohipofiză și corticosuprarenală prelevate au fost prelucrate în vederea efectuării studiilor de microscopie electronică [15].

Cantitatea de glucoză sanguină a fost determinată enzimatic cu God-Perid-Glucose Kit. Colesterolul seric a fost dozat cu micrometoda fotocolorimetrică a lui Z l a t k i s și colab. [5, 16].

Rezultate și discuții. *Studiul ultrastructural al adenohipofizei la prepuberi.* La lotul *M celulele somatotrope-STH* (Fig. 1) au nucleul ovalar, predominant eucromatic, heterocromatina fiind repartizată la periferia nucleului într-un strat subțire și din loc în loc în câteva blocuri mai mari. În citoplasmă se observă prezența a numeroase granule electrondense sferice având dimensiuni cuprinse între 350-400 nm. Mitocondriile sunt alungite și dispuse în grupuri, complexul Golgi apare în vecinătatea nucleului, alcătuit din saci aplatizați, care la multe celule sunt aranjați sub formă de potcoavă. În zona trans a sacilor aplatizați există numeroase microvezicule, ceea ce semnifică intensă activitate de elaborare și eliberare de granule de secreție de natură hormonală. Reticulul endoplasmic este reprezentat de profile înguste, dispuse de regulă în jurul nucleului dar și între mitocondrii și granule de secreție. În matricea citoplasmică se găsesc mai mulți sau mai puțini ribozomi în funcție de starea de activitate a celulei.

Celulele gonadotrope-GTH se găsesc dispuse de regulă fie izolat sau în grupuri de câte 2-3 celule. Granulele de secreție sunt relativ numeroase, răspândite în toată citoplasma și au mărimi variabile (Fig. 2): dimensiunea granulelor mici variază între 150-200 nm, iar a celor mari între 400-500 nm. Caracteristic pentru aceste celule este faptul că reticulul endoplasmic apare și sub formă cisternală, dând un aspect ușor vezicular acestora. În funcție de stadiul funcțional al celulelor, matricea citoplasmică poate apărea mai electrondensă, cu numeroși ribozomi liberi și cu reticulul endoplasmic (RE) mai puțin dilatat, cu mitocondrii de formă alungită. Matricea citoplasmică în unele celule apare mai puțin electrondensă, având mai puțini ribozomi liberi. În aceste celule mitocondriile sunt sferice, ovalare și cu matricea mitocondrială rarefiată, iar reticulul endoplasmic se prezintă sub formă cisternală. Nucleul este ovalar, cu 1-2 nucleoli evidenți, având heterocromatina fin dispersată în nucleoplasmă.

Forma *celulelor adrenocorticotrope-ACTH* este poligonală, caracteristica principală a acestor celule fiind poziția granulelor de secreție pe un singur rând de-a lungul membranei celulare (Fig. 2). Dimensiunea granulelor este de aproximativ 200 nm. Nucleul este ovalar, fiind situat în axul longitudinal al celulelor; are un nucleol evident, iar heterocromatina este dispusă în blocuri electrondense împrăștiată în masa carioplasmei, precum și într-o peliculă foarte fină la periferia membranei nucleare. Citoplasma este de electrondensitate medie, conținând mitocondrii

de formă alungită, relativ puține profile de reticol endoplasmic și ribozomi răspândiți în toată matricea citoplasmică. Aceste organite celulare, în unele celule sunt mai mult sau mai puțin numeroase, în funcție de ciclul de secreție al celulei.

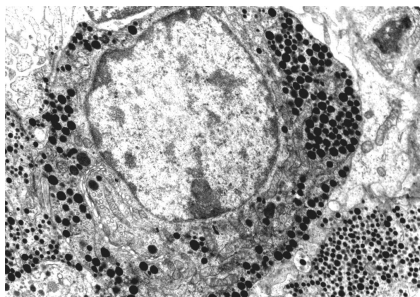


Fig. 1. Celulă STH la lotul M (x12000).

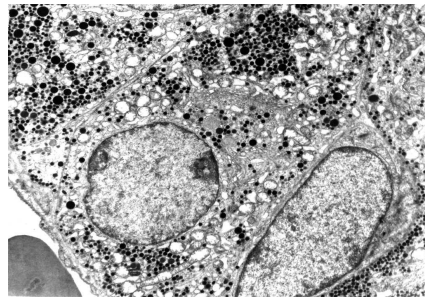


Fig. 2. În colțul drept al imaginii se observă o celulă ACTH, în partea stângă o celulă GTH (x8400).

Celulele proopiomelanocorticotrope-POMC sunt situate de regulă în vecinătatea celulelor ACTH și spre deosebire de acestea posedă un număr mai mare de granule de secreție, dintre care majoritatea au dimensiuni asemănătoare cu granulele de secreție ale corticotropelor și un număr mai mic de granule au dimensiuni mai mari, de aproximativ 250-300 nm (Fig. 3). Toate aceste granule sunt uniform răspândite în citoplasmă. Nucleul este sferic și posedă un nucleol evident, heterocromatina este răspândită relativ uniform sub formă de granule fine în nucleoplasmă.

Imaginile de ansamblu ale adenohipofizei de la lotul D arată că aproape toate celulele STH prezintă modificări ultrastructurale, unele mai intense, altele mai puțin intense. Modificările ultrastructurale ale celulelor somatotrope se manifestă în primul rând prin dilatarea cisternelor reticulului endoplasmic și a spațiului perinuclear, observându-se și un început de condensare a nucleului (Fig. 4). În celulele cu alterări mai puțin intense numărul granulelor de secreție suferă doar o ușoară scădere. Între aceste celule unele apar degranulate (Fig. 5) total, dar cu o structură, aproape normală, însă și în acestea se observă creșterea numărului de lizozomi. Alte celule prezintă modificări mai avansate manifestate prin vacuolizarea întregii citoplasme și prin dispariția totală a granulelor de secreție (Fig. 6).

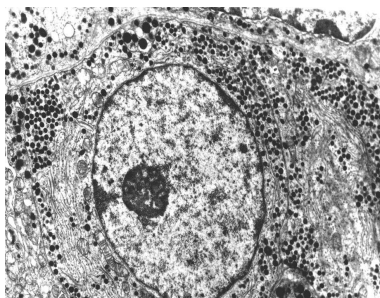


Fig. 3. Celulă POMC (x12000).

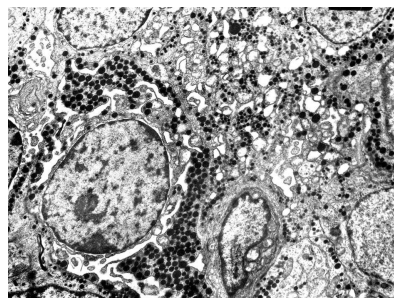


Fig. 4. Celulă STH cu RE dilatat (x 12600).

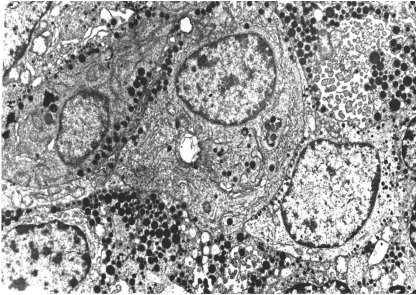


Fig. 5. Celulă STH degranulată (x8400).

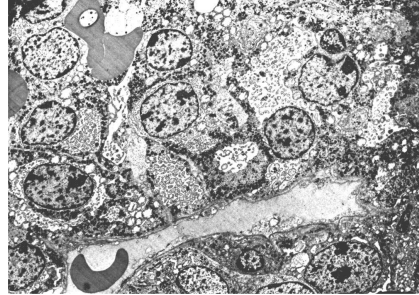


Fig. 6. Vacuolizări ale citoplasmei celulelor STH (x4830).

Celulele GTH prezintă modificări semnificative față de martori. Alterările ultrastructurale sunt mai intense în cazul celulelor situate lângă capilarele sanguine congestionate (Fig. 7), celule în care nucleul are contur neregulat. Reticulul endoplasmic și mitocondriile sunt vacuolizate, iar numărul granulelor de secreție este mult mai redus comparativ cu lotul martor. În unele celule apar vacuolizări intense ale citoplasmei, iar nucleul devine picnotic, cu cromatină condensată (Fig. 8). Numărul granulelor de secreție în aceste celule este foarte redus. Într-un stadiu mai avansat al procesului de alterare, celulele somatotrope cât și cele gonadotrope suferă un proces de vacuolizare completă urmat de dispariția majorității granulelor de secreție. Zone întinse din hipofiză apar cu capilarele sparte și cu hematii extravazate în spațiile intercelulare. În aceste zone alterările structurale sunt mai intense din cauza lipsei aportului de substanțe nutritive și oxigen. Ca urmare, în citoplasma tuturor celulelor apar numeroase vacuolizări care pot conduce într-o fază ulterioară la dispariția completă a granulelor de secreție și la ruperea membranei celulare, precum și la degradarea celulelor din zona respectivă (Fig. 9).

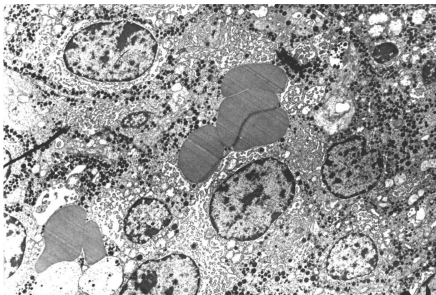


Fig. 7. În jurul capilarelor congestionate celulele GTH prezintă structură profund alterată (x5880).

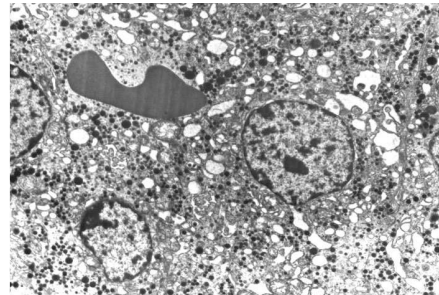


Fig. 8. Celule GTH cu mitocondrii și RE vacuolizate (x8400).

La nivelul *celulelor ACTH* apar modificări mai puțin intense față de lotul martor. Astfel, se observă dilatări ale reticulului endoplasmic și ale mitocondriilor și o ușoară scădere a numărului granulelor de secreție (Fig. 10), care se dispun neregulat de-a lungul membranei celulare. Modificările ultrastructurale la nivelul *celulelor POMC* sunt mai puțin intense (Fig. 11). Cea mai mare parte a celulelor prezintă o activitate secretorie normală. Totuși, se observă că în unele celule mitocondriile apar vacuolizate, matricea citoplasmatică este rarefiată și numărul granulelor de secreție este redus.

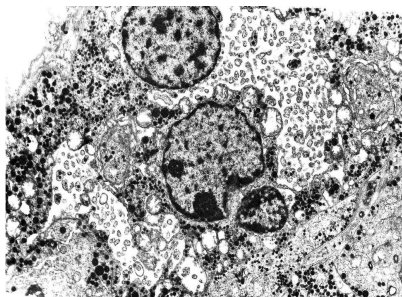


Fig. 9. Celule GTH și STH cu citoplasma complet vacuolizată(x 8400).

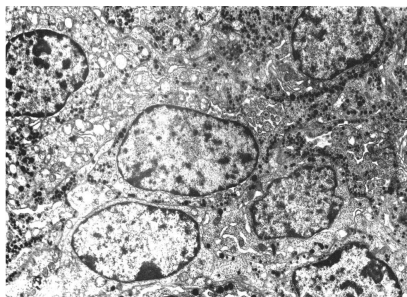


Fig. 10. Celule ACTH cu număr redus de granule de secreție(x 8400).

Studiul ultrastructural al corticosuprarenalei la prepuberi. Studiul ultrastructural al corticosuprarenalei la *lotul M* arată că celulele din zona fasciculată sunt de formă poligonală și sunt dispuse în cordoane (Fig.12). Celulele posedă în centrul lor câte un nucleu sferic sau neregulat, cu nucleolul evident, iar heterocromatina este dispusă atât în mici blocuri dispersate în cariolimfă cât și de-a lungul membranei nucleare interne. Caracteristic este faptul că în celule se găsesc numeroase mitocondrii sferice având criste tubulare. În unele mitocondrii se pot observa la interior și o serie de formațiuni dense, fasciculare. De asemenea, celulele posedă relativ numeroase granule slab electrondense și un număr redus de lizozomi. Complexul Golgi este situat în apropierea nucleului și este bine dezvoltat, prezintă numeroase microvezicule, ceea ce demonstrează existența unui proces intens de sinteză hormonală. În matricea citoplasmică se găsesc relativ numeroși ribozomi, dispuși de regulă în polizomi. Printre mitocondrii se găsește reticul endoplasmic neted dispus sub formă de profile scurte sau vezicule (Fig. 13).

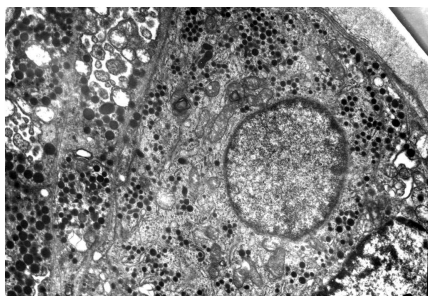


Fig. 11. Celulă POMC cu RE ușor dilatat (x 12600).

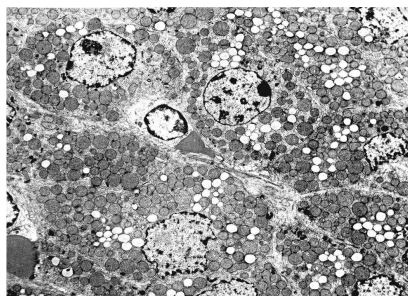


Fig. 12 Ultrastructura corticosuprarenalei (x5250).

Din studiul ultrastructural al corticosuprarenalei *lotului D* reiese că din celulele zonei fasciculate lipsesc aproape în totalitate granulele de secreție hormonală (Fig. 14). Celulele au nuclee cu contur neregulat, spațiul perinuclear este dilatat, iar în cariolimfă cromatina începe să se condenseze; heterocromatina crește cantitativ și este dispusă atât dispersat cât și în blocuri. Comparativ cu martorul putem remarca o rarefiere a matricei și a cristelor mitocondriale care devin slab electrondense. Se observă o intensificare a dilatării reticulului endoplasmic neted, care apare sub formă veziculară sau de profile scurte printre mitocondrii (Fig. 15). La un anumit număr de celule aceste modificări se accentuează, iar nucleul acestora prezintă tendință de picnozare.

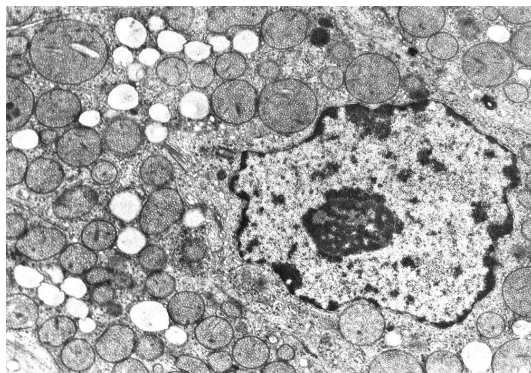


Fig. 13. *Celulă din zona fasciculată a corticosuprarenalei (x 12600)*

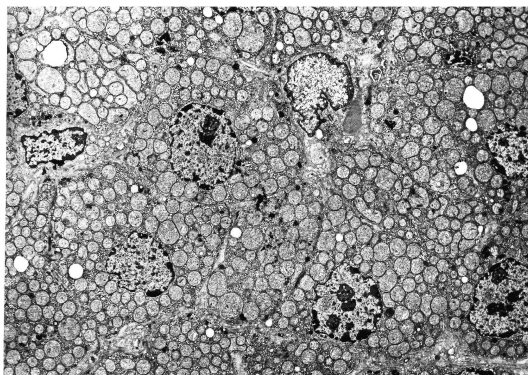


Fig. 14. *Celule corticosuprenale lipsite de granule de secreție (x 4830).*

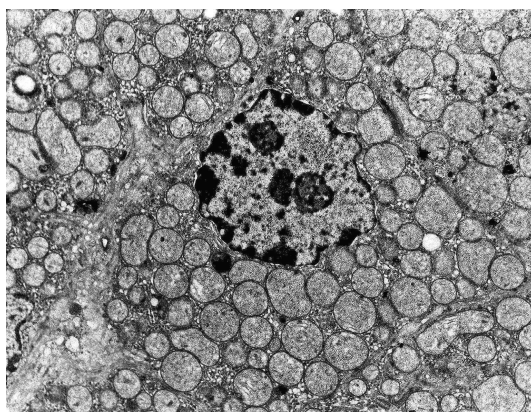


Fig. 15. *Celulă din zona fasciculată cu matricea mitocondrială rarefiată (x 8400).*

Rezultatele studiului biochimic.

Din analiza statistică a datelor obținute la șobolani Wistar masculi prepuberi rezultă (Tabel 1) că tratamentul topic cu Dermovate determină o hiperglicemie semnificativă. Glicemia crește față de lotul martor cu 47 %. Această creștere a glicemiei este rezultatul hiperproducției hepatice de glucoză, a intensificării gluconeogenezei și glicogenezei hepatice, precum și a rezistenței musculare față de acțiunea insulinei. Hiperglicemia este asociată cu creșterea concentrației colesterolului seric, ceea ce este, de asemenea, un indiciu al excesului glucocorticoidic.

Tabel 1

Variația procentuală a glicemiei și colesterolemiei

Loturi	Glicemie	Colesterolemie
	mg (%)	%
M	66	218
D	86	264
a	+ 47 **	+32**

a-Valori raportate la loturile martor.

** Valori foarte semnificative (P<0,001).

În condiții fiziologice normale ACTH intensifică captarea colesterolului din lipoproteinele cu densitate mică, după care colesterolul este esterificat și depozitat în citoplasmă, sub formă de picături lipidice. Prin acțiunea colesterol-hidrolazei, din colesterolul esterificat se desprinde colesterolul liber. Un căraș proteic îl transportă în mitocondrii unde sub acțiunea colesterol-dezmolazei se transformă în pregnenolon. Pregnenolonul trece în reticulul endoplasmic neted și printr-un proces de dehidrogenare formează progesteronul. Progesteronul, sub acțiunea enzimei 17 α hidroxilaza se transformă în cortizol (respectiv în corticosteron la șobolani). În condițiile investigațiilor noastre, deși ultrastructura celulelor corticotrope este aproape normală, absența totală a picăturilor lipidice din celulele zonei fasciculate din corticosuprarenală sugerează o eventuală blocare a eliberării de ACTH. Datorită acestui fapt nu are loc captarea colesterolului, fiind mai mult alterat echipamentul enzimatic răspunzător de sinteza steroizilor, ceea ce determină depleția totală de lipide. În absența sintezei hormonale crește concentrația colesterolului seric.

Dinamica greutății relative a suprarenalelor și timusului (Tabel 2) demonstrează că excesul glucocorticoidic realizat prin absorbția transcutană a cremei Dermovate determină scăderea semnificativă a greutății relative a organelor luate în studiu. Greutatea relativă a suprarenalei scade cu 11 % față de control, iar a timusului cu 63 %.

Tabel 2

Greutatea relativă a suprarenalei (GRSR) și timusului (GRT)

Loturi	GRSR mg(%)	GRT (%)
M	22	411
D	19	152
a	-11*	-63**

a-Valori raportate la loturile martor.

* Valori semnificative (P<0,05).

** Valori foarte semnificative (P<0,001).

Rezultatele gravimetrice demonstrează potența timolitică a acestui dermocorticoid, ceea ce conduce la scăderea capacității imunologice a organismului tânăr.

Rezultatele ultrastructurale și biochimice arată că tratamentul epicutan cu Dermovate determină un exces glucocorticoidic manifestat prin modificări endocrino-metabolice. Aceste modificări sunt însă mai puțin intense comparativ cu modificările descrise la dermocorticoidul Fluocinolon-acetonid N [1-4, 6-10], explicația constând probabil în structura moleculară diferită a dermocorticoidului Dermovate, acesta fiind un glucocorticoid bihalogenat monoclorurat-monofluorurat. Celulele hipofizare cele mai afectate sunt STH și GTH ca și în cazul tratamentului cu Fluocinolon-acetonid N [8]. La aceste celule putem observa atât alterarea aparatului secretor cât și înhibarea eliberării secreției hormonale. Înhibarea secreției de STH este reflectată și de modificările gravimetrice semnalate în literatura din țară, conform cărora are loc scăderea greutatei relative a timusului, suprarenalei, splinei și pancreasului, efecte mai puternice fiind înregistrate la șobolanii prepuberi [1-4, 7, 11-14]. Aceste date coroborate cu rezultatele biochimice și gravimetrice sugerează o încetinire a creșterii, dezvoltării și maturării sexuale a organismului. De asemenea, modificările induse la nivelul celulelor STH pot fi corelate și cu aspectul morfologic al corticosuprarenalei. La microscopul optic aceasta prezintă o corticală mai îngustă la loturile tratate în comparație cu loturile martori netratate [3]. Însă reducerea grosimii corticosuprarenalei este mai puțin intensă decât la tratamentul cu Fluocinolon-acetonid N.

Modificările ultrastructurale și biochimice induse de Dermovate sunt mai puțin intense comparativ cu modificările induse de tratamentele cu Fluocinolon-acetonid N [6, 7, 11-14], ceea ce arată că Dermovate are o acțiune nocivă moderată. Rezultatele experimentelor noastre sunt în concordanță cu datele din literatura de specialitate conform cărora administrarea dermocorticoidului Dermovate determină timoliză precum și atrofierea suprarenalei [1-4, 11-14].

Rezultatele din literatura de specialitate [3] arată că atrofierea timică este asociată și cu reducerea greutatei relative a suprarenalei. Această modificare este în concordanță cu rezultatele noastre structurale conform cărora zona fasciculată este mai îngustă comparativ cu cea de la martor. Este de menționat că reducerea zonei fasciculate este mai puțin evidentă comparativ cu efectul tratamentului cu Fluocinolon-acetonid N [3, 9]. La loturile tratate cu Dermovate se observă prezența granulelor de secreție, ceea ce sugerează faptul că Dermovate nu inhibă în totalitate secreția de corticosteroidi. Granulele sunt prezente în celulele nealterate sau cu alterări minore. În celulele cu structură grav alterată, granulele de secreție lipsesc în totalitate.

Activitatea secretorie înregistrată la nivelul suprarenalei sugerează că tratamentul cu Dermovate nu blochează în totalitate eliberarea ACTH la nivelul hipofizei, ceea ce este în concordanță cu rezultatele ultrastructurale înregistrate la nivelul celulelor ACTH.

Datele experimentale din literatura de specialitate, ca și rezultatele noastre, arată că tratamentul glucocorticoidic cu Dermovate determină perturbarea metabolismului glucidic, proteic și lipidic. Ca și tratamentul cu Fluocinolon-acetonid N, Dermovate determină hiperglicemie datorită insulinorezistenței tisulare, asociată cu intensificarea gluconeogenezei. Intensificarea gluconeogenezei hepatice sugerează că excesul glucocorticoidic acționează atât direct asupra ficatului determinând intensificarea mobilizării glucozei, cât și indirect prin stimularea receptorilor β -adrenergici [6, 7, 10, 12, 14] datorită intensificării descărcărilor de catecolamine.

Concluzii. 1. Tratamentul epicutan cu dermocorticoidul Dermovate determină un exces glucocorticoidic în organism, manifestat prin alterări endocrino-metabolice.

2. La nivelul hipofizei, aplicarea epicutană a dermocorticoidului Dermovate afectează grav ultrastructura celulelor STH și GTH.

3. Excesul glucocorticoidic provocat de administrarea epicutană de Dermovate determină atrofierea suprarenalei.

4. Dermovate are efect antisomatotrop și timolitic.

BIBLIOGRAFIE

1. Crăciun, C., Ardelean, A., Madar, I., Tarba, C., Șildan, N., Crăciun, V., Fărcaș, T., *Ultrastructural studies of the secondary effects induced at the level of thymus by topic application of Fluocinolone-acetonid N in prepubertal rats*, în Crăciun, C., Ardelean, N. (Eds.), *Current Problems and Technique in Cellular and Molecular Biology*, p.176-186, Mirton, Timișoara, 1997.
2. Crăciun, C., Frățila, S., Ardelean, A., Madar, I., Crăciun, V., *Ultrastructural and biochemical studies concerning the action of some topical dermocorticoids on prepubertal rat thymuses, before and simultaneously with the β -adrenoreceptors blocking*, în Crăciun, C., Ardelean, N. (Eds.), *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, p. 209-248, Risoprint, Cluj-Napoca, 1999.
3. Crăciun, C., Kis, E., Sandu, V.-D., Pașca, C., Puică, C., Crăciun, V., Madar, I., *Comparative studies of the adrenal cortex structure and ultrastructure in mature rats treated with topical dermocorticosteroids*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **46** (1), 2001, 91-98.
4. Crăciun, C., Miclăuș, V., Crăciun, V., *Comparative study of thymus ultrastructure, thymolysis and blood-serum lipids in prepubertal rats, treated with topical corticosteroids*, în Crăciun, C., Ardelean, N., (Eds.), *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, p. 200-217, Risoprint, Cluj-Napoca, 1998.
5. Cucuianu, M., Rus, H. G., Niculescu, D., Vonica, A., *Biochimie. Aplicații clinice*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1991.
6. Kis, E., Crăciun C., *Atenuarea modificărilor structurale și metabolice induse de excesul glucocorticoidic prin administrarea de propranolol*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **48** (1), 2003, 67-79.
7. Kis, E., Crăciun C., *Atenuarea modificărilor gravimetrice induse de tratamentul cu Fluocinolone-acetonid N prin administrarea de propranolol*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **48** (2), 2003, 83-88.
8. Kis, E., Crăciun C., Pașca, C., Sandu, V.-D., Crăciun, V., Madar, I., *Comparative studies of the ultrastructure of somatotrope, gonadotrope and corticotrope cells in mature rats treated with topical dermocorticosteroids*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **46** (1), 2001, 99-109.
9. Kis, E., Puică, C., Pașca, C., Sandu, V.-D., Madar, I., *Attenuation of the Fluocinolone-acetonid N induced histological alteration of hypothalamic-pituitary-adrenal axis by Propranolol in white Wistar rats*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **44** (1-2), 1999, 127-134.
10. Kis, E., Sandu, V.-D., Pașca, C., *Efectul antiglucocorticoid al Propranololului*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **46** (2), 2001, 83-97.
11. Madar, I., Gurgea, R., Borda, D., Roman, I., Borș, M., *Comparative data on the "in vivo" effects of Hydrocortison-17-butyrate and Clobetasol-propionate upon the thymus in prepubertal young rats*, în Crăciun, C., Ardelean, A. (Eds.), *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, p.221-225, Risoprint, Cluj-Napoca, 1997.
12. Madar, I., Gurgea, R., Roman, I., Borda, D., *Age-related role of beta-adrenoreceptor activity during Clobetasol-induced thymolysis in male young wistar rats*, în Crăciun, C., Ardelean, A. (Eds.), *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, p.254-262, Risoprint, Cluj-Napoca, 1998.

13. Madar, I., Șildan, N., Borșan, M., Ilyés, I., *Effects of epicutaneous treatment with Fluocinolone unguent on glycemia, insulinemia and muscular sensitivity to insulin in various age-groups of Wistar rats*, în Crăciun, C., Ardelean, A. (Eds.), *Current Problems and Technique in Cellular and Molecular Biology*, p.301-304, Mirton, Timișoara, 1996.
14. Madar, I., Șildan, N., Ilyés, I., Crăciun, C., Frățilă, S., Găvan, N., Crăciun, A. R., *Age-related thymolytic and hyperglycemic effects of some percutaneously absorbed topical corticosteroids in rats*, în Crăciun, C., Ardelean, A. (Eds.), *Current Problems and Technique in Cellular and Molecular Biology*, p.305-310, Mirton, Timișoara, 1996.
15. Ploaie, P. G., Petre, Z., *introducere în microscopia electronică cu aplicații în biologia celulară și moleculară*, Ed. Acad. Rom., București, 1979.
16. Zlatkis, A., Zak, B., Boyle, A. J., *A new method for the direct determination of serum cholesterol*, "J. Lab. Clin. Med.", **41**, 1953, 486-492.

SULFUR CYCLE AND TROPHIC RELATIONSHIPS AMONG HALOALKALIPHILIC SULFUR BACTERIA

HORIA BANCIU^{1,2}

SUMMARY. Sulfur is one of the main elements whose natural cycling is essential to life on Earth. Chemical and biological processes are involved in the transformation of sulfur to different organic or inorganic compounds. Microorganisms take advantages of utilizing various sulfur compounds, either the reduced (serving as energy source) or the oxidized S-forms (electron acceptor). The sulfur cycle is also present in the extreme environments like saline and alkaline lakes. Purple sulfur bacteria and chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria (SOB) are among the major groups that use reduced sulfur compounds as energy source and electron donor in the saline-alkaline lakes. The haloalkaliphilic SOB isolated from soda lakes proved to be highly specialized for the doubly extreme conditions of high salt concentration and high pH. Based on these properties, the haloalkaliphilic SOB from soda lakes can be usefully exploited in bioreactors with stable soda alkalinity and supplied with inorganic sulfur compounds for sulfur removal from waste streams..

Natural sulfur cycling. Sulfur is one of the most important elements for sustaining life on Earth. The sulfur chemistry is complicated by the many oxidation states sulfur can assume (**Table 1**). Geochemically, sulfur is very abundant and several sources of production, emission or storage can be identified (**Table 2**) [36].

Table 1

Oxidation states of sulfur in common compounds

Oxidation state	Compounds
-2	Dihydrogen sulfide H ₂ S, hydrogen sulfide ion HS ⁻ , sulfide ion S ²⁻ as in FeS; thiocyanate SCN ⁻
-1	Disulfane H ₂ S ₂ ; disulfide S ₂ ²⁻ as in pyrite FeS ₂ ; thiosulfate sulfane S ¹⁻ ; polysulfides ⁻ S(S) _n S ⁻
0	Elemental sulfur S _n ; organic polysulfanes R-S _n -R; polythionates ⁻ O ₃ S(S) _n SO ₃ ⁻
+1	Dichlorodisulfane Cl-S-S-Cl
+2	Sulfur dichloride SCl ₂ ; sulfoxylate SO ₂ ²⁻
+3	Dithionite S ₂ O ₄ ²⁻
+4	Sulfur dioxide SO ₂ ; sulfite SO ₃ ; bisulfite HSO ₃ ⁻
+5	Dithionate S ₂ O ₆ ²⁻ ; sulfonate RSO ₃ ⁻ ; thiosulfate sulfone SO ₃ ⁵⁺
+6	Sulfur trioxide SO ₃ ; sulfate SO ₄ ²⁻ ; peroxosulfate SO ₅ ²⁻

The biochemical significance of sulfur is tremendous. The origin of life has been linked with iron sulfide (pyrite) that becomes catalytically active at elevated temperature and at high pressures [4, 24, 38]. Sulfur plays a catalytical role in the iron-sulfur clusters within respiratory enzymes. Sulfur containing aminoacids (cysteine, cystine and methionine), sulfolipids, and many co-enzymes (glutathione, coenzyme A, biotin, lipoic acid) are essential for cell metabolism.

1. Department of Experimental Biology, Babes-Bolyai University, Cluj-Napoca, Romania

2. Department of Biotechnology, Delft University of Technology, The Netherlands

Main sources of sulfur

Source of sulfur	Dominant sulfur compound
Volcanic activity	SO ₂
Biogenic emissions (from vegetation, wetlands, lands)	H ₂ S, dimethyl sulfide, carbonyl sulfide
Biogenic emissions from oceanic environments	SO ₄ ²⁻ , dim ethylsulfide
Anthropogenic activities	SO ₂ , SO ₃
Sulfur storage products	Gypsum (CaSO ₄ • 2H ₂ O), metal sulfides, elemental sulfur (S ⁰)

In the natural environment the element sulfur is part of a closed cycle with alternating oxidized and reduced sulfur species, in the organic and inorganic forms. The chemical sulfur cycle strongly interacts with biological activity resulting in utilization, transformation and storage of sulfur compounds (**Figure 1**). Nevertheless, the biological importance of sulfur compounds resides in their capacity to serve as electron donor and acceptor for anaerobic respiration or aerobic light-dependent CO₂ reduction and moreover, as an aerobic energy source for ATP production [21].

Biological oxidation of inorganic sulfur. The most abundant form of sulfur available in nature for use by living organisms is in the oxidized state (SO₄²⁻). Sulfate is biologically reduced under anaerobic conditions by sulfate-reducing bacteria (SRB) using different substrates as electron donors (organic compounds or H₂). Bacterial sulfate reduction in the presence of low concentration of oxygen has also been observed [3].

The process of sulfate reduction is synonym to sulfide (H₂S) production or sulfidogenesis. In a next step of biological sulfur cycle, H₂S, the most reduced sulfur compound, serves as electron donor and energy source for chemolithotrophic microorganisms. The anaerobic phototrophic sulfur-oxidizing bacteria (SOB) such as *Allochromatium*, *Chlorobium*, some *Rhodospirillaceae*, *Ectothiorhodospiraceae* and some cyanobacteria when grown anaerobically use H₂S as the electron donor for CO₂-fixation. In the chemolithoautotrophic nutrition, the reduced sulfur compound has a dual role, i.e. as electron donor as is the case in the phototrophs, and as energy source. The oxidation of sulfur compounds leads to the build-up of a proton motive force, which may generate ATP for CO₂-fixation. The proton motive force is also used to drive reversed electron transport to provide the reducing power (as NADH) for CO₂-fixation. The CO₂ fixation pathway in most known phototrophic and chemotrophic bacteria is the Calvin cycle, but also the reversed tricarboxylic acid cycle has been detected in a variety of (non)phototrophic bacteria.

Two groups of lithotrophic SOB have been distinguished previously; members of one group are able to utilize polythionates, and members of the other group are not able to do this [15, 16]. On the basis of physiological and biochemical data, at least two major pathways have been proposed for different SOB:

- (i) The sulfur oxidation pathway and
- (ii) The S₄ intermediate pathway involving polythionates [6, 16].

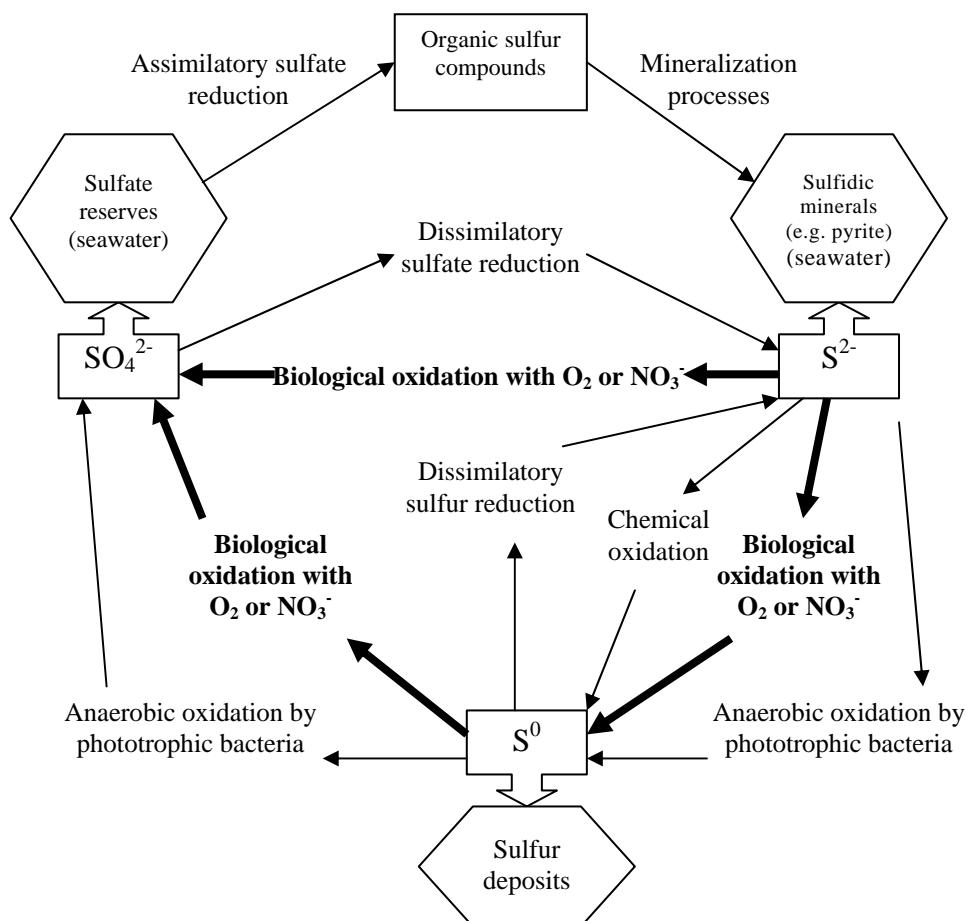


Fig. 1. The biological sulfur cycle. The thickened arrows indicate the oxidation processes that occur in the alkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes [29].

The product of biological sulfide oxidation is SO_4^{2-} (complete oxidation), S^0 (elemental sulfur) or both SO_4^{2-} and S^0 (incomplete oxidation). Occasionally also thiosulfate was detected as end product both under aerobic and anaerobic conditions [13, 14, 41]. Elemental sulfur can be excreted in the environment or it can be stored extra- or intracellularly. The forms of stored elemental sulfur were investigated recently and it was shown that sulfur atoms are associated in chains or rings to which organic radical groups are attached. In this way, the biologically stored elemental sulfur differs in structure and composition from that of sulfur deposits resulting from chemical reactions [27, 28]. The excreted and the stored elemental sulfur are further oxidized to SO_4^{2-} by the same organism or by other SOB to yield supplementary energy. Several phototrophic bacteria, when grown in the dark, can also use elemental sulfur as acceptor for electrons derived from the storage compounds. Another category of SOB is able to use H_2S under anaerobic condition with NO_3^- as electron acceptor (denitrifying colorless sulfur bacteria). Interestingly, a number of strictly anaerobic bacteria are capable of “fermenting” partially reduced sulfur compounds, such as

sulfur, thiosulfate and sulfite into a mixture of H₂S and sulfate. In this way a complete turnover of inorganic sulfur compounds is possible through biological processes.

When seasonal or accidental changes occur in the physico-chemical or geological parameters of the natural environments, perturbation of the sulfur cycle can follow. A predominance of sulfide production may lead to accumulation of this toxic compound, which will diffuse toward the aerobic zones. A gradient of sulfide is thus established. In a very narrow layer, at the aerobic-anaerobic interface, H₂S meets O₂. H₂S can be oxidized either chemically or biologically under aerobic conditions. The factors that influence the rate of chemical oxidation are the concentration of the reaction components, the pH and the presence of metal ions [17]. Several groups of microorganisms are able to oxidize reduced sulfur compounds such as H₂S under aerobic or microaerobic conditions [18, 20].

Three main groups of SOB can be distinguished: the anoxygenic phototrophs (e.g. green and purple sulfur bacteria), the obligate and the facultatively autotrophic colorless sulfur bacteria among which one can find the morphologically conspicuous bacteria (**Table 3**). There also exist sulfur-dependent Archaea (e.g. *Thermococcus*, *Sulfolobus*, *Acidianus*). A group called purple nonsulfur bacteria was originally thought to be unable to use sulfide as an electron donor for the reduction of CO₂ to cell material. However, under certain conditions, sulfide at low concentrations can be used by most purple nonsulfur species [8].

Table 3

Categories of SOB

Category	Metabolic type	Location	S-compound used as electron donor	Representatives
Green sulfur bacteria	Anaerobic photolithoautotrophs	Mud and anoxic water	H ₂ S, S ⁰	<i>Chlorobium</i>
Purple sulfur bacteria	Anaerobic or microaerophilic (photo)lithoautotrophs	Oxic and anoxic water, above green sulfur bacteria layer	H ₂ S, S ₂ O ₃ ²⁻ , S ⁰	<i>Chromatium</i> , <i>Rhodospirillum</i> , <i>Rhodobacter</i> , <i>Thiospirillum</i> , <i>Thiocapsa</i> , <i>Ectothiorhodospira</i> , <i>Halorhodospira</i>
Obligate autotrophic colorless sulfur bacteria	Aerobic and anaerobic obligate chemolithoautotrophs	Soil, sediments, oxic/ anoxic interfaces of water, sulfur springs and other volcanic sources	H ₂ S, metal sulfides, S ₂ O ₃ ²⁻ , S ⁰ , S ₃ O ₆ ²⁻ , S ₄ O ₆ ²⁻	<i>Thiobacillus thioparus</i> , <i>Thermithiobacillus tepidarius</i> , <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> , <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , <i>Halothiobacillus neapolitanus</i> , <i>Halothiobacillus halophilus</i> , <i>Thiomicrospira pelophila</i>
Facultatively autotrophic colorless sulfur bacteria	Aerobic and anaerobic facultative chemoautotrophs		H ₂ S, metal sulfides, S ₂ O ₃ ²⁻ , S ⁰ , S ₄ O ₆ ²⁻	<i>Starkeya novella</i> , <i>Thiobacillus aquaesulis</i> , <i>Thiomicrospira thyasirae</i> , <i>Paracoccus denitrificans</i> , <i>Paracoccus versutus</i> ; Morphologically conspicuous bacteria as <i>Beggiatoa</i> , <i>Thiothrix</i> , <i>Thioploca</i> , <i>Achromatium</i> , <i>Macromonas</i> , <i>Thiobacterium</i> , <i>Thiospira</i> , <i>Thiomargaritha</i>

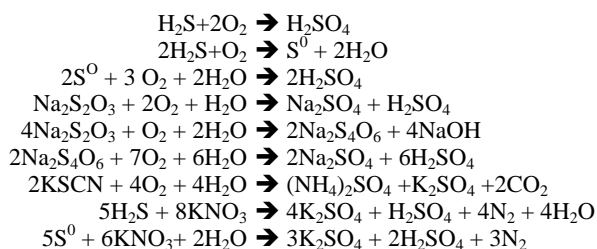
Representatives of the SOB can be isolated from acidic, neutral or alkaline environments, from cold, moderate or hot habitats, as well as from low to highly saline waters and soils.

Examples of the energy-yielding reactions used by colorless sulfur bacteria are presented in **Table 4**. From this table it can be noticed that, in general, the oxidation of inorganic sulfur compounds releases high amounts of energy, which is trapped as proton-motive force or sometimes, directly as ATP (by substrate-level phosphorylation). The complete oxidation of inorganic sulfur leads to production of sulfuric acid and therefore there is a strong tendency of acidification of the surrounding environment. The microbial oxidation of sulfides is important for the formation of sulfuric acid in coal mines and in sulfur deposits. The acidification resulting from the biological activity has a strong impact on large natural areas [7, 22].

The sulfur-oxidizing (leading to H₂SO₄) and sulfate-reducing (H₂S) activities of microorganisms are often related to strong corrosion in sewer systems, concrete structures and in the equipment used to mine, store or transport coal [23].

Table 4

Examples of the reactions used by colorless sulfur bacteria to gain energy for growth (Robertson and Kuenen, 1992)



Sulfur cycling in the haloalkaline environments. The high salinity and hence high density of the hypersaline and many soda lakes explain why they are often hydrologically stratified. This often results in a layer of less saline water permanently covering the concentrated salt layer (known as meromixis) [9]. Only the upper layers of the water contain oxygen and can support eukaryotic and aerophilic prokaryotic life. Due to the lack of mixing, the bottom waters are anoxic and at alkaline pH values, toxic inorganic compounds as sulfide or ammonia accumulate. The stratification of physical properties (e.g. temperature, light) or chemical parameters (dissolved oxygen, pH and salinity) is reflected in a stratification of microbial community. Despite their apparently too extreme conditions to support life, the soda lakes accommodate a large variety of microorganisms [5].

Microorganisms involved in the sulfur cycle from saline and alkaline environments like soda lakes have been well studied [39]. The haloalkaliphilic sulfur-oxidizing phototrophic and anoxygenic bacteria are members of the genus *Ectothiorhodospira* (*E. haloalkaliphila*, *E. vacuolata*) [10, 37] and of the genus *Halorhodospira* sp. (*H. halophila*, *H. halochloris*, *H. abdelmalekii*) [11]. The halophilic sulfate-reducing bacteria are found within *Desulfonatronovibrio* sp. (*D. hydrogenovorans*) [40] and *Desulfonatronum* (*D. lacustre*, *D. thiodismutans*) [25, 26]. Together with recently discovered obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria of the genera *Thioalkalimicrobium* and *Thioalkalivibrio* [2, 31-35], the heterotrophic sulfur-oxidizers and sulfate-reducers constitute an ecologically balanced microbial community that ensures the recycling of sulfur in the saline and alkaline lakes (**Fig. 2**).

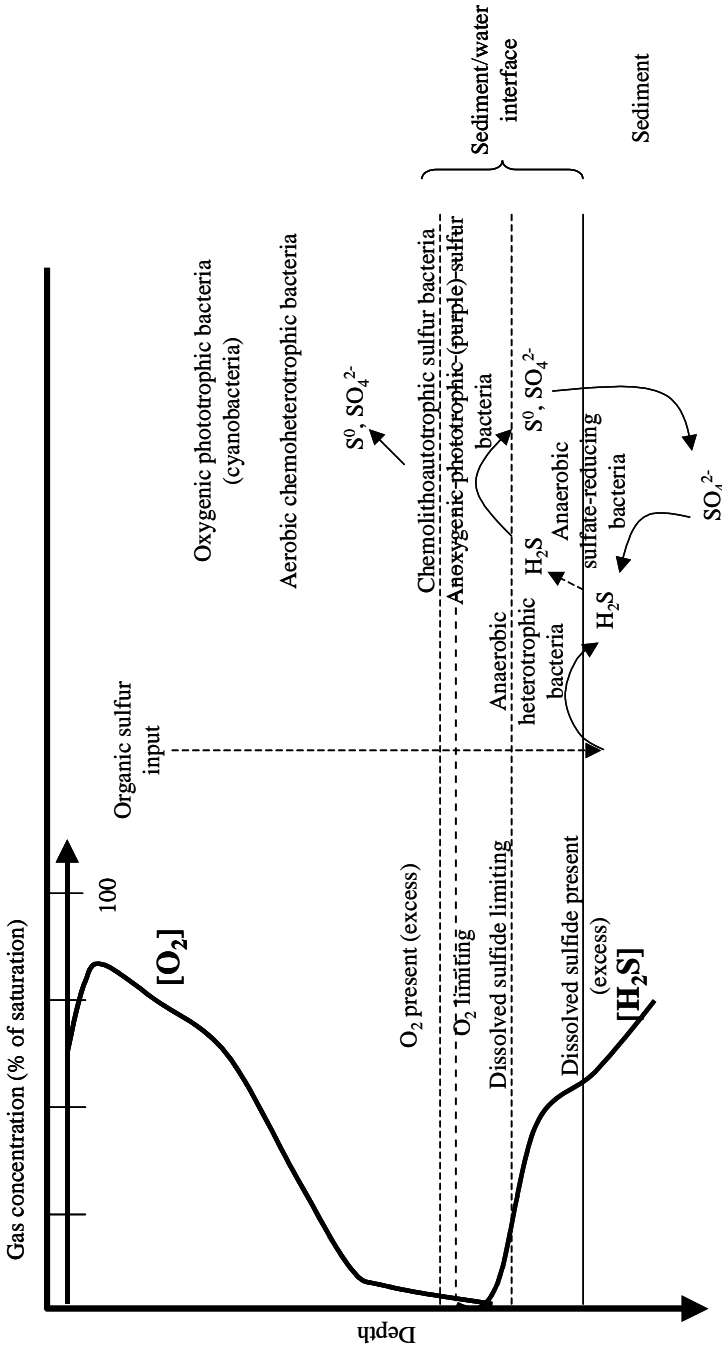


Fig. 2. The diagram of the biological sulfur cycling in a saline alkaline lake. The alkaliphilic, chemolithoautotrophic SOX bacteria inhabit the O_2/HS^- interface where two situations are possible: a coexistence of O_2 with HS^- and the presence of a shuttle system between O_2 , Fe^{2+} , Mn^{2+} and HS^-

Potential applications of haloalkaliphilic SOB. Several environmental problems are caused by sulfur compounds like sulfate (pollution of surface water, acid mine drainage), SO_2 (acid rain), H_2S (odor problems, high toxicity, acid rain) and methylated sulfur compounds (odor problems, toxicity, climate change). The aim of sulfur biotechnology is to prevent loss of sulfur compounds to the atmosphere and to avoid complete oxidation of sulfur compounds to sulfate. Current research is therefore focused on the production of a sulfur compound, which can be easily separated from the waste streams, stored and re-used for other purposes. One of the successful processes is the production of elemental sulfur from H_2S -containing gas streams by sulfur-oxidizing bacteria in the Thiopaq® process (Paques BV, Balk, The Netherlands) (Fig. 3). In this system gasses can be treated by the absorption of H_2S in a scrubber unit, subsequent biological oxidation of sulfide to elemental sulfur at neutral pH and separation of the sulfur and recycling of the percolation water to the scrubber [1, 12, 19, 30]. A variety of gas streams (pressurized natural gas, synthesis gas, biogas and refinery gas) can be treated with this two-step process. Points for major innovation of this process are the enhancement of the stripping efficiency of H_2S in the scrubber (by elevating the pH) and the reduction of the bleed stream of the aerobic reactor (by maintaining high salt conditions). Moreover, since high CO_2 content is usual for H_2S -containing industrial gases, use of alkaline carbonates in the scrubber instead of organic or inorganic alkali (NaOH) is beneficial for the effectiveness of H_2S absorption.

The alkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria that originate from soda lakes of Siberia (Russia) and Kenya can tolerate a very high pH (up to 10.6-11) and high salt concentrations (1-4 M Na^+), making them attractive for biotechnological sulfide removal.

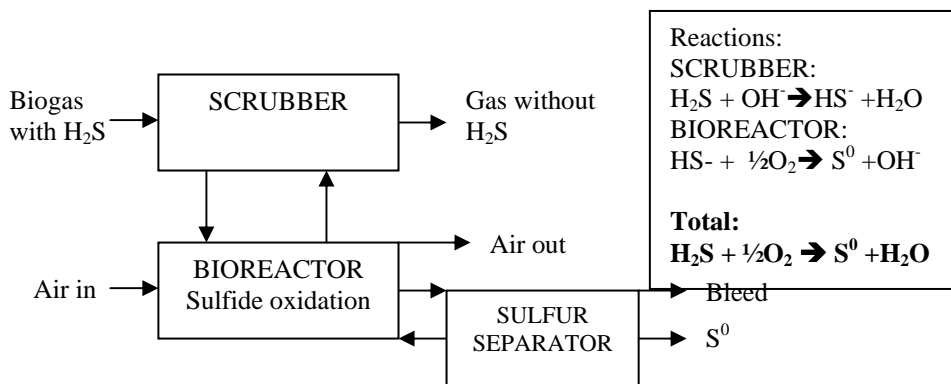


Fig. 3. Block process diagram of the Thiopaq®-bioscrubber and reaction mechanisms involved

In **conclusion**, biological sulfur oxidation is a widespread natural process accommodated even in the harshest environments, as hypersaline and soda lakes are. The occurrence of the sulfur cycle in these ecotopes is possible at almost all levels of oxidation states due to a large spectrum of metabolic activities found here. Sulfur-oxidizing bacteria have been for long time known but the particular group of chemolithoautotrophic haloalkaliphilic SOB was only recently described. Beside their scientific significance, there have been conceived several biotechnological applications especially in the removal of toxic sulfur compounds under saline and alkaline conditions.

We dedicate this review to **Gijs J. Kuenen** on the occasion of his 25th anniversary of becoming 3rd Professor to follow M.W. Beijerinck as Professor of General and Applied Microbiology at Delft University of Technology, The Netherlands. He was the promoter of the author's doctoral dissertation in 2004.

REFERENCES

1. Banciu, H., Sorokin, D. Y., Muyzer, G., Kleerebezem, R., Galinski, E. A., Kuenen, J. G., *Application of haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria for the removal of H₂S from gas streams*, In Verstraete, W. (Ed) "Environmental Biotechnology – ESEB 2004", A.A. Balkema Publishers, Leiden, 2004, pp. 345-348.
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, 225-234.
3. Canfield, D. E., DesMarais, D. J., *Aerobic sulfate reduction in microbial mats*, "Science", **251**, 1991, 1471-1473.
4. Cody, G. D., Boctor, N. Z., Filley, T. R., Hazen, R. M., Scott, J. H., Sharma, A., Yoder, Jr. H. S., *Primordial carbonylated iron-sulfur compounds and the synthesis of pyruvate*, "Science", **289**, 2000, 1337-1340.
5. 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.
6. Friedrich, C. G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A., Fischer, J., *Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism?*, "Appl. Environ. Microbiol.", **67**, 2001, 2873-2882.
7. Gonzalez-Toril, E., Lobet-Brossa, E., Casamayor, E. O., Amann, R., Amils, R., *Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River*, "Appl. Environ. Microbiol.", **69**, 2003, 4853-4865.
8. Hansen, T. A., van Gemerden, H., *Sulfide utilization by purple nonsulfur bacteria*, "Arch. Mikrobiol.", **86**, 1972, 49-56.
9. 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.
10. 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.
11. Imhoff, J. F., Süling, J., *The phylogenetic relationship among Ectothiorhodospiraceae: a reevaluation of their taxonomy on the basis of 16S rDNA analyses*, "Arch. Microbiol.", **165**, 1996, 106-113.
12. Janssen, A. J. H., Ruitenberg, R., Buisman, C. J. N., *Industrial applications of new sulphur biotechnology*, "Water. Sci. Technol.", **44**, 2001, 85-90.
13. Jørgensen, B. B., *Biogeochemistry of chemolithoautotrophic bacteria*, In: Schlegel, H. G., Bowien, B., (eds), "Autotrophic bacteria", Springer-Verlag, Berlin, 1989, pp 117-146.
14. Jørgensen, B. B., *The sulfur cycle of freshwater sediments: role of thiosulfate*, "Limnol. Oceanogr.", **35**, 1990, 1329-1342.
15. Kelly, D. P., *Thermodynamic aspects of energy conservation by chemolithotrophic sulfur bacteria in relation to the sulfur oxidation pathways*, "Arch. Microbiol.", **171**, 1999, 219-229.
16. Kelly, D. P., Shergill, J. K., Lu, W. - P., Wood, A. P., *Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria*, "Ant. van Leeuwenhoek", **71**, 1997, 95-107.

17. K u e n e n, J. G., *Colorless sulfur bacteria and their role in the sulfur cycle*, "Plant and Soil", **43**, 1975, 49-76.
18. K u e n e n, J. G., B e u d e k e r, 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.
19. K u e n e n, J. G., R o b e r t s o n, L. A., *The use of natural bacterial populations for the treatment of sulfur-containing wastewater*, "Biodegradation", **3**, 1992, 239-254.
20. K u e n e n, J. G., R o b e r t s o n, L. A., T u o v i n e n, O. H., *The genera Thiobacillus, Thiomicrospira and Thiosphaera*. In: B a l o w s, A. et al., (eds). "The Prokaryotes", Springer Verlag, New York, 3, 1992, pp 2638-2657.
21. L e n s, P. N. L., K u e n e n, J. G., *The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology*, "Water Sci. Technol.", **44**, 2001, 57-66.
22. L o p e z - A r c h i l l a, A. I., M a r i n, I., A m i l s, R., *Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the Tinto River, Spain*, "Microb. Ecol.", **41**, 2001, 20-35.
23. L i t t l e, B. J., R a y, R. I., P o p e, R. K., *Relationship between corrosion and the biological sulfur cycle: a review*, "Corrosion", **56**, 2000, 433-443.
24. M a r t i n, W., R u s s e l l, M. J., *On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells*, "Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.", **358**, 2003, 59-83.
25. P i k u t a, E. V., H o o v e r, R. B., B e j, A. K., M a r s i c, D., W h i t m a n, W. B., C l e l a n d, D., K r a d e r, P., *Desulfonatronum thiodismutans sp. nov., a novel alkaliphilic, sulfate-reducing bacterium capable of lithoautotrophic growth*, "Int. J. Syst. Evol. Microbiol.", **53**, 2003, 1327-1332.
26. P i k u t a, E. V., Z h i l i n a, T. N., Z a v a r z i n, G. A., K o s t r i k i n a, N. A., O s i p o v, G. A., R a i n e y, F. A., *Desulfonatronum lacustre sp. nov.: a new alkaliphilic sulfate-reducing bacterium utilizing ethanol*, "Microbiology (Moscow)", **67**, 1998, 123-131.
27. P r a n g e, A., A r z b e r g e r, I., E n g e m a n n, C., M o d r o w, H., S c h u m a n n, O., T r ü p e r, H. G., S t e u d e l, R., D a h l, C., H o r m e s, J., *In situ analysis of sulfur in the sulfur globules of phototrophic sulfur bacteria by X-ray absorption near edge spectroscopy*, "Biochim. Biophys. Acta", **1428**, 1999, 446-454.
28. P r a n g e, A., C h a u v i s t r e, R., M o d r o w, H., H o r m e s, J., T r ü p e r, H. G., D a h l, C., *Quantitative speciation of sulfur in bacterial sulfur globules: X-ray absorption spectroscopy reveals at least three different species of sulfur*, "Microbiology", **148**, 2002, 267-276.
29. R o b e r t s o n, L. A., K u e n e n, J. G., *The colorless sulfur bacteria*. In: B a l o w s, A., T r ü p e r, H. G., D w o r k i n, M. D., H a d e r e, W., S c h l e i f e r, K. H. (eds) "The Prokaryotes, 2nd ed. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications", Vol 1. Springer-Verlag, New York, 1992, pp 385-413.
30. S o r o k i n, D. Y., *Use of microorganisms for the protection of environment from pollution by toxic sulfur compounds*, "Microbiology (Moscow)", **63**, 1994, 533-547.
31. 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)", **65**, 1996, 326-338.
32. 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, M. 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 sibericum, Thioalkalimicrobium aerophilum gen. nov., sp. nov. and Thioalkalivibrio versutus, Thioalkalivibrio nitratis, Thioalkalivibrio denitrificans gen. nov., sp. nov., new obligately alkaliphilic and obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes*, "Intl. J. Syst. Evol. Microbiol.", **51**, 2001, 565-580.
33. 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 obligately chemolithoautotrophic alkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria*, "Ant. van Leeuwenhoek", **77**, 2000, 251-260.

34. Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Lysenko, A. M., Mityushina, L. L., Kuenen, 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.", **52**, 2002, 657-664.
35. Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Sjollem, K. A., Kuenen, J. G., *Thialkalivibrio nitratireducens* sp. nov., a nitrate-reducing member of an autotrophic denitrifying consortium from soda lake, "Int. J. Syst. Evol. Microbiol.", **53**, 2003, 1779-1783.
36. Stuedel, R., *The chemical sulfur cycle*. In: Lens, P. N. L., Hulshoff Pol, L., (eds) "Environmental Technologies To Treat Sulfur Pollution", IWA Publishing, London, 2000, pp 1-32.
37. Tindall, B. J., *Prokaryotic life in the alkaline saline athalassic environment*, "Halophilic Bacteria", Rodriguez - Valera, F. (Ed.), CRC Press, Boca-Raton, 1988, pp 31-70.
38. Wächtershäuser, G., *Before enzymes and templates – theory of surface metabolism*, "Microbiol. Rev.", **52**, 1988, 452-484.
39. Zavarzin, G. A., Zhilina, T. N., Ke v b r i n, V. V., *The alkaliphilic microbial community and its functional diversity*. "Microbiology (Moscow)", **68**, 1999, 579-599.
40. Zhilina, T.N., Zavarzin, G. A., Rainey, F. A., Pikuta, E. N., Osipov, G. A., Kostrikin, N. A., *Desulfonatronovibrio hydrogenovorans* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, sulfate-reducing bacterium, "Int. J. Syst. Bacteriol.", **47**, 1997, 144-149.
41. de Zwart, J. M. M., Nelisse, P. N., Kuenen, J. G., *Isolation and characterization of Methylophaga sulfidovorans*, sp. nov.; an obligately methylotrophic, aerobic, dimethylsulfide oxidizing bacterium from a microbial mat, "FEMS Microbiol. Ecol.", **20**, 1996, 261-271.

DISTRIBUȚIA CANTITATIVĂ A GRUPELOR ECOFIZIOLOGICE DE BACTERII IMPLICATE ÎN CIRCUITUL AZOTULUI ÎN LACUL DE ACUMULARE GILĂU

MANUELA-CLAUDIA CURTICĂPEAN* și MIHAIL DRĂGAN-BULARDA**

SUMMARY. The quantitatively distribution of the bacteria ecophysiological groups from the nitrogen cycle in the Gilău dam reservoir. The Gilău dam reservoir, situated on the Someșul Mic river has as main purpose to supply with drinking water the city Cluj-Napoca and the nearby vilages. Because the modification of the nitrogen concentration may determine a perturbation of the normal trophic cycle, the emphasize of the main microbiological activities and mechanisms from water and sediment, is essential, especially about the reduction of the nitrogen substances, determining the ammonium increases. In 2002 and 2003, have been achieved 6 seasonal harvest campaign, in each campaign have been taken 8 water samples and 7 sediment samples. The bacteriological researches were consisted in the determination of three ecophysiological groups of bacteria, involved in recycling of different organic residues, namely: ammonifying bacteria, nitrifying bacteria and denitrifying bacteria. At the same time, the results of the bacteriological analyses have been correlated with the results of the chemical analyses, especially with nitrogen system ones. The results of the chemical analyses were compared with the values from "The normative regarding the reference objectives for clasification of the surface water quality", issues in 2002.

În contextul situației României printre țările europene cu resurse de apă relativ reduse, gospodărirea și valorificarea apelor din țara noastră constituie o problemă prioritară, de importanță deosebită, determinând în ultimele decenii o extindere a lucrărilor hidrotehnice, urmărindu-se creșterea rezervelor de apă și diminuarea dependenței acestora de factorii meteo-climatici [4].

În ultimele decenii, atenția oamenilor de știință se orientează tot mai pregnant spre studiile complexe, ecologice, ale marilor acumulări de apă, știut fiind că civilizația industrială actuală, prin efectele sale secundare, a determinat accelerarea unor procese ecologice extrem de complexe, în mediile acvatice, cu consecințe deseori contrare conceptului de dezvoltare durabilă.

Lacul de acumulare Gilău face parte din sistemul cascadă de acumulări amplasate în bazinul superior al râului Someșul Mic. Barajul acumulării Gilău- prima acumulare dată în folosință în anul 1972- este construit într-un sector de îngustare al văii Someșul Mic la ieșirea din spațiul montan. Cuveta acumulării este situată într-un bazinet de eroziune conturat de confluența Someșului Clad cu Someșul Rece [17].

Acumularea Gilău, cu o capacitate de 4,1 milioane m³ apă are următoarele funcții: ca scop principal - asigurarea cu apă potabilă și industrială a municipiului Cluj-Napoca și a altor localități din jur (orașul Gherla și zona Aghireș); energetic; prevenirea inundațiilor; atenuarea undelor de viitură și asigurarea cu apă a păstrăvăriilor Gilău [21].

* *Universitatea de Medicină și Farmacie, Facultatea de Farmacie, Catedra F₁, Disciplina Biologie Celulară, str. Gh. Marinescu, nr. 38, 4300, 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, 3400, Cluj-Napoca, România, e-mail: draganb@bioge.ubbcluj.ro*

Microorganismele acvatice au un rol esențial în conversia substanțelor vegetale și animale în materie organică, prin procesele de mineralizare, care restituie organismelor fotosintetizante nutrienții esențiali pentru continuarea activității lor. Pe scară globală aceste produse fac parte din ciclurile biogeochimice care asigură transformările și recircularea elementelor biogene (C, N, P, S, Fe, Mn) în natură [5, 10, 18].

Modificarea adesea bruscă și brutală a concentrației diferiților nutrienți, în special cu N și P, ca rezultat al unor activități umane, determină o perturbare profundă a ciclului trofic normal, cu repercursiuni asupra microorganismelor acvatice, proces numit eutrofizare. “Înfloririle” sunt manifestări ale eutrofizării determinate de creșterea explozivă, în special, a numărului cianobacteriilor sau al algelor într-o anumită regiune.

Deoarece modificarea concentrației azotului poate determina o perturbare a ciclului trofic normal, este esențială evidențierea principalelor activități și mecanisme microbiologice din apă și sedimente, în special, în ceea ce privește reducerea substanțelor azotate (amonificarea, denitrificarea), determinând creșteri în amoniu [6].

Sedimentele constituie o verigă cheie în ciclul biogeochimic al elementelor în ecosistemele acvatice. Aici se finalizează procesele de mineralizare a substanțelor organice care n-au fost degradate în coloana de apă. Cercetările microbiologice a bacteriilor implicate în circuitul azotului din sedimentul lacului de acumulare Gilău, urmăresc completarea cunoștințelor despre procesele complexe care se desfășoară în aceste habitate, cu o semnificație deosebită.

În conformitate cu cerințele Directivei 91/271/EEC, transpusă în legislația românească prin HG 188/ 2002, s-a realizat o identificare inițială a cursurilor de apă și a lacurilor eutrofic sensibile, prin compararea concentrațiilor de nutrienți (N și P) măsurate în cursurile de apă, cu valorile concentrațiilor reglementate (HG 100/2002). S-a considerat zonă potențial sensibilă, cursul de apă pentru care s-au constatat depășiri ale valorilor normate, chiar și pentru un singur indicator de poluare. Deoarece, aplicând aceste cerințe, s-a constatat faptul că lacul Gilău este situat într-o zonă sensibilă, studiul bacteriilor implicate în circuitul azotului poate constitui un răspuns la această problemă.

Studiul constă în determinarea a 4 grupe ecofiziologice de bacterii implicate în recircularea diferitelor reziduuri organice, și anume: bacterii amonificatoare, nitrificatoare (nitrat- și nitrit-bacterii) și denitrificatoare. Totodată, rezultatele analizelor bacteriologice au fost corelate cu rezultatele analizelor chimice, cu cele ale regimului de azot (azotiți, azotați, amoniu și azot mineral total). Rezultatele analizelor chimice au fost raportate valorilor standard existente în Normativul privind obiectivele de referință pentru clasificarea calității apelor de suprafață [20].

Materiale și metode. În perioada 2002-2003, s-au realizat 6 campanii sezoniere de recoltare, în cadrul fiecărei campanii fiind prelevate 8 probe de apă și 7 probe de sediment.

Probele de apă s-au prelevat de la suprafață și de la diferite adâncimi, punctele de recoltare fiind următoarele: Baraj- 0 m, Baraj- 3 m, Baraj- 6 m, Baraj- adâncime maximă, Mijloc lac- 0 m, Mijloc lac- adâncime maximă, Coadă lac- 0 m și Coadă lac- adâncime maximă.

Probele de sediment au fost prelevate de la adâncimea de 0-10 cm, din următoarele puncte de recoltare: Baraj- mijloc, Baraj- mal drept, Baraj- mal stâng, Mijloc lac- mijloc, Mijloc lac- mal drept, Mijloc lac- mal stâng și Coadă lac- mijloc.

Pentru determinarea bacteriilor din principalele faze ale ciclului azotului am utilizat metodele de lucru conform cu *Cușa* [6] și *Drăgan-Bularda* [7].

Datorită faptului că diferite categorii de sediment pot avea un conținut variabil de apă, care ar influența exprimarea încărcării microbiene raportate la greutatea sedimentului, s-a procedat la determinarea umidității fiecărei probe de sediment în paralel cu pregătirea lor pentru analiză [6].

Statistic, am urmărit corelația între densitățile numerice ale bacteriilor implicate în circuitul azotului și valorile indicatorilor chimici din regimul de azot, în perioada 2002-2003. Calculul coeficienților de corelație (r) s-a efectuat cu ajutorul programului de operare Microsoft Excel.

Rezultate și discuții. *Activitatea microorganismelor amonificatoare.* În sol și ape, macromoleculele care conțin azot din resturile de origine vegetală și mai ales animală sunt descompuse de către bacteriile amonificatoare la amoniac, prin procesul de amonificare. Amoniacul rezultat în urma procesului de mineralizare a compușilor organici cu azot reacționează cu apa formând ionul amoniu. Astfel, azotul din compușii organici, inaccesibil plantelor, devine, datorită amonificării, accesibil. Acest proces are loc în orizonturile superficiale ale sedimentelor acvatice, unde se depun resturile organice moarte care formează detritusul organic [12].

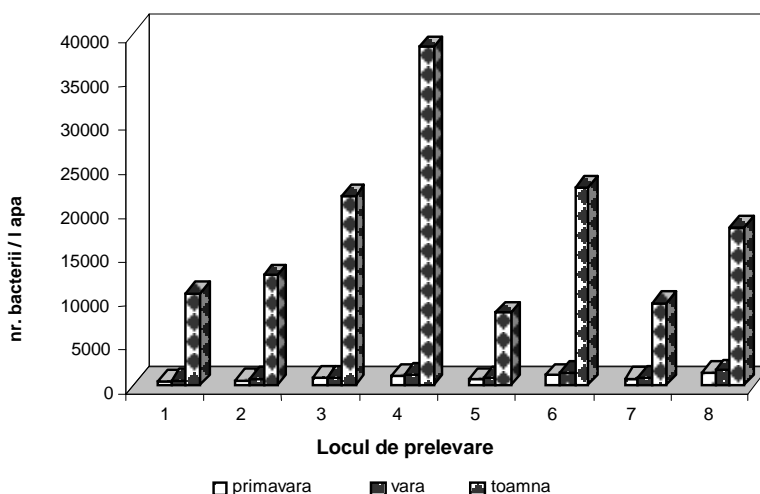
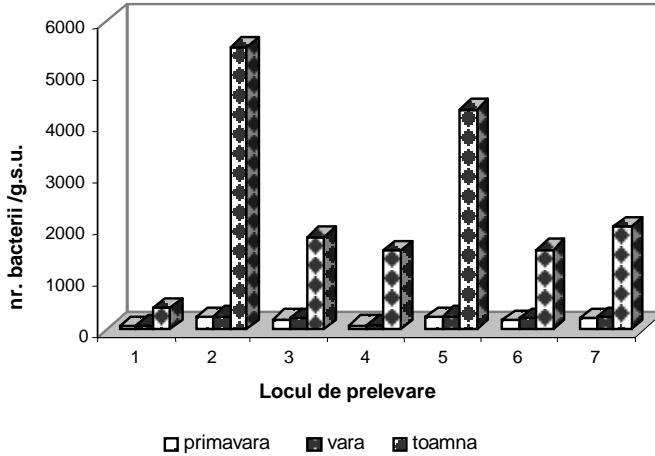


Fig. 1. Distribuția cantitativă a bacteriilor amonificatoare în apa lacului Gilău

În profilul vertical al apei, numărul bacteriilor amonificatoare a crescut, în general, de la suprafață spre adâncime, rămânând la limita de zeci de mii de bacterii (Fig. 1). Acest fapt este explicat prin „ploaia biologică” (rămășițele organismelor moarte) din straturile trofogenice spre zonele de adâncime ale lacului [2, 11], ceea ce demonstrează existența unor cantități mari de substrat particulat azotat [10].

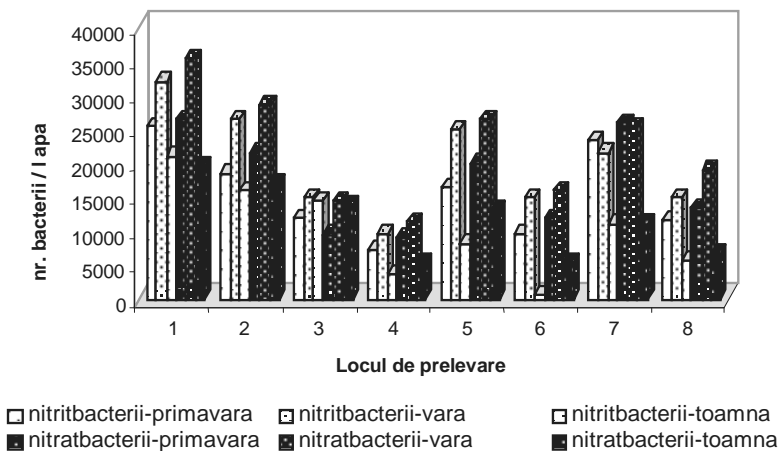
În sediment, aceste bacterii au înregistrat valori de ordinul miilor de bacterii, cele mai ridicate înregistrându-se în secțiunile de la periferie și de la coada lacului (Fig. 2). Se apreciază că în zonele de la periferia lacului există surse care pot contribui la poluarea lacului cu substanțe organice- nitrați. O caracteristică generală a acestui grup o prezintă dezvoltarea explozivă în sezonul de toamnă. Materia organică provenită prin moartea organismelor este parțial degradată în masa apei (structurile ușor asimilabile), cele mai intense procese desfășurându-se în sedimente [6]. Amoniacul urmează calea oxidărilor bacteriene, efectuate de grupul nitrit- și nitrat- bacterii, în procesul de nitrificare.



Fi g. 2. Distribuția cantitativă a bacteriilor amonificatoare în sedimentul lacului Gilău

Activitatea microorganismelor nitrificatoare. Bacteriile nitrificatoare sunt prezente pretutindeni, în sol, în bazinele acvatice, dulci și marine, în stațiile de epurare a apelor uzate. Densitatea maximă în bazinele acvatice este atinsă la interfața dintre apă și sedimente. Activitatea acestor bacterii este maximă primăvara și vara în straturile superficiale ale sedimentelor și la suprafața apelor [6, 9, 10, 19].

Activitatea bacteriilor nitrificatoare (nitrit- și nitrat-bacterii) a fost maximă în zonele de la suprafața apei, valorile de ordinul zecilor de mii scăzând odată cu adâncimea în profilul vertical al apei (Fig. 3).



Fi g. 3. Distribuția cantitativă a bacteriilor nitrificatoare în apa lacului Gilău

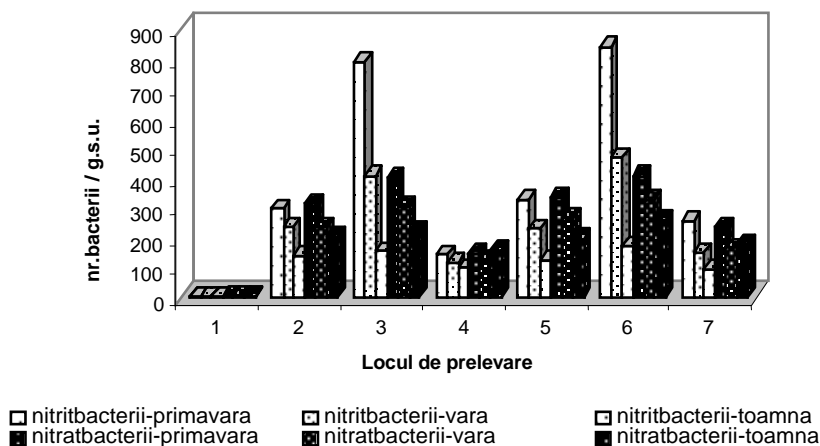


Fig. 4. Distribuția cantitativă a bacteriilor nitrificatoare în sedimentul lacului Gilău

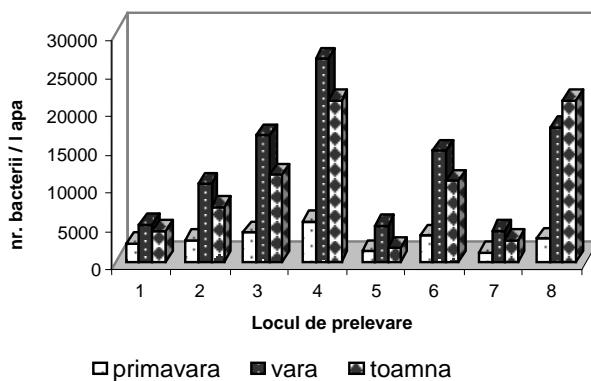
Procesul de nitrificare reprezintă etapa finală a mineralizării substanțelor organice azotate. Dar nu toate resturile organice sunt transformate în azotați, ci o mare parte sunt depozitate sub formă de sedimente. În sediment, bacteriile nitrificatoare au avut valori mici, de ordinul sutelor de celule (Fig. 4), fiind mai bine reprezentate în zonele periferice și la coada lacului. Întrucât bacteriile nitrificatoare sunt exigente la gradul de oxigenare al apei, este necesară o bună circulație a apei în bazinele acvatice. Prezența microorganismelor heterotrofe, care determină descompunerea substanțelor organice din apă, favorizează dezvoltarea bacteriilor nitrificatoare autotrofe [12].

În procesul de nitrificare din sol și ape, în afară de amoniacul de origine biologică, se utilizează și amoniac de origine nebiologică, eliberat de pe argile sau provenite din îngrășămintele amoniacale [12, 13, 15].

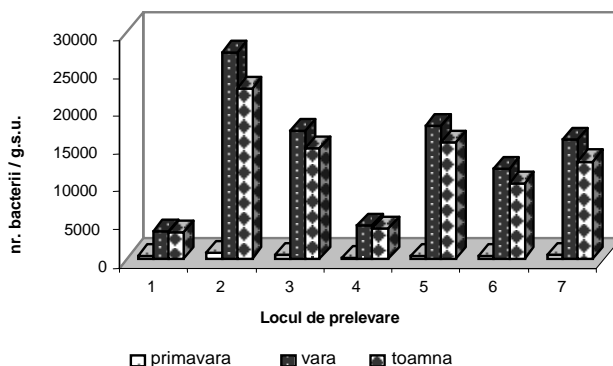
Activitatea microorganismelor denitrificatoare. Denitrificarea este un proces biologic efectuat în exclusivitate de bacteriile denitrificatoare, proces de reducere dezasimilatorie anaerobă prin care bacteriile denitrificatoare reduc nitrații până la N_2 , NO_2 sau NH_3 [6].

Pe baza analizelor efectuate, s-a constatat că procesul de denitrificare a avut o evoluție sezonieră, cu maxime vara și toamna. În profilul vertical al apei, numărul bacteriilor denitrificatoare a crescut de la suprafață spre adâncime (Fig. 5), variind de la mii de celule la suprafață până la zeci de mii de celule la adâncime. Bacteriile denitrificatoare, fiind anaerobe, au o activitate mai intensă în sediment [10]. Aici s-au înregistrat valori de ordinul zecilor de mii de celule (Fig. 6), maxime observându-se în zonele periferice și la coada lacului. Rezultate asemănătoare s-au obținut și pentru lacurile Vaduri, Siriu și Șerbănești [1, 2, 11].

Denitrificarea are loc în medii slab aerate unde se acumulează cantități mari de substanțe organice- în special nitrați [16]. Din această cauză denitrificarea este des întâlnită în apele stagnante (lacuri, heleștee) unde gradul de aerare este mic. Procesele de denitrificare pot fi întâlnite și în ape și sedimente bine aerate întrucât microorganismele denitrificatoare sunt facultativ anaerobe. O denitrificare intensă are loc la administrarea în bazinele acvatice de îngrășămintă chimice, când cantitatea de azotați crește simțitor. Pentru a preîntâmpina acțiunea nedorită de denitrificare este necesară asigurarea unei bune aerații a apei și a fundului bazinului [12].



F i g. 5. Distribuția cantitativă a bacteriilor denitrificatoare în apa lacului Gilău



F i g. 6. Distribuția cantitativă a bacteriilor denitrificatoare în sedimentul lacului Gilău

Evidențierea proceselor de reducere a substanțelor azotate la nivelul sedimentelor (denitrificarea) având ca rezultat creșterea concentrațiilor de amoniu, prezintă o importanță sporită în cazul sedimentelor cu o componentă predominant organică, care favorizează procesele bacteriene de reducere anaerobă și cu concentrații mari de substanțe azotate, provenite prin deversări de ape uzate - menajere și industriale [3, 8].

Denitrificarea reprezintă unul din mecanismele eficiente de reducere a conținutului în azot al apelor reziduale organice, bogate în nitrați, împiedicând prin aceasta pericolul de poluare și eutrofizare a cursurilor de apă în care aceștia sunt deversați [14].

În conformitate cu valorile standard existente în Normativ, cantitățile de azoțiți au încadrat apa lacului în categoria II și IV de calitate (Fig. 7).

Valorile de nitrați înregistrate, au încadrat apa lacului din toate secțiunile, în categoria a II-a de calitate (Fig. 8), ceea ce indică prezența unor concentrații uniforme în toată masa apei, indiferent de adâncime.

Comparativ cu valorile existente în Normativ, apa lacului s-a încadrat în categoriile III și IV la indicatorul amoniu, concentrațiile acestuia fiind destul de ridicate (Fig. 9). Acest fapt indică prezența unei activități denitrificatoare intense în toată masa apei lacului.

GRUPE ECOFIZIOLOGICE IMPLICATE ÎN CIRCUITUL AZOTULUI ÎN LACUL GILĂU

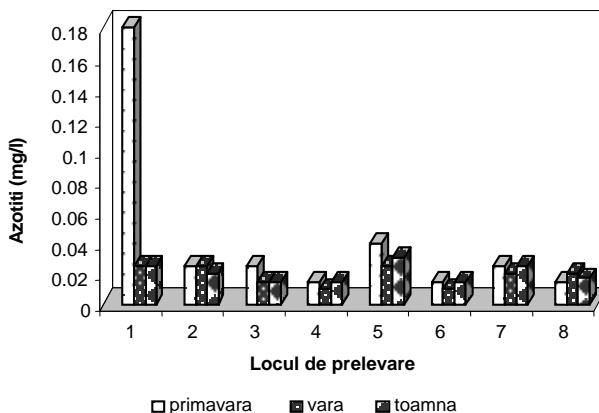


Fig. 7. Cantitatea de azotiți din apa lacului de acumulare Gilău

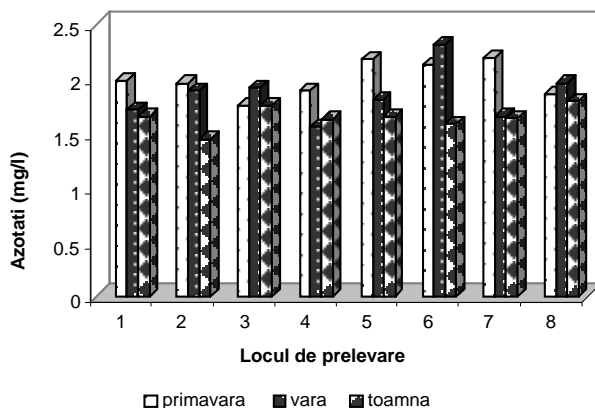
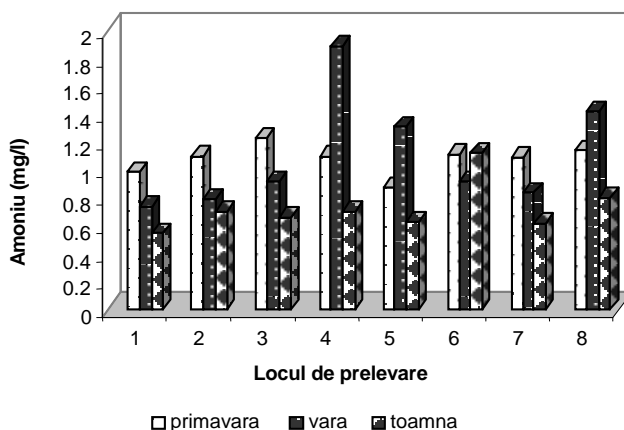


Fig. 8. Cantitatea de azotați din apa lacului de acumulare Gilău

Statistic, am urmărit corelația între densitățile numerice ale bacteriilor implicate în circuitul azotului și valorile indicatorilor chimici din regimul de azot, în perioada 2002-2003. Calculul coeficientului de corelație (r) s-a efectuat cu ajutorul programului de operare Microsoft Excel.

Coeficienții de corelație și semnificația lor fac posibilă înțelegerea mult mai exactă a variațiilor distribuției grupelor de bacterii investigate, funcție de proprietățile chimice ale apei lacului. Rezultatele analizelor de corelație sunt prezentate în Tabelul 1. În vederea realizării acestor corelații, am fost folosite datele puse la dispoziție de specialiștii din cadrul Laboratorului de Analize Fizico-Chimice din cadrul Direcției Apelor Someș-Tisa Cluj.

Densitățile numerice înregistrate pentru bacteriile amonificatoare, în perioada 2002-2003, s-au corelat pozitiv cu valorile azotului mineral total și cu bacteriile denitrificatoare. Nitritbacteriile s-au corelat pozitiv cu nitratbacteriile și cu bacteriile denitrificatoare (Fig. 10). Nitratbacteriile s-au corelat pozitiv cu indicatorii azotați și amoniu și cu bacteriile denitrificatoare. Bacteriile denitrificatoare s-au corelat negativ cu toți indicatorii chimici din regimul de azot.



F i g. 9. Cantitatea de amoniu din apa lacului de acumulare Gilău

Tabel 1

**Corelația statistică între proprietățile chimice și microbiologice
în apa lacului de acumulare Gilău în perioada 2002-2003**

	BAM	NITRITB	NITRATB	BDN	AZOTIȚI	AZOTAȚI	AMONIU	N min. total
BAM	1							
NITRITB	-0.7508	1						
NITRATB	-0.8726	0.8915	1					
BDN	0.2826	0.1944	0.1954	1				
AZOTIȚI	-0.2022	-0.3197	-0.0682	-0.5446	1			
AZOTAȚI	-0.4104	-0.0830	0.2413	-0.3012	0.9210	1		
AMONIU	-0.4422	-0.0798	0.3591	-0.1839	0.5219	0.6463	1	
N min. total	0.2208	-0.3779	-0.1339	-0.0180	0.4498	0.3568	0.5609	1

În apa lacului Gilău s-a observat o fluctuație evidentă a densității numerice bacteriene pe grupe fiziologice, în perioada 2002-2003. Aceste variații în structura și activitatea comunității heterotrofe de bacterii din circuitul azotului s-au produs pe fondul oscilațiilor hidro-chimice caracteristice perioadei investigate.

Materia organică este un factor cheie care determină structura și activitatea comunităților bacteriene heterotrofe. Aceste microorganisme sunt capabile să hidrolizeze un spectru foarte larg de compuși organici existenți în apa lacului. În acțiunea de descompunere microbiană a substanțelor organice, importantă nu este concentrația globală a unui substrat, ci disponibilitatea lui imediată pentru a fi utilizat de către microorganisme.

Nutrienții (azotații și fosfații) proveniți din surse alohtone, reprezentate de evacuările de ape uzate, contribuie indirect la creșterea bugetului local de materie organică autohtonă (de natură fitoplanctonică).

Variația factorilor chimici ai apei lacului au imprimat particularități temporale populațiilor bacteriene din circuitul azotului. Oscilațiile sezoniere și periodice ale populațiilor bacteriene, ca rezultat al influenței proceselor naturale ciclice și a compușilor proveniți din alte surse (afluenți, deversări de ape uzate), arată că apa lacului este un mediu foarte complex și heterogen în care, factorii abiotici, alături de cei biotici dețin un rol important în controlul proceselor biodegradative microbiene.

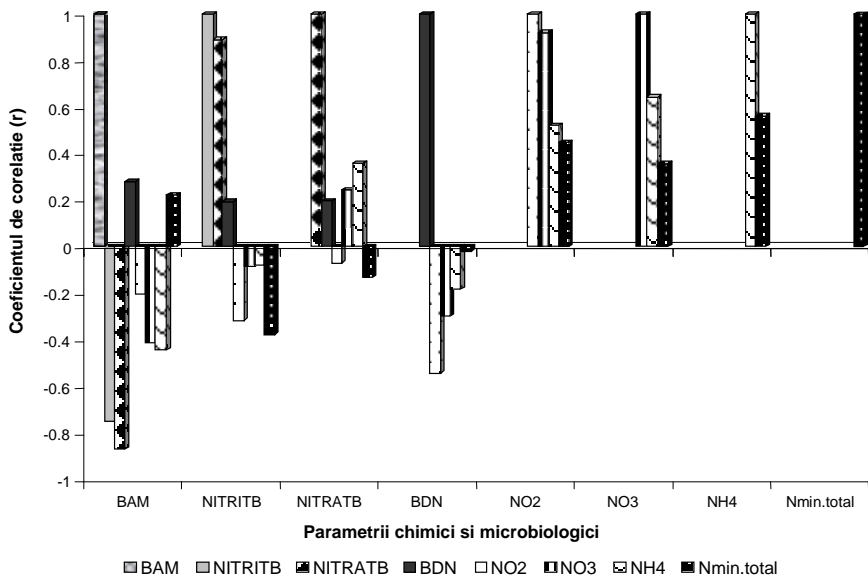


Fig. 10. Reprezentarea coeficienților de corelație (r) din apa lacului Gilău

Concluzii. 1. Este evidentă o creștere a densității numerice a bacteriilor amonifitoare toamna, în secțiunile de adâncime ale apei și în sediment în zonele periferice și la coada lacului funcție de accesibilitatea la materialul organic azotos. Aceste creșteri s-ar putea datora acumulării de material detritic de proveniență vegetală sau animală (sau poluanților organici rezultați din deversări). Acest fapt este ilustrat și de concentrațiile mari de amoniu din apa lacului.

2. Creșteri mai semnificative ale bacteriilor nitrificatoare (nitrit- și nitrat-bacterii) s-au observat mai ales primăvara și vara, valori maxime înregistrându-se în secțiunile de la suprafața apei și în sediment.

3. Procesul de denitrificare a avut o evoluție sezonieră, cu maxime vara și toamna. Bacteriile denitrificatoare fiind anaerobe, au o activitate mai intensă la nivelul bentosului. Concentrațiile ridicate de amoniu din apa lacului indică prezența unei activități denitrificatoare intense în toată masa apei lacului.

4. Analizele de corelație dintre proprietățile chimice și microbiologice din apa lacului au confirmat că factorii abiotici dețin un rol important în controlul proceselor biodegradative microbiene.

BIBLIOGRAFIE

1. Ailieșei, O., Jâpa, F., *Microbiological characteristics of the Vaduri dam lake in the natural conditions and under the influence of salmonid aquaculture*, "An. Ști. Univ. Al.I.Cuza Iași", **41**(II), 1995, 97-104.
2. Ailieșei, O., Nimițan, E., Jâpa, F., Dunca, S., *Ecology of some bacterial populations in the Șerbănești dam lake*, "An. Ști. Univ. Al.I.Cuza Iași", **44** (II), 1998, 163-175.

3. Awadallah, R. M., Soltan, M. E., Shabeeb, M. S. A., Moalla, S. M. N., *Bacterial removal of nitrate, nitrite and sulphate in wastewater*, „Wat. Res.”, **32** (10), 1998, 3080-3084.
4. Burian, P., *Lacul de acumulare- analiza biologică*, Edit. Universității de Medicină și Farmacie, University Press, Târgu-Mureș, 2002, 13-16, 117.
5. Caron, D. A., Goldman, J. C., Dennett, M. R., *Experimental demonstration of the roles of bacteria and bacterivorous protozoa in plankton nutrient cycles*, „Hydrobiologia”, 1988, **159**, 27-40.
6. Cușa, V., *Instrucțiuni metodologice pentru analiza microbiologică a sedimentelor din ecosistemele acvatice*, Inst. Cercet. Ing. Mediului, București, **4**, 1996, 14-20.
7. Drăgan - Bularda, M., *Microbiologie generală- lucrări practice*, Univ. Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, 2000, 153-158.
8. Fera y, C., Montuelle, 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.
9. Gelda, R. K., Brooks, C. M., Effer, S. W., Auer, M. T., *Interannual variations in nitrification in a hypereutrophic urban lake: occurrences and implications*, „Wat. Res.”, **34** (4), 2000, 1107-1118.
10. Herlea, V., Lazăr, V., Canja, D., Ciolac – Russu, A., Popescu, V., *Caracterizarea unor aspecte ale diversității microbiotei râului Prahova, cu implicație în biodegradarea poluanților deversați*, „An. Univ. București”, **44**, 1995, 77-88.
11. Jâpa, F., Ailiesei, O., *The quantitative distribution of the main ecophysiological groups of bacteria involved in the biogenic elements cycle from the Siriu lake*, „An. Ști. Univ. Al.I.Cuza Iași”, **45** (II), 1999, 161-166.
12. Niclescu, C., *Microbiologia apei și a produselor acvatice*, Edit. „Cetatea de Scaun”, Târgoviște, 2002, 171-271.
13. Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Cirpus, I., Strous, M., Bock, E., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M., *Aerobic and anaerobic ammonia oxidizing bacteria-competitors or natural partners*, „FEMS Microb. Ecol.”, **39**(3), 2002, 175-181.
14. Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M., Strous, M., *New concepts for the microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater*, „FEMS Microb. Rev.”, **27**(4), 2003, 481-492.
15. Stief, P., Schramm, A., Altmann, D., deBeer, D., *Temporal variation of nitrification rates in experimental freshwater sediments enriched with ammonia or nitrite*, „FEMS Microb. Ecol.”, **46**(1), 2003, 63-71.
16. Strong, D. T., Fillery, I. R. P., *Denitrification response to nitrate concentration in sandy soils*, „Soil Biol. and Biochem.”, **34**(7), 2002, 945-954.
17. 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.
18. Verhies, G. J., Cortes, S., Clément, B., Montuelle, B., *Chemical and bacterial changes during laboratory conditioning of formulated and natural sediments*, „Chemosphere”, **46**, 2002, 961-974.
19. Zarnea, G., *Tratat de microbiologie generală*, Vol.II, Edit. Academiei RSR, București, 1984, 31, 241.
20. *** *Normativul privind obiectivele de referință pentru clasificarea calității apelor de suprafață*, Monitorul Oficial al României, Partea I, Nr. 197, 2003.
21. *** *Regulamente de exploatare a lacurilor*, Direcția Apelor Someș-Tisa, Cluj, 2002.

ENZYMATIC ACTIVITIES IN A BROWN LUVIC SOIL

ALINA DORA SAMUEL¹, MIHAI DRĂGAN-BULARDA²,
CORNEL DOMUȚA³

SUMMARY. – Actual and potential dehydrogenase, catalase, acid and alkaline phosphatase activities were determined in the 0–20-, 20–40- and 40–60-cm layers of a brown luvic soil submitted to a complex tillage (no-till and conventional tillage), crop rotation (2- and 6-crop rotation) and fertilization {mineral(NP) fertilization and farmyard-manuring} experiment. Each activity decreased with increasing sampling depth. No-till – in comparison with conventional tillage – resulted in significantly higher soil enzymatic activities in the 0–20-cm layer and in significantly lower activities in the deeper layers.

The soil under maize or wheat was more enzyme-active in the 6- than in the 2-crop rotation. In the 2-crop rotation, higher enzymatic activities were recorded under wheat than under maize. Farmyard-manuring of maize – in comparison with its mineral (NP) fertilization – led to a significant increase in each activity. The enzymatic indicators of soil quality calculated from the values of enzymatic activities determined in the plots of the 6-crop rotation showed the order > farmyard-manured maize > minerally fertilized (m.f. wheat) > m. f. maize (plot 6) > m.f. soybean > m.f. maize (plot 3) > m.f. oats-clover.

The degradation of plant and animal matter, i.e. the release and binding of nutrients and trace elements, is one of the most important functions of soil organisms. The microorganisms are important for the enzymatic degradation of the complex organic substances to nutrients and for the release of nutrients and trace elements from the mineral soil fraction [1, 8].

Soil microorganisms, the living component of the soil, usually occupy less than 1% of the soil volume, while their number and efficiency are very high. The number and activity of soil microorganisms are dependent on plant growth, soil type, soil treatment, soil cultivation as when as on the macro- and microclimate at each location [9].

In continuation of our investigations [6, 7], during which in October 1997, now we report on the determination of dehydrogenase, catalase and phosphatase activities in a brown luvic soil submitted to a complex tillage, crop rotation and fertilization experiment at the Agricultural Research Station in Oradea / Bihor county.

Material and methods. The ploughed layer of the studied soil is of mellow loam texture, it has a pH value of 5.5, medium humus (2.32%) and P (22 ppm) contents, but it is rich in K (83 ppm).

The experiment started in 1992. The experimental field occupying 3.84 ha was divided into plots and subplots for comparative study of no-till and conventional tillage, rotations of 2 and 6 crops, and mineral (NP) fertilization and farmyard-manuring.

¹ University of Oradea, Department of Plant Biology, 3700 Oradea, Romania.

E-mail: alinasamuel@rdslink.ro

² University of Babeș-Bolyai, Department of Plant Physiology, Laboratory for Environmental Enzymology and Microbiology, 3400 Cluj, Romania, E-mail: draganb@biogeubbcluj.ro

³ Agricultural Research Station, 3700 Oradea, Romania.

Each plot consisted of two subplots representing the no-till and conventional tillage variants. The plots were annually NP-fertilised at rated of 120 kg of N/ha and 90 kg of P/ha, excepting, in each year, a maize plot (in the 6-crop rotation) which received farmyard manure (50 t/ha) instead of mineral fertilizers. The plots (and subplots) were installed in three repetitions.

In October 2004, soil was sampled from all subplots. Sampling depths were 0–20-, 20–40- and 40–60-cm. The soil samples were allowed to air dry, then ground and passed through a 2-mm sieve and, finally, used for enzymological analyses. Five enzymatic activities (actual and potential dehydrogenase, catalase, acid and alkaline phosphatase (were determined according to the methods described in [2,4]. Dehydrogenase activities are expressed in mg of triphenylformazan (TPF) produced (from 2,3,5,-triphenyltetrazolium chloride, TTC) by 10 g of soil in 24 hours, whereas catalase activity is recorded as mg of H₂O₂ decomposed by 1 g of soil in 1 hour. Phosphatase activities are expressed in mg phenol/ g soil/ 2 hours. The enzymatic activities values were submitted to statistical evaluation by the two-way-t-test [5].

Results and discussion

Results of the enzymological analyses are presented in Table 1, and those of the statistical evaluation are summarised in Table 2.

Table 1

The effects of soil management practices on enzymatic activities in a brown luvisc soil

Soil enzymatic activity*	Soil depth (cm)	Rotation of 2-crops**								Rotation of 6-crops																			
		Wheat				Maize				Soybean				Oats-clover				Maize				Wheat				Maize (FYM)***			
		N.t.	C.t.	N.t.	C.t.	N.t.	C.t.	N.t.	C.t.	N.t.	C.t.	N.t.	C.t.	N.t.	C.t.	N.t.	C.t.	N.t.	C.t.	N.t.	C.t.	N.t.	C.t.						
ADA	0–20	6.40	5.18	7.14	6.62	6.18	5.18	6.76	5.18	7.24	6.92	6.66	5.54	7.54	7.02	7.18	6.78												
	20–40	4.54	4.88	5.32	5.52	3.36	4.20	2.66	3.50	5.14	5.45	3.08	4.92	5.66	5.84	4.94	5.31												
	40–60	1.84	1.94	1.66	2.26	1.96	2.05	1.76	1.96	1.41	1.54	1.84	1.96	1.78	2.10	1.26	2.24												
PDA	0–20	21.98	20.92	20.50	19.12	25.96	29.24	22.88	24.00	26.24	21.90	23.74	22.54	27.62	22.04	24.98	19.74												
	20–40	15.18	15.96	14.50	16.52	17.36	18.62	13.36	14.56	16.44	17.52	15.26	16.68	17.18	18.28	14.42	15.21												
	40–60	3.24	3.92	4.21	4.52	6.76	7.00	5.38	6.26	4.76	5.06	1.44	5.84	5.50	6.34	5.28	5.60												
CA	0–20	1.93	1.60	1.80	1.73	1.80	1.70	1.74	1.63	1.86	1.83	2.06	1.73	2.23	2.00	2.20	2.94												
	20–40	1.40	1.48	1.13	1.28	1.32	1.43	1.19	1.25	1.36	1.32	1.53	1.60	1.66	1.56	1.63													
	40–60	0.69	1.00	0.74	0.93	0.76	0.86	1.05	1.08	0.88	1.01	0.73	1.09	0.94	1.04	0.93	0.97												
AcPA	0–20	0.263	0.206	0.221	0.200	0.352	0.328	0.323	0.308	0.280	0.246	0.336	0.316	0.304	0.296	0.290	0.278												
	20–40	0.166	0.239	0.192	0.196	0.184	0.222	0.161	0.181	0.150	0.163	0.209	0.221	0.178	0.207	0.182	0.190												
	40–60	0.050	0.081	0.044	0.079	0.080	0.085	0.053	0.077	0.064	0.092	0.082	0.095	0.052	0.064	0.055	0.064												
AlkPA	0–20	0.202	0.194	0.258	0.173	0.258	0.213	0.244	0.232	0.240	0.195	0.268	0.241	0.314	0.250	0.263	0.243												
	20–40	0.136	0.165	0.118	0.157	0.156	0.179	0.149	0.181	0.146	0.163	0.178	0.208	0.201	0.205	0.155	0.168												
	40–60	0.050	0.081	0.044	0.079	0.080	0.085	0.053	0.077	0.064	0.092	0.082	0.095	0.052	0.064	0.055	0.064												

* ADA – Actual dehydrogenase activity

PDA – Potential dehydrogenase activity

CA – Catalase activity

AcPA – Acid phosphatase activity

AlkPA – Alkaline phosphatase activity

** N.t. – No-till.

C.t. – Conventional tillage.

*** (FYM) – (farmyard- manured)

Variation of soil enzymatic activities in dependence of sampling depth

It is evident from Table 1 that each activity decreased with sampling depth in both subplots under all crops of both rotations. In addition, Table 2 shows that the mean values of each of the five activities in both non-tilled and conventionally tilled subplots also decreased with increasing soil depth.

ENZYMATIC ACTIVITIES IN A BROWN LUVIC SOIL

Table 2

Significance of the differences between enzymatic activities in a brown luvisc soil submitted to different management practices

Management practices	Soil enzymatic activity*	Soil depth	Mean activity values in management practices			Significance of the differences
1	2	3	4	5	6	7
No-till (a) versus conventional tillage (b)	ADA	0-20	6.89	6.05	0.84	0.002>p>0.001
		20-40	4.34	4.95	-0.61	0.02>p>0.01
		40-60	1.69	2.01	-0.32	0.05>p>0.02
	PDA	0-20	24.24	22.44	1.80	0.01>p>0.002
		20-40	15.46	16.67	-1.21	0.0001>p
		40-60	4.95	5.57	-0.62	0.01>p>0.002
	CA	0-20	1.95	1.78	0.17	0.01>p>0.002
		20-40	1.35	1.45	-0.10	0.001>p>0.0001
		40-60	0.84	1.00	-0.16	0.01>p>0.002
	AcPA	0-20	0.296	0.272	0.024	0.002>p>0.001
		20-40	0.178	0.202	-0.024	0.02>p>0.01
		40-60	0.128	0.148	-0.020	0.01>p>0.002
AlkPA	0-20	0.256	0.218	0.038	0.01>p>0.002	
	20-40	0.155	0.178	-0.23	0.001>p>0.0001	
	40-60	0.060	0.080	-0.020	0.001>p>0.0001	
The same crop in the two rotations						
Wheat in 2-crop rotation (a) versus wheat in 6-crop rotation (b)	ADA	0-60	4.13	4.00	0.13	p>0.10
	PDA		13.53	14.75	-1.22	0.01>p>0.002
	CA		1.35	1.41	-0.06	0.01>p>0.002
	AcPA		0.194	0.227	-0.033	0.10>p>0.05
	AlkPA		0.138	0.179	-0.041	0.002>p>0.001
Maize in 2-crop rotation (a) versus maize in 6-crop rotation (b)**	ADA	0-60	4.75	4.62	0.13	0.05>p>0.02
	PDA		13.23	15.32	-2.09	0.05>p>0.02
	CA		1.27	1.37	-0.10	0.001>p>0.0001
	AcPA		0.177	0.185	-0.008	0.01>p>0.002
	AlkPA		0.138	0.150	-0.12	0.0001>p
Different crops in the same rotation						
2-crop rotation Wheat (a) versus maize (b)	ADA	0-60	3.82	3.64	0.18	0.05>p>0.02
	PDA		17.49	15.32	2.17	0.10>p>0.05
	CA		1.31	1.37	-0.06	0.002>p>0.001
	AcPA		0.219	0.185	0.034	0.01>p>0.002
	AlkPA		0.162	0.150	0.012	p>0.10
6-crop rotation Soybean (a) versus oats-clover(b)	ADA	0-60	3.82	3.64	0.18	0.05>p>0.02
	PDA		17.49	14.41	3.08	0.01>p>0.002
	CA		1.31	1.32	-0.01	0.01>p>0.002
	AcPA		0.219	0.208	0.011	0.001>p>0.0001
	AlkPA		0.162	0.156	0.006	0.002>p>0.001
Soybean (a) versus maize (plot 3)(b)	ADA	0-60	3.82	4.62	-0.080	0.01>p>0.002
	PDA		17.49	15.32	2.17	0.10>p>0.05
	CA		1.31	1.37	-0.06	0.002>p>0.001
	AcPA		0.219	0.185	0.034	0.01>p>0.002
	AlkPA		0.162	0.150	0.012	p>0.10
Soybean (a) versus wheat (b)	ADA	0-60	3.82	4.00	-0.18	0.02>p>0.01
	PDA		17.49	14.75	2.74	0.02>p>0.01
	CA		1.31	1.41	-0.10	0.10>p>0.05
	AcPA		0.219	0.227	-0.008	0.05>p>0.02
	AlkPA		0.162	0.179	-0.017	0.01>p>0.002

Table 2 (continued)

Soybean (a) versus maize (FYM)***	ADA	0-60	3.82	4.99	-1.17	0.05>p>0.02
	PDA		17.49	16.16	1.33	p>0.10
	CA		1.31	1.58	-0.27	0.001>p>0.0001
	AcPA		0.219	0.218	0.001	0.01>p>0.002
	AlkPA		0.162	0.181	-0.019	0.001>p>0.0001
Soybean (a) versus maize (plot 6) (b)	ADA	0-60	3.82	4.61	-0.79	0.01>p>0.002
	PDA		17.49	14.21	3.28	0.10>p>0.05
	CA		1.31	1.54	-0.23	0.01>p>0.002
	AcPA		0.219	0.206	0.13	0.01>p>0.002
	AlkPA		0.162	0.158	0.004	0.02>p>0.01
Oats-clover (a) versus maize (plot 3) (b)	ADA	0-60	3.64	4.62	-0.98	0.05>p>0.02
	PDA		14.41	15.32	-0.91	0.01>p>0.002
	CA		1.32	1.37	-0.05	0.01>p>0.002
	AcPA		0.208	0.185	0.023	0.10>p>0.05
	AlkPA		0.156	0.150	0.006	0.05>p>0.02
Oats-clover (a) versus wheat (b)	ADA	0-60	3.64	4.00	-0.36	p>0.10
	PDA		14.41	14.75	-0.34	0.01>p>0.002
	CA		1.32	1.41	-0.09	0.02>p>0.01
	AcPA		0.208	0.227	-0.019	0.05>p>0.02
	AlkPA		0.156	0.179	-0.023	0.0001>p
Oats-clover (a) versus maize (FYM) (b)	ADA	0-60	3.64	4.99	-1.35	0.05>p>0.02
	PDA		14.41	16.16	-1.75	0.05>p>0.02
	CA		1.32	1.58	-0.26	0.01>p>0.002
	AcPA		0.208	0.218	-0.010	0.001>p>0.0001
	AlkPA		0.156	0.181	-0.025	0.05>p>0.02
Oats-clover (a) versus maize (plot 6) (b)	ADA	0-60	3.64	4.61	-0.97	0.05>p>0.02
	PDA		14.41	14.21	0.20	0.10>p>0.05
	CA		1.32	1.54	-0.22	0.01>p>0.002
	AcPA		0.208	0.206	0.002	0.002>p>0.001
	AlkPA		0.156	0.158	-0.002	0.002>p>0.001
Maize (plot 3) (a) versus wheat (b)	ADA	0-60	4.62	4.00	0.62	0.05>p>0.02
	PDA		15.32	14.75	0.57	0.05>p>0.02
	CA		1.37	1.41	0.04	0.01>p>0.002
	AcPA		0.185	0.227	-0.042	0.02>p>0.01
	AlkPA		0.150	0.179	-0.029	0.01>p>0.002
Maize (plot 3) (a) versus maize (FYM) (b)	ADA	0-60	4.62	4.99	-0.37	0.01>p>0.002
	PDA		15.32	16.16	-0.84	0.01>p>0.002
	CA		1.37	1.58	-0.21	0.01>p>0.002
	AcPA		0.185	0.218	-0.033	0.01>p>0.0001
	AlkPA		0.150	0.181	-0.031	0.01>p>0.002
Maize (plot 3) versus maize (plot 6) (b)	ADA	0-60	4.62	4.61	0.61	0.05>p>0.02
	PDA		15.32	14.21	0.54	0.02>p>0.01
	CA		1.37	1.54	-0.13	
	AcPA		0.185	0.206	0.021	0.001>p>0.0001
	AlkPA		0.150	0.158	0.021	0.01>p>0.002
Wheat (a) versus maize (FYM) (b)	ADA	0-60	4.00	4.99	-0.99	0.02>p>0.01
	PDA		14.75	16.16	-1.41	0.05>p>0.02
	CA		1.41	1.58	-0.17	0.05>p>0.02
	AcPA		0.227	0.218	0.009	0.01>p>0.002
	AlkPA		0.179	0.181	-0.002	0.01>p>0.002
Wheat (a) versus maize (plot 6) (b)	ADA	0-60	4.00	4.61	0.61	0.02>p>0.01
	PDA		14.75	14.21	0.54	0.05>p>0.02
	CA		1.41	1.54	-0.13	0.02>p>0.01
	AcPA		0.227	0.206	0.021	0.001>p>0.0001
	AlkPA		0.179	0.158	0.021	0.01>p>0.002
	ADA	0-60	4.99	4.61	0.38	0.02>p>0.01

Table 2 (continued)

Maize (FYM) (a) versus maize (plot 6) (b)	PDA	16.16	14.21	1.95	0.01>p>0.002
	CA	1.58	1.54	0.04	0.01>p>0.002
	AcPA	0.218	0.206	0.012	0.01>p>0.002
	AlkPA	0.181	0.158	0.023	0.01>p>0.002

- * ADA – Actual dehydrogenase activity.
- PDA – Potential dehydrogenase activity.
- CA – Catalase activity.
- AcPA – Acid phosphatase activity.
- AlkPA – Alkaline phosphatase activity.
- ** Maize (plot 3).
- *** (FYM) – (farmyard-manured).

The effect of tillage practices on the enzymatic activities in soil

Each of the five enzymatic activities determined was significantly higher (at least at $p < 0.01$) in the upper (0–20-cm) layer of the non-tilled subplots. The reverse was true in the deeper (20–40- and 40–60-cm) layers. These findings are valid for subplots under each crop of both rotations.

The effect of crop rotations on the enzymatic activities in soil

For evaluation of this effect, the results obtained in the three soil layers analysed in the two subplots of each plot were considered together.

The soil enzymological effect of the same crop in the two rotations

As wheat and maize were crops in both rotations, it was possible to compare the soil enzymological effect of the 2- and 6-crop rotations. The soil under both plants was more enzyme-active in the 6- than in the 2-crop rotation. In the soil under wheat, the activities were significantly higher (at least at $p < 0.01$) in the 6- than in the 2-crop rotation, excepting acid phosphatase activity which was only unsignificantly higher ($p > 0.05$) and actual dehydrogenase activity which was higher in the 2-crop rotation. In the soil under maize, the difference between the two crop rotations was significant (at least at $p < 0.05$) while actual dehydrogenase activity was higher in the 2-crop rotation.

The soil enzymological effect of different crops in the same rotation

The 2-crop rotation. Each enzymatic activity measured in the wheat soil exceeded significantly ($p < 0.01$) the corresponding activity recorded in the maize soil, excepting alkaline phosphatase activity, which was the same under the both crops and actual dehydrogenase which was significantly higher ($p < 0.02$) under maize than under wheat.

The 6-crop rotation. Significant ($p < 0.05$ to $p < 0.001$) and unsignificant ($p > 0.05$ to $p > 0.10$) differences were registered in the soil enzymatic activities depending on the kind of enzymatic activity and the nature of crop. Based on these differences the following decreasing orders of the enzymatic activities could be established in the soil of the six plots:

- actual dehydrogenase activity: maize (FYM) > maize (plot 3) ~ maize (plot 6) > wheat > soybean > oats-clover;
- potential dehydrogenase activity: soybean > maize (FYM) > maize (plot 3) > wheat > oats-clover > maize (plot 6);
- catalase activity: maize (FYM) > maize (plot 6) > wheat > maize (plot 3) > oats-clover > soybean;

- acid phosphatase activity> wheat > soybean > maize (FYM) > oats-clover > maize (plot 6) > maize (plot 3);
- alkaline phosphatase activity: maize (FYM) > wheat > soybean > maize (plot 6) > oats-clover > maize (plot 3).

It is evident from these orders that each of the six plots presented either a maximum or a minimum value of the five enzymatic activities. Consequently, these orders do not make it possible to establish such an enzymatic hierarchy of the plots which takes into account each activity for each plot. For establishing such a hierarchy, we have applied the method suggested in [3]. The results obtained (Table 3) show that in the hierarchy of the six plots, position 1 is occupied by the farmyard-manured maize plot, followed by the minerally fertilised cereal (wheat and maize) plots, while the last positions are occupied by the minerally fertilized legume (soybean, oats and clover) plots.

Table 3

Enzymatic indicators of soil quality in plots of the 6-crop rotation

Position	Plot	Enzymatic indicator of soil quality
1	Farmyard-manured maize	0.488
2	Minerally fertilized (M.f.) wheat	0.452
3	M.f. maize (plot 6)	0.449
4	M.f. soybean	0.445
5	M.f. maize (plot 3)	0.431
6	M.f. oats-clover	0.416

The effect of fertilization on the enzymatic activities in soil

The three maize plots in the 6-crop rotation could be serve for comparing the effect of mineral (NP) fertilization (plot 3 and 6) and farmyard-manuring (plot 2). One can see from Table 1 that the enzymatic activities were always higher in the 0–20 cm layer and were generally higher in the 20–40 and 40–60 cm layers of the farmyard-manured subplots in comparison with the subplots that had received mineral (NP) fertilizers. When the three soil layers were considered together (Table 2), each of the five enzymatic activities was found to be significantly higher (at least at $p < 0.05$) in the farmyard-manured plot than in the minerally fertilized plots.

Conclusions. 1. The soil enzymatic activities decreased with increasing sampling depth.

2. No-till – in comparison with conventionally tillage – resulted in higher enzymatic activities in the 0–20 cm layer and in lower activities in the 20–40 and 40–60 cm soil layer under each crop of both rotations.

3. The 6-crop rotation – as compared to the 2-crop rotation – led, in general to higher enzymatic activities in the soil layers under maize or wheat.

4. In the 2-crop rotation, the soil layers under wheat were more enzyme-active than those under maize.

5. Farmyard-manuring – in comparison with mineral (NP) fertilization – proved to be more efficient in increasing enzymatic activities in soil layers under maize in the 6-crop rotation.

6. The enzymatic indicators of soil quality calculated from the values of enzymatic activities determined in the plots of the 6-crop rotation showed the order: farmyard-manured maize > minerally fertilised (m.f.) wheat > m.f. maize (plot 6) > m.f. soybean > m.f. maize (plot 3) > m.f. oats-clover.

REFERENCES

1. Dick, R.P., *A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters*, Agric., Ecosyst. Environ., **40**, 1992, 25-36.
2. Drăgan-Bularda, M., *Lucrări practice de microbiologie generală*, pp. 167-169, Univ. Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca, 1983.
3. Kiss, S., Pasca, D., Drăgan-Bularda, M., Cristea, V., Blaga, G., Crişan, R., Muntean, V., Zborovschi, E., Mitroescu, S., *Enzymological analysis of lead and zinc mine spoils submitted to biological recultivation*, "Stud. Univ Babeş-Bolyai, Biol.", **35**(2), 1990, 70-79.
4. Öhlinger, R., *Phosphomonoesterase activity with the substrate phenylphosphate*, in Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (Eds.), *Methods in Soil Biology*, pp. 210-213, Springer, Berlin, 1996.
5. Sachs, L., *Statistische Auswertungsmethoden*, pp 140, 309-310, Springer, Berlin, 1968.
6. Samuel, A.D., Kiss, S., *The effects of soil management practices on the enzymatic activities in a brown luvic soil*, "Stud. Univ Babeş-Bolyai, Biol.", **44**(1-2), 1999, p. 189-197.
7. Samuel, A.D., Vicas, S., *Catalase activity in a brown luvic soil*, An. Univ Oradea, Fasc. Biol., **11**, 2004, 201-203.
8. Ştefanic, G., *Enzimologia solurilor cultivate*, în Kiss, S., Ştefanic, G., Pasca, D., Drăgan-Bularda, M., Zborovschi, E., Crişan, R., *Enzimologia mediului înconjurător*, vol 1, pp 83-84, Ceres Bucureşti, 1991.
9. Tang, S., *Microbiological characteristics and biological activity of albic soils*, Acta Pedol. Sin., **24**, 1987, 239-247.